



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว)

ปริญญา

เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การตายของเซลล์ในช่วงการชราภาพของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*)
ที่ถูกชักนำโดยเอทิลีน

Programmed Cell Death of *Dendrobium* Orchid Flowers Induced by Ethylene
during Senescence

นามผู้วิจัย นางสาวกาญจนา กิระศักดิ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์สายชล เกตุษา, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ชัชวรินทร์ อิ่มสบาย, วท.ค.)

ประธานสาขาวิชา

(ศาสตราจารย์สายชล เกตุษา, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตายของเซลล์ในช่วงการชราภาพของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*)

ที่ถูกชักนำโดยเอทิลีน

Programmed Cell Death of *Dendrobium* Orchid Flowers Induced by Ethylene during Senescence

โดย

นางสาวกาญจนา กิระศักดิ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กาญจนา กิระศักดิ์ 2553: การตายของเซลล์ในช่วงการชราภาพของดอกกล้วยไม้สกุล
หวาย (*Dendrobium*) ที่ถูกชักนำโดยเอทิลีน ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยี
หลังการเก็บเกี่ยว) สาขาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว โครงการสหวิทยาการระดับ
บัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศาสตราจารย์สายชล เกตุษา, Ph.D.
155 หน้า

ดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ลัคกี้ควน เรดบอมโจ มีสีพื้น ซากุระ ทับทิม และขาวสนาน
เมื่อได้รับเอทิลีนความเข้มข้น 0.1-1.0 $\mu\text{L/L}$ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
และความชื้นสัมพัทธ์ 80% ทำให้เกิดการชราภาพของดอกกล้วยไม้ โดยดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์
ลัคกี้ควนตอบสนองมากที่สุด ขณะที่พันธุ์เรดบอมโจตอบสนองน้อยที่สุด และสาร 1-MCP
(1-methylcyclopropene) ที่ให้กับดอกกล้วยไม้ก่อนได้รับเอทิลีน สามารถยับยั้งการชราภาพของ
กล้วยไม้ที่ได้รับเอทิลีน ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของชั้นเซลล์ในกลีบดอกบนกล้วยไม้พันธุ์
ลัคกี้ควนภายใต้กล้อง LM พบว่าชั้นเซลล์มีไซฟิลเกิดการยุบตัวบริเวณรอบท่อลำเลียง เห็นเป็น
ช่องว่างขนาดใหญ่ชัดเจนหลังจากได้รับเอทิลีน แต่ชั้นเซลล์อีพิเดอมิสเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย
สำหรับดอกกล้วยไม้พันธุ์เรดบอมโจ พบชั้นเซลล์มีไซฟิลเปลี่ยนแปลงเห็นช่องว่างขนาดเล็ก และ
การเปลี่ยนแปลงของกลีบดอกในพันธุ์ลัคกี้ควน สามารถยืนยันผลการทดลองได้เมื่อดูภายใต้
กล้อง SEM โดยเห็นการยุบตัวของชั้นมีไซฟิลเกิดขึ้นอย่างชัดเจนในดอกกล้วยไม้ที่ได้รับเอทิลีน
และเมื่อดูผลการเปลี่ยนแปลงของออร์แกเนลล์ในเซลล์ ภายใต้กล้อง TEM พบว่า ผนังเซลล์บางลง
และเยื่อหุ้มผนังเซลล์แยกตัวจากผนังเซลล์อย่างชัดเจน แวกคิวโอลขยายขนาดใหญ่ขึ้น ไม่พบ
ไรโบโซมและเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม เยื่อหุ้มนิวเคลียสแตกและโครมาตินภายในนิวเคลียส
แตกหักและรวมตัวกันเป็นกลุ่ม เซลล์มีการสร้างมัดติเวซิควิลัมบอดีและไมอีลินบอดีมากขึ้น
ไมโทคอนเดรียเกิดการเสื่อมสภาพ บริเวณพื้นที่ระหว่าง cristae ขยายตัวเพิ่มขึ้น เวสซิเคิลที่มี
เยื่อหุ้มชั้นเดียว และมีกรานูลจำนวนมากเกิดอิลคตรอนหนาแน่น ในขณะที่พลาสติดกลืนกิน
ส่วนของไซโทพลาสซึมและพลาสติดพัฒนาเป็นแวกคิวโอล เกิดกิจกรรมของ autophagosome หรือ
autolysosome ขณะที่เอนไซม์ดีเอ็นเอสมิกิจกรรมเพิ่มขึ้นหลังดอกกล้วยไม้ได้รับเอทิลีนและเพิ่ม
อีกครั้งในวันที่ดอกกล้วยไม้เสื่อมสภาพที่สุด การแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation)
ปรากฏเพียงเล็กน้อยหลังดอกกล้วยไม้ได้รับเอทิลีน และเกิดน้อยที่สุดในวันที่ดอกกล้วยไม้
เสื่อมสภาพมากที่สุด

Kanjana Kirasak 2010: Programmed Cell Death of *Dendrobium* Orchid Flowers Induced by Ethylene during Senescence. Doctor of Philosophy (Postharvest Technology), Major Field: Postharvest Technology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Professor Saichol Ketsa, Ph.D. 155 pages.

Senescence programmed cell death (PCD) of two cvs Lucky Duan and Red Bomjo of *Dendrobium* flowers in response to exogenous ethylene was comparatively conducted. It was found that flower cv. Lucky Duan was more sensitive to ethylene than flower cv. 'Red Bomjo'. However, 1-MCP (1-methylcyclopropene) completely inhibited senescence of 'Lucky Daun' induced by ethylene treatment. 'Lucky Duan' flowers started to show mesophyll layers of petals collapsed. However, epidermal layers of ethylene-treated flowers still showed a normal shape after ethylene treatment investigated under LM and this was confirmed by SEM study. Under TEM study showed that ethylene treatment resulted in thin cell walls and cell membrane separated from cell wall after ethylene treatment. Ethylene treatment also resulted in enlarged vacuoles and disorganized mitochondria followed by disappearance of ribosomes and endoplasmic reticulum. Nucleus showed chromatin condensed and nuclear envelope collapsed. There were more multivesicular bodies and myelin bodies. In addition, mitochondria had swollen and some of which showed internal degeneration. These granules were used as an indicator of still later stages of mitochondrial development in these cells. The apparent final stage of mitochondrial degeneration was a single-membrane-bound vesicle, resembling a vacuole. Some of these mitochondria showed high electron-density. While that plastids engulfed portions of the cytoplasm. Initial evidence rather suggested the formation of vacuoles from plastids. Taken together, the data strongly indicated that plastids can act both as autophagosomes and autolysosomes. DNase activity increased after ethylene treatment and increased again on the last day, DNA fragmentation of the ethylene-treated appeared smear after treatment and decreased to the most on last day.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยความกรุณาอย่างสูงจาก ศาสตราจารย์ ดร. สายชล เกตุษา ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ได้ให้คำปรึกษา ข้อชี้แนะ และความช่วยเหลือทุกสิ่ง ทุกหลายอย่างเสมอมา ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. วชิรญา อิ่มสบาย กรรมการร่วม รศ.ดร. อุณารุจ บุญประกอบ ประธานกรรมการสอบ และ รศ. ดร. สมโภชน์ น้อยจินดา ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอก ที่ให้ความกรุณาในการตรวจแก้ไข คำปรึกษา แนะนำ และช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จ ลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ Dr. Wouter G. van Doorn ที่ช่วยตรวจแก้ไขเรื่องสำหรับลงในวารสาร

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. ศุภางค์ มณีศรี เลอกรองด์ และขอบคุณ นางสาวเพ็ญพรรณ นवलบุญมา นางอภินันท์ อ่องอนันต์ และนางยุพิน ศรีหิรัญ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ เตรียมตัวอย่าง และอำนวยความสะดวกในการใช้กล้องอิเล็กทรอนิกส์

ขอขอบพระคุณ โครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษาและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงาน กองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนทุน ในการศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ เพื่อน และน้อง ที่เรียนมาด้วยกันและให้ความช่วยเหลือในการวิจัยครั้งนี้ จนกระทั่งเสร็จสิ้น รวมถึงเจ้าหน้าที่ศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและ เรือนปลูกพืชทดลอง ม.เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ในการอำนวยความสะดวก การใช้ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ขอขอบคุณเป็นพิเศษกับนางสาวสุทิน กันยะมี และนายศพล ผลาผล รวมถึงผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้เอื้อนามไว้ ณ ที่นี้

สุดท้ายนี้ กราบขอบพระคุณพ่อฉันท์ และคุณแม่กิ่งมาศ กิระศักดิ์ บุพการี ผู้ให้ทุกสิ่ง ทุกอย่างกับผุ้วิจัย และรวมถึงพี่สาวและน้องชายที่ทำให้กำลังใจ ช่วยดูแลบุพการีแทนผู้วิจัยในช่วง ผู้วิจัยทำงานวิจัย

กาญจนา กิระศักดิ์

พฤษภาคม 2553

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	21
ผลและวิจารณ์	30
ผล	30
วิจารณ์	109
สรุป	119
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	121
ภาคผนวก	144
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	155

สารบัญตาราง

ตารางผนวกที่	หน้า
1 การเกิดสีซีดของกล้วยไม้หวายพันธุ์ลี้กี้ควน เรดบอมโจ ขาวสนาน ซากุระ มีสีทึน และทับทิม	145
2 การเหี่ยวของกล้วยไม้หวายพันธุ์ลี้กี้ควน เรดบอมโจ ขาวสนาน ซากุระ มีสีทึน และทับทิม	146
3 การเกิดเส้นแวนของกล้วยไม้หวายพันธุ์ลี้กี้ควน เรดบอมโจ ขาวสนาน ซากุระ มีสีทึน และทับทิม	147
4 การเกิดสีซีดของกล้วยไม้หวายที่ไม่ได้รับเอทิลีน และได้รับเอทิลีนระดับความเข้มข้น 0.2 0.4 และ 0.8 $\mu\text{L/L}$	148
5 การเหี่ยวของกล้วยไม้หวายที่ไม่ได้รับเอทิลีน และได้รับเอทิลีนระดับความเข้มข้น 0.2 0.4 และ 0.8 $\mu\text{L/L}$	148
6 การเกิดเส้นแวนของกล้วยไม้หวายที่ไม่ได้รับเอทิลีน และได้รับเอทิลีนระดับความเข้มข้น 0.2 0.4 และ 0.8 $\mu\text{L/L}$	149
7 ค่า EC ของส่วนกลีบดอกและเส้าเกสรของกล้วยไม้ลี้กี้ควนที่ไม่ได้รับเอทิลีน และเอทิลีนระดับความเข้มข้น 0.4 $\mu\text{L/L}$	150

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	คะแนนของอาการลีซีด(A) การเหี่ยว(B) และการเกิดเส้นเวน(C) ของดอกกล้วยไม้พันธุ์ลัคกี้ควน ซากุระ เรดบอมโฌ มีสทิน ขาวสนาน และ ทับทิม ที่ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$	31
2	คะแนนของอาการลีซีด(A) การเหี่ยว(B) และการเกิดเส้นเวน(C) ของดอกกล้วยไม้หวาย พันธุ์ลัคกี้ควน ซากุระ เรดบอมโฌ มีสทิน ขาวสนาน และทับทิมที่ได้รับเอทิลีนความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4 และ 0.8 $\mu\text{L/L}$	32
3	คะแนนของอาการลีซีด(A) การลู่(B) และการเกิดเส้นเวน(C) ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกี้ควนหลังได้รับเอทิลีนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง	33
4	คะแนนของอาการลีซีด(A) การเหี่ยว(B) และการเกิดเส้นเวน(C) ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์เรดบอมโฌหลังได้รับเอทิลีนความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง	35
5	คะแนนของอาการลีซีด(A) การเหี่ยว(B) และการเกิดเส้นเวน(C) ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ซากุระหลังได้รับเอทิลีนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง	36
6	คะแนนของอาการลีซีด(A) การเหี่ยว(B) และการเกิดเส้นเวน(C) ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์มีสทินหลังได้รับเอทิลีนความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง	38
7	คะแนนของอาการลีซีด(A) การเหี่ยว(B) และการเกิดเส้นเวน(C) ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ขาวสนานหลังได้รับเอทิลีนความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง	39
8	คะแนนของอาการลีซีด(A) การเหี่ยว(B) และการเกิดเส้นเวน(C) ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ทับทิมหลังได้รับเอทิลีนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง	40
9	การร่วงไหลของประจุในกลีบดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกี้ควนที่แยกก่อน(A) และกลีบดอกที่แยกหลัง(B) การได้รับเอทิลีนความเข้มข้นระดับต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	42
10	การร่วงไหลของประจุในเส้าเกสรดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกี้ควนที่แยกก่อน (A) และเส้าเกสรที่แยกหลัง (B) การได้รับเอทิลีนความเข้มข้นระดับต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	43

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11	การรื้อไหลของประจุในกลีบดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกี้ควอน(A) และเส้าเกสร (B) ที่ได้รับเอทิลีนความเข้มข้นระดับต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	44
12	การรื้อไหลของประจุในกลีบดอกและเส้าเกสรของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกี้ควอนที่ไม่ได้รับเอทิลีนและได้รับเอทิลีนความเข้มข้น 0.4 $\mu\text{L/L}$	45
13	การเสื่อมสภาพของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกี้ควอนที่ไม่ได้รับเอทิลีน(A) ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (B) 1-MCP 500 nL/L(C) และ 1- MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (D) เวลาต่าง ๆ (0 d before คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	47
14	คะแนนของอาการลีซีด (A) การลู่ (B) และการเกิดเส้นเวน (C) ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกี้ควอน เวลาต่าง ๆ (0 d before คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	48
15	การเสื่อมสภาพของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์เรดบอมโงที่ไม่ได้รับเอทิลีน(A) ได้รับ เอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (B) 500 nL/L 1-MCP(C) และ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (D)	49
16	คะแนนของอาการลีซีด(A) การเหี่ยวหรือสลด(B) และการเกิดเส้นเวน(C) ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์เรดบอมโง	50
17	การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่าของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกี้ควอนที่ไม่ได้รับเอทิลีน(A) และได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (B) เวลาต่างๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	52
18	การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคภายใต้การดูกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่าของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกี้ควอน หลังที่ได้รับ 1-MCP 500 nL/L เวลาต่าง ๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
19	การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคภายใต้การดูแลของจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกี้ควนหลังที่ได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับ เอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ เวลาต่าง ๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	54
20	การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคภายใต้การดูแลของจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกี้ควนที่ไม่ได้รับเอทิลีน เวลาต่าง ๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	56
21	การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคภายใต้การดูแลของจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า ของดอกกล้วยไม้พันธุ์ลัคกี้ควน หลังที่ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ เวลาต่าง ๆ (before treatment คือดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	57
22	การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคภายใต้การดูแลของจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์เรดบอมโจ หลังที่ได้รับ 1-MCP 500 nL/L เวลาต่าง ๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	58
23	การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคภายใต้การดูแลของจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์เรดบอมโจหลังที่ได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับ เอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ เวลาต่าง ๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	59
24	การเปลี่ยนแปลงทางเซลล์วิทยาภายใต้การดูแลของจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 200 เท่า ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกี้ควนที่ไม่ได้รับเอทิลีน (A) และได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (B) เวลาต่าง ๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	62

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
25	การเปลี่ยนแปลงทางเซลล์วิทยาภายใต้การดูล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 200 เท่าของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกีควนที่ได้รับ 1-MCP 500 nL/L(A) และได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 μ L/L(B) เวลาต่างๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	63
26	การเปลี่ยนแปลงนิเวศของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกีควนที่ไม่ได้รับเอทิลีน (A) ได้รับเอทิลีน 0.4 μ L/L(B) ได้รับ 1-MCP 500 nL/L(C) และได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 μ L/L(D) เวลาต่างๆ (before treatment คือดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	66
27	การเปลี่ยนแปลงโครมาตินของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกีควนที่ไม่ได้รับเอทิลีน (A) ได้รับเอทิลีน 0.4 μ L/L(B) ได้รับ 1-MCP 500 nL/L(C) ได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 μ L/L(D) เวลาต่างๆ (before treatment คือดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	67
28	การเปลี่ยนแปลงนิเวศไอโอสของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกีควน ที่ไม่ได้รับเอทิลีน (A) ได้รับเอทิลีน 0.4 μ L/L(B) ที่ได้รับ 1-MCP 500 nL/L(C) และได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 μ L/L(D) (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	69
29	การเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มเซลล์ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกีควนที่ไม่ได้รับเอทิลีน(A) ได้รับเอทิลีน 0.4 μ L/L(B) ได้รับ 1-MCP 500 nL/L(C) และได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 μ L/L(D) เวลาต่างๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	71

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
30	การเปลี่ยนแปลงไมอิลินบอดีของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ล็กี่ควน ที่ไม่ได้รับเอทิลีน(A) ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (B) ได้รับ 1-MCP 500 nL/L(C) และได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (D) เวลาต่างๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	73
31	การเปลี่ยนแปลงมัลติเวสซิควาร์บอดีของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ล็กี่ควนที่ไม่ได้รับเอทิลีน(A) ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (B) ได้รับ 1-MCP 500 nL/L (C) และได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (D) เวลาต่างๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	75
32	การเปลี่ยนแปลงเม็ดแป้งของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ล็กี่ควนที่ไม่ได้รับเอทิลีน (A) ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (B) ได้รับ 1-MCP 500 nL/L(C) และได้รับ 1-MCP 500 nL/Lร่วมกับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (D) เวลาต่างๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	77
33	การเปลี่ยนแปลงไมโทคอนเดรียของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ล็กี่ควนที่ไม่ได้รับเอทิลีน(A) ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (B)ได้รับ 1-MCP 500 nL/L(C) และได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (D) เวลาต่างๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	78
34	โครงสร้างภายในเซลล์มีโซพิลล์ของกลีบดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ล็กี่ควน เซลล์ที่พัฒนาระยะแรก(A) เซลล์เข้าสู่ระยะการชราภาพ(B) และเซลล์ที่มีเวคคิวโอลขนาดใหญ่(C-E)	80

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
35	ไมโทคอนเดรียภายในเซลล์มีโซพิลล์ของกลีบดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลี้กี้ควน ไมโทคอนเดรียรูปทรงคล้ายสี่เหลี่ยมผืนผ้าและทรงกลม(A และ B) รูปทรงกลม และคัมเบล(C) รูปทรงคล้ายเกือกม้า(D) กราณูลที่มีอิเล็กตรอนหนาแน่น 2 อัน เชื่อมต่อกันภายในไมโทคอนเดรียบริเวณเยื่อหุ้ม(E) บริเวณ cristae ขยายขนาด ใหญ่ภายในไมโทคอนเดรีย และ กราณูลจำนวนหนึ่ง (F)	82
36	การเสื่อมสภาพของไมโทคอนเดรียภายในเซลล์มีโซพิลล์ของกลีบดอกกล้วยไม้ หวายพันธุ์ลี้กี้ควน ไมโทคอนเดรียขนาดต่างๆ (A) ภาพขยายไมโทคอนเดรีย ขนาดต่างๆ (B) ไมโทคอนเดรียที่มีเวสซิเคิลอยู่ตรงกลาง (C) โครงสร้างไมโท คอนเดรียเสื่อมสภาพ (D) โครงสร้างไมโทคอนเดรียคล้ายแวกคิวโอล (E)	84
37	การเสื่อมสภาพของไมโทคอนเดรียภายในเซลล์มีโซพิลล์ของกลีบดอกกล้วยไม้ หวายพันธุ์ลี้กี้ควน ไมโทคอนเดรียเสื่อมสภาพรุนแรงภายในเซลล์ (A) ภาพขยาย ภาพ A (B และ C) ภายในไมโทคอนเดรียที่มีเยื่อหุ้มสองชั้นรอบเวสซิเคิล (D) แวกคิวโอลเสื่อมสภาพไปเป็นไมโทคอนเดรีย (E และ F)	85
38	ขนาดไมโทคอนเดรียแต่ละระยะการพัฒนภายในเซลล์มีโซพิลล์ของกลีบดอก กล้วยไม้หวายพันธุ์ลี้กี้ควน(A) และจำนวนไมโทคอนเดรีย แต่ละระยะการพัฒนา เซลล์(B) [อัตราส่วนระหว่างพื้นที่แวกคิวโอลต่อพื้นที่เซลล์ (ไม่รวมผนังเซลล์) จัดเป็น 4 ระยะ (ระยะ 1: อัตราส่วน ≤ 0.25 , ระยะ 2: อัตราส่วน 0.26 -0.50, ระยะ 3: อัตราส่วน 0.51- 0.75, ระยะ 4: อัตราส่วน 0.76-1.0)]	87
39	โครงสร้างภายในเซลล์มีโซพิลล์ของกลีบดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ลี้กี้ควน (A) เซลล์มีแวกคิวโอลขนาดใหญ่ และมีเส้นรอบนอกของไซโตพลาสซึมที่บาง มาก(B) พลาสติดที่มีลักษณะโค้งให้เห็น 2 ระดับ(C และ D) รูปแบบที่พลาสติด โอบล้อมมัดคิวบิกของไซโตพลาสซึมแต่ละลักษณะ (E-L)	90
40	จำนวนและขนาดของ intraplastidial vesicle ภายในเซลล์มีโซพิลล์ของกลีบดอก กล้วยไม้ สกุลหวายพันธุ์ลี้กี้ควน	90

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
41	Intrplastidial vesicles ภายในพลาสต์ที่ชั้นเซลล์มีโซฟิลล์ของกลีบดอกกล้วยไม้ หวายพันธุ์ลักกี้ควน มีเยื่อหุ้มสองชั้นที่ล้อมรอบ intrplastidial vesicle(A B และ D) ชั้นในของเวสซิเคิล (ลูกศรบาง) และช่องว่างของ vesicle ชั้นนอก (ลูกศรหนา) (E และ G) อิเล็กตรอนหนาแน่นมากภายใน โครงสร้างที่มีรูปร่างกลม (ลูกศรบาง) (F และ H)	93
42	พลาสต์ภายในชั้นเซลล์มีโซฟิลล์ของกลีบดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ลักกี้ควน เยื่อหุ้มIntrplastidial vesicles สองชั้น และ plastoglobuli ที่มีอิเล็กตรอนหนาแน่นมากใน พลาสต์ (A-E) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายใน intrplastidial vesicle (C-E) พลาสต์เสื่อมสภาพ (I) intrplastidial vesicle ที่มีอิเล็กตรอนหนาแน่นน้อย (G และ H) โครงสร้างภายใน intrplastidial vesicle เสื่อมสภาพ (I และ J)	97
43	โครงสร้างอื่นๆ ภายในพลาสต์ที่ชั้นเซลล์มีโซฟิลล์ของกลีบ ดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ ลักกี้ควน มีเม็ดแป้ง (A และ B) Plastoglobuli เป็นกลุ่มในพลาสต์รูปทรง คัมเบล (C และ D) เยื่อหุ้มสองชั้นติดกับขอบของกลุ่ม Plastoglobuli (E-G) อิเล็กตรอนหนาแน่นน้อยใน Plastoglobuli (H) โครงสร้างคล้าย เวสซิเคิลขนาด เล็กภายในพลาสต์ (I-L)	98
44	โครงสร้างของพลาสต์และ Intrplastidial vesicles ที่บริเวณชั้นเซลล์มีโซฟิลของ กลีบ ดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลักกี้ควน intrplastidial vesicles เคลื่อนออกไปจาก พลาสต์(A) พลาสต์ที่ไม่มี Intrplastidial vesicles (B) intrplastidial vesicle และแวคคิวโอลขนาดใหญ่ (C) ภาพขยายจากภาพ C (D) เศษที่เหลือของเยื่อหุ้ม (E) intrplastidial vesicle ที่ไม่มีเยื่อหุ้มในแวคคิวโอล (F) ภาพขยาย intrplastidial vesicle ที่ไม่มีเยื่อหุ้ม (G) เวสซิเคิลที่ภายในบรรจุด้วยเส้นใยเชื่อมต่อกัน (H-J) เวสซิ เคิลที่ล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้มหลายชั้น (K-M)	100

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
45	<p>พลาสติกพัฒนาไปเป็นแวคคิวโอลบริเวณชั้นเซลล์มีไซพิลล์ของกลีบดอกกล้วยไม้ หวายพันธุ์ล็กี่ควน (A และ B) แวคคิวโอลรูปทรงดัมเบล (C) แวคคิวโอลมีวัตดูดิบ ล้อมรอบ (D) แวคคิวโอลบรรจุด้วย plastoglobules ตามอันที่มีอิเล็กตรอนหนา มาก (E) intraplastidial vesicle และนิวเคลียส ขนาดใหญ่ (F และ G)</p>	103
46	<p>จำนวนพลาสติก (A) ขนาดของ intraplastidial vesicles (B) และขนาดพลาสติก (C) ในเซลล์บริเวณชั้นเซลล์มีไซพิลล์ของกลีบดอกกล้วยไม้ หวายพันธุ์ล็กี่ควน ทุกระยะของการพัฒนาเซลล์คือพื้นฐานบนค่าอัตราส่วนของพื้นที่แวคคิวโอลต่อ พื้นที่เซลล์ (ไม่รวมผนังเซลล์) จัดเป็น 4 ระยะ (ระยะ 1: อัตราส่วน ≤ 0.25, ระยะ 2: อัตราส่วน 0.26 -0.50, ระยะ 3: อัตราส่วน 0.51- 0.75, ระยะ 4: อัตราส่วน 0.76- 1.0)</p>	104
47	<p>แสดงกิจกรรมเอนไซม์ DNase ของดอกกล้วยไม้ หวายพันธุ์ล็กี่ควน ที่ไม่ได้รับ เอทิลีน (T1; A) ได้รับทุกทริทเมนต์ (T1-T4; B) ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (T2; C) ได้รับ 1-MCP 500 nL/L (T3; D) และ ได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (T4; D) (bef. คือ ดอกกล้วยไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์; h คือจำนวน ชั่วโมงหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ d คือ จำนวนวันหลังได้รับ ทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)</p>	106
48	<p>แสดง DNA fragmentation ของดอกกล้วยไม้ หวายพันธุ์ล็กี่ควนที่ไม่ได้รับเอ ทิลีน (T1) ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (T2) ได้รับ 1-MCP 500 nL/L (T3) และ ได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (T4) (bef. คือ ดอกกล้วยไม้ก่อน ได้รับทริทเมนต์; h คือจำนวนชั่วโมงหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ d คือ จำนวนวันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)</p>	108
49	<p>กลไกการเกิด PCD ในช่วงการชราภาพของดอกกล้วยไม้ หวายที่ถูกกระตุ้นด้วย เอทิลีน</p>	118

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า	
1	กระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาคภายในไมโทคอนเดรียของเซลล์ กลีบดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลี้กี้ควนหลังดอกไม้บานจนกระทั่งเกิดการชราภาพ	153
2	กระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาคภายในพลาสต์ของเซลล์ กลีบดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลี้กี้ควนหลังดอกไม้บานจนกระทั่งเกิดการชราภาพ	154

การตายของเซลล์ในช่วงการชราภาพของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) ที่ถูกชักนำโดยเอทิลีน

Programmed Cell Death of *Dendrobium* Orchid Flowers Induced by Ethylene during Senescence

คำนำ

กล้วยไม้ตัดดอกในประเทศไทย ปัจจุบันมีพื้นที่ปลูกประมาณ 20,739 ไร่ ผลผลิตรวมทั้งหมด 45.937 ล้านกิโลกรัม ปีที่ผ่านมาทำรายได้จากการส่งออกประมาณ 90% ของมูลค่า การส่งออกไม้ดอกไม้ประดับทั้งหมดของไทย โดยในปี 2552 มีปริมาณการส่งออกดอกกล้วยไม้สดประมาณ 24.60 ล้านกิโลกรัม คิดเป็นมูลค่าประมาณ 2,366.4 ล้านบาท ตลาดส่งออกที่สำคัญ ได้แก่ ญี่ปุ่น มีมูลค่าการส่งออก 740.4 ล้านบาท สหรัฐอเมริกา มูลค่าการส่งออกรองลงมาเป็นอันดับสอง มีมูลค่า 445.8 ล้านบาท อิตาลี 232.7 ล้านบาท และจีน 232.1 ล้านบาท เป็นต้น (กรมศุลกากร, 2553) กล้วยไม้จึงเป็นไม้ตัดดอกเศรษฐกิจที่มีความสำคัญและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในและต่างประเทศประมาณ 80% กล้วยไม้ตัดดอกส่วนใหญ่ เป็นกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) ซึ่งเป็นสกุลกล้วยไม้ใหญ่ที่สุด พันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้าและส่งออกมาก ได้แก่ พันธุ์โซเนียบอม เบอร์ 17, 18 และ 28 เป็นต้น เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่มีอายุการใช้งานนาน ส่วนพันธุ์อื่นที่นิยมปลูกเป็นการค้า ได้แก่ พันธุ์ ขาวสนาน บุรณะเจด และ มีสติน เป็นต้น (http://orchidnet.doae.go.th/home/technic_orchid.php?c=1&d=1&id=3)

ปัจจุบันการส่งออกดอกกล้วยไม้ของประเทศไทยประสบปัญหาที่สำคัญ คือ ดอกกล้วยไม้มีคุณภาพลดลงเมื่อถึงมือผู้รับปลายทาง เช่น ดอกเหี่ยว หลุดร่วง และมีอายุการปักแจกันสั้นลง ซึ่งมีสาเหตุสำคัญมาจากเอทิลีน โดยขั้นตอนในกระบวนการสังเคราะห์เอทิลีนในพืช เกิดจากการเปลี่ยน S-adenosyl methionine (SAM) ไปเป็น 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) โดยมีเอนไซม์ ACC synthase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และเอนไซม์ ACC oxidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ขั้นตอนต่อไปเพื่อเปลี่ยน ACC ไปเป็นเอทิลีน ซึ่งเอทิลีนมีผลต่อการเร่งให้ดอกไม้เสื่อมสภาพและเหี่ยวเร็ว (http://www.rdi.ku.ac.th/kasetfair49/Plant/p_57) ในดอกกล้วยไม้มีระบบการสร้างเอทิลีนแบบ autocatalytic system ซึ่งคล้ายกับผลไม้ประเภท climateric คือเมื่อดอกไม้ได้รับเอทิลีนจากภายนอกจะกระตุ้นให้สร้างเอทิลีนเพิ่มขึ้นภายในดอกไม้ โดยเฉพาะในดอกกล้วยไม้สกุลหวาย

พบว่าเมื่อได้รับเอทิลีนทำให้กลีบดอกสีซีด ปลายของกลีบดอกเหี่ยว และก้านดอกโค้งงอ แต่ถ้าเป็นเอทิลีนที่ดอกไม้สร้างขึ้น หรือเอทิลีนในบรรยากาศถูกยับยั้งไม่ให้ทำงาน ดอกไม้จะมีความเสียหายน้อยลงได้ (สายชล, 2531) ซึ่งอาการที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่าการชราภาพ (Senescence) โดยการชราภาพของดอกไม้ส่วนใหญ่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา เช่น เยื่อหุ้มเซลล์เสื่อมสภาพ เอ็นไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนมีการทำงานเพิ่มขึ้น มีการเคลื่อนย้ายอาหารออกจากแหล่งผลิตไปยังแหล่งใช้อื่นๆ มากขึ้น มีผลทำให้เซลล์เสื่อมสภาพ ทำงานไม่ได้ และการชราภาพเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการที่เรียกว่า programmed cell death (PCD) (Yamada *et al.*, 2003) ซึ่งกระบวนการ PCD ประกอบด้วยการเกิดการเปลี่ยนแปลงในพืช 3 ลักษณะคือ 1) การเจริญเติบโตและพัฒนาของพืชตามปกติ 2) การชราภาพ และ 3) การตอบสนองต่อสภาวะเครียด (Jones, 2001)

การศึกษาการตอบสนองต่อเอทิลีนของกระบวนการต่าง ๆ ในดอกกล้วยไม้สกุลหวายที่เข้าสู่กระบวนการชราภาพ และมีสัมพันธ์กับกระบวนการเกิด PCD นั้น เพื่อให้ทราบถึงกลไกการควบคุมการตายภายในของเซลล์ดอกไม้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับปรับปรุงคุณภาพเพื่อการใช้เทคโนโลยีที่เหมาะสม ในการยืดอายุการใช้งานของดอกกล้วยไม้ (Serex *et al.*, 1995) โดยมีการศึกษาลักษณะนี้อย่างกว้างขวางในไม้ตัดดอกในระดับอุตสาหกรรม เช่น คาร์เนชั่น ลิลลี่ พิทูเนีย และ *Alstromeria* เป็นต้น แต่ในดอกกล้วยไม้สกุลหวายยังไม่มีการศึกษาวิจัยด้านนี้ ดังนั้น การศึกษากระบวนการต่างๆ เหล่านี้ในกล้วยไม้สกุลหวาย จะทำให้สามารถพัฒนาการผลิตกล้วยไม้สกุลหวายเพื่อการค้าได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

วัตถุประสงค์

การศึกษาเรื่องการตายของเซลล์ในช่วงการชราภาพของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) ที่ถูกชักนำโดยเอทิลีน มีวัตถุประสงค์ดังต่อไปนี้คือ

เพื่อศึกษากลไกการตายของเซลล์ (PCD) ในระหว่างการเสื่อมสภาพของดอกกล้วยไม้สกุลหวายที่ถูกชักนำด้วยเอทิลีน



การตรวจเอกสาร

คำจำกัดความ การชราภาพ (senescence) และ programmed cell death (PCD)

คำศัพท์ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาและเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต มีหลายความหมาย ในแต่ละความหมายมีความใกล้เคียงกัน ในบางครั้งอาจแยกออกจากกันได้ยาก เพื่อให้มีความเข้าใจตรงกัน จึงได้มีการอธิบายความหมายในคำที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยไว้ดังนี้คือ

Aging คือ การเสื่อมสภาพของสิ่งมีชีวิตที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติไม่มีการควบคุม และไม่มีการใช้พลังงานผลักดันให้เกิดขึ้น ในพืชจะใช้กับส่วนของเมล็ด (จริงแท้, 2549)

การชราภาพ (senescence) คือ การเจริญเติบโตและพัฒนาของพืชอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งถึงระยะการชราภาพที่นำไปสู่การตายและเป็นกระบวนการที่ก่อให้เกิดประโยชน์ มีการควบคุมให้เกิดขึ้นจากภายใน (จริงแท้, 2549)

Programmed cell death (PCD) คือ เซลล์ที่มีการพัฒนาไปสู่การตาย เป็นกระบวนการที่มีการควบคุมภายในและนำไปสู่ความตายเฉพาะอย่าง ในเวลาหรือสถานการณ์จำเพาะ (จริงแท้, 2549)

แต่นักวิจัยบางคนให้ความหมายของ การชราภาพ และ PCD เป็นความหมายเดียวกัน คือ เป็นอาการเปลี่ยนแปลงของพืชที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า นำไปสู่การตายของเซลล์ ซึ่งอาการดังกล่าวจะปรากฏและกล่าวถึงที่เกี่ยวข้องกับในเรื่องเซลล์พืช เมื่อเกิดลักษณะการเปลี่ยนแปลงนี้ขึ้นในพืชแล้วจะ ไม่มีการย้อนกลับมาลักษณะเดิมได้อีก (van Doorn and Woltering, 2004)

การศึกษา PCD

การศึกษาเรื่อง PCD มีการศึกษาในสัตว์มาก่อนพืช โดยในเซลล์สัตว์เรียกการเกิด PCD ว่า apoptosis เนื่องจากการเกิดลักษณะนี้เซลล์จะแตกออกเป็นเซลล์ย่อย ๆ ขนาดเล็กเรียกว่า apoptotic body (Wyllie, 1987) ซึ่งการเกิด PCD ในพืชพบว่ามีความคล้ายคลึงกับการเกิดภายในสัตว์ คือ กระบวนการ apoptosis และ autophagy ซึ่งมีพื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับสัญญาณวิทยาของสิ่งมีชีวิต

ในช่วงที่เซลล์กำลังจะตาย จนกระทั่งตายไป (จริงแท้, 2549) ทำให้มีการศึกษากระบวนการเกิด PCD ในพืชอย่างกว้างขวางมากขึ้น

Jones (2001) มีแนวความคิดเกี่ยวกับกระบวนการ PCD ในพืช คือ การที่พืชมีการพัฒนา และเจริญเติบโตที่เป็นไปอย่างปกติ เข้าสู่การเกิดกระบวนการชราภาพ และจนกระทั่งตายไป ซึ่งมีการควบคุมความสมดุลระหว่างการใช้ชีวิตและสัญญาณการตาย ซึ่งแต่ก่อนจะกล่าวถึงเฉพาะเซลล์ที่ตาย แต่ในปัจจุบันพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับระยะเวลาเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย จึงกล่าวได้ว่ากระบวนการ PCD เป็นกระบวนการที่ไม่มีการย้อนกลับ และมีการกำหนดเวลาการตายของเซลล์ ซึ่งกระบวนการ PCD จะเกี่ยวข้องกับพืช 3 แนวทางคือ การเจริญและพัฒนาของเซลล์ การชราภาพจากการได้รับสิ่งรบกวนภายนอก และการต้านทานต่อการเข้าทำลายของโรคพืช ในเบื้องต้นมีการศึกษามากด้านเซลล์วิทยาพบว่าลักษณะการตายของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี และเกี่ยวข้องกับสัญญาณการชักนำให้เซลล์ตายด้วย เมื่อเวลาผ่านไปจึงได้พัฒนาทางวิชาการที่เกี่ยวข้องกับการพิสูจน์กระบวนการ PCD เพิ่มขึ้น โดยนำวิชาการด้านพันธุศาสตร์เข้ามาใช้ในการศึกษาการตายของเซลล์ และล่าสุดคือการใช้เทคโนโลยีด้านการจำแนกสัญญาณที่เป็นสื่อกลางในกระบวนการเกิด PCD

กระบวนการ PCD แสดงผลชัดเจนในระดับเซลล์ ซึ่งมี 3 รูปแบบ คือ 1) การเกิด apoptosis กระบวนการนี้ DNA ในนิวเคลียสมีการแตกหักเกิดขึ้นก่อนที่จะเกิดการรวมตัวกันของโครมาตินภายในนิวเคลียส ทำให้นิวเคลียสหดตัวและเปลี่ยนรูปร่างไปจนกระทั่งนิวเคลียสถูกทำลายไปในที่สุด ส่งผลให้โครงสร้างของเซลล์เสื่อมลงอย่างรวดเร็ว 2) การตายของเซลล์ที่เกิดขึ้นในช่วงการชราภาพของพืชที่มีผลมาจากการเสื่อมสภาพของโครโรพลาสต์ไปอย่างช้าๆ ในช่วงที่เซลล์ใกล้จะตายและในช่วงเวลานี้ นิวเคลียสและแวคคิวโอลเกิดการเสื่อมสภาพการทำงานไปพร้อมๆ กัน แต่ทั้งสองเหตุการณ์จะเกิดหลังจากที่เซลล์แสดงอาการเสื่อมสภาพไปแล้ว และโครโรพลาสต์สลายตัวไปหมด เซลล์จะตายไปในที่สุด ซึ่งการเกิดแบบนี้มีผลกระทบต่อพืชทั้งต้น รวมทั้งอวัยวะต่างๆ ของพืชด้วย และ 3) PCD ที่มีจุดศูนย์กลางการเกิดอยู่ที่แวคคิวโอล การเกิดแบบนี้มีทั้งการเร่งการตายของเซลล์ให้เกิดเร็วขึ้นและมีการกอบกู้เซลล์ให้กลับคืนมาอยู่ในสภาพการใช้งานได้อีกครั้ง (Fukada, 2000)

การศึกษา PCD ในพืชเปรียบเสมือนการศึกษาเรื่อง การชราภาพ โดยทั่วไปแล้วการศึกษาด้านนี้กับพืช มักใช้ส่วนของกลีบดอกไม้เป็นตัวแทนพืชทั้งต้น สำหรับศึกษาทั้งระบบของการเกิด PCD เนื่องจากกลีบดอกไม้เป็นอวัยวะที่เมื่อเกิดการชราภาพขึ้นแล้ว มีความสัมพันธ์กับส่วนอื่นๆ ด้วย อีกทั้งกลีบดอกไม้เป็นส่วนที่เกิดการชราภาพได้อย่างรวดเร็วและสม่ำเสมอทั่วทั้งต้นในเนื้อเยื่อ

แต่ลักษณะการเกิดเหล่านี้จะมีความแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด ซึ่งขึ้นกับพันธุกรรม การกลายพันธุ์ และการถ่ายยีน (Berdnard, 2000; Thomas *et al.*, 2003) และการเกิดลักษณะเหล่านี้ ในบางช่วงเวลาหรือบางส่วนของกระบวนการอาจมีให้เห็นเหมือนกันบ้างในบางพืช ส่วนใหญ่ แล้วการเกิดการชราภาพในกลีบดอกไม้ มักมีความสัมพันธ์กับการผลิตและเพิ่มปริมาณของเอทิลีน ภายในพืชหรือพืชที่ได้รับเอทิลีนจากภายนอก (Wagstaff *et al.*, 2003) การศึกษาการชราภาพ สามารถทำได้หลายวิธี นักสรีรวิทยาใช้การศึกษาการชราภาพกับการทำงานของอวัยวะพืช โดย ศึกษาการแสดงออกทางสัณฐานวิทยาของสภาพการแก่ของพืช และการชราภาพ ในส่วนของ นักกายวิภาคศึกษาการตายของเซลล์ที่เกิดในช่วงการพัฒนาการของพืช ช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เพศผู้และเพศเมีย และช่วงการพัฒนารังไข่ เป็นต้น โดยเป็นที่ทราบกันว่ากระบวนการเหล่านี้คือ การพัฒนาของเซลล์ไปสู่ความตาย (van Doorn and Woltering, 2004) นอกจากนี้ยังมีการสังเคราะห์ เอนไซม์ที่เป็นตัวกระตุ้นให้โปรตีนเสื่อมสภาพก่อนการแสดงออกให้เห็นได้ตามมาในภายหลัง (Belenghi *et al.*, 2004) ซึ่งการศึกษา PCD ที่เป็นการชราภาพ นั้น มีการนำวิธีทางชีวโมเลกุลมาใช้ในการตรวจสอบการย่อยสลายของ DNA และการแสดงออกของยีน โดยพบว่าวิธีการนี้เป็น วิธีการบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ของกระบวนการเกิด PCD และ การชราภาพได้ดีวิธีการหนึ่ง (Orzaez and Granell, 1997 and Bernard, 2000)

การชราภาพ (Senescence) กับ Programmed Cell Death (PCD)

การชราภาพเป็นอาการเปลี่ยนแปลงของพืชที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เช่น ใบเหลือง และกลีบดอกเหี่ยว เป็นต้น (van Doorn and Woltering, 2004) ซึ่งมีความหมายเหมือนกัน กับ PCD ที่อธิบายในใบพืชที่เปลี่ยนเป็นสีเหลือง ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงไม่มากสามารถย้อนกลับคืน เป็นสีเขียวได้ ส่วนในใบที่เป็นสีเขียวนั้นคือ การที่ใบเข้าสู่เส้นทางของโปรแกรมที่นำไปสู่การตาย ก่อนที่จะมองเห็นเป็นสีเหลือง จึงเป็นไปได้ว่าการชราภาพในเซลล์เป็นกระบวนการ PCD ที่ สามารถ เกิดได้ทั่วทุกเซลล์ โดยเซลล์ที่เกิด PCD เริ่มแรกแวกคิวโอลขยายใหญ่ขึ้นจนดันให้บริเวณที่มี ส่วนของไซโทพลาสซึมขนาดเล็กลง ลักษณะเช่นนี้เกิดขึ้นพร้อมกับการเปลี่ยนแปลงของออร์แกเนลล์ที่อยู่ ภายในเซลล์ด้วย พบว่าไมโทคอนเดรีย และนิวเคลียสเป็นออร์แกเนลล์สุดท้ายที่ถูกทำลายไป แต่ ลักษณะที่เกิดขึ้นนี้ไม่ปรากฏออกมาให้เห็น จนกว่าไซโทพลาสซึมแตกออก และสามารถเกิดขึ้นได้ โดยไม่จำเป็นต้องเกิดการรวมตัวกันของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมกับไรโบโซม และช่วงเวลา เดียวกันนี้ เยื่อหุ้มแวกคิวโอลและเยื่อหุ้มเซลล์เสื่อมสภาพและยุบตัวลง ลักษณะต่างๆ ที่เกิดขึ้น เหล่านี้ขึ้นกับชนิดและพันธุ์พืชด้วย (van Doorn, 2005)

การศึกษาการชราภาพของพืชช่วงเวลา 20 ปีที่ผ่านมา พบว่า ช่วงที่พืชเกิดการชราภาพ เซลล์มีการเปลี่ยนแปลง โดยเริ่มจากแวคคิวโอลถูกทำลาย มีการแตกแยกของเยื่อหุ้มแวคคิวโอล เกิดขึ้นก่อนเหตุการณ์อื่น จึงใช้เป็นหลักฐานได้ว่าแวคคิวโอลที่เสื่อมสภาพอาจเป็นกลไกที่เกิดได้ทั่วไปของการตายของเซลล์พืช แต่อย่างไรก็ตาม พืชต้องมีกลไกที่ใช้จัดการกับซากเซลล์ที่ตายไปด้วย โดยจะต้องมีการแก้ไขปัญหาที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงสภาพของแวคคิวโอล เซลล์จำเป็นต้องมีกิจกรรมการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เป็นตัวทำลายซากเซลล์ที่ตาย โดยพืชสร้างเอนไซม์ไฮโดรเลสแล้วส่งเข้าไปในแวคคิวโอล ทำให้เกิดเป็นพิษกับแวคคิวโอลในเซลล์นั้น ที่ก่อให้เกิดซากเซลล์ จากนั้นจึงปลดปล่อยเอนไซม์ออกคืนกลับออกมาสู่ภายนอก ซึ่งทั้งหมดอยู่บนพื้นฐานการทำงานร่วมกันของสัญญาณที่ส่งจากพืชเพื่อไปสังเคราะห์เอนไซม์ เมื่อแวคคิวโอลได้รับผลกระทบอย่างแรงจากเอนไซม์ไฮโดรเลสขึ้นก่อนที่จะกำหนดให้เซลล์ตาย และเซลล์ตายก็จะเป็นกลไกหลังจากที่เซลล์มีการเตรียมตัวเพื่อถูกกำจัดทิ้งไปในขณะนั้นด้วย (Jones, 2001)

การชราภาพเป็นการเจริญเติบโตอย่างหนึ่ง แต่เป็นการเจริญเติบโตของพืชหรือส่วนของพืชไปสู่ความตาย ซึ่งพืชจะแสดงออกถึงการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา กายวิภาค รวมถึงชีวโมเลกุล โดยมีอินเป็นตัวควบคุมและแสดงออกมากขึ้นในช่วงที่มีการชราภาพ ยีนจำพวกนี้จะมีการถอดรหัสทางพันธุกรรมใหม่ แต่อาการที่แสดงออกของพืชนั้นจะเกิดขึ้นภายหลังการถอดรหัสและการแปลรหัสทางพันธุกรรมแล้ว (Thomas *et al.*, 2003) องค์ประกอบของกระบวนการ PCD ในพืช เป็นโปรแกรมทางพันธุศาสตร์ และการชราภาพ ที่แสดงให้เห็นการเกิดที่สามารถย้อนกลับได้ และถูกควบคุมโดยสัญญาณที่เกี่ยวข้อง เช่น ฮอร์โมน ออกซิน ไซโตไคนิน เอทิลีน และแสง เป็นต้น PCD ของพืชเป็นกระบวนการทำงานกำหนดการตายของเซลล์ เกี่ยวข้องกับการทำงานของไซโตพลาสติก มีสัญญาณการตายและสัญญาณการมีชีวิต การเรียนรู้ของเซลล์ในกระบวนการนี้ส่งผลต่อการตายของเซลล์ รวมทั้งความสามารถในการกำจัดเซลล์ที่ตายแล้ว นอกจากนี้ยังส่งผลต่อเนื่องไปยังกิจกรรมการทำงานของแวคคิวโอล โดยพบว่าแวคคิวโอลเป็นออร์แกเนลล์แรกที่เกิดการปรับตัวเปลี่ยนแปลงไปหลังจากได้รับสัญญาณที่ส่งต่อมาจากไซโตพลาสติก (Thomas and Stoddart, 1980)

การเกิดกระบวนการ PCD ระหว่างการชราภาพของดอกไม้

การชราภาพเกิดขึ้นในระยะสุดท้ายของช่วงการเจริญเติบโตทางกิ่งใบ และระยะสืบพันธุ์ ซึ่งเกิดขึ้นตามมาอย่างต่อเนื่อง (Eason *et al.*, 2002) การเกิดชราภาพมีการตายของเซลล์เกิดขึ้นได้ 2 แบบ คือ 1) การชราภาพของอวัยวะ เช่น ใบ กลีบดอก ผล กิ่งก้าน และราก 2) การชราภาพทั้งต้น

ส่วนใหญ่จะพบในพืชฤดูเดียวที่มีการเจริญเติบโตทางกิ่งใบ ตามด้วยการปฏิสนธิ และการพัฒนามล็ด แล้วต้นก็จะตาย การชราภาพเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นแล้ว สามารถมองเห็นอาการที่เกิดขึ้นได้ด้วยตา เช่น ใบเหลือง และกลีบดอกเหี่ยว เป็นต้น (Van Doorn and Woltering, 2004) และพบว่ามี การแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นที่เกี่ยวข้องกับการชราภาพ โดยเฉพาะ เช่น SAG12 (SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 12) ทั่วไปแล้ว SAG 12 เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ cysteine protease ซึ่งทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพและเกิดการชราภาพตามมา (Belenghi *et al.*, 2004)

การชักนำการชราภาพเกิดขึ้นได้จากการเริ่มผลิตเอทิลีน แบบ autocatalytic ที่กลีบดอก (Shibuga *et al.*, 2000) และการสร้างเอทิลีนเริ่มลดลงในระหว่างเกิดกระบวนการการชราภาพ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำงานของ lipoxidation (Leverentz *et al.*, 2002) และ proteolytic (Xu and Hanson, 2000) ในสภาวะความเครียดทั่วไป สามารถชักนำการชราภาพได้ โดยพืชจะชราภาพได้เร็วขึ้น ถ้าดอกไม้มีบาดแผล เนื่องจากการสร้างเอทิลีนเพิ่มมากขึ้น มีกรด jasmonic และสารหลายชนิดเกิดขึ้นจากกระบวนการสันดาป ส่งเสริมการเกิดการชราภาพ ดังเช่นในดอกกล้วยไม้บางชนิด มี lipoxygenase (LOX) เพิ่มขึ้น ซึ่ง LOX เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่เกิดขึ้นจากวิถีของการสร้างกรด jasmonic เป็นสารส่งเสริมการชราภาพของพืช ทำให้เกิดกระบวนการ peroxidation ที่เป็นกระบวนการที่สลายกรดไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้สารประกอบภายในเซลล์รั่วไหลออกจากเซลล์ เป็นต้น (Porat *et al.*, 1993)

การชราภาพในดอกไม้ คือ การที่กลีบดอกไม้มีสภาพเปลี่ยนแปลงไปจากปกติ จะเห็นได้ชัดเจนจากการแสดงอาการเหี่ยว และเกิดเป็นสีน้ำตาล ซึ่งเป็นการยากที่จะวัดหรือประเมินค่าในทางปริมาณ (Yamada *et al.*, 2003) การพัฒนาของดอกไม้ ต้องมีตัวการชักนำให้เข้าสู่โปรแกรมการชราภาพ เนื่องจากเป็นกระบวนการที่เคร่งครัดมาก ในส่วนการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ที่พืชจำเป็นจะต้องให้เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ และต้องมีการผสมเกสร เพื่อดำรงเผ่าพันธุ์ไว้ (Eason *et al.*, 2002b) โดยพบว่าการชราภาพที่เกิดขึ้นในดอกไม้ นั้น มีหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง เช่น เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี ซึ่งมีความสัมพันธ์กับฮอร์โมนที่สร้างขึ้น มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างกลีบดอกกับส่วนอื่นๆ ของดอกภายหลังการถ่ายเรณู มีการเสื่อมสภาพหลังการเก็บเกี่ยวดอกไม้ที่เกิดหลายสาเหตุ มีการขาดแหล่งพลังงาน (จริงแท้, 2549) เกิดกระบวนการ PCD ภายในดอกไม้ เซลล์เปลี่ยนแปลงรูปร่างและขนาด รวมทั้งผนังเซลล์บางลง เป็นต้น (Bernard, 2000, Yamada *et al.*, 2003)

ตามธรรมชาติของดอกไม้ นั้น เมื่อดอกไม้บานแล้วอวัยวะแต่ละส่วนมีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงแตกต่างกันไปหลังดอกบาน เพื่อการปรับตัวให้เหมาะสมกับการอยู่รอด เป็นการดึงดูด

ให้สิ่งมีชีวิตอื่น เช่น พวกแมลงหรือสัตว์ช่วยถ่ายเรณู และเมื่อเกิดการถ่ายเรณูแล้วก็เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างอื่นขึ้น เพื่อลดการคั่งคูดของพาหะที่ใช้ถ่ายเรณูในดอกไม้บานและเกิดการชราภาพของกลีบดอก มีการควบคุมทางชีววิทยาที่เป็นเหตุการณ์วิกฤตในวงจรชีวิตของพืชที่มีดอก ซึ่งการบานของดอกเป็นอาการที่มองเห็นได้อย่างแรกว่า โปรแกรมการชราภาพได้เริ่มขึ้นแล้ว (O'Donoghue *et al.*, 2002) ในการชราภาพของกลีบดอก ถูกกำหนดโดยการแสดงออกของยีน โดยเฉพาะ และมีสัญญาณเกิดขึ้นร่วมด้วย สำหรับดอก *Alstroemeria* ที่อยู่ในตระกูล Liliaceous มีการชราภาพของกลีบดอกโดยแสดงลักษณะการเหี่ยวและม้วนเข้า และตามด้วยดอกร่วง 8-10 วัน หลังดอกบาน และพบว่าเกี่ยวข้องกับ PCD ที่เริ่มต้นขึ้นก่อนจนถึงดอกบานและเกิดการชราภาพขึ้นอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ลักษณะทางสรีรวิทยาและโมเลกุลในกระบวนการ PCD แสดงออกให้เห็นในช่วงที่กลีบดอกชราภาพ โดยการเหี่ยวของกลีบดอกเป็นการชี้บอกถึงการชราภาพที่เกิดขึ้นที่ของดอกไม้หลายชนิด และสัมพันธ์กับการสูญเสียความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ การเปลี่ยนแปลงแรงต่ง และการรั่วไหลของประจุ (Rubinstein, 2000) ในขณะที่ดอกคาร์เนชั่นที่มีการชราภาพเกิดขึ้น จะเกิดระบบการสร้าง เอทิลีนแบบเหนี่ยวนำจากกลีบดอก และตามมาด้วยการเหี่ยวของกลีบดอก การควบคุมการผลิตเอทิลีนและการเหี่ยวที่เกิดขึ้นในดอกคาร์เนชั่นที่ชราภาพ แสดงให้เห็นว่ากลีบดอกที่ชราภาพถูกกระตุ้นโดยเอทิลีนที่ผลิตจากส่วนของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย มีการตอบสนอง 2 แบบ คือ การตอบสนองสำหรับการผลิตเอทิลีนแบบระบบการสร้างเอทิลีนและแบบเหนี่ยวนำ และมีการแสดงออกของยีน ACO และ ACS ในกลีบดอกตามลำดับ และการแสดงออกของยีน ACO น่าจะมีผลต่อเนื่องมาจากยีน ACS ด้วย (Satoh *et al.*, 2005) นอกจากนี้ในการชราภาพของดอกไม้เกี่ยวข้องกับการเสื่อมลงของปริมาณแคโรทีนอยด์ แป้ง และ โปรตีนภายในเนื้อเยื่อกลีบดอกอีกด้วย (Eason *et al.*, 1997)

การผสมเกสรเป็นกระบวนการหนึ่งที่สำคัญในการกระตุ้นการชราภาพ มีผลยืนยันในพืชได้มากถึง 60 สกุล เช่น ช่อดอกกล้วยไม้ของสกุล *Phalaenopsis* และ *Dendrobium* จะมีอายุนาน 3 เดือน แต่ถ้ามีการผสมเกสรเกิดขึ้น ดอกจะเสื่อมสภาพภายใน 1 วัน เนื่องจากการสร้างเอทิลีนเพิ่มขึ้นทั้งก่อนและระหว่างการผสมเกสร และเมื่อตรวจสอบในกลีบดอกหลังผสมเกสรพบว่า มีระดับ mRNA ของเอนไซม์ ACO และมีการสร้างเอทิลีนมากขึ้น เนื่องจากการสร้างและเคลื่อนย้าย ACC ที่เป็นสารตั้งต้นของเอทิลีนในกลีบดอกทำให้มีการสร้างเอทิลีนเพิ่มมากขึ้นตามมา จากนั้นจึงตามด้วยการชราภาพของดอกไม้ (Halevy, 1998) แต่ถ้าเป็นดอกไม้ที่ไม่ผสมเกสร การชักนำการชราภาพเกิดขึ้นได้โดยการเริ่มสร้างเอทิลีนในระยะที่ 2 แบบ autocatalytic ที่บริเวณกลีบดอกไม้ และเอทิลีนเริ่มลดลงในระหว่างการเกิดกระบวนการชราภาพ (Shibuga *et al.*, 2000)

กลีบดอกไม้ชราภาพก่อให้เกิด apoptotic-like PCD ซึ่งเป็นกระบวนการที่ถูกควบคุมและมีกิจกรรมการทำงานเกี่ยวข้องกับการ transcription และ translation (Buchanan-wallaston *et al.*, 2003) ดอกไม้บางชนิด เช่น *gypsophila* มีสิ่งทีกำกับการตายของเซลล์ในกลีบดอก ซึ่งเป็นกระบวนการแตกหักของ DNA เกิดช่วงดอกบานเต็มที่ แสดงผลให้เห็นว่ามีการเสื่อมสภาพภายในดอกไม้เกิดขึ้นก่อนที่จะเห็นการเปลี่ยนแปลงภายนอกของดอกที่มองเห็นได้ด้วยตา มีผลอ้างอิงจากกลไกการชราภาพในเซลล์กลุ่ม climacteric flower ซึ่ง DNA ที่เสื่อมสลายจะเกิดอยู่ช่วงเวลาสั้นๆ ในช่วงดอกไม้บาน ซึ่งถือเป็นสัญญาณชี้บอกว่าการชราภาพมีการเริ่มต้นพร้อมแล้วก่อนดอกบานเต็มที่ นอกจากนี้ภายในเซลล์ยังมีเอทิลีนปรากฏให้ตรวจพบได้ในระยะสุดท้ายของการชราภาพ และพบว่ามีเซลล์ตายจำนวนมากจนเห็นการยุบตัวของชั้นอีพิเดอมิส และมีไซฟิลล์เซลล์ของกลีบดอกไม้ ซึ่งต่างกับการชราภาพของใบ ที่เซลล์ยังคงมีชีวิตอยู่ แต่กิจกรรมภายในเซลล์เริ่มช้าลงในระยะการชราภาพ สำหรับระยะก่อนการพัฒนาของกลีบดอก พบว่ามีเซลล์ตายภายในกลีบดอกเช่นกัน แต่อยู่ในช่วงกิจกรรมของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงและกำจัดเซลล์ที่ไม่จำเป็นทิ้งไป พบในช่วงเวลาสั้นๆ เท่านั้น การเปลี่ยนแปลงนี้เกิดขึ้นในช่วงนี้ ช่วยในการสนับสนุนการทำงานในหน้าที่ขั้นต้นของกลีบดอก เช่น ล่อแมลง ผสมเกสร และผู้ช่วยผสม เป็นต้น และช่วงนี้การผลิตเอทิลีนเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นการช่วยผลักดันกระบวนการชราภาพให้เข้าไปถึงระยะสุดท้ายที่จะนำไปสู่การยุบตัวของชั้นเซลล์อีพิเดอมิส และปรากฏการณ์การชราภาพให้เห็น (Bailey *et al.*, 2001) การเกิดกระบวนการชราภาพของดอกไม้มักจะพบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นหลัก ๆ ได้หลายอย่างดังนี้คือ

1. การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา

การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาในช่วงการชราภาพมีหลายอาการที่เกิดขึ้นกับดอกไม้ เช่น อัตราการหายใจและปริมาณแซคคาไรด์ลดลง เป็นต้น การหายใจเป็นลักษณะที่เปลี่ยนแปลงชัดเจน โดยเฉพาะกับพืชในกลุ่มไคลแมคเทอริค ที่พบว่าปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ และการสูญเสียน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น พืชมีความไวต่อเอทิลีนและผลิตเอทิลีนเพิ่มขึ้นในช่วงที่มีการหายใจสูงขึ้น โดยขึ้นกับแต่ละชนิดพืช (Nooden, 2004) การเคลื่อนย้ายของสารประกอบไนโตรเจน และน้ำตาลออกจากเซลล์ เป็นตัวบ่งชี้ได้ว่าพืชกำลังเข้าสู่การชราภาพ โดยเซลล์จะส่งคาร์โบไฮเดรตออกไปในรูปของน้ำตาล และสารประกอบไนโตรเจนในรูปของ amides, glutamine และ asparagines (Wagstaff *et al.*, 2003) ในขณะเดียวกันสารโมเลกุลใหญ่ถูกสลายให้เป็นโมเลกุลเล็ก เนื่องจากมีเอนไซม์กลุ่มไฮโดรไลติกหลายชนิดเพิ่มขึ้นในช่วงนี้ มีผลให้เกิดการเคลื่อนย้ายแร่ธาตุไนโตรเจน และแร่ธาตุชนิดอื่นๆ ออกจากดอกไปยังเนื้อเยื่อส่วนอื่นที่ยังไม่ชราภาพ ทำให้โครงสร้างเซลล์กลีบดอกเปลี่ยนแปลงไป มีการสูญเสียน้ำหนักแห้ง ขนาดของเมดเปลล์ลดลง

ปริมาณแป้งจึงลดลงตามไปด้วย จากการศึกษาในคาร์เนชั่น พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ เบต้ากลูโคซิเดส (β -glucosidase) และเบต้ากาแลคโตซิเดส (β -galactosidase) เพิ่มขึ้น และมีการสูญเสียคาร์โบไฮเดรตออกจากกลีบดอก (Woodson, 1994) ส่วนในดอกกลีดิพบว่าหลังดอกบานมีการส่งวัตถุดิบออกจากแหล่งผลิตไปยังแหล่งที่ใช้ เช่น คาร์โบไฮเดรต และกรดอะมิโนถูกส่งออกไปเรื่อยๆ เป็นเวลายาวนานหลังดอกเหี่ยว ในส่วนของแร่ธาตุอาหารที่มีการสูญเสียไปด้วย พบว่าการเกิดการชราภาพของกลีบดอกจะเกิดขึ้นพร้อมกับการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่ม hydrolytic หลายชนิด เชื่อว่าทำให้โมเลกุลขนาดใหญ่ถูกย่อยสลายลง แล้วตามมาด้วยการส่งแร่ธาตุอาหารออกจากกลีบดอก ไปยังรังไข่ที่กำลังพัฒนา (Bieleski, 1995)

2. การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี

เป็นการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบภายในเซลล์ช่วงการชราภาพมีการเปลี่ยนแปลงหลายรูปแบบ ดังนี้คือ

2.1 การเปลี่ยนแปลงสารสี การวัดการเปลี่ยนแปลงภายในพลาสติด ซึ่งเป็นการเปลี่ยนสี มีการเปลี่ยนแปลงของคลอโรพลาสต์ไปเป็นโครโมพลาสต์ และคลอโรพลาสต์จะมีการสูญเสียปริมาณโปรตีนและสารคลอโรฟิลล์ ในดอกไม้มีการเปลี่ยนสีของกลีบดอก สามารถใช้ป็นสิ่งชี้บอกได้ถึงเกิดการชราภาพ จะเห็นได้ชัดเจนในดอกไม้ที่มีการสะสมสารสีแอนโทไซยานินในแวคคิวโอล ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงในบริเวณนี้จะเป็นสิ่งที่บ่งบอกล่วงหน้าก่อนการเกิดการชราภาพ อาจเกิดขึ้นก่อนหรือเกิดขึ้นพร้อมกันกับการสีบพันธุ์ สีกลีบดอกซีดลง ซึ่งจะบอกได้ว่ากาพัฒนา กำลังจะสิ้นสุดลง (Thomas *et al.*, 2003) นอกจากนี้คลอโรฟิลล์จะถูกย่อยสลายด้วย หลังจากที่มีคลีอื่นแยกออกไปแล้ว

2.2 การเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มเซลล์ แบ่งย่อยได้ 2 แบบ คือ

2.2.1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างกลีบดอก และชีวกายภาพของเยื่อหุ้ม โดยทั่วไป การมีชีวิตของเซลล์สิ่งมีชีวิต จะขึ้นกับความสามารถของเซลล์ที่เป็นตัวกำหนดโดยใช้ปริมาณอาหาร การเลือกขนส่งอาหาร และเลือกเก็บอาหารไว้ที่โครงสร้างใด และเยื่อหุ้มเซลล์มีหน้าที่ต้องรักษาสภาพการเก็บนี้ไว้ได้ แต่ถ้าเกิดการชราภาพ ประสิทธิภาพของเยื่อหุ้มเซลล์จะลดลง ทำให้เกิดการรั่วไหลของสารต่างๆ ออกจะเซลล์ หรือไหลจากข้างนอกเข้าสู่เซลล์ได้ เช่นในกลีบดอก ผักบุ้งฝรั่ง การชราภาพสังเกตได้จากเยื่อหุ้มแวคคิวโอลภายในเซลล์ในส่วน of cytosolic ที่ชั้นของ

cytoplasm บางลงและแวกคิวโกลขยายตัวเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการสูญเสียสภาพของเซลล์ เกิดการไหลเข้าออกของแร่ธาตุอาหารภายในเซลล์เกิดขึ้น (Phyllips and Kende, 1980; Matile and Winkenbach, 1971) ในกลีบดอกคาร์เนชั่น พบว่ามีฟองอากาศในแวกคิวโกลและ cytosolic เกิดขึ้นก่อนที่จะชราภาพ เนื่องมาจากฮอร์โมนเอทิลีน และในไซโตพลาสซึมมีตะกอนเกิดขึ้น จากนั้นเยื่อหุ้มจะบวมขึ้น และแตกออก ทำให้ไซโตพลาสซึมที่แตกทับถมกันอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ (Smith *et al.*, 1992) ในดอกกลีดี พบว่ามีเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมบางลง และเยื่อหุ้มแวกคิวโกลที่เซลล์พื้นผิวแตก เกิดการรั่วไหลของสาร (Stead and van Doorn, 1994) นอกจากนี้ยังพบว่าการชราภาพของกลีบดอก Iris มีการรวมตัวกันของแวกคิวโกลขนาดเล็ก และชั้นของไซโตพลาสซึมเสื่อมลงมีผนังเซลล์พอง เซลล์มีไซฟิลล์เริ่มยุบตัว และไม่พบเยื่อหุ้มของ cytosolic (van Doorn *et al.*, 2003)

2.2.2 การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและ โมเลกุลของเยื่อหุ้ม ถ้ามีการวัดทางกายภาพ และชีวเคมีของเยื่อหุ้มจะพบว่ามีเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นก่อนที่จะมีแร่ธาตุรั่วไหลออก การเปลี่ยนรูปร่าง และลักษณะเหล่านี้จะเกิดขึ้นก่อนการชราภาพ เช่นในดอกคาร์เนชั่น จะมีการแยกตัวของไขมันที่บริเวณเยื่อหุ้ม (Faragher *et al.*, 1987) ส่วนในดอกกุหลาบมีการสูญเสียน้ำในเซลล์ หลังการชราภาพ เยื่อหุ้มมีการเคลื่อนย้ายสารผิดปกติไป ทำให้การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เยื่อหุ้มจะเกี่ยวข้องกับ phospholipid และการเพิ่ม neutral lipid ทำให้การเปลี่ยนรูปได้ของเยื่อหุ้มมีประสิทธิภาพลดลงอย่างมาก (Paliyath and Droillard, 1992) การควบคุมเอนไซม์ที่ตอบสนองต่อการสังเคราะห์ phospholipid ลดลง ในขณะที่มีการเพิ่มเอนไซม์ hydrolytic ที่อาจเป็นสาเหตุให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย ดังตัวอย่างในกล้วยไม้ 2 ชนิด พบว่าเกิด lipid peroxidation อาจมีผลมาจากเอนไซม์ lipoxigenase (LOX) ของกระบวนการสูญเสียสภาพเยื่อหุ้ม นอกจากนี้ยังเกิด reactive oxidation species (ROS) ที่เป็นผลพลอยได้ของ LOX ซึ่ง ROS ก็เป็นสารหนึ่งที่มีผลต่อการตายของกลีบดอกได้ และจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วงชราภาพ จากการศึกษาพบในดอกคาร์เนชั่น และกลีดี (Porat *et al.*, 1995) นอกจากนี้ทั้งในดอกกล้วยไม้และคาร์เนชั่น ยังพบอีกว่ามี peroxisome เพิ่มขึ้นในช่วงชราภาพ ซึ่งเป็นออร์แกเนลล์ที่บริเวณไขมันถูกทำลาย และเป็นบริเวณที่สามารถผลิต H_2O_2 ได้ โดยสาร 2 ชนิดนี้เป็นตัวกระตุ้นให้เกิด PCD ได้เช่นกัน (Bernard, 2000)

2.3 การเปลี่ยนแปลงโปรตีน และกรดนิวคลีอิกในดอกไม้ ค่าความเป็นกรดต่าง มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โปรติเอสที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบในแวกคิวโกล (Matile *et al.*, 1999) การชราภาพเกี่ยวข้องกับหลายอย่าง ดังเช่นพบว่ามี การสูญเสียโปรตีนที่เกิดจากการทำงานที่ผิดปกติของเอนไซม์ protease (Bernard, 2000) รวมถึงกรดนิวคลีอิก แร่ธาตุอาหาร

(Thomas *et al.*, 2003) และไซมัน (Leverentz *et al.*, 2002) ในดอกไม้ที่ชราภาพ บริเวณกลีบดอก จะมีความล้มเหลวในการผลิตโปรตีน มีเอนไซม์ protease เพิ่มขึ้นและมีการสังเคราะห์โปรตีน ชนิดใหม่เพิ่มเข้ามาแทนที่ นอกจากนี้ยังเพิ่มการสังเคราะห์เอนไซม์ cysteine protease ที่เป็น เอนไซม์สำคัญในการย่อยสลายโปรตีนในดอกคาร์เนชั่น (Michelle *et al.*, 1995) นอกจากนี้ยัง เกี่ยวข้องกับ ubiquitin proteasome ที่เป็นระบบหลักของ cytoplasmic proteolytic ทำให้การสร้าง โปรตีนล้มเหลวในการที่จะเปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโน นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์นิวคลีเอสเพิ่ม มากขึ้น ดังเช่น ในดอกผักบุงฝรั่ง (Leshem *et al.*, 1986; Panavas and Rubinstein, 1998) ในดอกบานชื่น ให้เกิดการตายของเซลล์ ในช่วงชราภาพเซลล์มีการปลดปล่อยเอนไซม์ไฮโดรเลส จากเวคคิวโอ ลอกไปล้อมรอบ พลาสติด (Fukada, 1996) ขณะที่ดอก Sandersonia ช่วงชราภาพมีการ เปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีเกิดขึ้น เช่น การสูญเสียคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และมีการสังเคราะห์ เอนไซม์ asparagine syntase เพิ่มขึ้นจากปกติ (Eason *et al.*, 1997) จากการศึกษาใน *Alstroemeria* และคาร์เนชั่น พบว่า ภายในกลีบดอกที่อยู่ในช่วงชราภาพ โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ จะมี ปริมาณลดลง แต่จะมีโปรตีนโมเลกุลขนาดเล็กเพิ่มขึ้น เนื่องจากโปรตีนขนาดใหญ่ถูกย่อยให้เป็น หน่วยเล็กๆลง (Mayak *et al.*, 1998; Bielecki, 1995) เมื่อเกิดการชราภาพพืชจะผลิตเอนไซม์นิวคลีเอ สมามาก นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ที่เป็นตัวการในการเปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรตโพลีเมอร์อีกด้วย ซึ่ง เป็นผลมาจากเกิดการเสื่อมสภาพของ DNA ในนิวคลีียส (Bernard, 2000) ทำให้โครงสร้างเซลล์ กลีบดอกเปลี่ยนแปลงไป และสูญเสียน้ำหนักแห้ง ขนาดของเม็ดแป้งลดลง ปริมาณของแป้งก็ลดลง ด้วย เช่น ดอกคาร์เนชั่นพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase และ β -galactosidase เพิ่มขึ้น มี การสูญเสียคาร์โบไฮเดรตในกลีบดอก (Woodson, 1994) สำหรับในดอกกลีลลี่ หลังจากที่ยอดบาน แล้วจะส่งวัตถุดิบออกจากแหล่งที่ผลิตไปยังแหล่งที่ใช้ คาร์โบไฮเดรต และกรดอะมิโน จะถูก ส่งออกไปเรื่อยๆ เป็นเวลายาวนานหลังดอกเหี่ยว (Bielecki, 1995) การเคลื่อนย้ายของสารประกอบ ไนโตรเจนและน้ำตาลออกจากเซลล์ เป็นตัวบ่งชี้ได้ดีว่าพืชกำลังเข้าสู่การชราภาพ โดยเซลล์จะส่ง คาร์โบไฮเดรตออกมาในรูปของน้ำตาลและสารประกอบไนโตรเจนในรูปของ amides, asparagines และ glutamine (Wagstaff *et al.*, 2003)

2.4 การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ หรือทางกายวิภาคในระดับเซลล์ การเกิดชราภาพ พบว่าเซลล์มีไซโทพลาสซึมเสื่อมสภาพ และเกิดขึ้นก่อนที่จะแสดงอาการภายนอกให้เห็น ด้วยตาเปล่า เช่นในดอก *Alstroemeria* บริเวณชั้นเซลล์มีไซโทพลาสซึมของกลีบดอก ถูกย่อยสลายตัว อย่างสมบูรณ์ในช่วงที่ยอดบาน ขณะที่มีการขยายตัวที่ผิวกลีบดอกจนกระทั่งถึงชั้นอพิเดอมิส ในช่วงหลังการชราภาพ (Wagstaff *et al.*, 2003) อาการเหล่านี้เกิดขึ้นคล้ายกัน ในดอก *Hemerocallis* และ *Iris* (Stead and van Doorn, 1994; Bailly *et al.*, 2001) ในกลีบดอกของ *Sandersonia* จะเกิด

ช่องว่างระหว่างเซลล์มีไซฟิลล์ อาจเนื่องมาจากกลีบดอกขยายตัวหรือเรียกว่าเซลล์ขยายตัวแต่ไม่ได้เกิดจากการแบ่งเซลล์ (O'Donoghue *et al.*, 2002) ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงขนาดของแวคคิวโอลภายในเซลล์ที่เป็นกระบวนการทางชีวเคมี และมีนัยสำคัญของอาการที่เกิดขึ้นก่อนการแสดงอาการชราภาพในกลีบดอกไม้ที่เห็นได้ด้วยตา โดยแวคคิวโอลมักจะมีบทบาทสำคัญในเซลล์ บทบาทของแวคคิวโอลที่พบ 3 อย่างคือ 1) แวคคิวโอล แสดงการถูกทำลายได้จากภาวะเครียดที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิต 2) แวคคิวโอลจะสะสมสารจากการสันดาปของการทำงานในกระบวนการอื่นๆ ไว้ และ 3) แวคคิวโอลจะเสื่อมสภาพเมื่อเกิดการชราภาพ ซึ่งเกิดขึ้นโดยอัตโนมัติ ทำให้มีผลต่อการตายของเซลล์

ยีนที่สัมพันธ์กับ PCD

ยีนที่ควบคุมการชราภาพในพืช มีการทำงานหรือสังเคราะห์เอนไซม์ต่าง ๆ ขึ้นมาในช่วงการชราภาพ ซึ่ง ส่งผลให้พืชเกิดการชราภาพและแสดงออกให้เห็นได้ด้วยตาเปล่าในรูปการเปลี่ยนแปลงสภาพของดอกภายนอก โครงสร้างเซลล์เปลี่ยน และมีการตายของเซลล์จำนวนมากเกิดขึ้น (van Doorn, 2005)

การเกิดการชราภาพในพืชเป็นการเปลี่ยนแปลงทั้งสารประกอบภายในและลักษณะภายนอกที่สามารถมองเห็นได้ แต่การเปลี่ยนแปลงซึ่งทั้งหมดนี้ ต้องเกี่ยวกับการทำงานของยีน ซึ่งส่งผลต่อการย่อยสลายโปรตีน คลอโรฟิล กรดนิวคลีอิก และไขมัน รวมถึงบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายแร่ธาตุอาหาร ยีนที่เกี่ยวข้องสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม คือ 1) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสาร โมเลกุลขนาดใหญ่ ได้แก่ การโปรตีน กรดนิวคลีอิก และกรดไขมัน 2) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายแร่ธาตุอาหาร 3) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวเองของพืชในระหว่างการย่อยสลายโมเลกุลขนาดใหญ่ในระยะการชราภาพของพืช และ 4) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการทั้งหมด (จริงแท้, 2549) เช่นยีน DAD-1 (Wagstaff *et al.*, 2003) รวมถึงหลายๆ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายสารมากกว่ายีนที่กำหนดให้แสดงออกให้เห็นด้วยตา เช่น ยีนที่กำหนดให้มีการสังเคราะห์ asparagine synthetase และ protease (Eason *et al.*, 2000 and Wagstaff *et al.*, 2003) และยีนที่เป็นตัวทำให้ไขมันเสื่อมสภาพลง เช่น malate synthetase และ isocitrate lyase (Graham *et al.*, 1994) การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ส่งผลให้เกิดการชราภาพที่มองเห็นได้ในรูปของเซลล์ที่มีการตายของเซลล์จำนวนมากเกิดขึ้น (van Doorn, 2004) โดยยีนจะกำหนดการทำงานของเอนไซม์ในช่วงชราภาพ ให้มีการสะสมไว้ที่เยื่อหุ้ม vesicle พิเศษ เช่น ricinosome และ aleurain ที่ถูกเก็บไว้ใน

แวกคิวโอล (Gietl *et al.*, 2000) เมื่อแวกคิวโอลแตกออกและปล่อย protease ออกมาในระยะสุดท้ายส่งผลให้เซลล์เสื่อมสภาพไป (Eason *et al.*, 2002)

ความสัมพันธ์ระหว่างฮอร์โมนกับการเกิด PCD

เอทิลีน

สัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการชราภาพ ประกอบด้วยฮอร์โมนและสภาพแวดล้อม สำหรับฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องประกอบไปด้วยเอทิลีน กรดแอบซิวซิก และออกซิน สำหรับเอทิลีนนั้น ทำให้เกิดการชราภาพได้โดยการเพิ่มขึ้นของเอทิลีน หรือสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้อง และสภาพแวดล้อมช่วยกระตุ้นให้เพิ่มการทำงานของฮอร์โมนมากขึ้น (Borochoy and Woodson, 1989 and Bernard, 2000)

การเสื่อมสภาพของกลีบดอกไม้ของพืช 93 ชนิด ใน 22 วงศ์ สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มคือ 1) การเหี่ยวเนื่องจากเอทิลีนเป็นสื่อ 2) การเหี่ยวที่ไม่ใช่ เกิดจากเอทิลีน และ 3) การหลุดร่วงที่มีเอทิลีนเป็นสื่อ ซึ่งการเกิดในชนิดที่ 1 และ 3 ของการชราภาพของกลีบดอกไม้มักเกิดจากเอทิลีนจากภายนอก (Woltering and van Doorn, 1988) เอทิลีนเป็นฮอร์โมนพืชชนิดเดียวที่เป็นแก๊สแพร่ไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืชได้ง่าย แรงอัตราการชราภาพของพืชหรือส่วนต่างๆของพืช เนื่องจากเอทิลีนสามารถกระตุ้นเนื้อเยื่อทุกชนิดให้มีอัตราการหายใจสูงขึ้นได้ เร่งให้ดอกไม้เหี่ยวเร็วกว่าปกติ เอทิลีนจัดเป็นสารที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ ทั้งพืชและจุลินทรีย์สามารถผลิตขึ้นได้ นอกจากนี้ยังเกิดขึ้นได้จากการสันดาปที่ไม่สมบูรณ์ของเครื่องยนต์ สารตั้งต้นในการสังเคราะห์เอทิลีนคือ เมไทโอนีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่พืชสังเคราะห์ได้เองจากกรดอินทรีย์ที่มีอยู่ในเซลล์ จากนั้นเมไทโอนีนจึงถูกเปลี่ยนไปเป็น S-adenosyl methionine (SAM) แล้วจึงเปลี่ยนต่อไปเป็น 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) ด้วยการกระตุ้นของเอนไซม์ ACC synthase แล้วเปลี่ยนต่อไปเป็นเอทิลีนด้วยเอนไซม์ ACC oxidase (ACO) โดยเอนไซม์ ACO จะมีอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มแวกคิวโอล การเกิดเอทิลีนนั้น ส่งผลให้พืชเกิดการชราภาพได้ เอทิลีนไม่ได้มีผลต่อพืชโดยตรง แต่ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้น โดยไปรวมตัวกับ โมเลกุลของตัวรับ (receptor) และโมเลกุลนั้นจึงส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลง เนื้อเยื่อพืชที่อยู่ในช่วงพัฒนาทางด้านกิ่งใบจะตอบสนองต่อความเข้มข้นที่ระดับประมาณ 0.01 ppm และแตกต่างกันไปตามเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิด แต่อย่างไรก็ตามการทำงานของเอทิลีน คงจะต้องเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน (gene expression) และการสังเคราะห์โปรตีนด้วย (จริงแท้, 2538) เอทิลีนเป็นสารที่มีบทบาทควบคุมการชราภาพของไม้ตัดดอกมากที่สุด โดยเฉพาะกับดอกไม้ที่ตอบสนองไว พบว่าดอกไม้พวกนี้จะผลิต

เอทิลีนเพิ่มขึ้นในช่วงชราภาพ และเมื่อรวมกับเอทิลีนจากภายนอก ซึ่งเป็นสาเหตุที่กระตุ้นให้มีการสร้างเอทิลีนภายในดอกเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการชราภาพได้ (Reid and Wu, 1992)

เอทิลีนที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ สามารถชักนำการเกิดชราภาพสำหรับดอกไม้ ในวงศ์ Caryophyllaceae, Leguminosaceae และ Orchidaceae หรือการชราภาพที่ชักนำโดยการผสมเกสรมีส่วนเกี่ยวข้องกับ climacteric rise ของการหายใจ โดยเพิ่มการผลิตเอทิลีน สารยับยั้งเอทิลีนมีผลยับยั้งการชราภาพได้ดี ในพืชกลุ่มนี้ แต่ในดอกไม้บางชนิดที่ไม่ตอบสนองต่อเอทิลีนจากภายนอกมีการผลิตเอทิลีนจากภายในน้อย และสารยับยั้งเอทิลีนไม่มีผลต่อการตอบสนองของพืชต่อเอทิลีนดอกไม้พวกนี้จัดเป็นกลุ่มที่ไม่ตอบสนองต่อเอทิลีน เช่น ลิลลี่ (Lukaszewski and Reid, 1989; Lay-Yee *et al.*, 1992 and Nooden, 2004)

สารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน เช่น ซิลเวอร์ไรโอซัลเฟต และคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้นสามารถชะลอการชราภาพไม้ออกหลายชนิดได้ เช่น คาร์เนชั่น (van Altvost and Bovy, 1995) ซิลเวอร์ไรโอซัลเฟตสามารถยืดอายุการปักแจกันในคาร์เนชั่น และใช้เป็นสารเคมีกับกลุ่มดอกไม้ทางการค้าที่ตอบสนองไวต่อเอทิลีน (Veen and van de Geijm, 1978) นอกจากนี้ยังมีสารอื่นๆ อีก เช่น Ag^+ , 2,5-norbornadiene (NBD) เป็นต้น (Beyer, 1976 and Sisler *et al.*, 1983) แต่ปัจจุบันสารที่นิยมใช้คือ 1-methylcyclopropene (1-MCP) โดย 1-MCP จะยับยั้งไม่ให้เอทิลีนสามารถจับกับตัวรับเอทิลีน มีผลให้เอทิลีนทำงานไม่ได้ (Sisler *et al.*, 1996) นอกจากนี้ 1-MCP ยังป้องกันผลกระทบจากเอทิลีนที่สร้างภายใน ได้มีการยืนยันไว้กับงานวิจัยคาร์เนชั่น ลิลลี่ และ พิทูเนีย (Serek *et al.*, 1995c; Serek *et al.*, 1996; Celikel *et al.*, 2002)

กรดแอบไซซิก (ABA)

ในดอกไม้บางชนิด เช่นกุหลาบและคาร์เนชั่น ซึ่งเป็นดอกไม้ที่ไวต่อเอทิลีน ถ้าได้รับ ABA มีผลกระตุ้นการสังเคราะห์เอทิลีนเพิ่มสูงขึ้นเร็วกว่าปกติ และการถูกกระตุ้นนี้ ลดลงได้เมื่อดอกไม้ได้รับสารยับยั้งการจับเอทิลีนและตัวรับเอทิลีน สำหรับดอกไม้บางชนิดที่ไม่ไวต่อ เอทิลีน เช่น ดอก daylily มีปริมาณ ABA เพิ่มมากขึ้นในช่วงการชราภาพ และเมื่อให้ ABA จากภายนอกสามารถกระตุ้นกระบวนการชราภาพได้ (จริงแท้, 2549) ในงานวิจัยด้านการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์นิวคลีเอสและการแตกหักของ DNA ในกลีบดอก daylily เพื่อศึกษากระบวนการเกิด PCD พบว่าเอนไซม์นิวคลีเอสและการแตกหักของ DNA เกิดขึ้นตั้งแต่ก่อนดอกบาน และกิจกรรมของนิวคลีเอสเกิดขึ้นได้ก่อนที่ดอกไม้จะบานเต็มที่ มีผลให้ดอกไม้ชราภาพเร็วขึ้นได้หลังจากที่มีการให้ ABA

จากภายนอก และสามารถลดการชราภาพให้ช้าลงได้โดยการใช้สาร CHI (Cycloheximide) (Panavas *et al.*, 2000)

ออกซิน

ในความสัมพันธ์ของออกซินกับการชราภาพในไม้ดอกไม้ประดับจำนวนมาก ดอกคาร์เนชั่นเมื่อได้รับออกซินจะกระตุ้นการสร้างเอทิลีนมากขึ้น การชราภาพเกิดมากขึ้นตาม แต่ถ้าให้ความเข้มข้นสูงขึ้นจะให้ผลตรงข้ามกัน นอกจากนี้ออกซินมีผลต่อการชะลอกระบวนการชราภาพและดอกหลุดร่วงในต้นคริสต์มาสได้ และปริมาณความเข้มข้นของออกซินภายในกลีบดอกลดลงระหว่างการชราภาพด้วย (จริงแท้, 2549)

การควบคุมกระบวนการเกิด PCD

ในพืชทุกชนิดที่มีการควบคุมการชราภาพโดยเอทิลีนเป็นหลักนั้น เอทิลีนอาจจะเป็นอิสระกับสัญญาณที่แสดงออกก็ได้ และสิ่งที่เป็นไปได้อีกอย่างหนึ่งของการเกิดชราภาพและ PCD อาจจะถูกควบคุมด้วย post-transcription ที่มีการกล่าวอ้างถึงบ่อยครั้ง (Thomas *et al.*, 2003) บางทีเป็นแบบเครือข่ายของทั้ง transcription และ post-transcription ควบคุมเป็นหนึ่งเดียว (Rien *et al.*, 2003) สัญญาณเริ่มต้น ในการรับและการส่งผ่านจะมีความแตกต่างกัน ดังที่พบบ่อย ๆ ในกลีบดอกไม้ที่ขอบของกลีบดอกจะมีการเปลี่ยนแปลงก่อนถึงตรงกลาง และเมื่อส่องกล้องดูจากภาพตัดขวางของกลีบดอกที่กำลังพัฒนา แสดงให้เห็นว่าขณะที่เซลล์อพิเดอมิสยังคงทำงานเป็นปกติ แต่เซลล์มิโซฟิลล์ได้มีการเปลี่ยนแปลงไปมากแล้วก่อนที่จะดอกจะบานเต็มที่ (Wagstaff *et al.*, 2003) และนอกจากเอทิลีนไม่เพียงแต่เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่กระตุ้นการเกิดกระบวนการ PCD ในดอกไม้แล้ว บางครั้งเชื่อมต่อกับสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นๆ ด้วย เช่น จิบเบออลิสิกแอซิด และไซโตไคนิน เป็นต้น (Cheung and Wu, 2000)

การเกิด PCD สามารถเกิดขึ้นได้ทุกแห่ง โดยเซลล์ที่จะเกิด PCD เริ่มแรกมีเวคคิวโอลขยายใหญ่ขึ้น จนกระทั่งชั้นของไซโตพลาสซึมบางลง ซึ่งเกิดขึ้นพร้อมกับการแปรปรวนของออร์แกเนลล์ที่อยู่ในนั้น แต่จะไม่ปรากฏให้เห็นจนกว่าโครงสร้างของ cytoplasm จะแตกออก กระบวนการนี้เกิดขึ้นได้โดยยังไม่มี การรวมตัวกันของ endoplasmic reticulum กับ ribosome ต่อจากนั้น mitochondria และนิวเคลียสจะเป็นออร์แกเนลล์สุดท้ายที่จะถูกทำลายไป มีการยุบตัวของเยื่อหุ้มเวคคิวโอลและเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งการเกิดลักษณะแต่ละอย่างของ PCD ในพืชนั้นขึ้นกับ

พันธุ์แต่ละพันธุ์ และแต่ละชนิดพืชด้วยเช่นกัน เป็นไปได้ว่า reactive oxygen species (ROS) มีส่วนเกี่ยวข้องกับ PCD ภายในพืช และเป็นผลผลิตที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของยีน ที่ก่อให้เกิดสาร H_2O_2 สามารถทำให้เกิด PCD ได้ แต่ทั้งนี้ในความแตกต่างของลักษณะเซลล์พืช เอทิลีนมีผลต่อการกระตุ้นเช่นกัน โดยเอทิลีนอาจไปกระตุ้นให้เกิดการรั่วไหลของ Ca^{2+} ทำให้มีผลต่อกระบวนการ protein phosphorylation นอกจากนี้เอทิลีนอาจไม่ใช่สาเหตุเดียว เพราะเอทิลีนต้องทำงานร่วมกับสัญญาณโมเลกุลอื่นที่ควบคุม PCD ด้วยเช่นเดียวกัน ดังเช่น GA ก็สามารถกระตุ้น PCD ได้ และเนื่องจากเอทิลีน และ GA มีผลกระทบต่อหลาย ๆ กระบวนการ ที่สามารถมีผลกระทบต่อเนื้อเยื่อร่วมกับไซโคไคนิน และ ABA เหมือนกันกับฮอร์โมนอื่น ๆ เป็นตัวร่วมกำหนด PCD ในพืช โดยไม่รู้แน่นอนว่าพืชตายอย่างไร แต่พบว่าเกี่ยวข้องกับ H_2O_2 หรือ โมเลกุลอื่นที่ก่อให้เกิด PCD และสะสมไว้เพียงอย่างเดียวในเซลล์นั้นที่เป็นสิ่งที่จะต้องนำไปสู่การตาย อีกสิ่งที่เป็นไปได้คือรูปแบบการแสดงออกของเอนไซม์ catalase และ peroxidase ที่กำหนดระดับภายในเซลล์ มีการควบคุมการเกิด H_2O_2 และป้องกัน PCD ในเซลล์ที่มีชีวิต นอกจากนี้ความเป็นไปได้อีกอย่างหนึ่งคือบางเซลล์พืชที่ขอบลักษณะภายใต้สภาพ PCD มากกว่าสิ่งอื่น และระบบที่เกิดขึ้นสมบูรณ์ในพืชนั้นทำให้เซลล์เกิดความต้องการที่จะเข้าสู่สภาพนี้โดยเฉพาะภายใต้การกระทำของ PCD และเป็นไปได้ว่ามีความเหมือนหรือสัมพันธ์กับการยับยั้งการทำงานของ oligosaccharide ของ PCD ในเซลล์พืช อาจมีการส่งเสริมให้มีการแข่งขันระหว่างเซลล์ และปรับจำนวนเซลล์ในกลไกนั้น ที่แสดงให้เห็นได้จากการแบ่งเซลล์ การแข่งขันสำหรับสัญญาณยับยั้งเซลล์ที่ตายสามารถนำไปสู่การคัดเลือกของเซลล์นั้นได้ ดังนั้นถ้าจะมีการควบคุม PCD ให้เกิดหรือไม่ให้เกิดขึ้นจะต้องพิจารณาลึกลงไปเป็นองค์ประกอบด้วย (van Doorn, 2005)

วิธีการศึกษา PCD ระหว่างการชราภาพของดอกไม้

การศึกษาระบวนการ PCD ที่สัมพันธ์กับระยะการเกิดการชราภาพของพืชแหล่งที่เกิดในระดับโมเลกุล และชนิดของโครงสร้างที่เสื่อมลง ขอบเขตเหล่านี้จะช่วยให้ทราบสัญญาณบางอย่างได้ก่อนการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน มีสัญญาณ 2 อย่างที่แสดงออกให้รู้ว่าเกิด PCD ในช่วงใดของการชราภาพนั้น คือลักษณะการเกิดการย่อยสลาย DNA ที่สามารถตรวจสอบได้บน agarose gel และการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคที่ระดับเซลล์และออร์แกเนลล์ โดยใช้วิธี transmission electron microscopy (TEM) ในการตรวจสอบ

การศึกษา PCD ในกลีบดอก *Alstroemeria* ซึ่งประกอบไปด้วยวิธีทางโมเลกุล โครงสร้าง และสรีรวิทยา แล้วนำผลการศึกษาที่ได้มานำเสนอเป็นผลงานรวมกันในระบบการทำงานของ PCD

ซึ่งใช้การจำลองรูปแบบ สำหรับการชราภาพของดอก *Alstroemeria* และผลที่ได้สอดคล้องกัน ระหว่างการเปลี่ยนแปลงการเชื่อมลงของเชื้อหุ้มและเครื่องหมายที่แสดงออก (gene maker) ใน อีกรงานทดลองหนึ่งกับ *Alstroemeria* คือการศึกษา PCD ที่เกิดขึ้นกับกลีบดอกใช้วิธี Light microscopy (LM) TEM และ electron microscopy (EM) (Wagstaff, *et al.* 2003) ซึ่งทั้ง LM และ EM เป็นการศึกษากายวิภาคของเซลล์ และ TEM ใช้ศึกษาทางเซลล์วิทยา เพื่อใช้ประกอบการยืนยัน ผลการเกิด PCD ในพืชพบว่าภายในเซลล์ บางชั้นเซลล์มีการฉีกขาด แสดงถึงภาวะการเสื่อมสภาพ ของเซลล์ นอกจากนี้ออร์แกเนลล์บางชนิดมีการสูญหายไปจากเซลล์ บางชนิดก็มีการเปลี่ยนแปลง ลักษณะรูปร่างไปจากเดิมในดอกไม้ปกติ

ในทางเซลล์วิทยานั้น Borora *et al.* (2000) ได้รายงานการตรวจสอบของโครงสร้างภายใน เซลล์ที่เปลี่ยนแปลง การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี และพันธุกรรมของพืช สามารถทำให้รู้ว่ามี การเปลี่ยนแปลงของโครโรพลาสต์ไปเป็น โคลโมพลาสต์ในช่วงที่พืชมีการพัฒนาจนกระทั่งเกิด การชราภาพได้ ดังนั้นการศึกษการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้นในช่วงผลไม้แก่มีสีเขียวเข้ม และผลสุก ซึ่งมีสีเหลืองและแดงส้มของ *Arum italicum* Miller โดยใช้วิธีตรวจดูความแปรปรวน โครงสร้าง ของแคโรทีนอยด์และภายในพลาสติด ด้วยวิธีการใช้ TEM เพื่อศึกษาแต่ละระยะการพัฒนาสีที่มี ลักษณะเฉพาะของชนิดพลาสติด ตามด้วยการศึกษาความผิดปกติไปตามลำดับที่เปลี่ยนแปลงจาก amyloplast ไปเป็น chloroplast จนถึง chromoplast ในส่วนของแคโรทีนอยด์และสารตั้งต้นของ แคโรทีนอยด์ การตรวจสอบโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ของใบอ่อนและใบแก่โดยใช้ TEM พบว่าใบแก่มีเซลล์มีไซฟิลล์ อีพิเดอมิส และแวคคิวโอล แข็งแรง ส่วนออแกเนลล์ภายใน เซลล์จะอยู่ในตำแหน่งที่ใกล้กับผนังเซลล์ แต่ใบอ่อนที่สุดมีคลอโรพลาสต์ขนาดใหญ่ เม็ดแป้งมี ขนาดใหญ่ และมีปริมาณ grana มาก แต่มี plastoglobule ขนาดเล็ก และยังไม่พบไมโทคอนเดรีย ภายในนิวเคลียสมียูโครมาตินกระจายตัว เป็นต้น ส่วนใบแก่ที่สุดมีเม็ดแป้งน้อย แต่มีคลอโรพลาสต์ มาก และ ขนาดใหญ่กว่าใบอ่อน มี plastoglobule มาก และมียูโครมาตินขดตัวกันแน่น ซึ่งชี้บอถึง ความสัมพันธ์กับการชราภาพและ PCD (Gulewicz, 2004) สิ่งเหล่านี้สามารถพบได้ใน ใบยาสูบที่มี การชราภาพมากเช่นเดียวกัน (Simeonova *et al.*, 2000) ในช่วงที่มีการชราภาพของพืชจะพบว่าจะมี การสูญเสียน้ำจากเซลล์มาก ในบางพืชมีการสูญเสียน้ำและแคลเซียมด้วยซึ่งมีผลต่อความแข็งแรงของ ผนังเซลล์ มีการศึกษาในลินี่เกี่ยวกับการสูญเสียน้ำและแคลเซียมในระหว่างการเกิดชราภาพหลัง การเก็บเกี่ยว โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ pericarp และเปรียบเทียบในแต่ละพันธุ์ และ ศึกษาผลกระทบของแคลเซียมที่ให้กับผลลินี่หลังการเก็บเกี่ยว พบว่า pericarp มีความแตกต่างกัน ระหว่างตำแหน่งเนื้อเยื่อ ส่วนในเซลล์ mesocarp มีไซโตพลาสต์ซึมขดตัว ผนังผิดปกติเกิด

plasmolysisเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายภายใน 2 วันหลังเก็บเกี่ยว เซลล์อิพิเดอมิสและเวคคิวโอลหดตัวแน่นขึ้น ผนังเซลล์มีครูปทรงไป (Huang *et al.*, 2005)

การตรวจสอบ PCD ในพืช โดยใช้ลักษณะการเกิด DNA fragmentation ซึ่ง Yamada *et al.* (2003) ได้รายงานการสกัด DNA จากกลีบดอก และการวิเคราะห์บน agarose gel สามารถบอกถึงการแตกหักของ DNA ที่เกิดขึ้นในกลีบดอกที่ชราภาพ การใช้วิธีทางเซลล์วิทยาของกลีบดอกทำให้ทราบการเปลี่ยนแปลงนิวเคลียสใน PCD การแตกหักของนิวเคลียสในช่วงเซลล์ตาย ที่นำไปสู่การชราภาพของกลีบดอกแกลดิโอลัส ในหน่อไม้ฝรั่งได้มีการตรวจสอบ PCD โดยการตรวจสอบการแตกหัก DNA และการย่อยสลายของนิวเคลียสที่เกิดการชราภาพในช่วงเก็บเกี่ยว ซึ่งพบว่ากระบวนการจำลอง DNA มีความสัมพันธ์ในช่วงเก็บเกี่ยว โดยจะชักนำการชราภาพ ซึ่งตรวจสอบพบนิวเคลียส DNA ถูกตัดและ DNA แตกหัก โดยใช้วิธี terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL), gel electrophoresis และ southern analysis และพบว่าเกิดการแตกหักของ DNA เกิดขึ้นหลังเก็บเกี่ยว พร้อมกับการชราภาพเพิ่มขึ้น และมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา (Eason *et al.*, 2002) กลีบดอกไม้ที่ชราภาพมีการย่อยสลาย DNA ในช่วง PCD และมี DNA แตกหักเพิ่มขึ้น เมื่อดอกไม้บาน สันฐานวิทยาเปลี่ยนไป การเกิด DNA แตกหักจะตามมาด้วย (Orzaez and Granell, 1997) และพบลักษณะเช่นนี้ในกลีบดอกพิทูเนียด้วยเช่นกัน (He and Kermode, 2003)

อุปกรณ์และวิธีการ

ดอกกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) ใช้ในการทดลองได้จากสวนกล้วยไม้ที่ปลูกเป็นการค้า และเป็นเกรดที่ส่งออกต่างประเทศ โดยดอกกล้วยไม้ที่นำมาใช้ในการทดลองนั้น ไม่ได้รับสารใดๆ หลังการเก็บจากสวนมาก่อน พันธุ์ที่ใช้ในการทดลองมี 6 พันธุ์ คือ ลักกี้ดูน (Lucky Duan) (ลูกผสมของมาดามปอมปาดัวร์), มีสทีน (Miss Teen), เรดบอมโจ (Red Bomjo), ซากุระ (Sakura), ทับทิม (Tuptim) และขาวสนาน (Sanan White) ดอกกล้วยไม้ทั้งหมดที่มาจากสวน ถูกบรรจุแบบแห้งในกล่องกระดาษลูกฟูกและขนส่งมายังศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ม.เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ภายในเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง หลังการตัดดอก คัดดอกกล้วยไม้ทั้ง 6 พันธุ์ ที่มีคุณภาพดี มีความสม่ำเสมอของดอก โดยเลือกจากช่อที่มีดอกบานช่อ 4-6 ดอก แซ่โคนก้านช่อดอกในน้ำกลั่นที่บรรจุอยู่ในหลอดแก้วขนาด 5 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ตลอดระยะเวลาทดลอง ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง

1. การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของดอกกล้วยไม้ระหว่างการชราภาพ

1.1 การตอบสนองของดอกและส่วนของดอกกล้วยไม้พันธุ์ลักกี้ดูน มีสทีน เรดบอมโจ ซากุระ ทับทิม และขาวสนาน ที่มีต่อเอทิลีน

เลือกดอกกล้วยไม้ที่มีความสม่ำเสมอ และมีคุณภาพดีจากกล้วยไม้ทั้ง 6 พันธุ์ โดยใช้ก้านช่อดอกเสียบในขวดแก้วบรรจุน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร วางแผนการทดลองแบบ Factorial in completely randomized design มี 2 ปัจจัย คือ พันธุ์ และเอทิลีน มีจำนวน 5 ซ้ำๆ ละ 1 ดอกย่อย

ปัจจัย 1 ได้แก่ ดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 6 พันธุ์ ลักกี้ดูน มีสทีน เรดบอมโจ ซากุระ ทับทิม และ ขาวสนาน

ปัจจัย 2 ได้แก่ เอทิลีนที่ระดับความเข้มข้น 0 0.2 0.4 และ 0.8 $\mu\text{L/L}$ นำดอกกล้วยไม้ไปไว้ในตู้พลาสติกใส และให้เอทิลีนทั้ง 4 ระดับความเข้มข้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 ± 3 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 80% หลังจากนั้นนำดอกกล้วยไม้ทั้งหมดมาไว้ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ตลอดเวลาของการทดลองและทำการเก็บบันทึกผลการทดลองดังต่อไปนี้

1.1.1 ให้คะแนนลักษณะการชราภาพภายนอก ได้แก่ ดอกเหี่ยวหรือดอกตูม สีซีด การเกิดเส้นแวน โดยให้เป็นระดับค่าคะแนน ดังนี้

- 1 คะแนน คือ ลักษณะภายนอกของดอกกล้วยไม้ที่มีการเปลี่ยนแปลงไป 1-10 %
 - 2 คะแนน คือ ลักษณะภายนอกของดอกกล้วยไม้ที่มีการเปลี่ยนแปลงไป 11-25 %
 - 3 คะแนน คือ ลักษณะภายนอกของดอกกล้วยไม้ที่มีการเปลี่ยนแปลงไป 26-40 %
 - 4 คะแนน คือ ลักษณะภายนอกของดอกกล้วยไม้ที่มีการเปลี่ยนแปลงไป 41-55 %
 - 5 คะแนน คือ ลักษณะภายนอกของดอกกล้วยไม้ที่มีการเปลี่ยนแปลงไป 56-70 %
 - 6 คะแนน คือ ลักษณะภายนอกของดอกกล้วยไม้ที่มีการเปลี่ยนแปลงไป 71-85 %
 - 7 คะแนน คือ ลักษณะภายนอกของดอกกล้วยไม้ที่มีการเปลี่ยนแปลงไป >85 %
- ค่าคะแนนที่มากกว่า 4 แสดงถึงการหมดอายุการใช้งานของดอกกล้วยไม้

จากนั้นนำผลการทดลองด้านความแตกต่างทางสรีรวิทยาภายนอกดอกกล้วยไม้พันธุ์ต่าง ๆ มาคัดเลือกเอาเฉพาะพันธุ์ที่ตอบสนองต่อเอทิลีน ไว้มากที่สุดและน้อยที่สุด เพื่อใช้ในการทดลองอื่นต่อไป

1.1.2 วัดการรั่วไหลของประจุ (ion leakage) โดยเลือกพันธุ์ที่มีการตอบสนองต่อเอทิลีนไว้มากที่สุด ใช้วิธีของ Wright and Simon (1973) โดยใช้ส่วนของกลีบดอก และส่วนของเส้าเกสร หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 0.3x0.3 มิลลิเมตร ล้างเนื้อเยื่อให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น 18 โอห์ม 3 ครั้ง แล้วใส่ลงในขวดชมพูขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นไว้ 30 มิลลิเมตร เขย่าไว้ 100 rpm ที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงทำการวัดการรั่วไหลของประจุ โดยใช้เครื่องวัด conductometer หลังจากนั้นนำไปไว้ในที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ใน water bath เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นโดยแช่ไว้ในน้ำประปา ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงวัดการรั่วไหลของประจุอีกครั้ง คำนวณค่าการรั่วไหลดังสูตร

$$\% \text{ Total EC} = \frac{\text{ค่า EC เริ่มต้น} - \text{ค่า EC สุดท้าย}}{100}$$

EC = electrical conductivity

1.2 การตอบสนองต่อสารยับยั้งเอทิลีนของดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ไวและไมไวต่อเอทิลีน

เลือกดอกกล้วยไม้พันธุ์ลัคกี๊ควนและเรดบอมโจที่ตอบสนองเอทิลีนจากข้อ 1.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยมีทริทเมนต์ดังนี้คือ

ทริทเมนต์ที่ 1 ไม้ให้สาร

ทริทเมนต์ที่ 2 เอทิลีนความเข้มข้น 0.4 $\mu\text{L/L}$

ทริทเมนต์ที่ 3 1-MCP ความเข้มข้น 500 nL/L รมนาน 3 ชั่วโมง

ทริทเมนต์ที่ 4 1-MCP ความเข้มข้น 500 nL/L รมนาน 3 ชั่วโมง ก่อนให้เอทิลีนความเข้มข้น 0.4 $\mu\text{L/L}$

แช่ก้านดอกกล้วยไม้ไว้ในขวดแก้วบรรจุน้ำกลั่น 3 มิลลิเมตร วางขวดแก้วไว้บนถาดสแตนเลสที่มีร่องบริเวณรอบขอบถาด เพื่อเติมน้ำป้องกันการแพร่ของแก๊ส เอทิลีนและครอบด้วยฝาพลาสติกรูปทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีขนาด 37.5x47.5x35.5 เซนติเมตร (66,433.5 ลูกบาศก์มิลลิเมตร) ที่มีพัดลมเป่าอากาศ และทริทเมนต์ที่ให้ 1-MCP 500 nL/L โดยใช้ 1-MCP ปริมาณ 0.0531 กรัม ใส่ในขวดแก้วขนาดเล็ก และเติมน้ำ 1.128 มิลลิเมตรให้ละลาย ใส่ไว้ข้างในตู้ที่มีดอกกล้วยไม้ โดยให้ 1-MCP ก่อนให้เอทิลีน 3 ชั่วโมง จากนั้นเปิดฝารอบออกทิ้งไว้ 20 นาที ปิดฝารอบพลาสติกและฉีดเอทิลีนตามปริมาณที่คำนวณได้ เช่นถ้าต้องการให้เอทิลีนเข้มข้น 0.4 $\mu\text{L/L}$ กับดอกกล้วยไม้ ต้องฉีดแก๊สเอทิลีนเข้าในตู้ปริมาณ $0.4 \times 66,433.5 / 10^4 = 2.7$ มิลลิเมตร แล้ววางไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

บันทึกผลการทดลองโดยให้เป็นระดับค่าการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับข้อ 1.1

2. การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคและเซลล์วิทยาของดอกกล้วยไม้สกุลหวายในระหว่างการชราภาพ

ใช้ดอกกล้วยไม้พันธุ์ลัคกี๊ควนและพันธุ์เรดบอมโจ ให้ทริทเมนต์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.2 หลังให้สารตามแผนการทดลอง แยกเฉพาะส่วนกลีบดอกบน (petal) ของกล้วยไม้ เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาทางกายวิภาคและเซลล์วิทยา โดยการตัดเนื้อเยื่อตามขวาง (cross section) ของกลีบดอก ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในช่วงชราภาพเบื้องต้น และอีกส่วนหนึ่งใช้ศึกษาออร์แกนัลภายในเซลล์

2.1 การศึกษาทางกายวิภาคของกลีบดอกของกล้วยไม้สกุลหวายระหว่างการชราภาพ

ใช้ดอกกล้วยไม้พันธุ์ล็กก็ควน โดยให้ทริทเมนต์ตามเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.2 แล้วจึงนำส่วนของกลีบดอกบน ตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อบริเวณตรงกลางของกลีบดอก ขนาด 0.3x0.5 เซนติเมตร เป็นช่วงเวลา (วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) ตั้งแต่วันเริ่มต้น (0 day หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) จนกระทั่งถึงช่วงเวลาที่จะแสดงอาการชราภาพให้เห็น แช่เนื้อเยื่อลงในสารละลายฆ่าและคงสภาพเซลล์ คือ formalin-acetic-alcohol (FAA) ที่ประกอบด้วย เอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 90% กรดกลacialอะซิติก (glacial acetic acid) 5% และฟอร์มาลิน (formalin) 5% เพื่อหยุดการทำงานของเซลล์ โดยตัดเนื้อเยื่อของดอกกล้วยไม้ก่อนให้สารตามการทดลองให้เป็นตัวควบคุม (before treated) หลังให้สารตัดเนื้อเยื่อวันแรก (0 day หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) และตัดเนื้อเยื่อเป็นช่วงวันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ติดต่อกันจนกระทั่งดอกกล้วยไม้แสดงอาการชราภาพ จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่ผ่านการแช่ใน FAA เป็นเวลา 24 ชั่วโมงขึ้นไป นำไปแช่ในสารต่างๆ ตามขั้นตอนดังนี้ คือ แช่ใน 2-methylpropan-2-butanol (TBA) ที่ความเข้มข้น 50 70 85 95 100 % และ absolute TBA 2 ครั้ง ตามลำดับ โดยการเปลี่ยนสารแต่ละความเข้มข้นทุกขั้นตอนต้องใช้เวลาแช่ทิ้งไว้ห่างกันนาน 12 ชั่วโมง เมื่อครบตามลำดับแล้ว จึงเปลี่ยนจากสาร TBA เป็น paraffin ทิ้งไว้นาน 2 วัน แล้วจึงเปลี่ยน paraffin ทุก 12 ชั่วโมง จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปเทลงแม่พิมพ์ที่แข็งแล้วในน้ำที่อุณหภูมิ 10-13 ไมโครเมตรด้วยเครื่องไมโครโทม (microtome) ผึ่งสไลด์ไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน ย้อมสีเนื้อเยื่อด้วยสาร toluidine blue o (Sekai, 1973) ความเข้มข้น 1% เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำเป็นสไลด์ถาวรด้วยการสไลด์ที่ย้อมแล้วล้างในน้ำกลั่นนาน 10 นาที วางผึ่งลมข้ามคืน แล้วนำมาแช่ไว้ใน xylene 2 ครั้ง ห่างกันนานครั้งละ 5 นาที และผึ่งลมสักครู่ แล้วจึงหยดสาร permount ปิดด้วย cover slip แล้วผึ่งลมไว้ 2-3 วัน ส่องดูเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Light microscopy, LM) ตามวิธีการของ Brooks *et al.* (1950)

2.2 การศึกษาทางเซลล์วิทยาของดอกกล้วยไม้สกุลหวายในช่วงการชราภาพ

2.2.1 ใช้เนื้อเยื่อส่วนกลีบดอกบน ของดอกกล้วยไม้เฉพาะพันธุ์ล็กก็ควน ที่ผ่านการให้สารตามทริทเมนต์ข้อ 1.2 เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ มีขั้นตอนดังนี้คือ ตัดชิ้นเนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็ก ขนาด 1x1 ตารางมิลลิเมตร ทำการแช่ชิ้นเนื้อเยื่อทั้งหมดในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) 3% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นชิ้นเนื้อเยื่อจะถูกย้ายลงในสารละลาย osmium tetroxide จากนั้นทำการดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่าง (dehydration) โดยการผ่านแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันลงในชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่าง (จากแอลกอฮอล์ 70% ถึงแอลกอฮอล์ 100%) จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อที่ปราศจากน้ำแล้วมาฝังในเบ้าพลาสติก (embedding mold) ด้วยสารละลายพลาสติก

(Epon 812) นำตัวอย่างทั้งหมดในเบ้าพลาสติกไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 คืน แล้วนำบล็อกตัวอย่างมาตัดให้มีความหนา 0.5 ไมโครเมตร ด้วยเครื่องไมโครโทม แล้วตรวจเช็คบริเวณที่มีท่อน้ำท่ออาหารและเซลล์รอบบริเวณดังกล่าว หลังจากนั้นตัดตัวอย่างซ้ำเฉพาะบริเวณที่เลือกไว้ ให้มีความหนา 80-90 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครโทม (หัวตัดทำด้วยเพชร) ชิ้นเนื้อเยื่อที่ถูกตัดถูกวางบนตาข่ายทองแดงขนาดเล็ก (copper grid) แล้วจึงถูกนำไปย้อมด้วยสารละลายโลหะหนัก 2 ชนิด คือ ยูรานิลอะซิเตท (uranyl acetate) และเลดซิเตรท (lead citrate) หลังจากนั้นจึงนำชิ้นเนื้อเยื่อที่ย้อมแล้วไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy, TEM)

2.2.2 ใช้เนื้อเยื่อส่วนกลีบดอกบนของกล้วยไม้เฉพาะพันธุ์ที่ไวต่อเอทิลีนที่ผ่านการให้สารตามทริทเมนต์ข้อ 1.2 เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงลักษณะพื้นผิวของเซลล์ โดยใช้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy, SEM) ขั้นตอนดังนี้คือ ตัดเนื้อเยื่อให้มีขนาดเล็กประมาณ 0.1×0.5 เซนติเมตร แช่เนื้อเยื่อลงในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% ที่เตรียมในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอช 7 (phosphate buffer pH 7.0) จากนั้นล้างตัวอย่างใน บัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอช 7 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์(M) 3 ครั้งๆ ละ 10-15 นาที ย้ายตัวอย่างลงในแอลกอฮอล์แต่ละความเข้มข้นคือ 30 50 70 80 90 และ 100% นาน 10-15 นาที จากนั้นทำให้ตัวอย่างแข็งด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วจึงแช่ในแอลกอฮอล์ 100 % นาน 10 นาที ย้ายตัวอย่างลงในเอมีลอะซิเตท (amylacetate) นาน 5-10 นาที นำตัวอย่างเข้าเครื่อง Critical point dryer นาน 90 นาที ย้ายออกมาเก็บไว้ในโถดูดความชื้นที่ใส่ซิลิกาเจลไว้ เมื่อใช้งานจึงนำตัวอย่างมาติดบน stubb แล้วนำไปหุ้มด้วยทองนาน 8 นาที 2 ครั้ง และนำตัวอย่างไปส่องดูภายใต้กล้อง SEM

3. การเปลี่ยนแปลงทางชีวโมเลกุลของดอกกล้วยไม้สกุลหวายในระหว่างการชราภาพ

3.1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ DNase ในดอกกล้วยไม้สกุลหวายระหว่างการชราภาพ

3.1.1 วิธีการสกัดโปรตีน DNase

ใช้ดอกกล้วยไม้พันธุ์ที่ตอบสนองต่อเอทิลีนไวมากที่สุด หลังให้สารตามทริทเมนต์ที่ 1.2 แยกเอาส่วนกลีบดอกบนของกล้วยไม้ตามเวลาต่างๆ บดให้ละเอียดด้วยการใช้ในไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำไปสกัดโปรตีนตามวิธีของ Xu and Hanson (2000) ที่มีการดัดแปลงโดย

นำตัวอย่างที่บดละเอียดประมาณ 0.1 กรัม เติมบัฟเฟอร์สกัดโปรตีน 1.2 มิลลิลิตร (50 mM Tris pH 7.6, 2 mM EDTA, 2% SDS[w/v] , 2 mM dithiothreitol (DTT) และ 14 mM β -mercaptoethanol) ใส่ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร เขย่าแรงด้วยเครื่อง vortex mixer ประมาณ 5 นาที หรือจนกว่าสารจะเข้ากัน นำไปแช่ในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนใสข้างบนใส่หลอดใหม่ แล้วนำไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (1976) โดยนำส่วนใสที่สกัดได้ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสาร Coomassie Brilliant Blue G-250 0.0125% 4 มิลลิเมตร (Coomassie Brilliant Blue G-250 100 มิลลิลิตร และกรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) 85% 100 มิลลิลิตร ละลายใน แอลกอฮอล์ 95% 800 มิลลิลิตร) เขย่าสารให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ประมาณ 1 นาที หรือจนกว่าสารจะเข้ากัน วางทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้สารทำปฏิกิริยา วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณปริมาณโปรตีนเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารตั้งต้น BSA ที่มีความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

3.1.2 วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ DNase

เมื่อวัดปริมาณโปรตีนได้แล้ว นำโปรตีนที่สกัดได้มาตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ DNase โดยการทำ SDS-PAGE ซึ่งใช้วิธีการตรวจสอบที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Blank and McKeon (1991) และ Panavas and Rubinstein (1998) ซึ่งการเตรียมเจลชั้นล่าง (resolving gel) 10 % ประกอบด้วย BSA 100 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร เติม salmon DNA 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ต้ม salmon DNA ในน้ำเดือด 3 นาที ก่อนที่จะเติมลงไป เพื่อให้ได้ DNA สายเดี่ยว) เติมน้ำกลั่น 4.1 มิลลิลิตร Acrylamide/Bis-acrylamide 30 % (บริษัท BIO-LAD) 3.3 มิลลิลิตร Tris pH 8.8 2.5 มิลลิลิตร SDS 10 % 0.1 มิลลิลิตร amonumpersulfate 50 ไมโครลิตร และ TEMED 5 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 50 นาที สำหรับเจลชั้นบน (Stacking gel) 5% ประกอบด้วย น้ำกลั่น 5.7 มิลลิลิตร 30 % Acrylamide/Bis-acrylamide (บริษัท BIO-LAD) 1.7 มิลลิลิตร Tris pH 6.8 2.5 มิลลิลิตร และ 10 % SDS 0.1 มิลลิลิตร amonumpersulfate 50 ไมโครลิตร และ TEMED 10 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 45-60 นาที จากนั้นดูดโปรตีน 20 ไมโครลิตร ใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 1X SDS sample buffer (50 mM Tris pH 6.8, 1% SDS [w/v], 5% glycerol [w/v], 100 mM DTT และ 0.01 % bromphenol blue [w/v]) 20 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 1 นาที เติม 6x loading dye 5 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ก่อนที่จะนำมาโหลดบนเจลที่แช่อยู่ใน running buffer (27.5 mM Tris-base, 0.1% SDS [w/v] และ 1.4 % glycine) ใช้กระแสไฟ 50 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเปลี่ยนเป็น 100 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง 30 นาที

จากนั้น แช่เจลไว้ใน renaturation buffer A (0.1 M Tris-HCl pH 7.4, 1% Triton X-100 และ 5 mM CaCl₂) เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อัตรา 50 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุก 30 นาที จนกระทั่งไม่เห็นสีของ bromphenol blue จากนั้นย้ายมาแช่ใน Tris pH 7.0 ที่อุณหภูมิห้องเขย่าเบาๆ ประมาณ 1 นาที แล้วจึงเปลี่ยนไปแช่ใน basic buffer ข้ามคืน (50 mM Tris pH 7.0, 20 μM CaCl₂, 10 μM MgCl₂ และ 20 mM NaCl) สุดท้ายย้อมเจลด้วย 0.1 M Tris pH 7.2 ที่เติม ethidium bromide 0.5 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร แช่เจลไว้นาน 1 ชั่วโมง นำเจลไปส่องดูแถบโปรตีน ภายใต้แสงยูวี บันทึกภาพเก็บผลการทดลอง

3.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลของดอกกล้วยไม้สกุลหวายระหว่างการชราภาพ

ดอกกล้วยไม้พันธุ์ที่ตอบสนองต่อเอทิลีนไวมากที่สุด หลังให้สารตามทริทเมนต์ที่ 1.2 แยกเอาส่วนของกลีบดอกบน เพื่อใช้ในการสกัด DNA

ทำการศึกษาถึงการแตกสลายของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) เพื่อการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลของเซลล์ระหว่างการชราภาพ ตามวิธี CTAB methods โดยดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Fluton *et al.* (1995) มีวิธีการดังต่อไปนี้ คือ บดส่วนของกลีบดอกบนกล้วยไม้ น้ำหนักประมาณ 1 กรัม ด้วยไนโตรเจนเหลว โดยใช้โกร่งบดตัวอย่าง บดให้ละเอียดจนเป็นผงแป้ง จากนั้นใส่ตัวอย่างลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ (Extraction buffer) (100 mM Tris pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl และ 2 % CTAB [w/v]) 15 มิลลิลิตร และเติม β-mercaptoethanol 250 ไมโครลิตร เขย่าอย่างแรงให้ตัวอย่างละลายในสารสกัด DNA ด้วยเครื่อง vortex mixer นำไปปั่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากนั้นเติมฟีนอล (phenol) 15 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงอีกครั้ง นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ให้ตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm นาน 40 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสเก็บไว้ในหลอดใหม่ 12 มิลลิลิตร เติม (phenol: chloroform) : isoamylalcohol อัตราส่วน (24:1) : 1 ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ผสมให้สารละลายเข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็วรอบ 13,000 rpm นาน 15 นาที ดูดส่วนใสเก็บไว้ในหลอดใหม่ 10 มิลลิลิตร และเติม (phenol: chloroform) : isoamylalcohol อัตราส่วน (24:1) : 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 13,000 rpm นาน 10 นาที ดูดส่วนใสเก็บไว้ในหลอดใหม่ 8 มิลลิลิตร เติม isopropanol 8 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 13,000 rpm นาน 10 นาที เทส่วนข้างบนทิ้ง เหลือเพียงตะกอนนำมาทำให้แห้งโดย

ใช้ vacuum นาน 5 นาที เติม TE buffer ที่ผสมด้วย RNase (10 mM Tris pH 8.0, 0.1 mM EDTA และ RNase 20 µg/ml) นำ DNA ไปโหลดบน 1.2 % agarose gel กระแสไฟ 50 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ย้อมด้วย ethidium bromide เพื่อตรวจสอบแถบ DNA ที่ปรากฏภายใต้แสงยูวี ถ้าให้ผลไม่ชัดเจนจึงทำ southern blot

การทำ southern blot มีวิธีการดังนี้คือ หลังจากส่องดูเจลภายใต้แสงยูวี แล้วนำเจลไปแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.25 นอร์มัล (N) วางบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 30 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นย้ายไปในสารละลาย denaturation solution (0.5 N NaOH และ 1.5 M NaCl) นาน 15 นาที 2 ครั้ง เขย่าที่ความเร็วเท่าเดิม นาน 10 นาที แล้วจึงย้ายเจลไปยังสารละลาย Neutralization buffer (0.5 M Tris pH 8.0 และ 1.5 N NaCl) นาน 15 นาที 2 ครั้ง เขย่าที่ความเร็วเท่าเดิม เมื่อครบตามเวลา วางเจลไว้บน nylon membrane (Amersham) โดยใช้วิธี capillary blotting เพื่อย้าย DNA ขึ้นไปยังเมมเบรน ใช้สารละลาย 10x SSC (3 M NaCl และ 300 mM sodium citrate) เป็นสื่อ ตั้งไว้ข้ามคืน หลังจากนั้นล้างเมมเบรนด้วย 2x SSC เขย่าด้วยความเร็ว 30 rpm นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเมมเบรนอบไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ใส่เมมเบรนลงในหลอดไฮบริไดร์ส เติมสารละลาย hybridization ปริมาณ 3-6 มิลลิลิตร ใส่ไว้ในตู้ไฮบริไดร์สที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 45-60 นาที เติม random primed probes 20 มิลลิลิตร โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Feinberg and Vogelstein (1983) (DNA คอกกกล้วยไม้ที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่ประกอบด้วย *Sau* 3 A 2 ไมโครลิตรผสมกับน้ำกลั่น 10 ไมโครลิตร ผสมกับ reaction mix label DIG 2 ไมโครลิตร เติมสาร hexanucleotide mix 4 ไมโครลิตร และ klenow enzyme 1 ไมโครลิตร) ผสมกับน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร ก่อนเติมลงในหลอดไฮบริไดร์ส ให้นำ random primed probes ไปต้มก่อน เป็นเวลา 5 นาที แล้ววางสาร random primed probes บนน้ำแข็ง 5 นาที ทิ้งไฮบริไดร์ส ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ไว้ข้ามคืนประมาณ 14 ชั่วโมง จากนั้นแช่เมมเบรนไว้ในสารละลาย 2x SSC ที่เติมสาร 0.1% SDS เขย่าความแรง 30 rpm ที่อุณหภูมิห้อง 2 ครั้ง นานครั้งละ 10 นาที ย้ายเมมเบรนไปแช่ไว้ในสารละลาย 0.5 x SSC ที่เติมสาร 0.1% SDS เขย่าความแรง 30 rpm ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที ย้ายเมมเบรนไปยัง washing buffer (maleic acid buffer 1X, pH 7.5 และ Tween 20 0.3%) เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที จากนั้นนำเมมเบรนใส่ถุงพลาสติก เติม 1% blocking solution 3-6 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 45 นาที เติม Anti DIG (1% blocking solution 0.5 มิลลิลิตรและ Anti DIG 0.35 ไมโครลิตร) เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำเมมเบรนออกมาแช่ใน washing buffer 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที เขย่าที่อุณหภูมิห้อง ย้ายเมมเบรนไปแช่ใน detection buffer (0.1 M Tris-HCl pH 9.5 และ 0.1 M NaCl) เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ย้ายเมมเบรนไปไว้ใน

ถุงพลาสติก เติม CDP star (Detection buffer 0.5 มิลลิลิตร และ CDP star 1.25 ไมโครลิตร) ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วรีดสารละลายออกให้หมด จากนั้นก็นำไปประกบกับฟิล์มในห้องมืด ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง และล้างฟิล์มด้วยน้ำประปา จะเห็นแถบ DNA ปรากฏขึ้นบนฟิล์ม



ผลและวิจารณ์

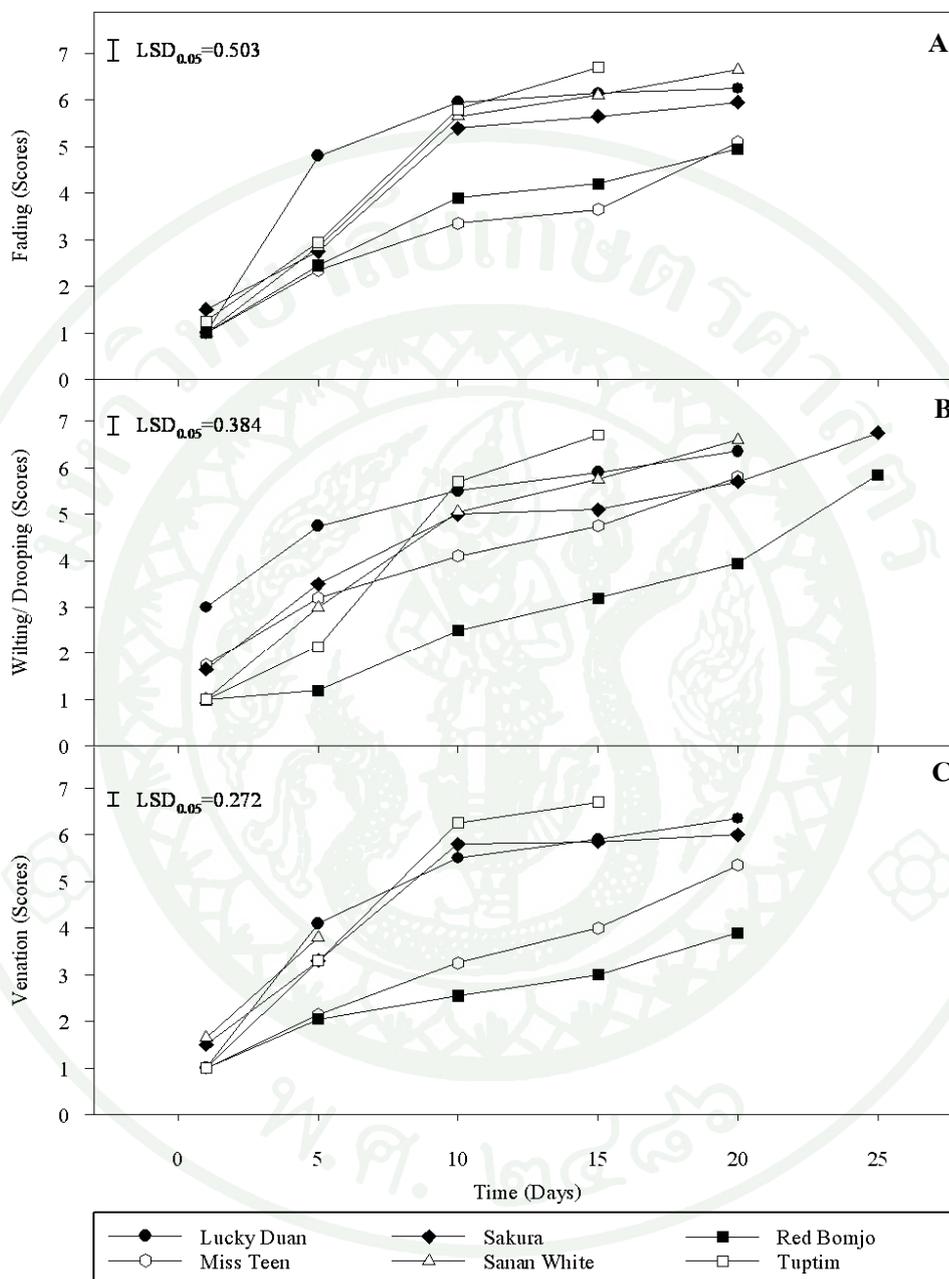
ผล

1. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของดอกกล้วยไม้ระหว่างการชราภาพ

1.1 การทดลองการตอบสนองของดอกและส่วนของดอกกล้วยไม้พันธุ์ต่างๆ 6 พันธุ์ที่มีต่อเอทิลีน

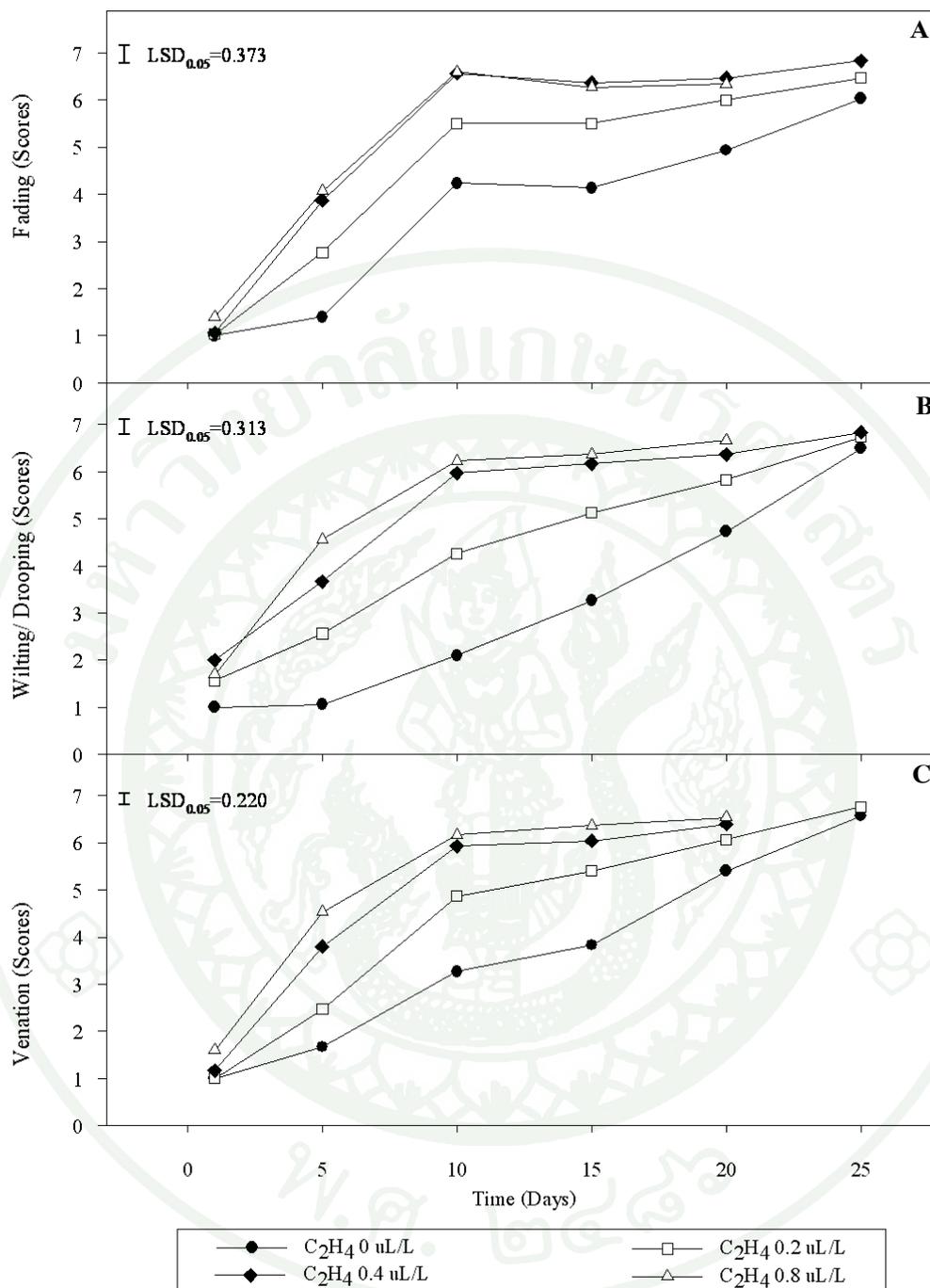
การทดลองนี้เปรียบเทียบพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย 6 พันธุ์คือ ลักกี้ควน มีสทิน เรดบอมโง ซากูระ ทับทิม และ ขาวสนาน ที่ได้รับเอทิลีน 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0.2 0.4 และ 0.8 $\mu\text{L/L}$ และไม่ได้รับเอทิลีน จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของดอกกล้วยไม้หลังจากให้ทริทเมนต์ คือ ดอกเหี่ยวและดอกตูม สีดอกซีด การเกิดเส้นแวน และการเปลี่ยนแปลงค่าการรั่วไหลของประจุ จากการทดลองพบว่า ดอกกล้วยไม้หวายทุกพันธุ์ที่ไม่ได้รับเอทิลีนมีอาการใช้งานของดอกนานมากกว่า 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และกล้วยไม้หวายจะตอบสนองได้ดีที่สุดในทุกอาการที่เกิดขึ้นที่ความเข้มข้นของเอทิลีน 0.8 $\mu\text{L/L}$ รองลงมาคือ 0.4 0.2 และ 0 $\mu\text{L/L}$ ตามลำดับ (ภาพที่ 1 และ 2) ในขณะที่ดอกกล้วยไม้พันธุ์ลักกี้ควน มีการงอกของกลีบดอกที่ระดับค่าคะแนน 3.5 ตั้งแต่หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทุกระดับความเข้มข้นของเอทิลีนไม่มีความแตกต่างกัน แต่ขณะที่ดอกกล้วยไม้ไม่ได้รับเอทิลีนคงสภาพปกติได้นานมากกว่า 21 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนการเกิดอาการกลีบดอกสีซีดนั้น ที่ระดับความเข้มข้นของเอทิลีน 0.8 $\mu\text{L/L}$ กลีบดอกสีซีดแสดงอาการชัดเจนตั้งแต่หลังได้รับเอทิลีน 24 ชั่วโมง และแสดงอาการมากที่สุด 2 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขณะที่ดอกกล้วยไม้ไม่ได้รับเอทิลีนความเข้มข้น 0.2 และ 0.4 $\mu\text{L/L}$ กลีบดอกสีซีดมากที่สุด 3 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งทั้ง 2 ความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ขณะที่ดอกกล้วยไม้ไม่ได้รับเอทิลีนสีกลีบดอกยังคงเป็นปกติและเริ่มแสดงอาการมากขึ้นนานกว่า 10 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถคงสภาพนี้อยู่ระยะเวลาหนึ่งนานกว่า 21 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับอาการเกิดเส้นแวนปรากฏว่าที่ระดับความเข้มข้นของเอทิลีน 0.8 $\mu\text{L/L}$ กลีบดอกแสดงเส้นแวนมากที่สุดในวันที่ 2 หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รองลงมาที่ความเข้มข้น 0.4 และ 0.2 $\mu\text{L/L}$ ซึ่งที่ระดับความเข้มข้น 0.2 $\mu\text{L/L}$ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ คือปรากฏเส้นแวนชัดที่สุด 3 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ดอกกล้วยไม้ไม่ได้รับ

เอทิลีนแสดงอาการเพียงเล็กน้อยและอายุสั้นสุดนานกว่า 20 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 3)



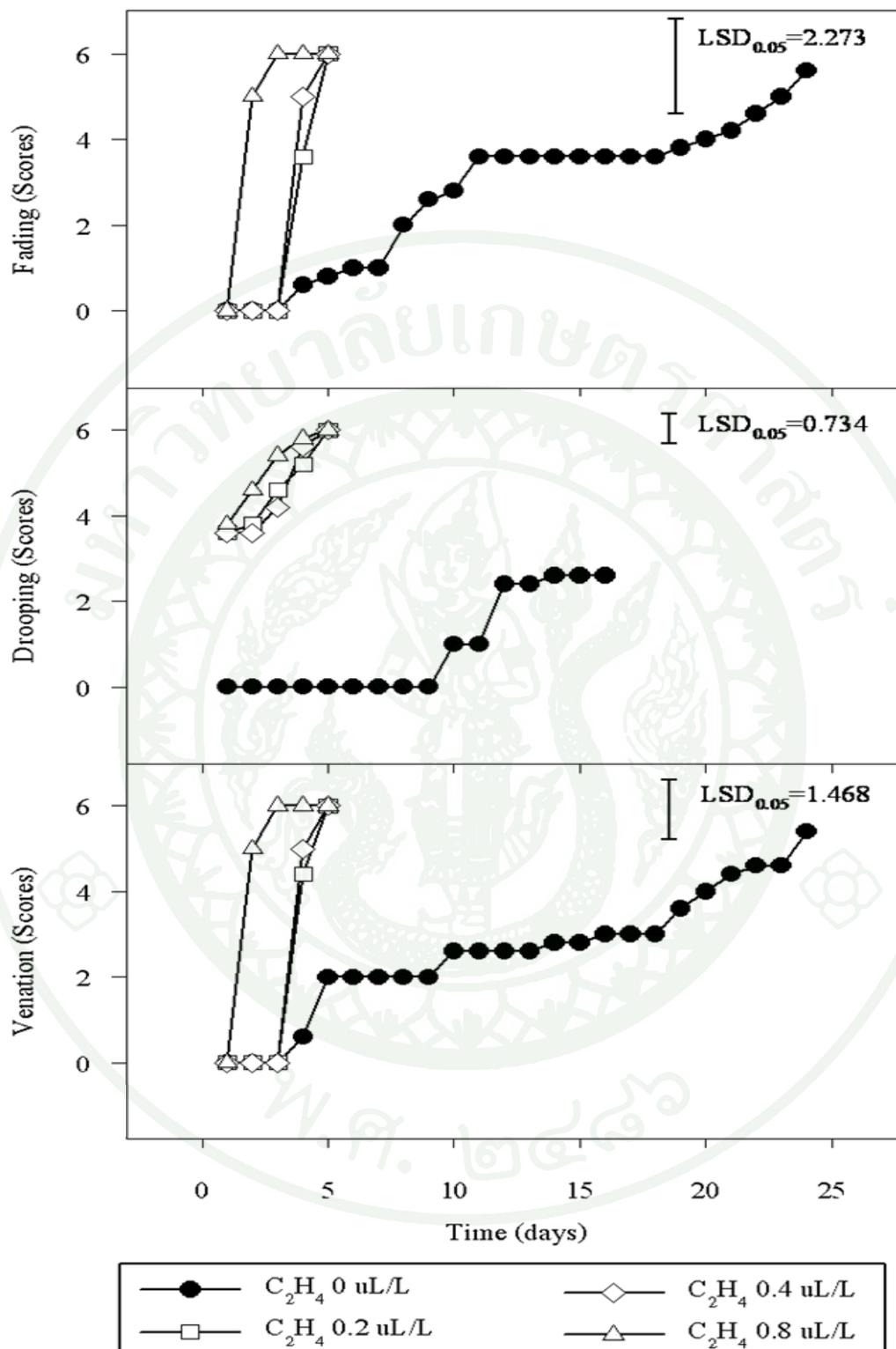
ภาพที่ 1 คะแนนของอาการสีซีด (A) การเหี่ยว (B) และการเกิดเส้นเวน (C) ของดอกกล้วยไม้พันธุ์ ลักกี้ดูน ซากุระ เรดบอมโจ มีสทีน ขาวสนาน และ ทับทิม ที่ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$

หมายเหตุ เฉพาะพันธุ์ลักกี้ดูนแสดงอาการกลีบดอกคู่ แต่พันธุ์อื่นๆ แสดงอาการกลีบดอกเหี่ยว



ภาพที่ 2 คะแนนของอาการสีซีด (A) การเหี่ยว (B) และการเกิดเส้นเวน (C) ของดอกกล้วยไม้หวาย พันธุ์ลัคกี้ควอน ซากุระ เรดบอมโฌ มีสทิน ขาวสนาน และ ทับทิม ที่ได้รับเอทิลีนความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4 และ 0.8 µL/L

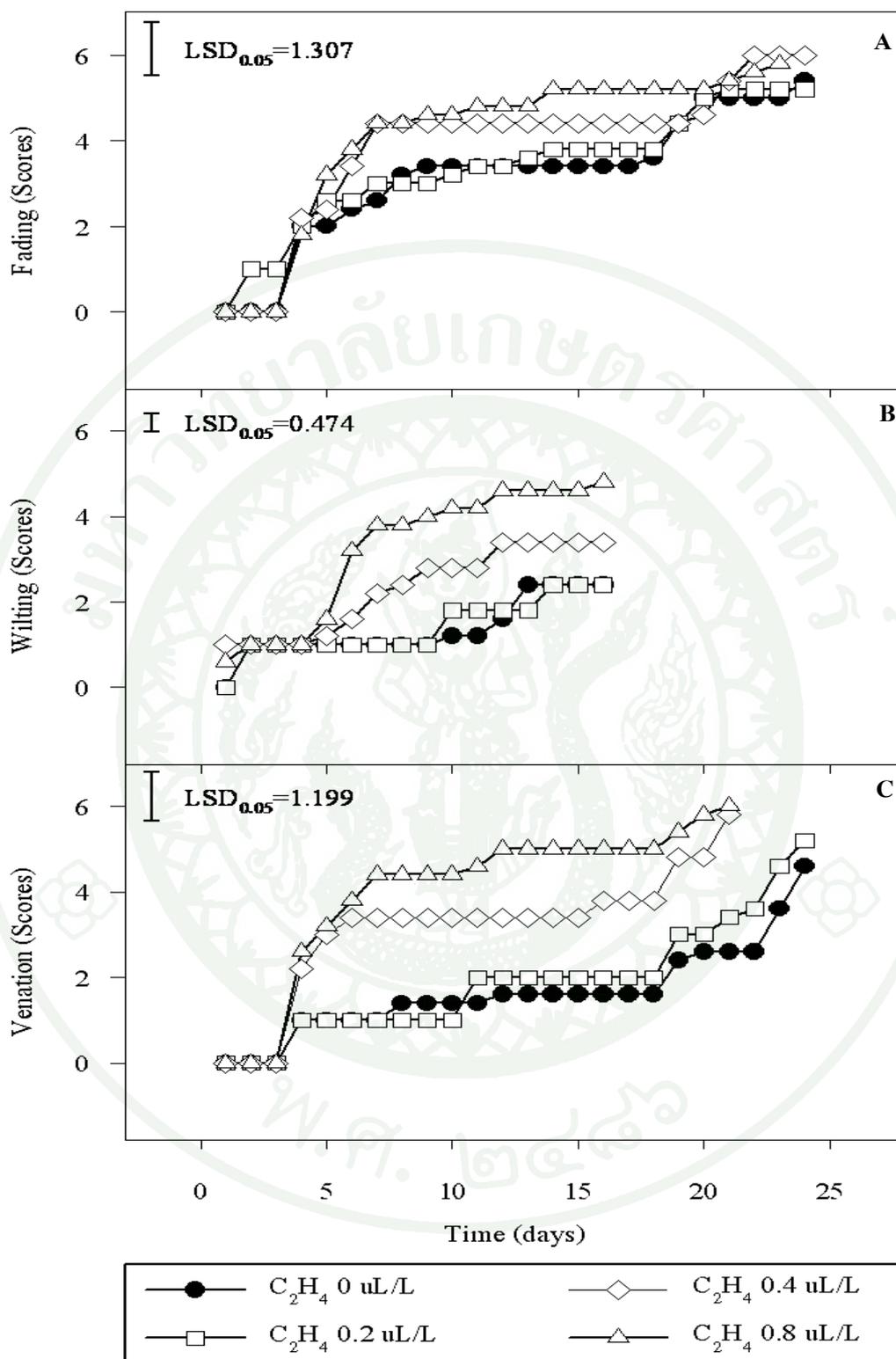
หมายเหตุ เฉพาะพันธุ์ลัคกี้ควอนแสดงอาการกลีบดอกงุ้มแต่พันธุ์อื่น ๆ แสดงอาการกลีบดอกเหี่ยว



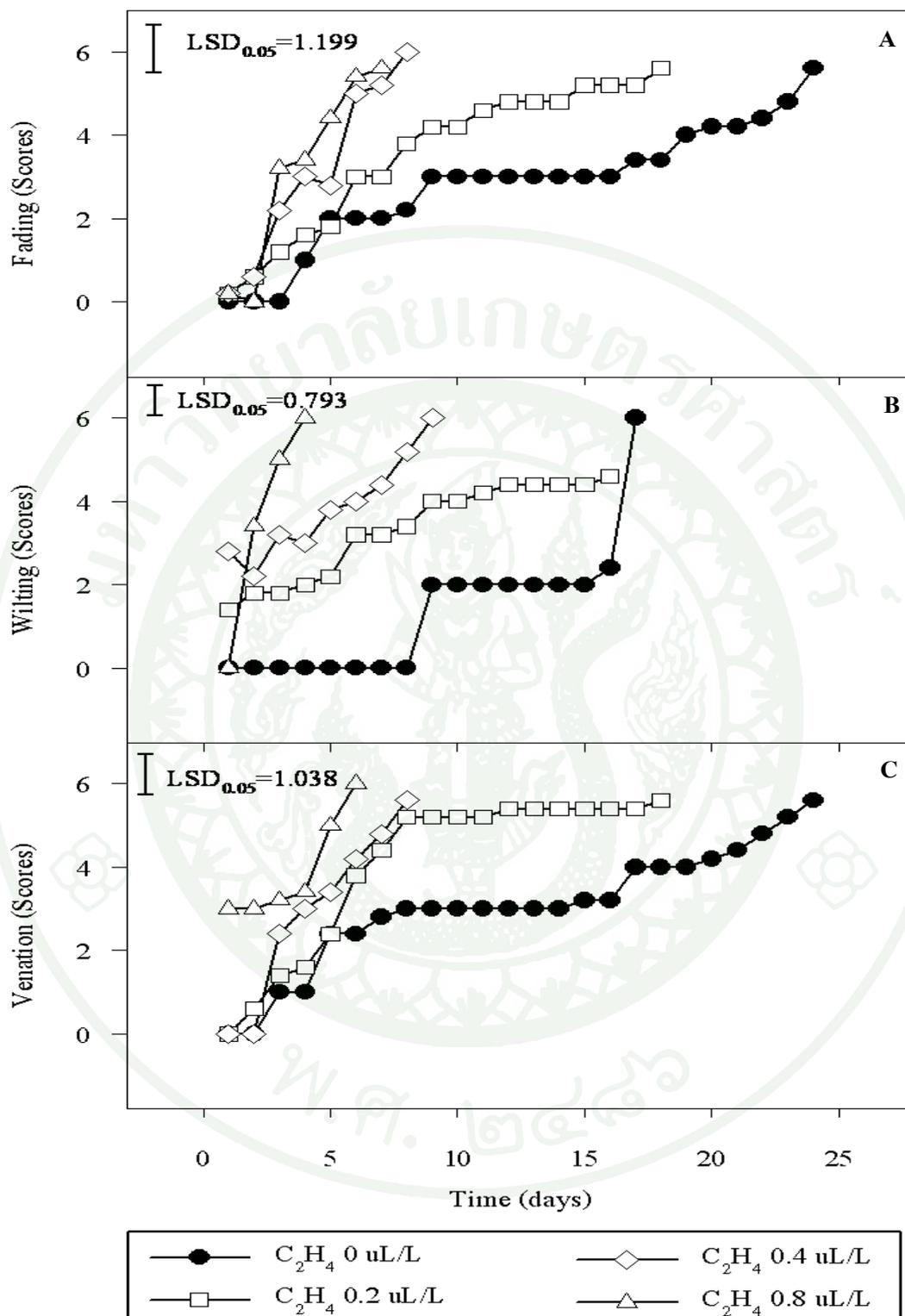
ภาพที่ 3 คะแนนของอาการสีซีด (A) การกุ่ม (B) และการเกิดเส้นเวน (C) ของดอกกล้วยไม้หวาย พันธุ์ลัคกีควนหลังได้รับเอทิลีนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ดอกกล้วยไม้พันธุ์เรดบอมโจ พบว่าในช่วง 3 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่มีอาการใดที่แตกต่างกันในทุกทริทเมนต์ หลังจากนั้นที่ความเข้มข้นของเอทิลีน 0.8 $\mu\text{L/L}$ ดอกแสดงอาการเหี่ยวมากกว่าทริทเมนต์อื่น รองลงมาคือ 0.4 และ 0.2 $\mu\text{L/L}$ และที่ไม่ได้รับเอทิลีนตามลำดับ ที่ระดับ 0.2 $\mu\text{L/L}$ และดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับเอทิลีน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนอาการกลีบดอกสีชดนั้นปรากฏว่าที่ความเข้มข้นเอทิลีน 0.2 $\mu\text{L/L}$ กลีบดอกสีชดที่ระดับค่าคะแนน 1 เริ่มตั้งแต่วันที่ 2 หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ทิ้งไว้ ที่ระดับค่าคะแนน 3 เมื่อถึงระดับ 3.5 จะคงที่ไปเรื่อยๆ และสีกลีบดอกชดมากที่สุดนานกว่า 19 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้นเอทิลีนที่เหมาะสม 0.4 $\mu\text{L/L}$ ดอกเริ่มสีชดในวันที่ 3 หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ระดับค่าคะแนน 2 และเพิ่มขึ้นถึงระดับ 4 นาน 7 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คงที่อยู่ระยะเวลาหนึ่ง และอายุสิ้นสุดที่ 14 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งอาการนี้แตกต่างกันกับดอกกล้วยไม้ที่ได้รับเอทิลีนเข้มข้น 0.8 $\mu\text{L/L}$ แต่ดอกที่ไม่ได้รับเอทิลีนคงสภาพปกติและการเสื่อมสภาพช้าที่สุดจนกระทั่งนานกว่า 20 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการเกิดเส้นเวนนั้น ในช่วงแรกทั้ง 4 ทริทเมนต์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อทิ้งไว้นานขึ้นการเกิดเส้นเวนชัดขึ้น ทริทเมนต์ที่ได้รับเอทิลีนเข้มข้น 0.8 รองลงมาคือ 0.4 $\mu\text{L/L}$ ในขณะที่ดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับเอทิลีนระดับความเข้มข้น 0.2 $\mu\text{L/L}$ และไม่ได้รับเอทิลีน การเกิดเส้นเวนไม่มีความแตกต่างกันในช่วงแรก แต่เมื่อถึง 10 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ได้รับเอทิลีนระดับ 0.2 $\mu\text{L/L}$ แสดงอาการมากกว่าดอกที่ไม่ได้รับเอทิลีน แต่ทั้ง 2 ทริทเมนต์นี้ แสดงอาการได้ช้ากว่าที่ระดับ 0.4 และ 0.8 $\mu\text{L/L}$ ตามลำดับ ดังภาพที่ 4

ดอกกล้วยไม้พันธุ์ซากระ อากาศเหี่ยวเห็นได้ชัดเจนที่สุดเมื่อดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับเอทิลีนที่ความเข้มข้น 0.8 $\mu\text{L/L}$ รองลงมาคือ 0.4 0.2 $\mu\text{L/L}$ และ ไม่ได้รับเอทิลีนตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 0.8 $\mu\text{L/L}$ ดอกเริ่มเหี่ยวตั้งแต่วันที่ 1 ส่วนอาการกลีบดอกชดนั้นก็เช่นเดียวกัน พบว่าที่ความเข้มข้น 0.8 $\mu\text{L/L}$ จะแสดงอาการได้ชัดเจนที่สุด รองลงมาคือ 0.4 0.2 $\mu\text{L/L}$ และไม่ได้รับเอทิลีนตามลำดับ โดยความเข้มข้น 0.8 $\mu\text{L/L}$ เริ่มปรากฏอาการสีชดให้เห็นตั้งแต่วันที่ 1 และการเกิดเส้นเวนที่ความเข้มข้นเอทิลีน 0.8 $\mu\text{L/L}$ แสดงอาการก่อนทริทเมนต์อื่น โดยแสดงอาการได้ตั้งแต่หลังให้ทริทเมนต์ 24 ชั่วโมง และเห็นเส้นเวนได้ชัดเจนที่สุด 3 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขณะที่เอทิลีนความเข้มข้น 0.4 0.2 $\mu\text{L/L}$ และไม่ได้รับเอทิลีน การเกิดเส้นเวนไม่มีความแตกต่างกันในช่วงวันแรกๆ แต่เมื่อวันเวลาผ่านไปที่ความเข้มข้น 0.4 $\mu\text{L/L}$ แสดงอาการได้ชัดเจนมากกว่าที่เอทิลีนไม่เกิน 0.2 $\mu\text{L/L}$ และไม่ได้รับเอทิลีนตามลำดับ (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 4 คะแนนของอาการสีซีด (A) การเหี่ยว (B) และการเกิดเส้นเวน (C) ของดอกกล้วยไม้หวาย พันธุ์เรดบอมโหล่งได้รับเอทิลีนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

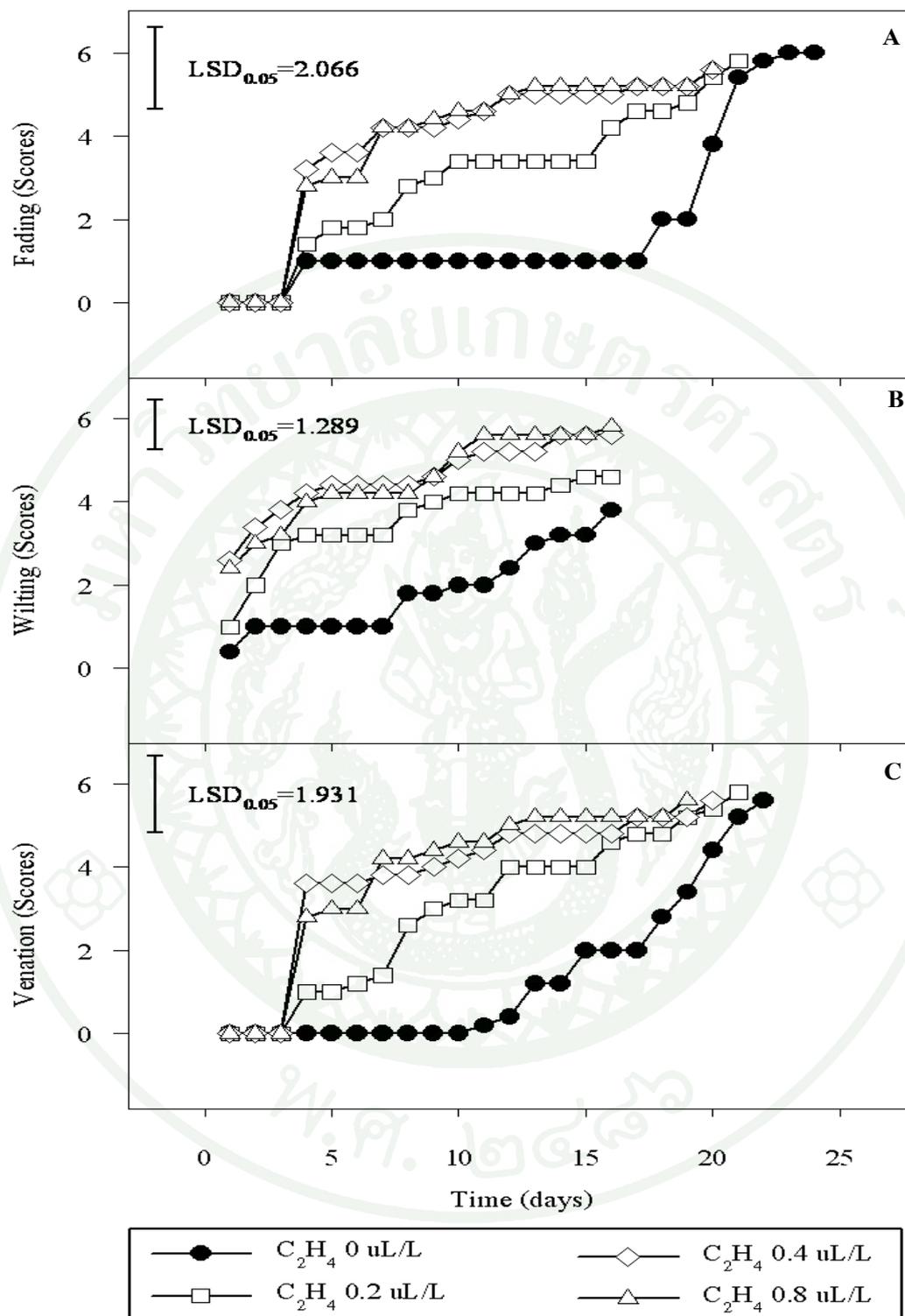


ภาพที่ 5 คะแนนของอาการสีซีด (A) การเหี่ยว (B) และการเกิดเส้นเวน (C) ของดอกกล้วยไม้หวาย พันธุ์ชากระหลั้งได้รับเอทิลีนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

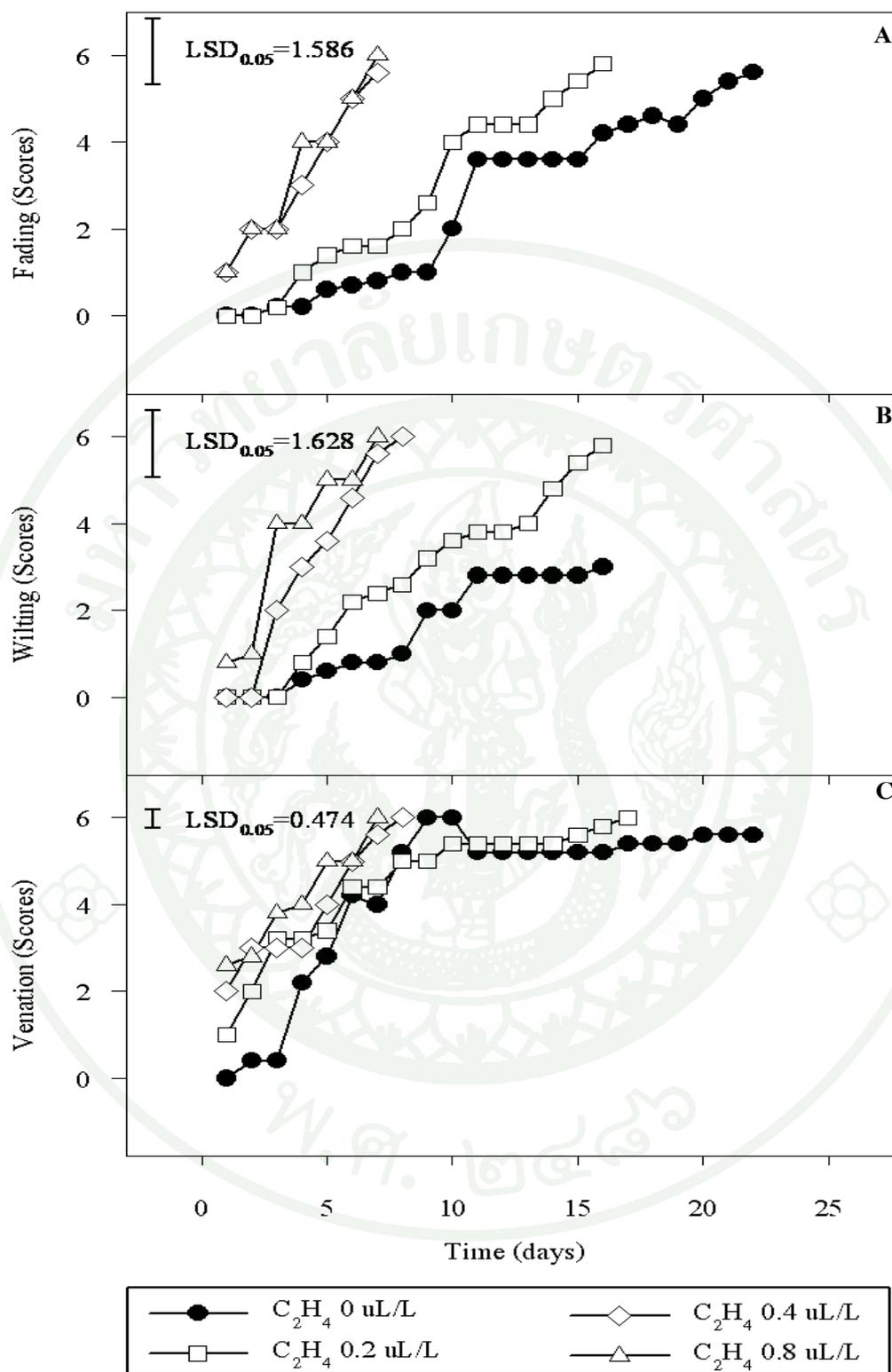
ดอกกล้วยไม้พันธุ์มีสทิน มีอาการเหี่ยวเริ่มตั้งแต่ 1 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเพิ่มตามเวลาที่ผ่านไปนานขึ้น โดยที่ความเข้มข้น 0.4 และ 0.8 $\mu\text{L/L}$ คะแนนการเหี่ยวไม่แตกต่างกันทางสถิติ รองลงมาคือดอกกล้วยไม้ที่ได้รับเอทิลีนความเข้มข้น 0.2 $\mu\text{L/L}$ และไม้ที่ได้รับเอทิลีนตามลำดับ สำหรับอาการกลีบดอกสีซีดนั้น ในช่วงวันแรกดอกกล้วยไม้ทุกทริทเมนต์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ หลังจากวันที่ 2 กลีบดอกเริ่มแสดงอาการซีดให้เห็นแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่เอทิลีนความเข้มข้น 0.4 และ 0.8 $\mu\text{L/L}$ แต่แสดงอาการรองลงมาคือ 0.2 $\mu\text{L/L}$ และไม้ที่ได้รับเอทิลีน ตามลำดับ อาการการเกิดเส้นแวน ของกลีบดอกปรากฏอาการหลังจากได้รับเอทิลีน 2 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และแสดงอาการได้เร็วไม่แตกต่างกับที่เอทิลีนความเข้มข้น 0.4 และ 0.8 $\mu\text{L/L}$ รองลงมาคือ 0.2 $\mu\text{L/L}$ และไม้ที่ได้รับเอทิลีน ตามลำดับ (ภาพที่ 6)

ดอกกล้วยไม้พันธุ์ขาวสนาน มีอาการเหี่ยวของกลีบดอก หลังได้รับเอทิลีน 24 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่เอทิลีนความเข้มข้นที่ 0.8 $\mu\text{L/L}$ มีอาการเหี่ยวมากกว่าที่เอทิลีนความเข้มข้น 0.4 0.2 $\mu\text{L/L}$ และไม้ที่ได้รับเอทิลีนตามลำดับ อาการสีซีดของกลีบดอกแสดงหลัง 24 ชั่วโมง ได้รับเอทิลีนที่ความเข้มข้น 0.4 และ 0.8 $\mu\text{L/L}$ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ รองลงมาคือ 0.2 $\mu\text{L/L}$ และไม้ที่ได้รับเอทิลีนตามลำดับ การปรากฏเส้นแวนของกลีบดอกแสดงอาการตามความเข้มข้นของเอทิลีน คือเอทิลีนความเข้มข้น 0.8 และ 0.4 $\mu\text{L/L}$ ตามลำดับ รองลงมาคือเอทิลีนความเข้มข้น 0.2 $\mu\text{L/L}$ และไม้ได้รับเอทิลีน แต่ดอกกล้วยไม้ที่ได้รับเอทิลีนความเข้มข้น 0.2 $\mu\text{L/L}$ และไม้ได้รับเอทิลีนแสดงอาการไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 7)

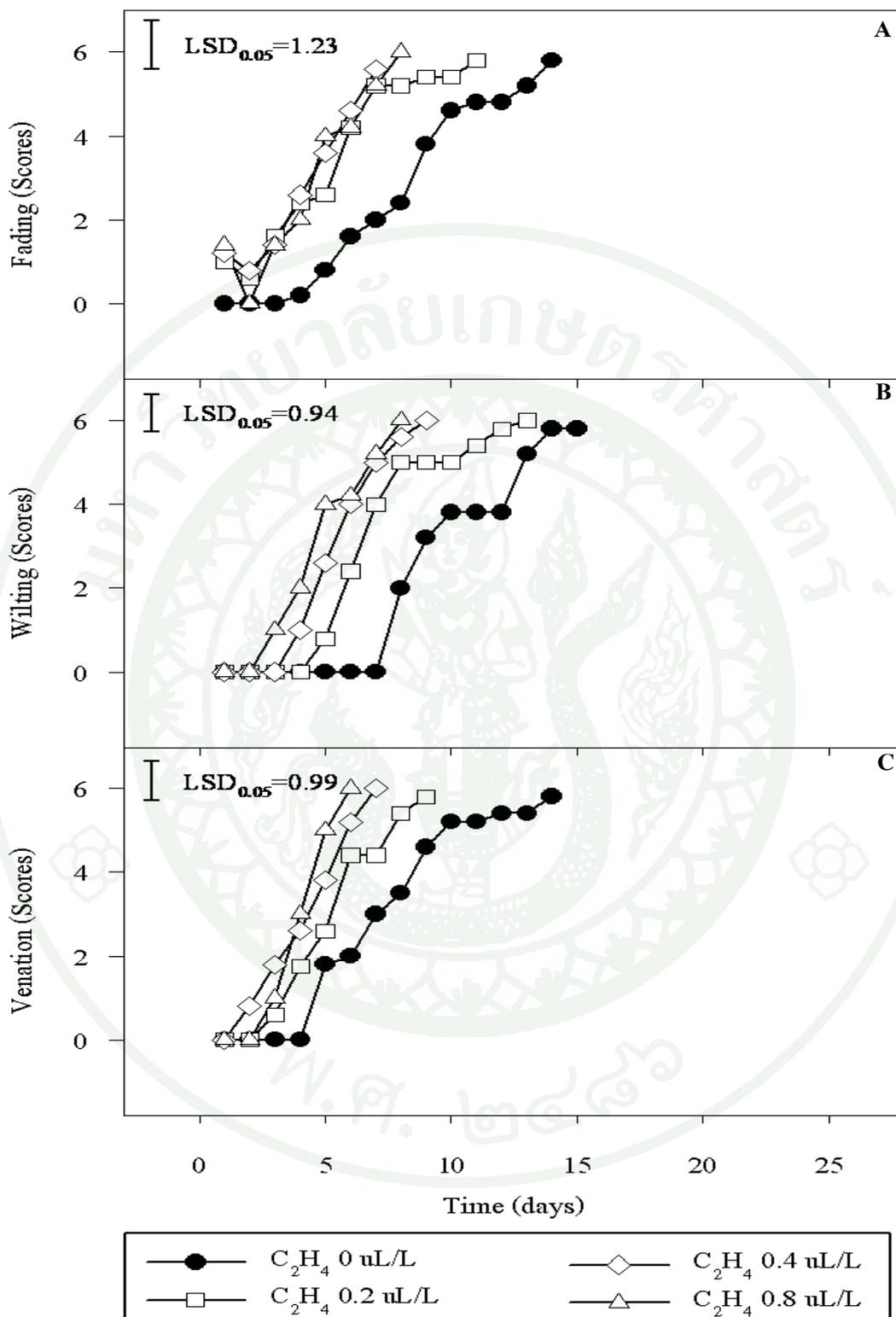
ดอกกล้วยไม้พันธุ์ทับทิม แสดงอาการเหี่ยวของกลีบดอกหลังได้รับเอทิลีนไม่แตกต่างกัน หลังวันที่ 2 ที่ได้รับเอทิลีนความเข้มข้น 0.8 $\mu\text{L/L}$ ทำให้ดอกไม้เหี่ยวได้มากกว่าเอทิลีนความเข้มข้น 0.4 และ 0.2 $\mu\text{L/L}$ และไม้ที่ได้รับเอทิลีนตามลำดับ อาการสีซีดของกลีบดอก ในช่วงวันแรก ที่ได้รับเอทิลีนความเข้มข้น 0.8 0.4 และ 0.2 $\mu\text{L/L}$ ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ให้ผลชัดเจนกว่าดอกไม้ที่ไม่ได้รับเอทิลีนตามลำดับ เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นดอกกล้วยไม้ ที่ได้รับเอทิลีนความเข้มข้น 0.8 และ 0.4 $\mu\text{L/L}$ ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แสดงอาการได้มากกว่าที่เอทิลีนความเข้มข้น 0.2 $\mu\text{L/L}$ เพียงเล็กน้อย ในขณะที่ดอกกล้วยไม้ไม่ได้รับเอทิลีน แสดงอาการน้อยที่สุด สำหรับอาการเกิดเส้นแวน ดอกกล้วยไม้ที่ได้รับเอทิลีนความเข้มข้น 0.8 $\mu\text{L/L}$ แสดงอาการมากที่สุด รองลงมาคือ 0.4 0.2 และ ไม้ที่ได้รับเอทิลีน ตามลำดับ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 6 คะแนนของอาการสีซีด(A) การเหี่ยว(B) และการเกิดเส้นเวน(C) ของดอกกล้วยไม้หายพันธุ์มีสทินหลังได้รับเอทิลีนความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 7 คะแนนของอาการสีซีด(A) การเหี่ยว(B) และการเกิดเส้นเวน(C) ของดอกกล้วยไม้หวาย พันธุ์ขาวสนานหลังได้รับเอทิลีนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

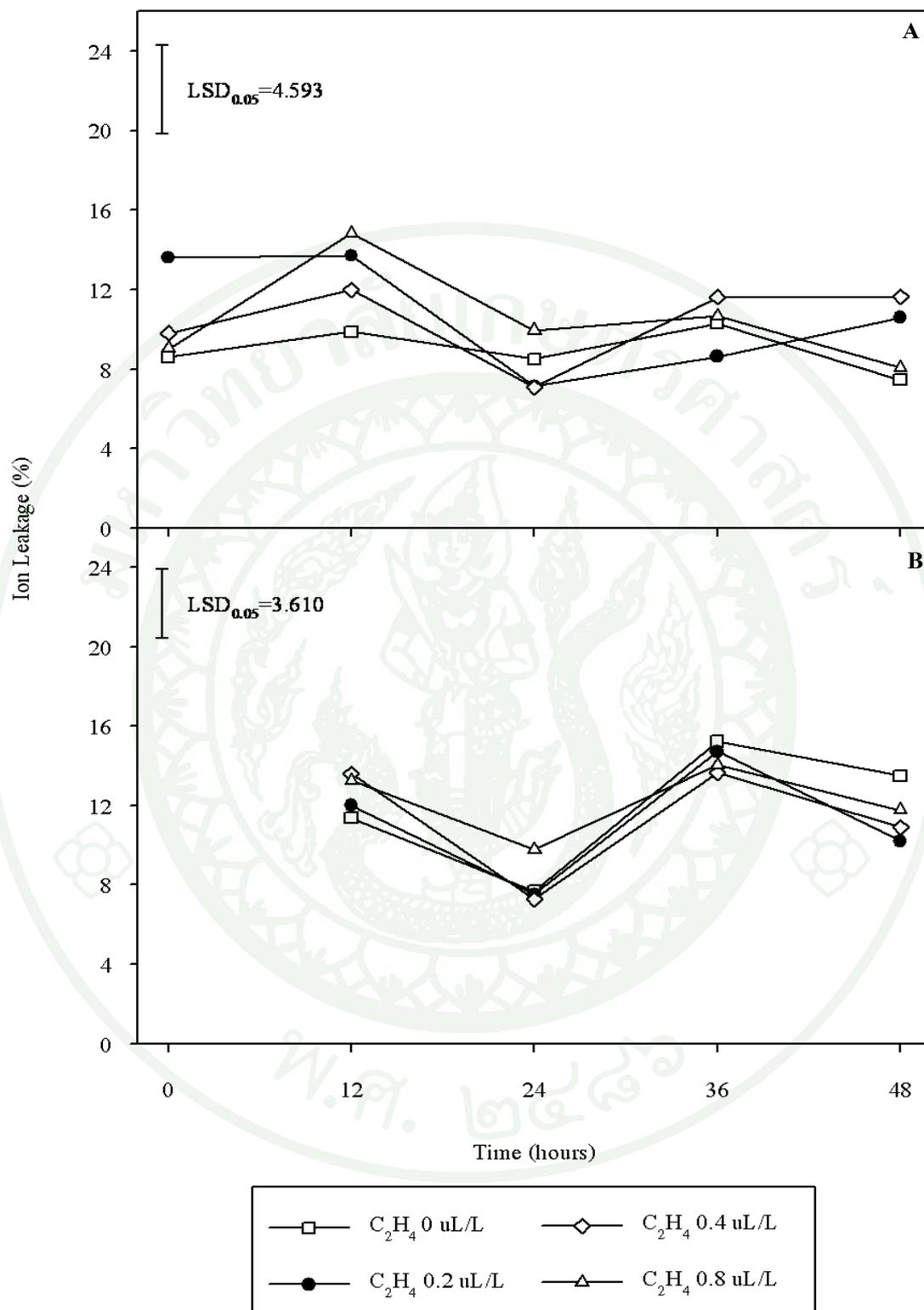


ภาพที่ 8 คะแนนของอาการสีซีด (A) การเหี่ยว (B) และการเกิดเส้นเวน (C) ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ทับทิมหลังได้รับเอทิลีนความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

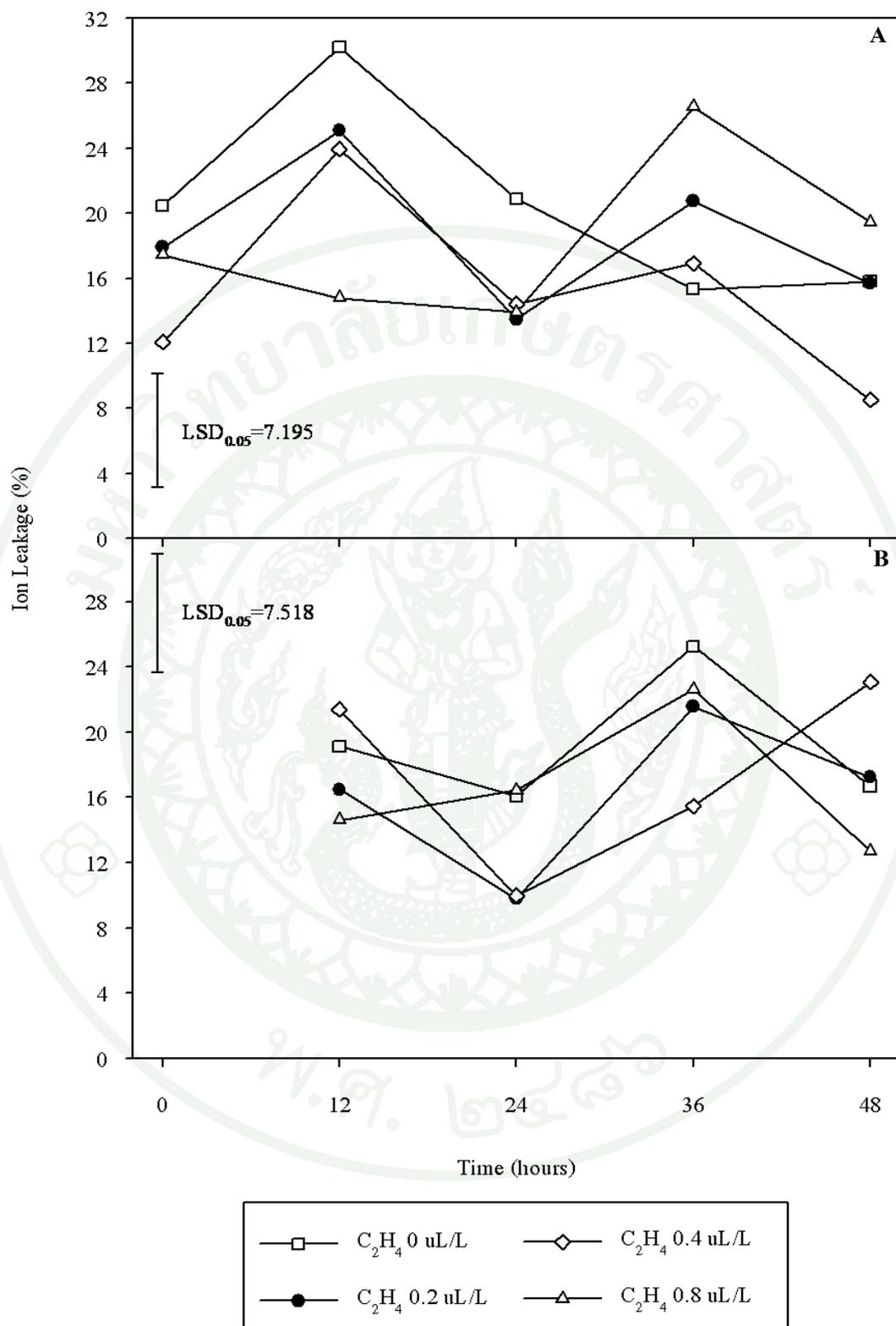
1.1.2 ค่าการรั่วไหลของประจุ (EC)

ดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษา EC โดยเลือกเฉพาะพันธุ์ลี้กี้ควน เพราะเป็นพันธุ์ที่ไวต่อเอทิลีน โดยแยกกลีบดอกบน และกลีบเลี้ยง ก่อนที่จะให้เอทิลีน และแยกกลีบดอกบนและกลีบเลี้ยงหลังจากให้เอทิลีน พบว่า ไม่มีความแตกต่างของค่าของ EC รวมทั้งค่า EC ของเส้าเกสร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในทุกทริทเมนต์ (ภาพที่ 9-11)

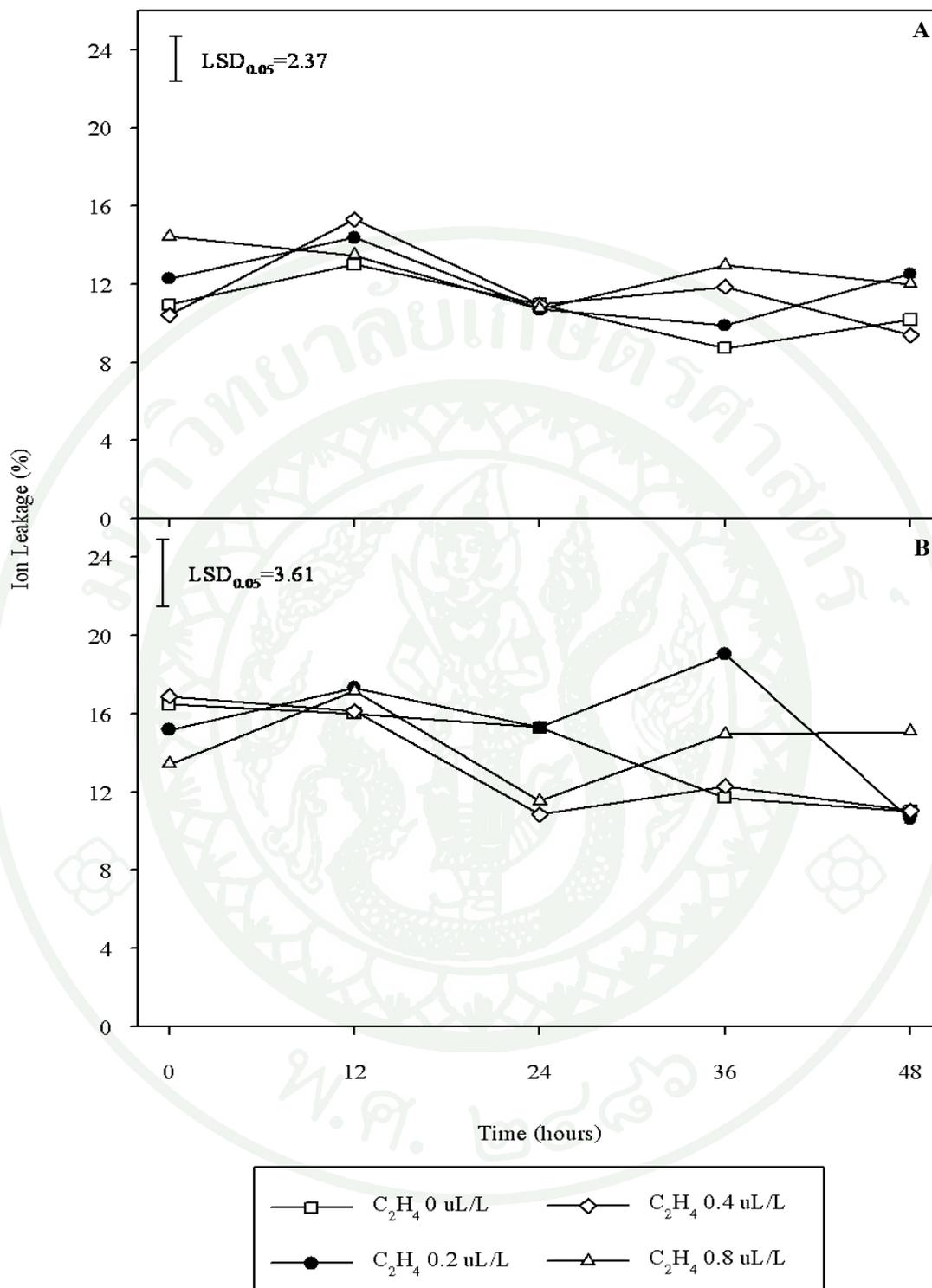
ในส่วนของการทดลองเฉพาะการให้เอทิลีนที่ความเข้มข้น $0.4 \mu\text{L/L}$ เพื่อเปรียบเทียบกับไม่ให้เอทิลีน ในดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลี้กี้ควน ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ไวต่อเอทิลีน พบว่าค่า EC ของส่วนเส้าเกสรที่ได้รับเอทิลีน มีค่าสูงกว่าไม่ได้รับเอทิลีนเล็กน้อย ในขณะที่ส่วนของกลีบดอกบนและกลีบเลี้ยง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 12)



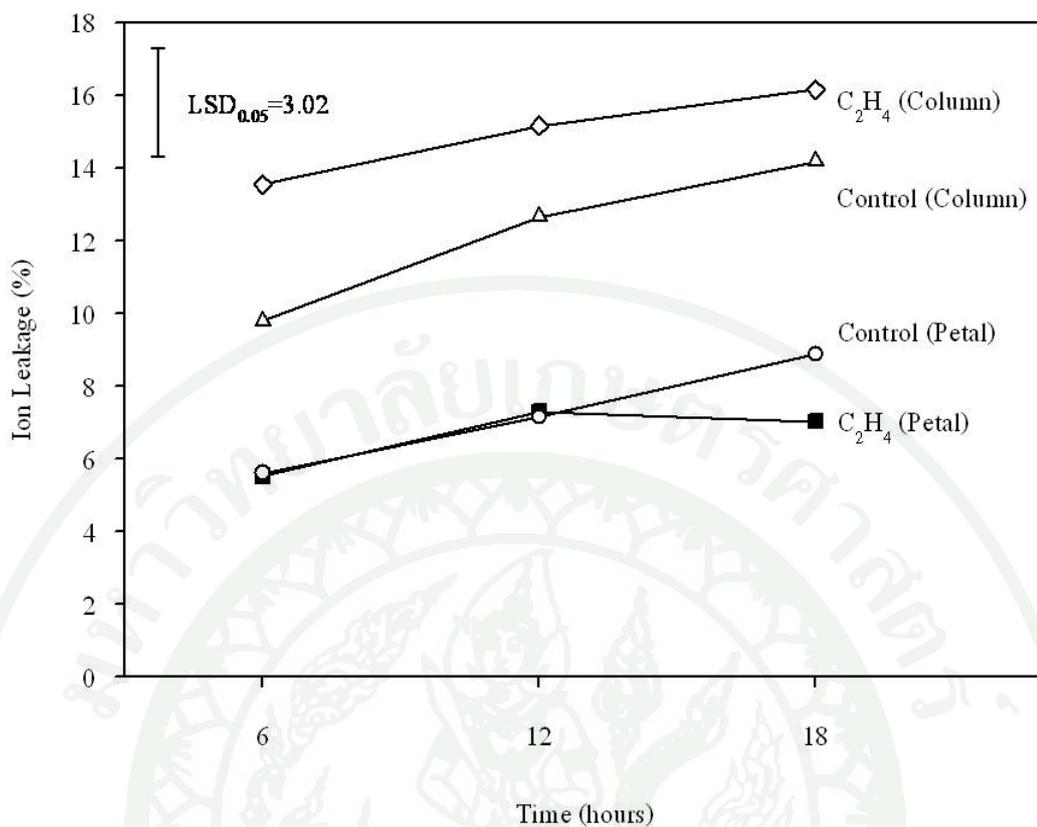
ภาพที่ 9 การรั่วไหลของประจุในกลีบดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลี้กี้ควนที่แยกก่อน(A) และกลีบดอกที่แยกหลัง(B) การได้รับเอทิลีนความเข้มข้นระดับต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 10 การรั่วไหลของประจุในเส้าเกสรดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลี้กี้ดวนที่แยกก่อน (A) และเส้าเกสรที่แยกหลัง (B) การได้รับเอทิลีนความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 11 การรั่วไหลของประจุในกลีบดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ตักกีดวน(A) และเส้าเกสร(B) ที่ได้รับเอทิลีนความเข้มข้นระดับต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

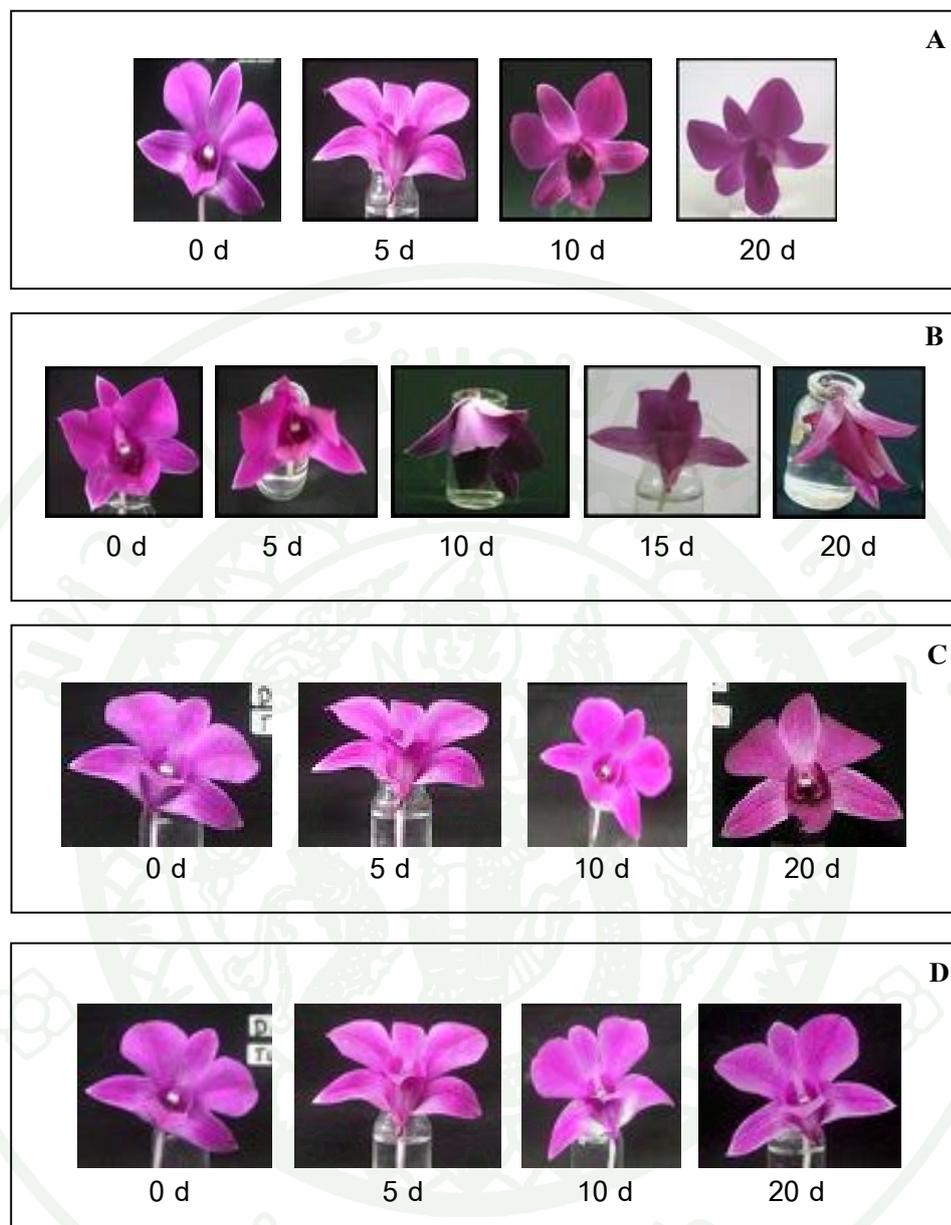


ภาพที่ 12 การรั่วไหลของประจุในกลีบดอกและเส้าเกสรของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกี้ควอนที่ไม่ได้รับเอทิลีนและได้รับเอทิลีนความเข้มข้น 0.4 $\mu\text{L/L}$

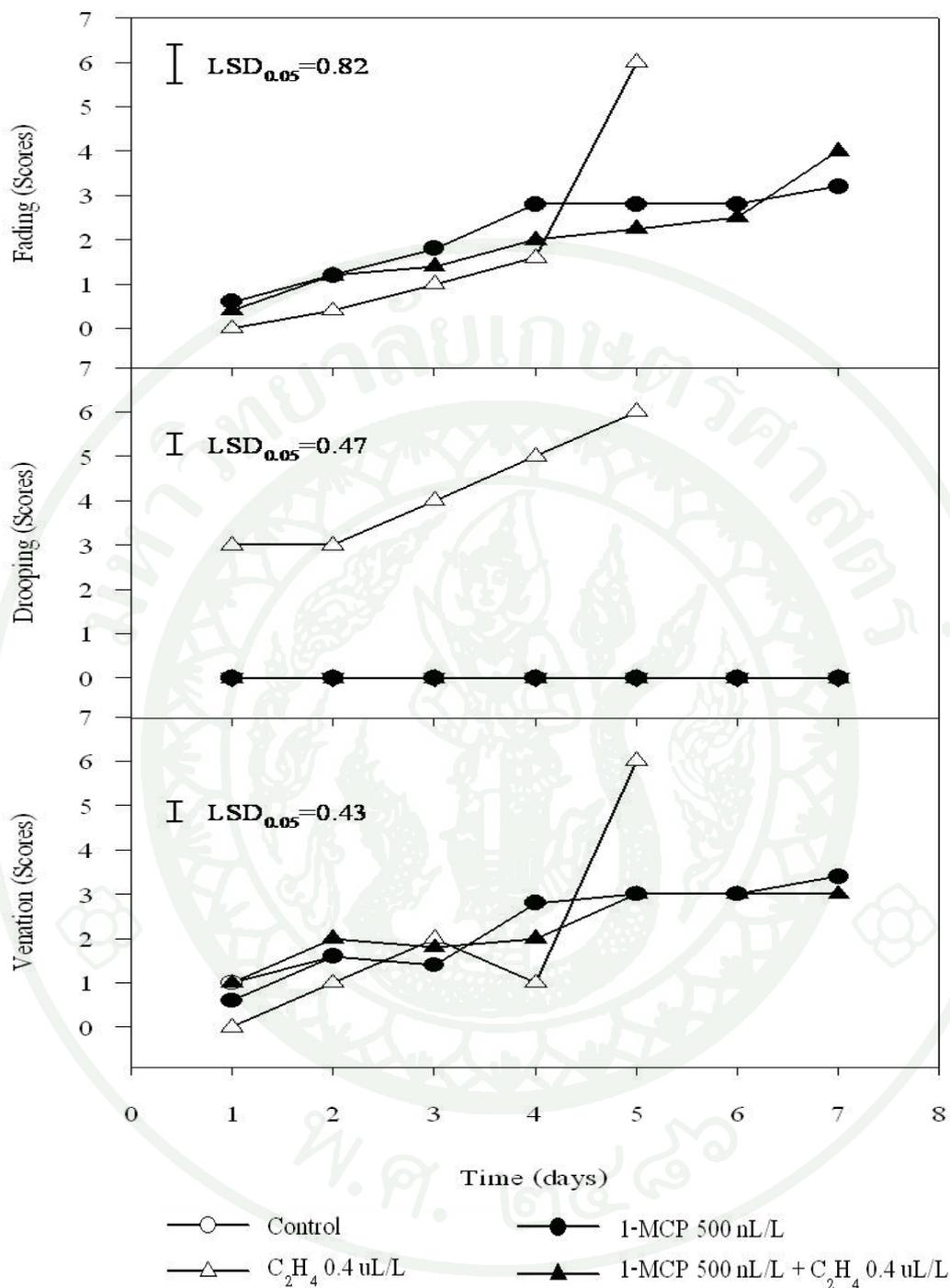
1.2 การตอบสนองต่อสารยับยั้งเอทิลีนของดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ที่ไวและไม่ไวต่อ เอทิลีน

เมื่อได้ความเข้มข้นของเอทิลีนที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดชราภาพของดอกกล้วยไม้และคัดเลือกดอกกล้วยไม้พันธุ์ที่ไวต่อเอทิลีนคือ พันธุ์ลัคกี้ควอน และพันธุ์ไม่วาโอคือ พันธุ์เรดบอมโม่ มาทดลองกับสารยับยั้งเอทิลีน โดยเปรียบเทียบ 4 ทริทเมนต์ คือ ไม่ได้รับเอทิลีน ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ ได้รับ 1-MCP 500 nL/L และ ได้รับ 1-MCP 500 nL/L ตามด้วยเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ ดอกกล้วยไม้ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ พบว่า พันธุ์ลัคกี้ควอน แสดงอาการชราของดอกตั้งแต่วันแรกและสิ้นสุดการใช้งาน 5 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ทริทเมนต์อื่น ดอกไม้ยังคงเป็นปกติและมีอายุมากกว่า 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อาการสีซีดเกิดขึ้นตามวันที่เพิ่มมากขึ้นหลังได้รับเอทิลีน ส่วนดอกกล้วยไม้ในทริทเมนต์อื่นไม่แสดงอาการ สำหรับการเกิดเส้นเวนของกลีบดอกในทุกทริทเมนต์ไม่มีความแตกต่างกัน ดังภาพที่ 13 และภาพที่ 14 แสดงถึงดอกกล้วยไม้พันธุ์ลัคกี้ควอน ที่ได้รับทริทเมนต์ต่างกัน ซึ่งดอกกล้วยไม้ที่ได้รับเอทิลีน หลังจากเก็บไว้หลังเก็บเกี่ยวตั้งแต่วันแรก (0 d) หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนกระทั่งถึง 20 วัน (20 d) หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดอกไม้ก็ยังคงมีลักษณะเหมือนเดิมไม่เปลี่ยนแปลง ยังคงมีความสมบูรณ์เป็นปกติ (ภาพที่ 13A) แต่ดอกกล้วยไม้ที่ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ หลังได้รับเอทิลีน 24 ชั่วโมง กลีบดอกกล้วยไม้แสดงอาการร่วงลงให้เห็นชัดเจนจนกระทั่งถึง 5 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กลีบดอกงอเพิ่มขึ้นมาก และแสดงอาการกลีบดอกงอเพิ่มขึ้นเมื่อนาน 10 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อถึง 15 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กลีบดอกงอมากขึ้น และดอกเริ่มแห้ง สีซีดเหลืองอย่างเห็นได้ชัดเจน การเกิดเส้นเวนเด่นชัด (ภาพที่ 13B) ดอกกล้วยไม้ในทริทเมนต์ที่ให้สารยับยั้งเอทิลีนพบว่าดอกกล้วยไม้ที่ได้รับ 1-MCP 500 nL/L กลีบดอกยังคงเป็นปกติตั้งแต่วันแรก และคงสภาพปกติจนกระทั่งถึง 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบทริทเมนต์ที่ไม่ได้รับเอทิลีนกลีบดอกก็ยังเป็นปกติและไม่แสดงการเปลี่ยนแปลง (ภาพที่ 13C) และเมื่อให้ดอกกล้วยไม้ได้รับ 1-MCP ก่อนให้เอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ ตามมานั้น พบว่ากลีบดอกยังคงเป็นปกติไม่แตกต่างจากดอกไม้ที่ไม่ได้รับเอทิลีน ตั้งแต่วันแรกจนกระทั่ง 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 13D)

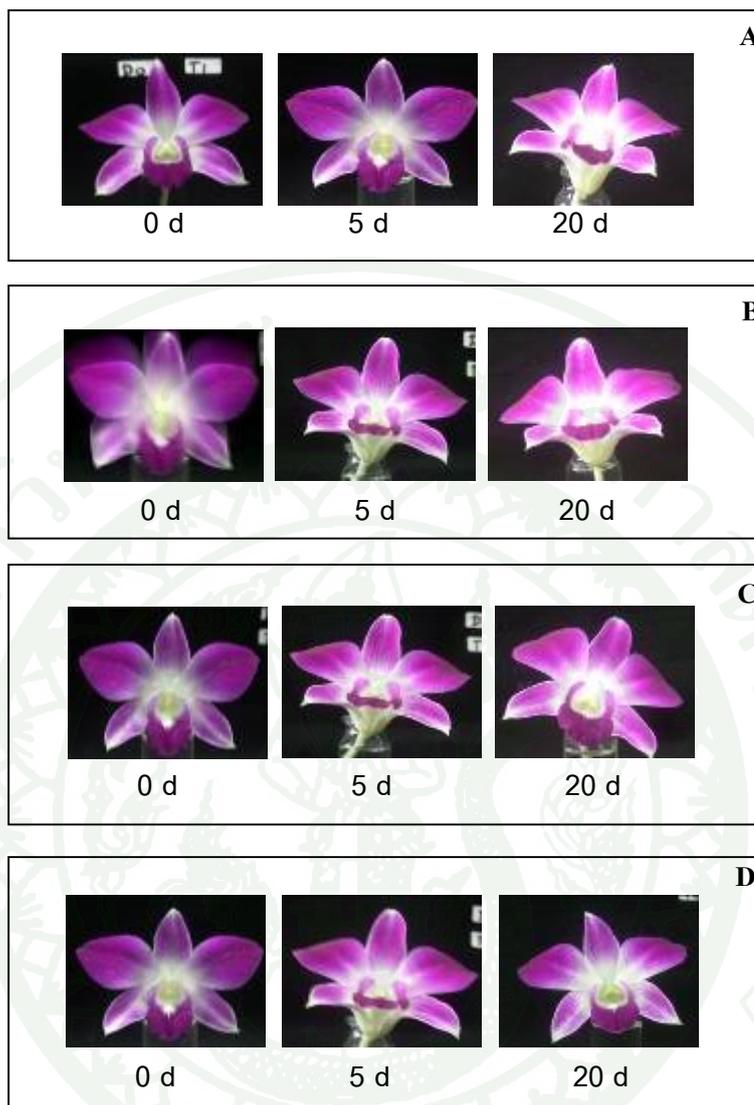
สำหรับพันธุ์เรดบอมโม่พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันในทุกทริทเมนต์ที่ให้กับดอกไม้ (ภาพที่ 15A-D และ ภาพที่ 16)



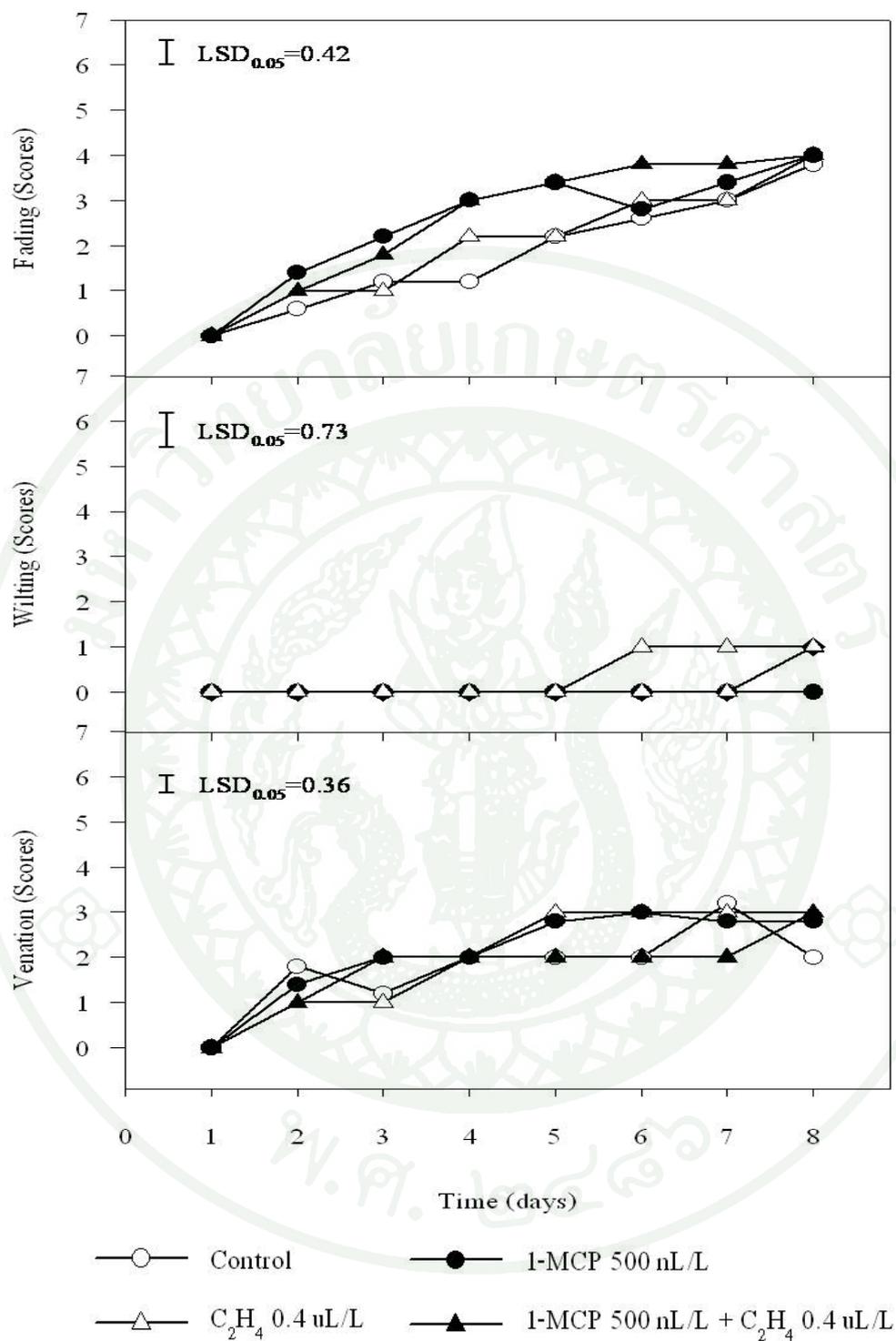
ภาพที่ 13 การเปลี่ยนแปลงสภาพของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลูกก๊วยควนที่ไม่ได้รับเอทิลีน(A) ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (B) 1-MCP 500 nL/L(C) และ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (D) เวลาต่าง ๆ (0 d before คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)



ภาพที่ 14 คะแนนของอาการสีซีด (A) การลู่ (B) และการเกิดเส้นเวน (C) ของดอกกล้วยไม้หวาย พันธุ์ลัคกี้ควน เวลาต่าง ๆ (0 d before คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวัน หลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)



ภาพที่ 15 การเสื่อมสภาพของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์เรดบอมโงที่ไม่ได้รับเอทิลีน(A) ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (B) 500 nL/L 1-MCP(C) และ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (D)



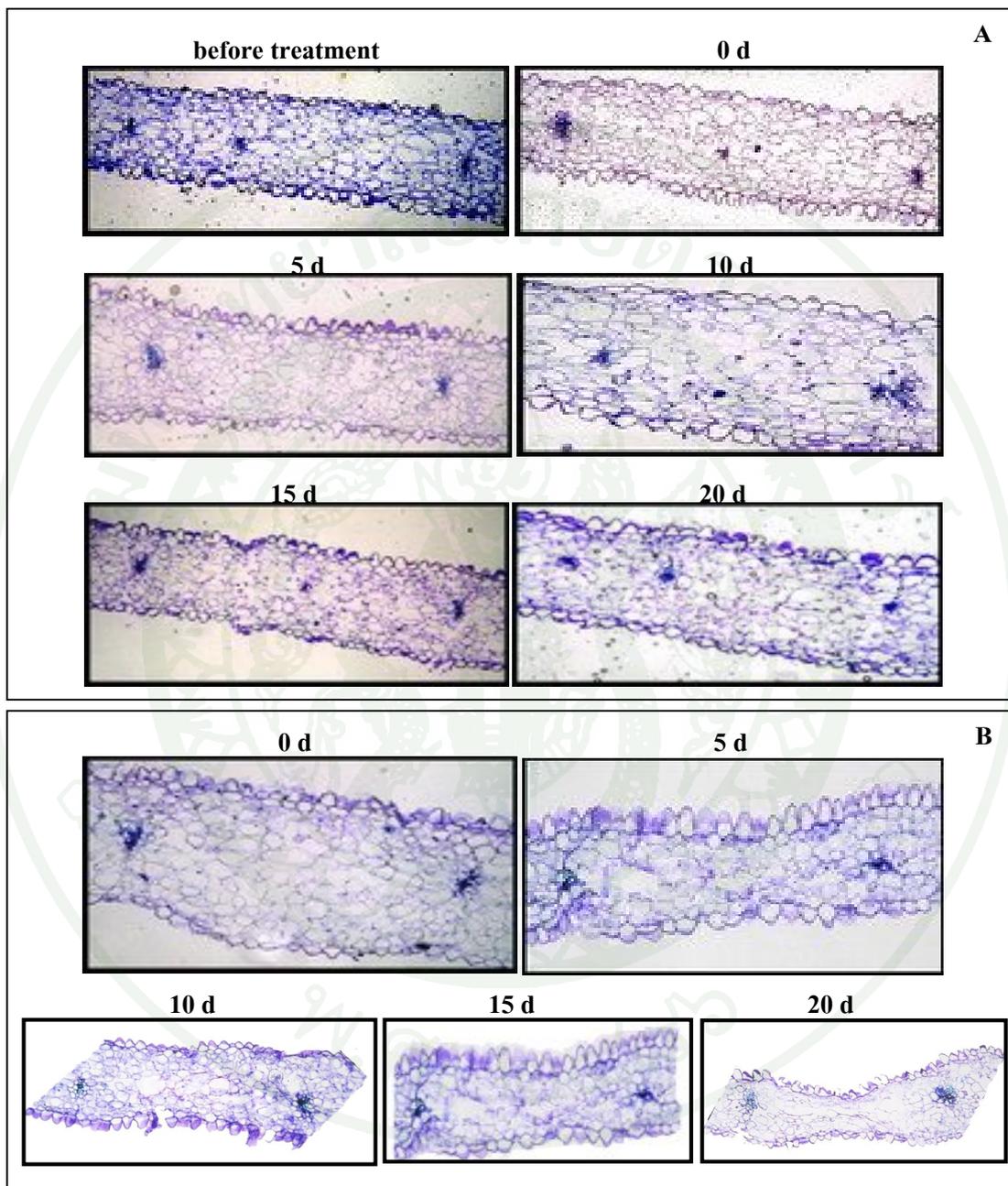
ภาพที่ 16 คะแนนของอาการสีซีด(A) การเหี่ยวหรือสลด(B) และการเกิดเส้นแวน(C) ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์เรดบอมโง

2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคและเซลล์วิทยาของดอกกล้วยไม้สกุลหวายในระหว่างการชราภาพ

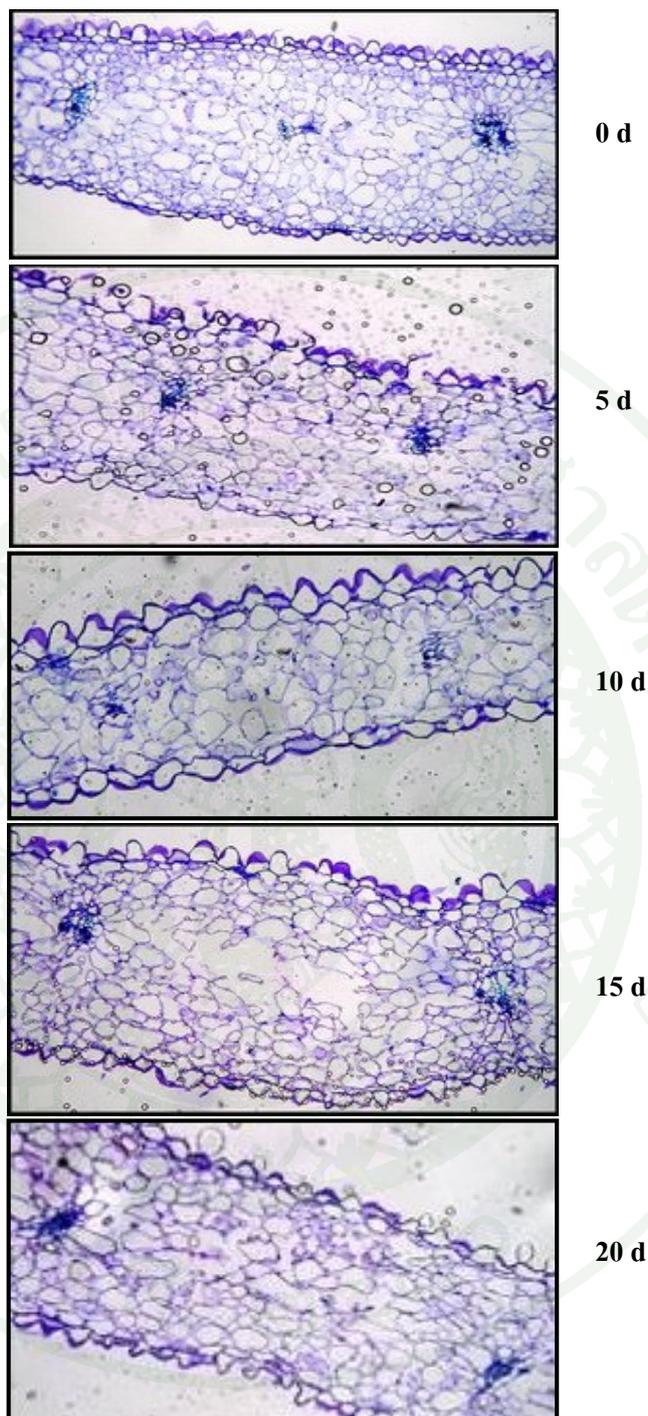
2.1 การศึกษาทางกายวิภาคของกลีบดอกของกล้วยไม้สกุลหวายระหว่างการชราภาพ

ทำการทดลองกับดอกกล้วยไม้พันธุ์ลัคกีควน และเรดบอมโจ โดยทำภาคตัดขวางของกลีบดอกบนของกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ เนื้อเยื่อดอกกล้วยไม้ที่นำมาศึกษาทางกายวิภาคทันทีหลังเก็บเกี่ยว และนำมาที่ห้องปฏิบัติการ (before treatment) หลังจากส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ทุกชั้นเซลล์เป็นปกติ มีความสมบูรณ์ของเซลล์ หลังจากนั้นเมื่อเริ่มให้ทริทเมนต์ สำหรับทริทเมนต์แรกคือไม่ให้เอทิลีน พบว่าในวันแรก เนื้อเยื่อกลีบดอก เซลล์ยังคงเป็นปกติ และไม่มีการเปลี่ยนแปลงจนกระทั่งถึง 5 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเก็บดอกไว้นาน 10 15 และ 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าบริเวณเซลล์ชั้นมีโซฟิลล์ เกิดการยุบตัว และเห็นเป็นช่องว่างขนาดเล็กกรอบบริเวณระหว่างท่อลำเลียงอาหาร ซึ่งช่องว่างที่เกิดขึ้นนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 17A) แต่เนื้อเยื่อกลีบดอกกล้วยไม้ที่ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ แล้วนำมาทำภาคตัดขวาง (ภาพที่ 17B) พบว่าหลังได้รับเอทิลีน 24 ชั่วโมง ชั้นเซลล์มีความผิดปกติเพียงเล็กน้อยบริเวณรอบท่อลำเลียง แต่เมื่อวางดอกกล้วยไม้ไว้นาน 5 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบความผิดปกติเกิดขึ้นชัดเจน ที่บริเวณชั้นเซลล์อีพิเดอมิสและพาเรงไคมา โดยเกิดรอบบริเวณท่อลำเลียงน้ำ ลำเลียงอาหาร และเห็นช่องว่างขนาดใหญ่ขยายเพิ่มขึ้นจากเดิม หลังจากวางดอกกล้วยไม้ไว้นาน 10 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขนาดของช่องว่างบริเวณเดียวกันมีขนาดใหญ่เพิ่มขึ้น และช่องว่างขนาดใหญ่นี้มีลักษณะเป็นทางยาวตลอดชั้นเซลล์มีโซฟิลล์ และพาเรงไคมา หลังจากดอกกล้วยไม้ได้รับทริทเมนต์แล้ว 15 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนกระทั่ง 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าความผิดปกตินี้แตกต่างไปจากวันที่ 15 เล็กน้อย คือเกิดการยุบตัวของเซลล์อีพิเดอมิสชั้นบน (ภาพที่ 17B) เมื่อให้สาร 1-MCP เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจนถึง 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าชั้นอีพิเดอมิสยังคงสมบูรณ์ ในขณะที่ชั้นเซลล์มีโซฟิลล์มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในช่วงระหว่างท่อลำเลียง ซึ่งเริ่มเกิดขึ้นตั้งแต่ 15 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 18) และเมื่อให้เนื้อเยื่อกลีบดอกได้รับ 1-MCP 500 nL/L ก่อนให้เอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ พบว่า เนื้อเยื่อชั้นมีโซฟิลล์ หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีความผิดปกติเพียงเล็กน้อย และอาการผิดปกตินั้นเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปจนกระทั่งถึง 15 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความผิดปกติบริเวณชั้นนี้เด่นชัดมากขึ้น โดยบริเวณเซลล์

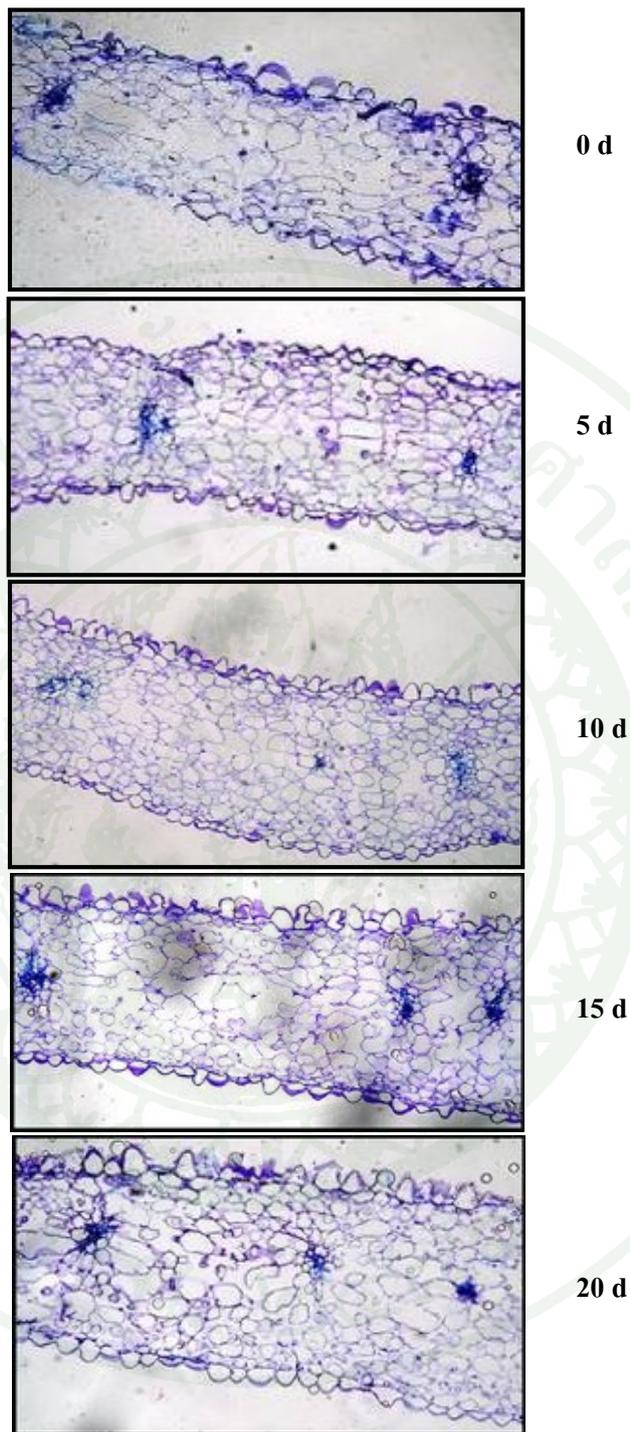
ชั้นมิโซฟิลล์เริ่มมีการฉีกขาดบริเวณระหว่างท่อลำเลียง และชั้นเซลล์อีพิเดอมิสยังคงเป็นปกติ จนกระทั่ง 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 17 การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ล็กก็ควนที่ไม่ได้รับเอทิลีน(A) และได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (B) เวลาต่างๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

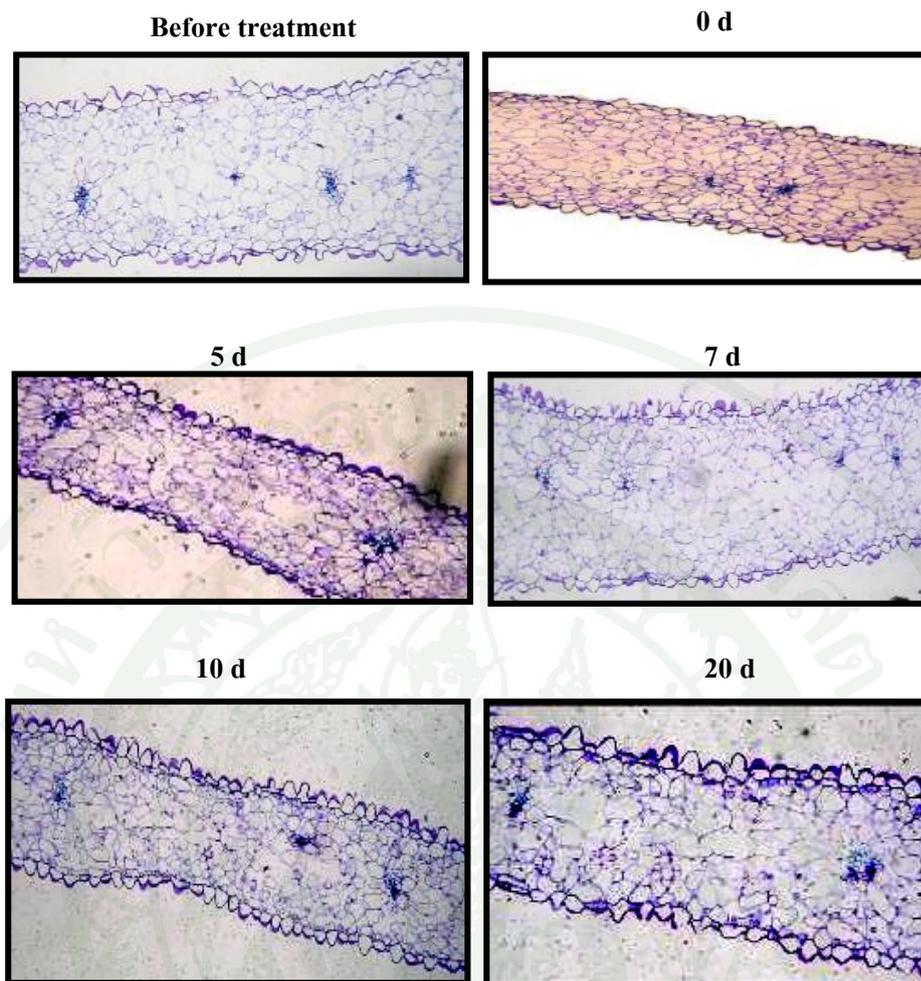


ภาพที่ 18 การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคภายใต้การดูล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลี้ก๊วคี่ควน หลังที่ได้รับ 1-MCP 500 nL/L เวลาต่าง ๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ ได้รับ ทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

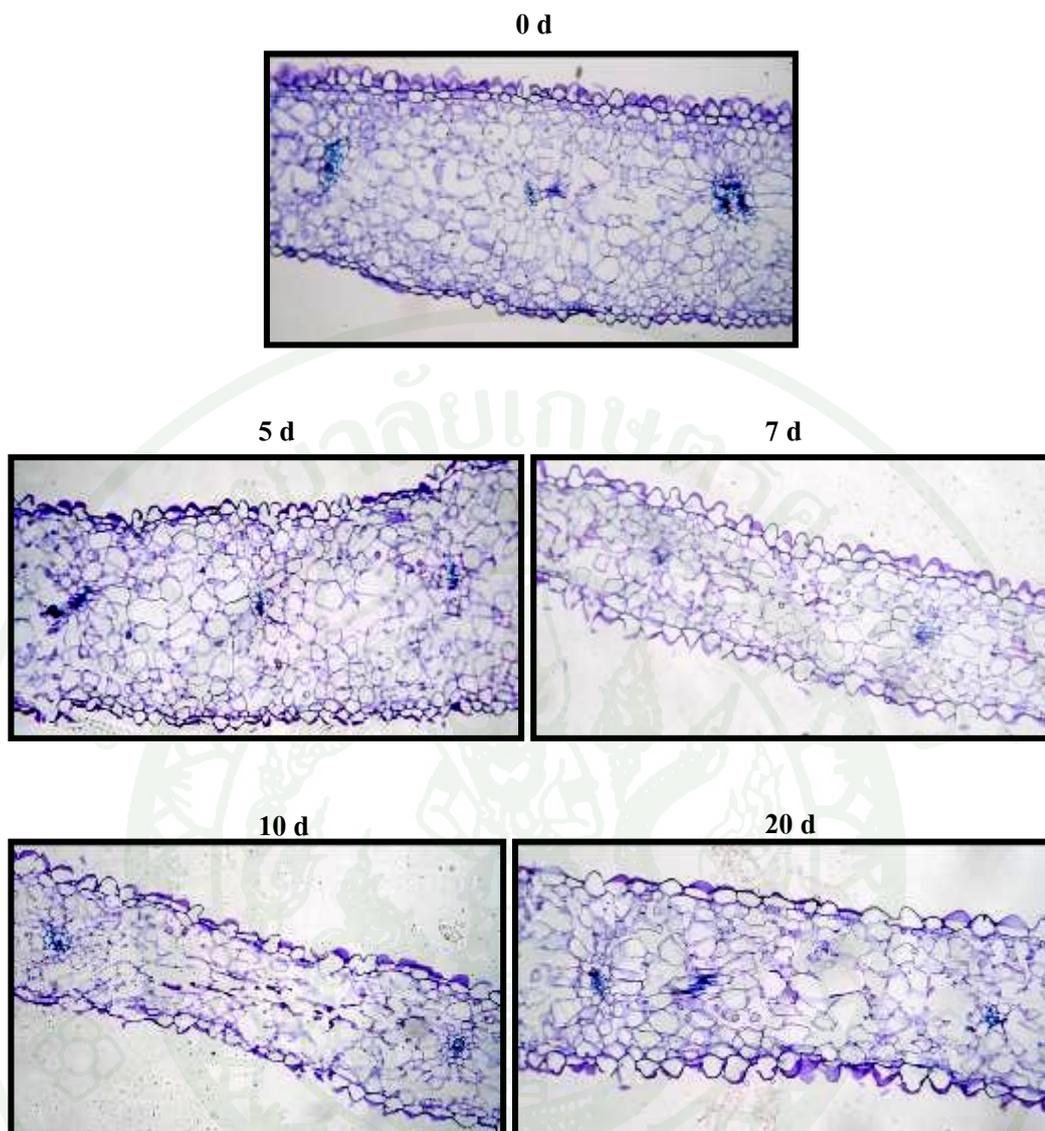


ภาพที่ 19 การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคภายใต้การดูล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลี้กั๊ควนหลังที่ได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 μ L/L เวลาต่าง ๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวัน หลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

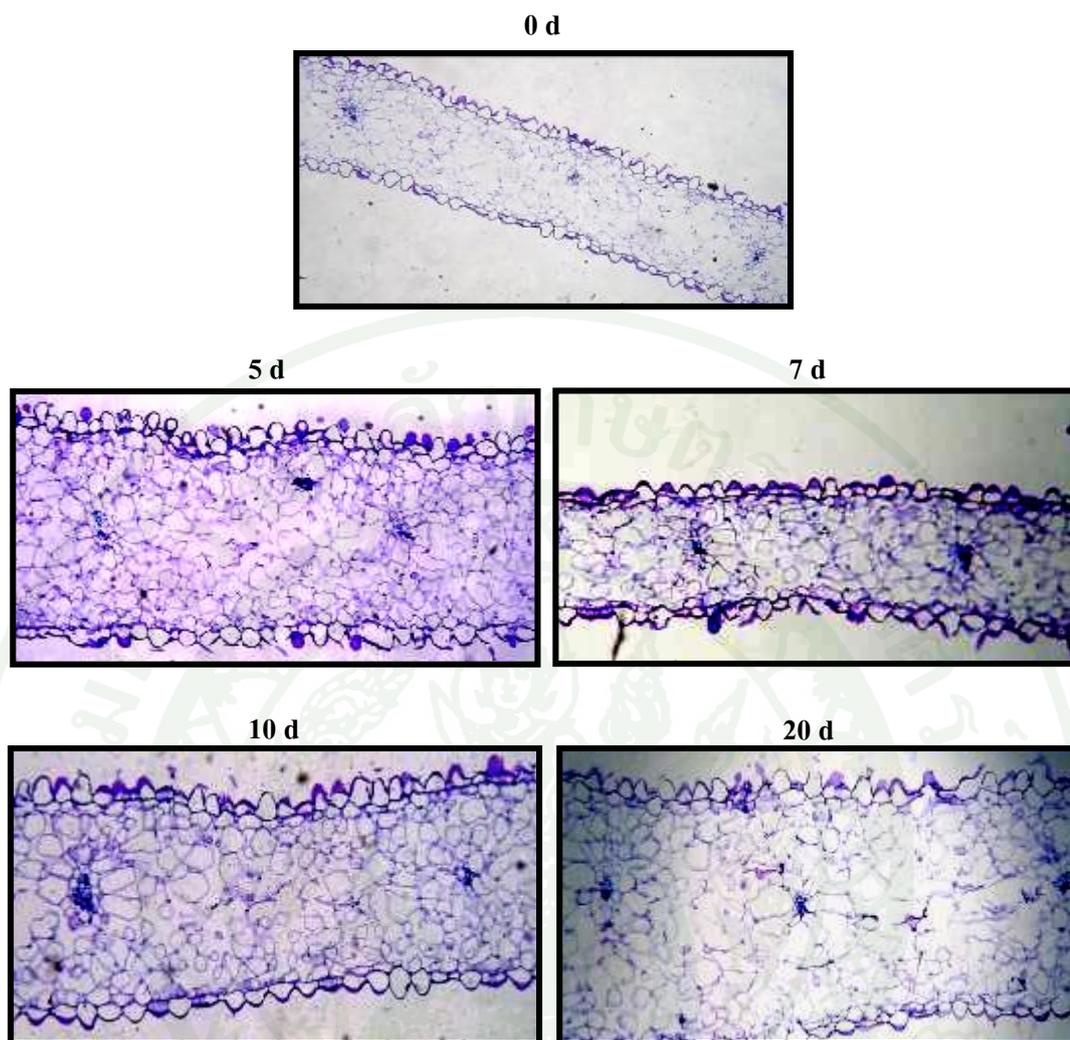
สำหรับผลการทำภาคตัดขวางของเนื้อเยื่อกลีบดอกกล้วยไม้พันธุ์เรดบอมโบ (ภาพที่ 20-23) พบว่าชั้นเซลล์อีพิเดอมิส ยังคงเป็นปกติจนกระทั่งถึง 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่ในชั้นเซลล์มิโซฟิลล์จะแสดงอาการยุบตัวเล็กน้อย เกิดขึ้นตั้งแต่ 15 วัน หลังได้รับ ทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งไม่แตกต่างกันกับ 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 20) สำหรับกลีบดอกกล้วยไม้ในทริทเมนต์ที่ได้รับเอทิลีน พบว่าในวันที่ 5 ชั้นเซลล์ มิโซฟิลล์ยุบตัวเล็กน้อย เป็นช่องว่างขนาดเล็กน้อยใกล้เคียงกับท่อลำเลียง และขนาดช่องว่าง ไม่ได้ขยายใหญ่ขึ้นในวันที่เก็บดอกไม้ไว้นานขึ้น ส่วนชั้นอีพิเดอมิสยังคงเป็นปกติจนกระทั่ง 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 21) สำหรับดอกกล้วยไม้ในทริทเมนต์ที่ได้รับ 1-MCP มีการยุบตัวเพียงเล็กน้อยบริเวณชั้นเซลล์มิโซฟิลล์ ปรากฏให้เห็นในวันที่ 10 ซึ่งผลไม่ ต่างกันกับ 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเซลล์ อีพิเดอมิสยังคงเป็นปกติ จนกระทั่ง 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 22) ในขณะที่ทริทเมนต์ให้ 1-MCP ก่อนการให้เอทิลีนพบว่าบริเวณชั้นมิโซฟิลล์มีช่องว่างขนาดเล็กน้อยเกิดขึ้นในวันที่ 5 แต่ไม่ แตกต่างกันกับ 7 และ 10 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่เพิ่มขนาดขึ้นอีกเล็กน้อย 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนชั้นเซลล์อีพิเดอมิสยังคงเป็นปกติตั้งแต่ 24 ชั่วโมงหลังการได้รับทริทเมนต์ จนกระทั่งถึง 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 20 การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคภายใต้การดักล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลี้ก๊วคั่นที่ไม่ได้รับเอทิลีน เวลาต่าง ๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)



ภาพที่ 22 การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคภายใต้การดูล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์เรดบอมโบ หลังที่ได้รับ 1-MCP 500 nL/L เวลาต่างๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)



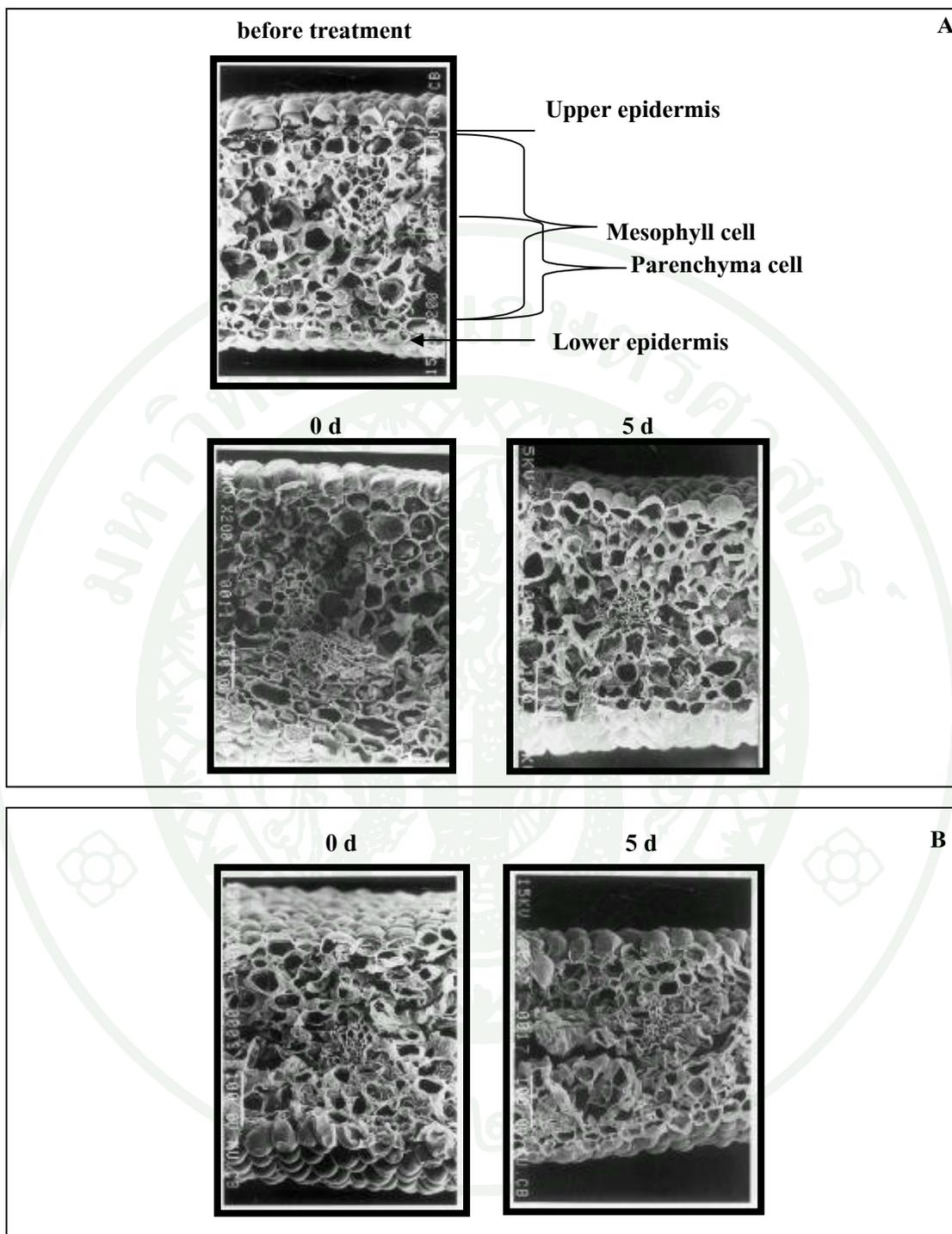
ภาพที่ 23 การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคภายใต้การดูแลของจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์เรดบอมโง่หลังที่ได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 μ L/L เวลาต่าง ๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

2.2 การศึกษาทางเซลล์วิทยาของดอกกล้วยไม้สกุลหวายในช่วงการชราภาพ

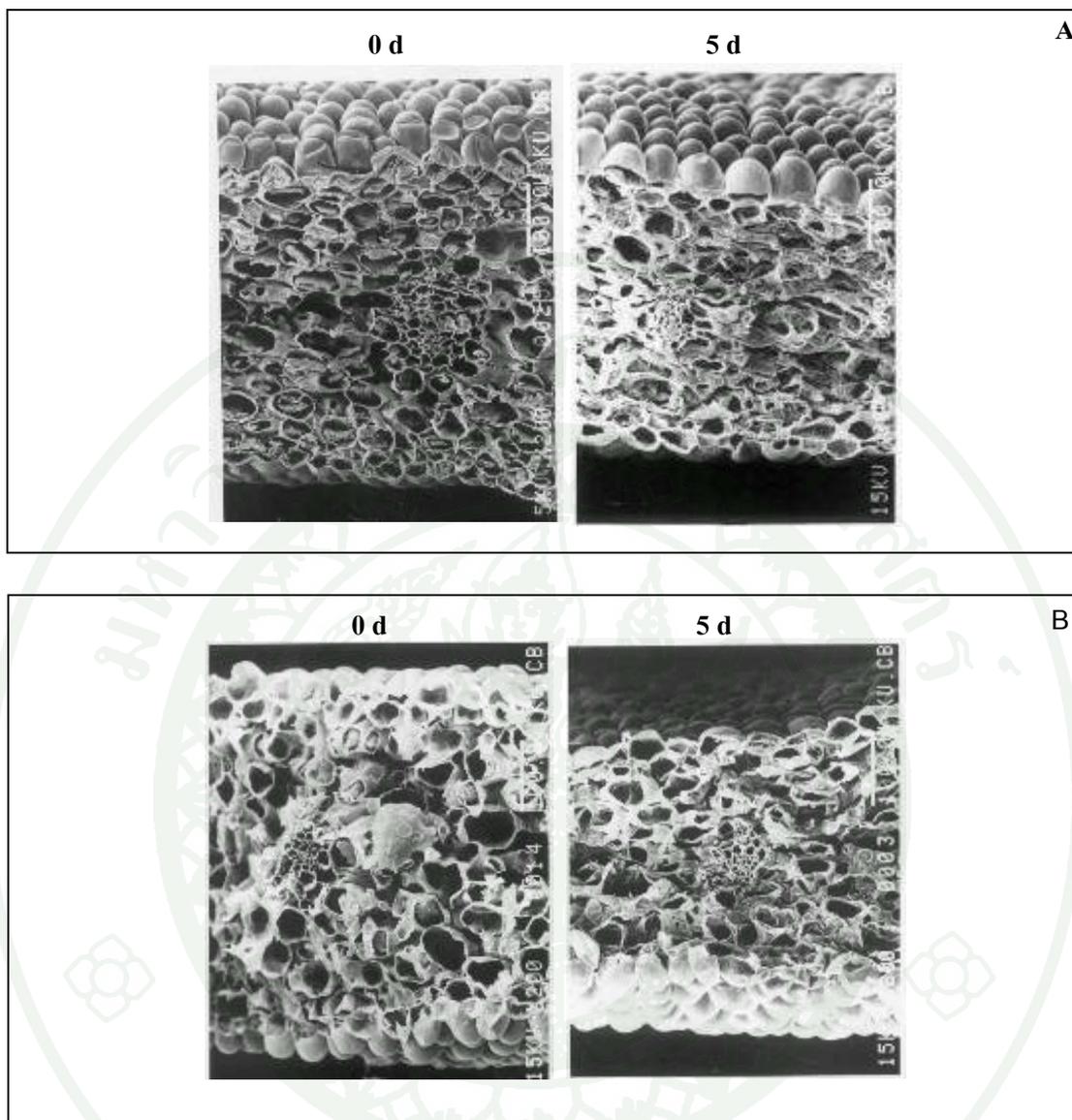
สำหรับการศึกษานี้ใช้เนื้อเยื่อเยื่อกลีบดอกภายใต้กล้อง SEM นั้น เพื่อยืนยันผลการทดลองใช้ดอกกล้วยไม้พันธุ์ลูกก๊ากวน โดยใช้เนื้อเยื่อเยื่อกลีบดอกบนเท่านั้น เนื่องจากเห็นการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นชัดเจนบริเวณชั้นเซลล์ต่าง ๆ จากการศึกษาภายใต้กล้อง SEM ในการทดลองที่ผ่านมา ผลการศึกษาพบว่า ในดอกที่ทำการศึกษาก่อน (0 d before) เซลล์ยังคงสมบูรณ์ ซึ่งเห็นเป็นช่องเซลล์ขนาดใหญ่จำนวนมากทั้งบริเวณชั้นเซลล์มีโซฟิลล์ และพารังโคมา ส่วนชั้นเซลล์อีพิเดอมิสชั้นบน ก็ยังคงมีความสมบูรณ์ ในขณะที่เซลล์กลีบดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับเอทิลีนเมื่อวางไว้ 24 ชั่วโมง (0 d) เซลล์ยังคงมีความสมบูรณ์เช่นกัน และเมื่อวางไว้ 5 วัน (5 d) หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ยังคงมีลักษณะเดิม ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลง (ภาพที่ 24A) แต่เมื่อเซลล์กลีบดอกกล้วยไม้ที่ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์แสดงการเหี่ยวลงเล็กน้อยโดยในชั้นเซลล์มีโซฟิลล์พบขนาดช่องเซลล์เล็กลง แต่บริเวณชั้นเซลล์อีพิเดอมิสยังคงเป็นปกติ เมื่อตั้งวางไว้ 5 วัน (5 d) หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์เหี่ยวมากขึ้น ซึ่งพบเซลล์มีขนาดเล็กลงทั้งบริเวณเซลล์มีโซฟิลล์และพารังโคมา และชั้นเซลล์อีพิเดอมิสชั้นล่างพบว่าเซลล์เหี่ยวลงเล็กน้อย (ภาพที่ 26B) ส่วนกลีบดอกกล้วยไม้ที่ได้รับ 1-MCP 500 nL/L หลังการให้สาร 24 ชั่วโมง และจนถึง 5 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ยังคงเป็นปกติ ขนาดของเซลล์แต่ละเซลล์ค่อนข้างสม่ำเสมอ (ภาพที่ 25A) ในขณะที่กลีบดอกกล้วยไม้ที่ได้รับ 1-MCP 500 nL/L ก่อนการให้เอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ ทุกชั้นเซลล์ยังคงเป็นปกติ เมื่อตั้งไว้ 24 ชั่วโมง และ 5 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บริเวณชั้นเซลล์พารังโคมาเหี่ยวลงเล็กน้อย (ภาพที่ 25D)

สำหรับการศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงของออร์แกเนลล์ภายในเซลล์ ภายใต้การส่องกล้อง TEM นั้น ในการทดลองนี้ใช้เฉพาะพันธุ์ดอกกล้วยไม้หวายที่ไวต่อเอทิลีน คือพันธุ์ลูกก๊ากวน โดยใช้เนื้อเยื่อส่วนกลีบดอกบน วิเคราะห์ผลการทดลองภายในเซลล์บริเวณรอบ และระหว่างท่อลำเลียงของชั้นเซลล์มีโซฟิลล์ ซึ่งเป็นชั้นเซลล์ที่มีการเสื่อมสภาพของเซลล์ชัดเจนหลังได้รับเอทิลีน ซึ่งผลการทดลองพบว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับเอทิลีน และได้รับ 1-MCP พ่นและเยื่อหุ้มเซลล์ยังคงความสมบูรณ์ ในขณะที่ออร์แกเนลล์หลายชนิด เช่น นิวเคลียส ไมโทคอนเดรีย พลาสติด เม็ดแป้ง และอื่น ๆ ยังคงเป็นปกติ แต่เซลล์ที่ได้รับเอทิลีนผนังเซลล์บาง และเยื่อหุ้มเซลล์เสื่อมสภาพ ออร์แกเนลล์บางชนิดมีการเสื่อมสภาพให้เห็นชัดเจน ดังเช่น เยื่อหุ้มนิวเคลียสแตก โครมาตินในนิวเคลียสแตกหักและรวมตัวเป็นกลุ่ม เกิดความหนาแน่นของอิเล็กตรอน บริเวณ cristae ภายในไมโทคอนเดรียขยายตัวเพิ่มขึ้น เกิดความหนาแน่นของอิเล็กตรอน และสร้างเวสซิเคิลขนาดเล็กจำนวนมาก หรือออร์แกเนลล์บางชนิดไม่มีการเปลี่ยนแปลง เป็นต้น

เนื่องจากออร์แกนเนลล์บางชนิดเกิดการเปลี่ยนแปลงเห็นได้ชัดเจนทั้งไม่ได้รับเอทิลีน และได้รับเอทิลีน ประกอบกับผลการทดลองชัดเจนว่า การให้ 1-MCP สามารถชะลอการเปลี่ยนแปลงในระดับออร์แกนเนลล์ได้เช่นเดียวกับทางสรีรวิทยาและกายวิภาค ดังผลการทดลองต่อไปนี้นำเสนอโดยแยกเป็นแต่ละออร์แกนเนลล์ ทริทเมนต์และวันที่สังเกตการเปลี่ยนแปลง รวมถึงดูกระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นพิเศษสำหรับไมโทคอนเดรีย และพลาสติด เพราะเป็นออร์แกนเนลล์ที่มีความสำคัญมากต่อการมีชีวิตของเซลล์และเกี่ยวข้องอย่างชัดเจนในกระบวนการเกิดลักษณะทาง PCD โดยศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงอย่างละเอียด ทุกระยะของการพัฒนาเซลล์ ไม่แยกเป็นแต่ละทริทเมนต์ แต่การดูแต่ละระยะการพัฒนาของเซลล์จากขนาดของแวคคิวโอลต่อพื้นที่เซลล์ทั้งหมดโดยไม่รวมส่วนของผนังเซลล์



ภาพที่ 24 การเปลี่ยนแปลงทางเซลล์วิทยาภายใต้การดูล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 200 เท่า ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกีควนที่ไม่ได้รับเอทิลีน(A) และได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (B) เวลาต่างๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)



ภาพที่ 25 การเปลี่ยนแปลงทางเซลล์วิทยาภายใต้การดูล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 200 เท่าของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลี้กี้ดวนที่ได้รับ 1-MCP 500 nL/L(A) และได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 μ L/L(B) เวลาต่างๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

ก. นิวเคลียส (nucleus)

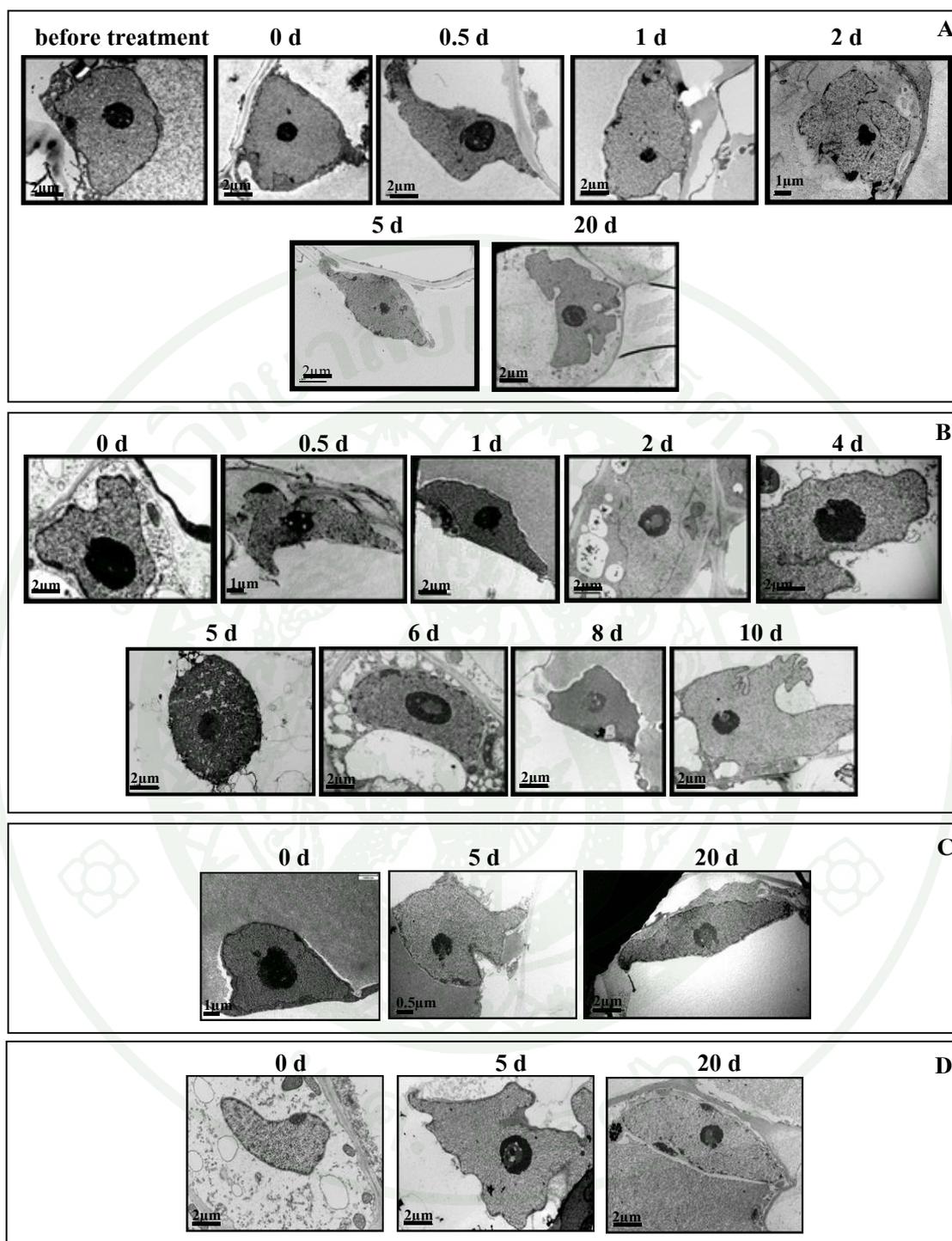
ดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับเอทิลิน(ภาพที่ 26 A) นิวเคลียสและเยื่อหุ้มนิวเคลียสมีความสมบูรณ์จนกระทั่ง 20 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงเริ่มแสดงอาการเยื่อหุ้มนิวเคลียสเริ่มเสื่อมสภาพบางลงกว่าปกติ สำหรับดอกกล้วยไม้ที่ได้รับเอทิลิน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (ภาพที่ 26B) พบว่าภายในนิวเคลียสเริ่มผิดปกติตั้งแต่หลังการได้รับ เอทิลินที่ 24 ชั่วโมง ในขณะที่เยื่อหุ้มนิวเคลียสยังคงปกติ และเยื่อหุ้มนิวเคลียสเริ่มบางลงเมื่อถึง 4 และ 5 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถึง 6 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายในนิวเคลียสผิดปกติมากขึ้นและเยื่อหุ้มนิวเคลียสเริ่มแตก ช่วง 8 และ 10 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อาการที่เกิดขึ้นเหมือนกับ 6 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับดอกกล้วยไม้ที่ได้รับ 1-MCP (ภาพที่ 26 C) พบว่าโครงสร้างนิวเคลียสรวมถึงเยื่อหุ้มนิวเคลียสยังสมบูรณ์ แต่ 5 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เยื่อหุ้มนิวเคลียสเริ่มบางลง และ 20 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โครงสร้างภายในนิวเคลียสมีความผิดปกติเล็กน้อย ขณะที่เยื่อหุ้มนิวเคลียสบางลงมากและขาดเป็นช่วงๆ ส่วนดอกกล้วยไม้ที่ได้รับ 1-MCP ร่วมกับเอทิลิน (ภาพที่ 26 D) หลังได้รับทริทเมนต์ 24 ชั่วโมง โครงสร้างภายในนิวเคลียสเริ่มแสดงอาการผิดปกติเพียงเล็กน้อย เยื่อหุ้มนิวเคลียสยังคงปกติ ขณะที่ 5 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เยื่อหุ้มนิวเคลียสเริ่มขาด และขาดมากขึ้นเมื่อถึง 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ข. โครมาติน (chromatin)

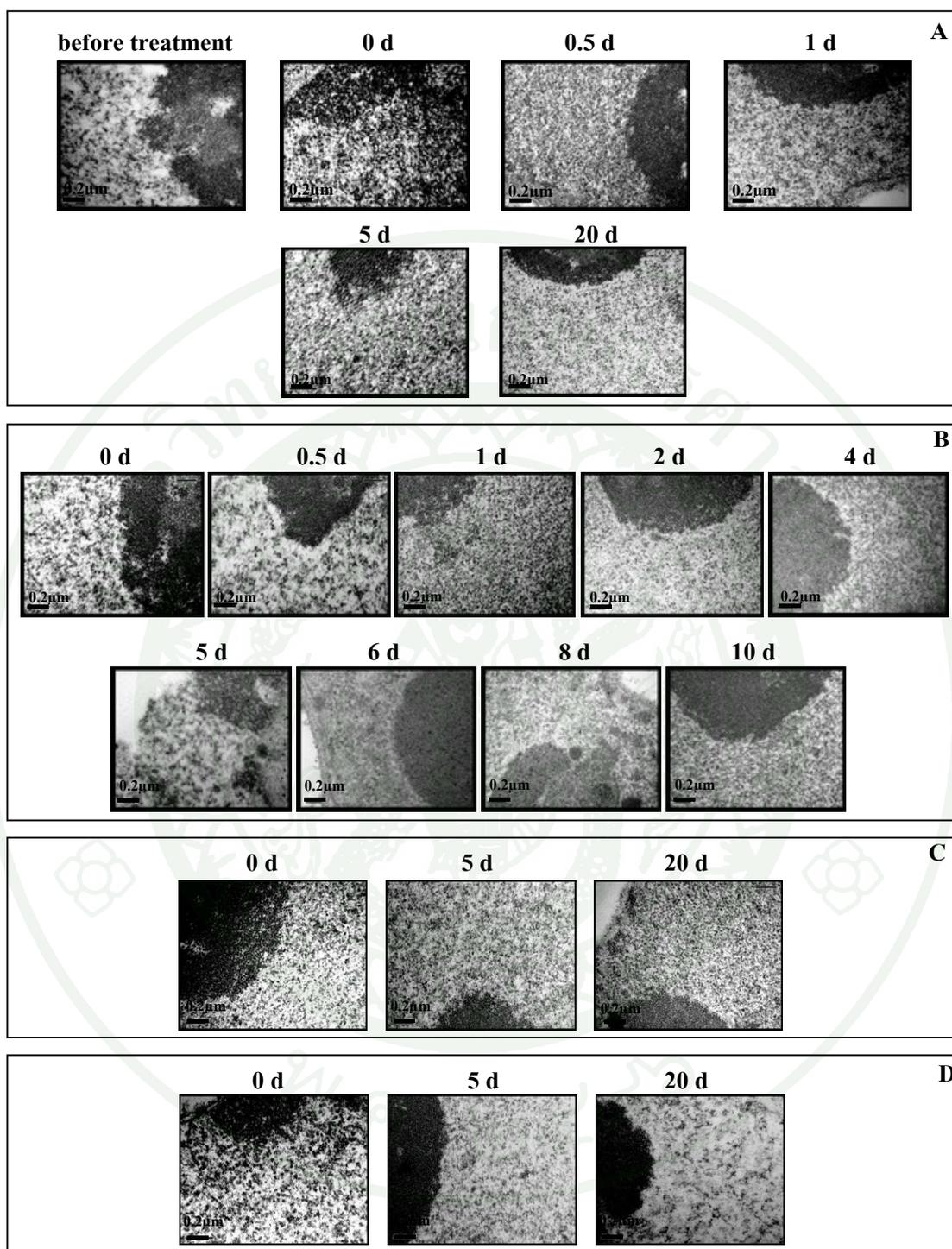
ดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับเอทิลินเริ่มตั้งแต่ก่อนได้รับทริทเมนต์จนกระทั่ง 20 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โครมาตินภายในนิวเคลียสยังคงเป็นปกติ (ภาพที่ 27 A) ส่วนดอกกล้วยไม้ที่ได้รับเอทิลิน (ภาพที่ 27B) โครมาตินภายในนิวเคลียสแตกหักรวมตัวกันเป็นกลุ่ม โดยเริ่มตั้งแต่หลังการได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนกระทั่ง 4 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีลักษณะไม่แตกต่างกันกับวันแรก แต่เห็นชัดเจนมากขึ้นเมื่อเข้าสู่ 5 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับ 6 8 และ 10 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นจาก 5 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพียงเล็กน้อย สำหรับดอกกล้วยไม้ที่ได้รับ 1-MCP (ภาพที่ 27C) โครมาตินภายในนิวเคลียส ตั้งแต่วันแรกจนกระทั่ง 5 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยังคงเป็นปกติ และเริ่มแสดงอาการผิดปกติเพียงเล็กน้อย เมื่อถึง 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ดอกกล้วยไม้ที่ได้รับ 1-MCP ร่วมกับเอทิลิน พบว่าโครมาตินตั้งแต่วันแรกจนถึง 5 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็น

เวลา 24 ชั่วโมง ยังเป็นปกติ และ 20 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เกิดอาการ ผิดปกติเพียงเล็กน้อย แต่เกิดอาการผิดปกติมากกว่า 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ของทริทเมนต์ที่ได้รับ 1-MCP เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 27D)





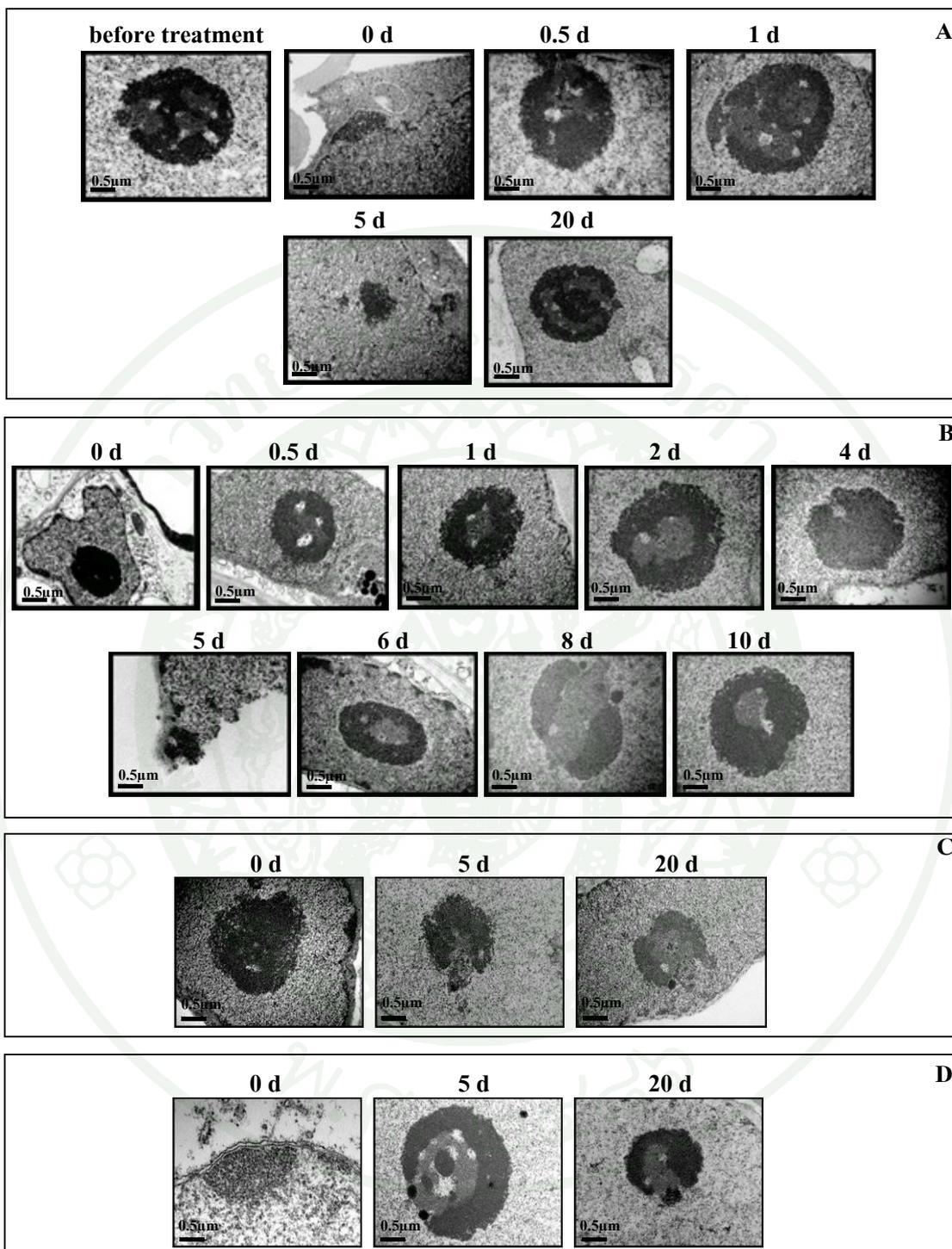
ภาพที่ 26 การเปลี่ยนแปลงนิวเคลียสของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกี้ควอนที่ไม่ได้รับเอทิลีน(A) ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (B) ได้รับ 1-MCP 500 nL/L(C) และได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (D) เวลาต่างๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับ ทรिटเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทรिटเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)



ภาพที่ 27 การเปลี่ยนแปลงโครมาตินของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ล็กก็ควานที่ไม่ได้รับเอทิลีน(A) ได้รับเอทิลีน 0.4 μL/L(B) ได้รับ 1-MCP 500 nL/L(C) ได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 μL/L(D) เวลาต่างๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

ค. นิวคลีโอลัส (Nucleolus)

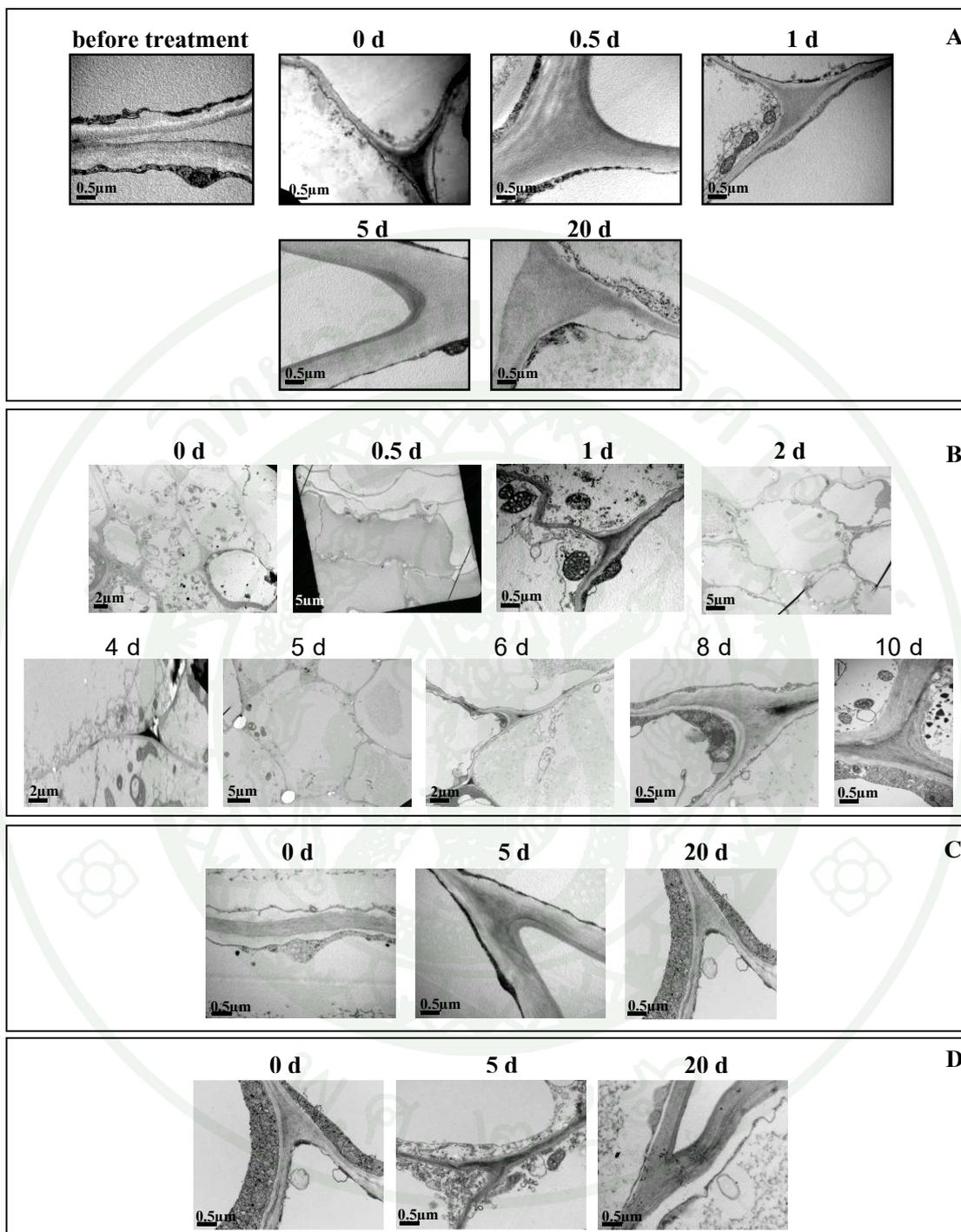
ดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับเอทิลีน นิวคลีโอลัสเป็นปกติตั้งแต่วันแรกจนกระทั่งถึง 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 28A) ดอกกล้วยไม้ที่ได้รับเอทิลีน นิวคลีโอลัสเริ่มแสดงอาการผิดปกติ 2 วัน หลังจากได้รับเอทิลีนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยตรงกลางของนิวคลีโอลัสขยายใหญ่มีช่องว่างมากขึ้น และแสดงอาการต่อเนื่องตั้งแต่ 4 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนกระทั่งถึง 10 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 28B) ในขณะที่ดอกกล้วยไม้ได้รับ 1-MCP หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนกระทั่งถึง 5 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นิวคลีโอลัสยังเป็นปกติ แต่เริ่มแสดงอาการผิดปกติชัดเจนเมื่อถึง 20 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ช่องตรงกลางของนิวคลีโอลัสขยายขนาดใหญ่กว่าปกติ (ภาพที่ 28C) ส่วนดอกกล้วยไม้ที่ได้รับ 1-MCP ร่วมกับเอทิลีนหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยังคงเป็นปกติ แสดงอาการผิดปกติเริ่มให้เห็น 5 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเห็นชัดขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งถึง 20 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 28D)



ภาพที่ 28 การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอลัสของดอกกล้วยไม้หายพันธุ์ลูกกึ่งควน ที่ไม่ได้รับเอทิลีน (A) ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (B) ที่ได้รับ 1-MCP 500 nL/L(C) และได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (D) (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

ง. ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ (cell wall and membrane)

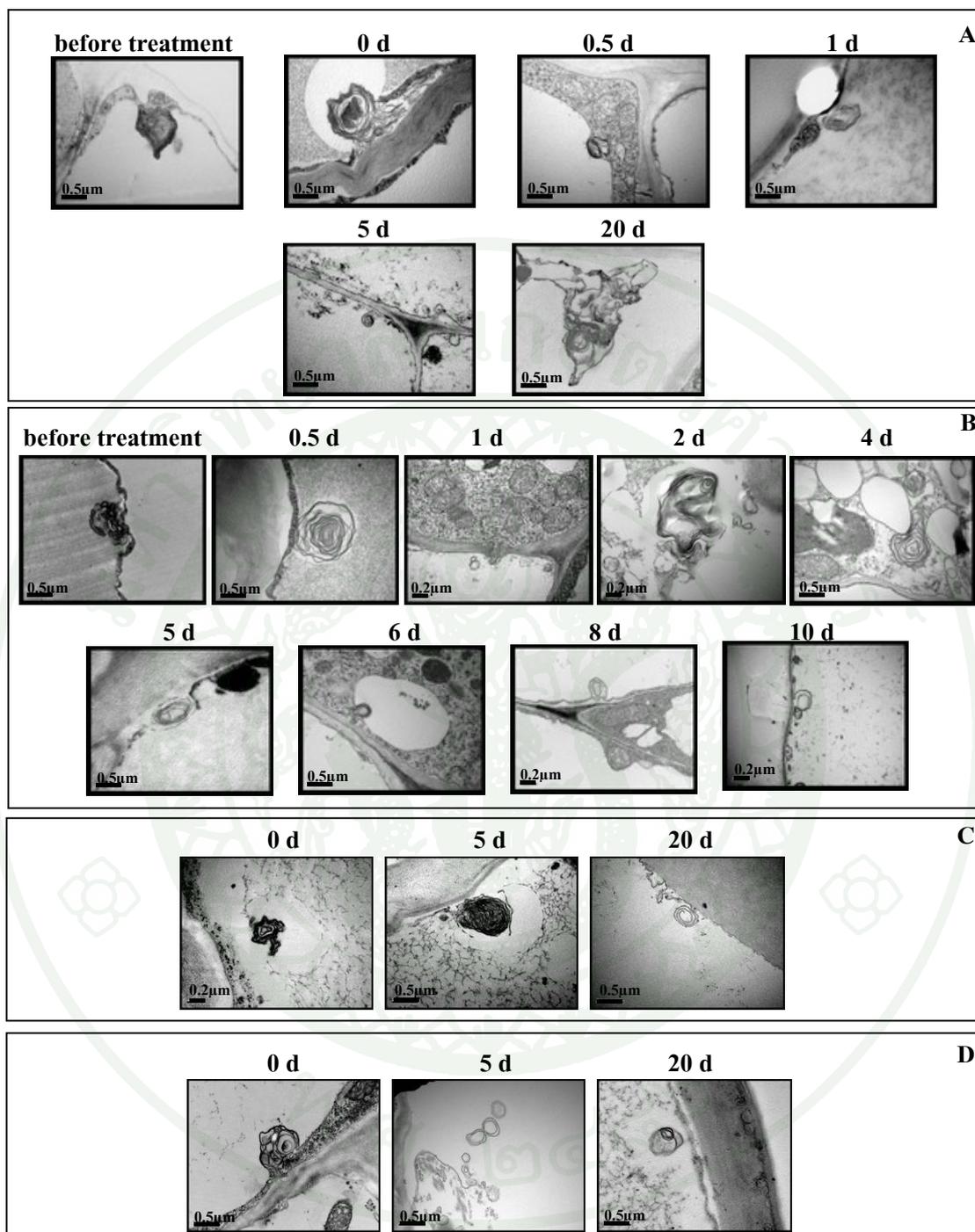
ดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับเอทิลีน พบว่า ก่อนได้รับทริทเมนต์จนกระทั่งวันที่ 5 ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ยังเป็นปกติ เมื่อถึง 20 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เยื่อหุ้มเซลล์เริ่มหดตัวและแยกออกจากผนังเซลล์ ในขณะที่ผนังเซลล์เริ่มบางลง (ภาพที่ 29A) ดอกกล้วยไม้ที่ได้รับเอทิลีน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ยังคงเกาะกันอย่างต่อเนื่อง ช่องว่างระหว่างเซลล์มีน้อย แต่เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 12 ชั่วโมง ผนังเซลล์เริ่มบางลง เยื่อหุ้มเซลล์เริ่มหดตัวเล็กน้อย มองเห็นช่องว่างระหว่างเซลล์มากขึ้น และเยื่อหุ้มเซลล์หดตัวเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึง 2 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 4 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เริ่มเห็นผนังเซลล์บางลงชัดเจนมากขึ้น เมื่อ 5 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เริ่มมองเห็นช่องว่างระหว่างเซลล์กว้างขึ้น เซลล์เริ่มขยายขนาดใหญ่ เยื่อหุ้มเซลล์หดตัว ผนังเซลล์บางลง ตั้งแต่ 6 ถึง 10 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างจาก 5 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเล็กน้อย (ภาพที่ 29B) ดอกกล้วยไม้ที่ได้รับ 1-MCP หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนถึง 20 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์เป็นปกติไม่หดตัวแยกออกจากผนังเซลล์ (ภาพที่ 29C) ส่วนใน ดอกกล้วยไม้ที่ได้รับ 1-MCP ร่วมกับเอทิลีนหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนถึง 5 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าผนังเซลล์เป็นปกติ เยื่อหุ้มเซลล์ยังไม่แยกออกจากผนังเซลล์ แต่ 20 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เยื่อหุ้มเซลล์เริ่มแยกออกจากผนังเซลล์เล็กน้อย (ภาพที่ 29D)



ภาพที่ 29 การเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มเซลล์ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลี้กี้ควนที่ไม่ได้รับเอทิลิน(A) ได้รับเอทิลิน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (B) ได้รับ 1-MCP 500 nL/L(C) และได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลิน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (D) เวลาต่างๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับ ทรืทเมนต์และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทรืทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

จ. ไมอีลินบอดี (myelin bodies)

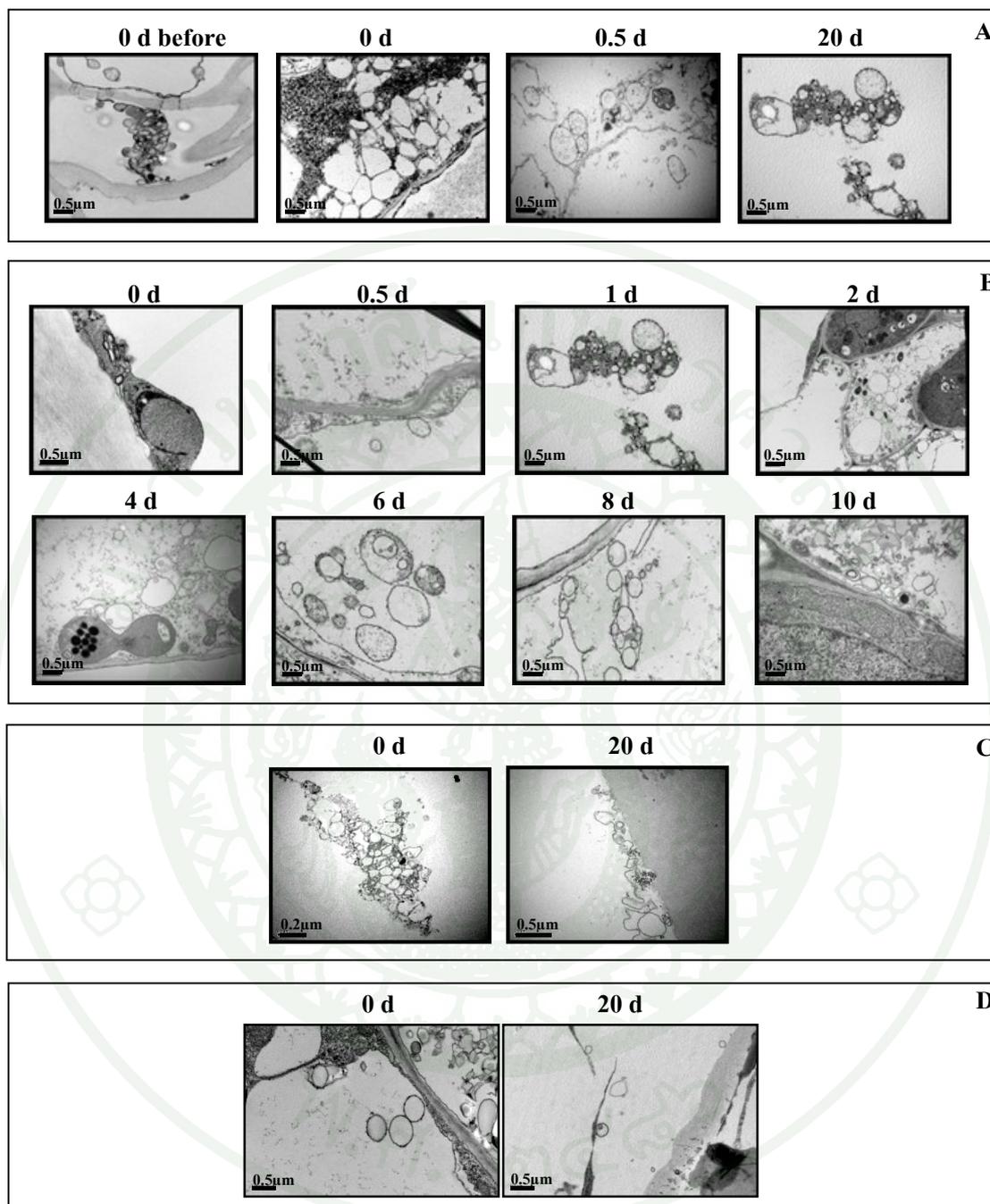
การสร้างไมอีลินบอดี ซึ่งเป็นเวสซิเคิลที่มีเยื่อหุ้มหลายชั้น ในดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับเอทิลีน (ภาพที่ 30A) เห็นเด่นชัดตั้งแต่ก่อนการได้รับทริทเมนต์ และไม่มีขนาดแตกต่างกันตั้งแต่ก่อนได้รับทริทเมนต์ จนกระทั่ง 20 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนในดอกไม้ที่ได้รับเอทิลีน ไมอีลินบอดีมีขนาดใหญ่กว่าดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับเอทิลีนตั้งแต่หลังการได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนกระทั่ง 2 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีขนาดใกล้เคียงกัน และเริ่มมีขนาดเล็กลงตั้งแต่ 4 วันและเล็กลงกว่าเดิมเมื่อถึง 5 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และขนาดเล็กลงตามมาในวันที่ปรากฏตามลำดับ และเล็กที่สุด 10 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่มีปริมาณไมอีลินบอดีมากกว่าทริทเมนต์อื่น (ภาพที่ 30B) และดอกกล้วยไม้ที่ได้รับ 1-MCP หลังการได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไมอีลินบอดีมีขนาดใหญ่ และเด่นชัด ซึ่งไม่แตกต่างกับวันที่ 5 เมื่อถึง 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กลับมีขนาดเล็กลงเล็กน้อย (ภาพที่ 30C) สำหรับดอกกล้วยไม้ที่ได้รับ 1-MCP ร่วมกับเอทิลีนหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบไมอีลินบอดีขนาดใหญ่ และขนาดเล็กลงเมื่อถึงวันที่ 5 วัน จนกระทั่ง 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไมอีลินบอดีมีขนาดเล็กลงกว่า 5 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 30D)



ภาพที่ 30 การเปลี่ยนแปลงไมอิลินบอดีของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกี้ควอน ที่ไม่ได้รับเอทิลีน(A) ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (B) ได้รับ 1-MCP 500 nL/L(C) และได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (D) เวลาต่างๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

จ. มัลติเวสซิควาร์บอดี (multivesicular bodies)

ผลการทดลองพบมัลติเวสซิควาร์บอดี ภายในเซลล์กลีบดอกกล้วยไม้บางวันเท่านั้น ซึ่งในดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับเอทิลีน (ภาพที่ 31A) ในช่วงวันแรกพบมัลติเวสซิควาร์บอดีอยู่รวมกลุ่มกัน มีขนาดเล็ก และเพิ่มมากขึ้นเมื่อวางดอกกล้วยไม้ไว้นานวันขึ้น มัลติเวสซิควาร์บอดีกระจายตัวกันภายในบริเวณเดียวกัน และขยายขนาดใหญ่ขึ้น แต่ดอกกล้วยไม้ที่ได้รับเอทิลีน มัลติเวสซิควาร์บอดีมีปริมาณน้อย มีขนาดเล็ก ในช่วงวันแรก ๆ หลังให้ทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่มีเพิ่มปริมาณมากขึ้นกว่าเดิม ขนาดขยายใหญ่ขึ้น และเห็นชัดเจนเมื่อ 6 8 และ 10 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มัลติเวสซิควาร์บอดี (ภาพที่ 31B) และดอกกล้วยไม้ที่ได้รับ 1-MCP หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มัลติเวสซิควาร์บอดีจะรวมกันเป็นกลุ่มมีขนาดเล็ก เมื่อเก็บดอกไม้ไว้นานขึ้น ถึง 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีมัลติเวสซิควาร์บอดีขนาดใหญ่ขึ้น แต่มีปริมาณลดลง (ภาพที่ 31C) และดอกกล้วยไม้ที่ได้รับ 1-MCP ร่วมกับเอทิลีน พบว่าหลังได้รับ ทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มัลติเวสซิควาร์บอดีมีปริมาณน้อยและมีขนาดใหญ่รวมตัวกันเป็นกลุ่ม จนกระทั่ง 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีขนาดเล็กลงและกระจายตัวออก (ภาพที่ 31D)



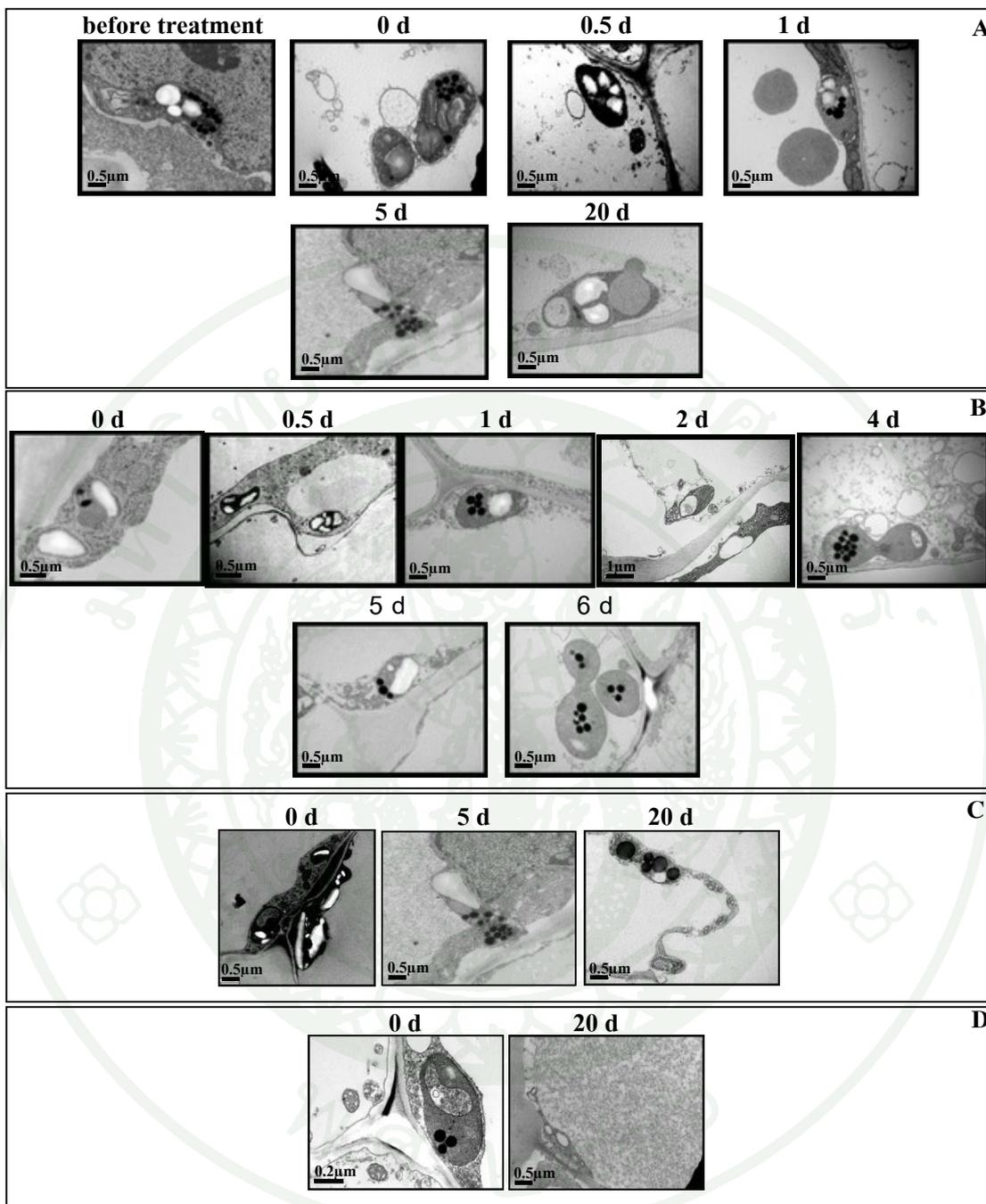
ภาพที่ 31 การเปลี่ยนแปลงมัลติเวสซิคลาร์บอดีของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลี้กี่ควนที่ไม่ได้รับเอทิลีน(A) ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (B) ได้รับ 1-MCP 500 nL/L (C) และได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (D) เวลาต่างๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

ช. เม็ดแป้ง (amyloplast)

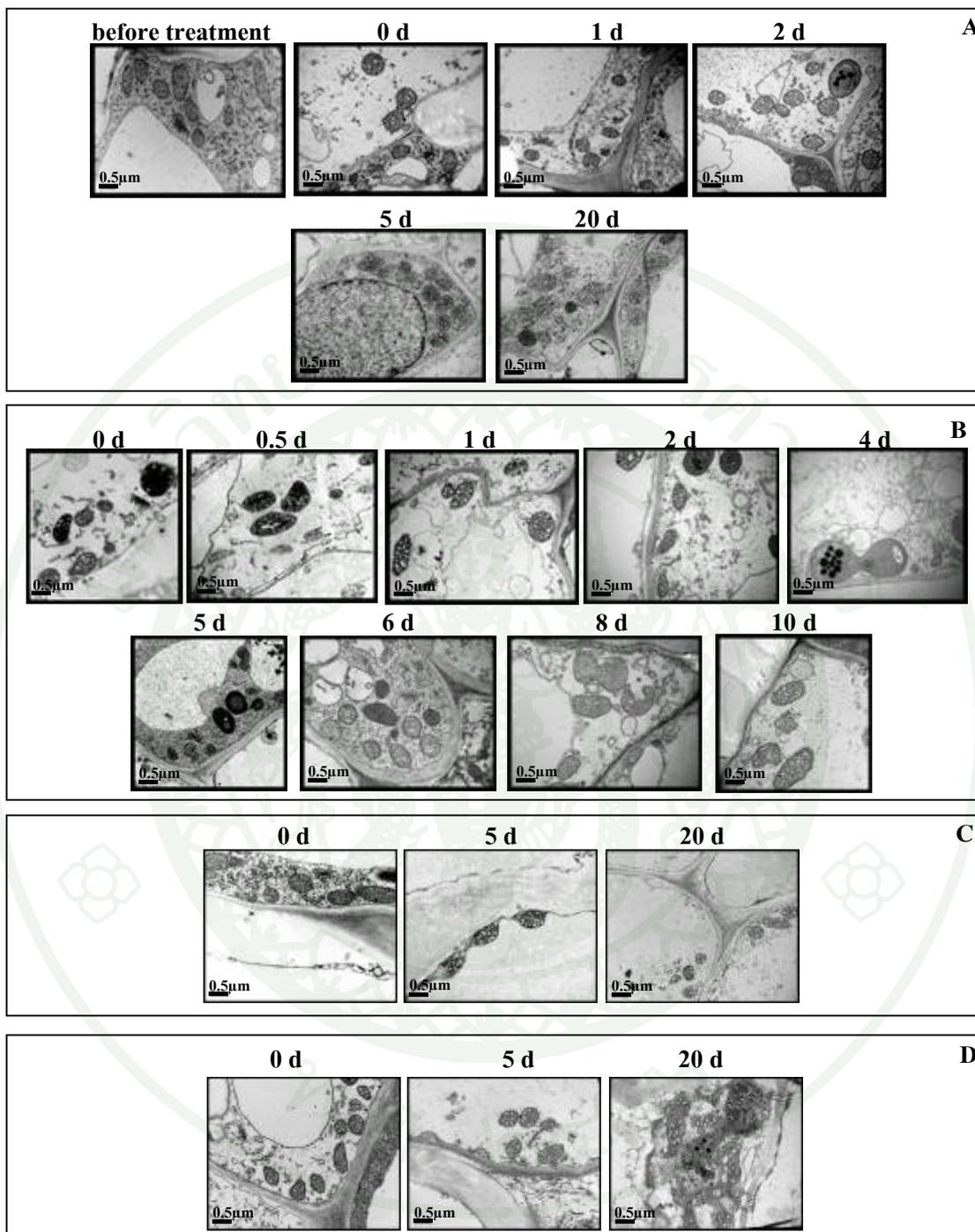
ขนาดและจำนวนเม็ดแป้งไม่มีความแตกต่างกันในทุกวันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทุกทริทเมนต์ (ภาพที่ 32)

ซ. ไมโทคอนเดรีย (Mitochondria)

เซลล์กลีบดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับเอทิลีนตั้งแต่วันแรกก่อนได้รับทริทเมนต์ พบว่าไมโทคอนเดรียยังคงมีความสมบูรณ์จนกระทั่งถึงวันที่ 20 พบว่าไมโทคอนเดรียมีปริมาณน้อยลงและพบความผิดปกติมากขึ้น (ภาพที่ 33A) เซลล์กลีบดอกหลังที่ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไมโทคอนเดรียเริ่มแสดงอาการผิดปกติ คือภายในบริเวณ cristae มีขนาดใหญ่ขึ้นเห็นเป็นช่องว่างขนาดใหญ่ และมีอาการที่ผิดปกติเด่นชัดขึ้น เมื่อถึง 1 และ 2 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ 4 และ 5 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณไมโทคอนเดรียลดลงมาก จนกระทั่ง 6 8 และ 10 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีไมโทคอนเดรียที่ขยายขนาดใหญ่และภายในเห็นช่องว่างขนาดใหญ่ จำนวนมากขึ้น (ภาพที่ 33B) เมื่อให้ดอกกล้วยไม้ได้รับ 1-MCP 500 nL/L เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไมโทคอนเดรียยังคงเป็นปกติ และ 5 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงเริ่มแสดงอาการผิดปกติเล็กน้อย เมื่อถึง 20 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เห็นอาการผิดปกติมากขึ้น แต่ขนาดไมโทคอนเดรียเล็กลง (ภาพที่ 33C) ในขณะที่เซลล์ของกลีบดอกที่รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไมโทคอนเดรียยังคงเป็นปกติ และ 5 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีอาการผิดปกติ แต่ขยายขนาดเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 20 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไมโทคอนเดรียมีอาการผิดปกติมากขึ้นและขยายขนาดเพิ่มขึ้นมากกว่าที่ 5 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 33D)

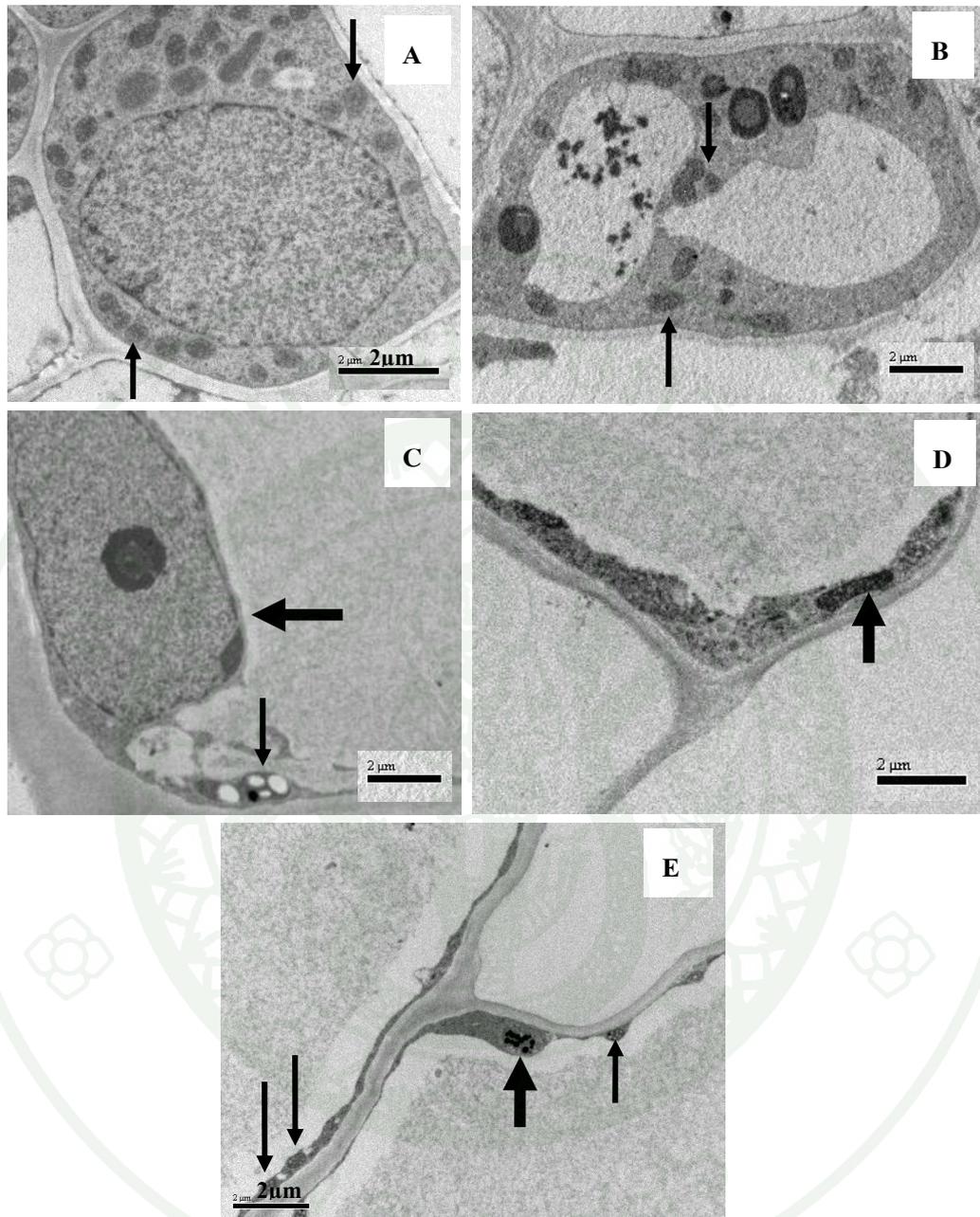


ภาพที่ 32 การเปลี่ยนแปลงเม็ดแป้งของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกี้ควอนที่ไม่ได้รับเอทิลีน(A) ได้รับเอทิลีน 0.4 μL/L(B) ได้รับ 1-MCP 500 nL/L(C) และได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 μL/L(D) เวลาต่างๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับ ทรिटเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทรिटเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)



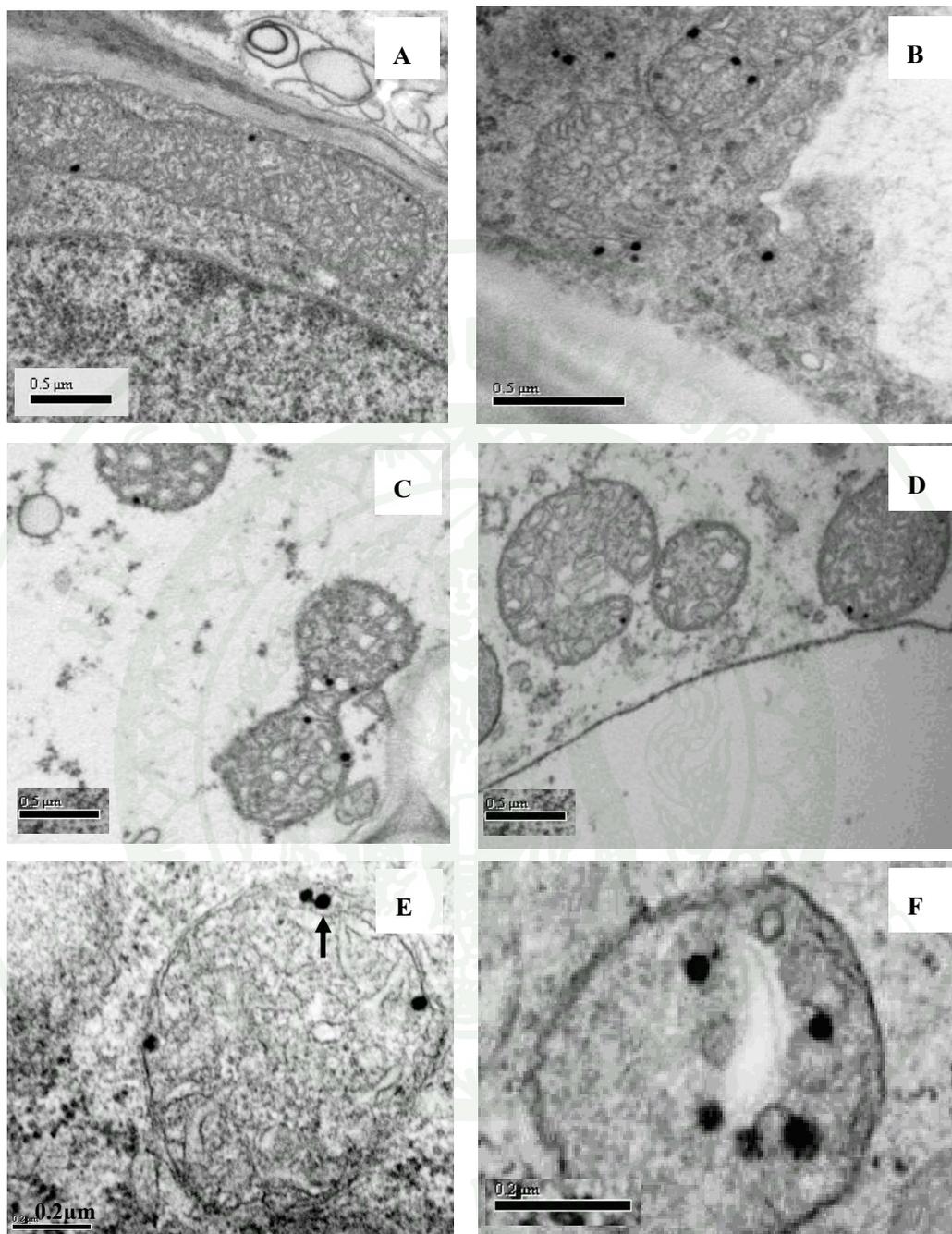
ภาพที่ 33 การเปลี่ยนแปลงไมโทคอนเดรียของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกี้ควอนที่ไม่ได้รับเอทิลีน (A) ได้รับเอทิลีน 0.4 μL/L(B)ได้รับ 1-MCP 500 nL/L(C) และได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 μL /L(D) เวลาต่างๆ (before treatment คือ ดอกไม้ก่อนได้รับ ทริทเมนต์ และ d คือวันหลังดอกไม้ได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

เนื่องจากจำนวนและคุณภาพของไมโทคอนเดรียมีความสำคัญต่อการบำรุงรักษาสภาพเซลล์ เป็นออร์แกเนลล์ที่ให้พลังงานและเกี่ยวข้องกับกระบวนการอื่นๆ เช่น การส่งสัญญาณ การพัฒนาเซลล์ และการตายของเซลล์ เป็นต้น ซึ่งในเซลล์สัตว์ไมโทคอนเดรียสามารถย้อนกลับคืนสภาพเดิมได้ โดยการสร้าง macro-autophagy โดยออร์แกเนลล์ถูกล้อมรอบด้วยโครงสร้างสองชั้นที่เรียกว่า autophagosome แต่ในพืชชั้นสูงยังไม่มีการยืนยัน ในงานทดลองนี้มีผลชี้บ่งชี้ได้ว่าไมโทคอนเดรียอยู่ในไซโตพลาสซึม ไม่ใช่ในแวคคิวโอลขนาดใหญ่ เป็นการแสดงให้เห็นว่าไมโทคอนเดรียในพืชสามารถย้อนกลับคืนสภาพได้เช่นเดียวกับในเซลล์สัตว์ โดยเกิด autophagosome หรือ autolysosome ขึ้น มีกรานูล (granule) เป็นวัตถุดิบอยู่ภายในไมโทคอนเดรีย ซึ่งกรานูลใช้เป็นสัญลักษณ์บ่งชี้ถึงออร์แกเนลล์ที่เป็นไมโทคอนเดรีย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาและบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรียที่มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาและโครงสร้างภายในระดับจุลภาคอย่างละเอียด โดยศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรียในทุกๆ ระยะของการพัฒนาเซลล์ตั้งแต่อายุเซลล์น้อย จนกระทั่งถึงระยะที่เซลล์เข้าสู่การชราภาพ โดยใช้วิธีการวัดอัตราส่วนของขนาดแวคคิวโอลภายในเซลล์ต่อขนาดของเซลล์ทั้งหมด ไม่คิดรวมส่วนของผนังเซลล์ ซึ่งจัดเป็น 4 ระยะ ดังนี้คือ ระยะ 1 อัตราส่วน ≤ 0.25 ระยะ 2 อัตราส่วน 0.26-0.50 ระยะ 3 อัตราส่วน 0.51-0.75 และระยะ 4 อัตราส่วน 0.76-1.0 ได้ผลการทดลองดังนี้คือ ภายในเซลล์มีไซโทพลาสต์ที่อยู่บริเวณใกล้เคียงกับท่อลำเลียง เป็นเซลล์ที่อยู่ในระยะการพัฒนาแรก ๆ พบว่ามีแวคคิวโอลขนาดเล็กอยู่จำนวนไม่มากนัก นิวเคลียสขนาดใหญ่ และมีไมโทคอนเดรียจำนวนมากอยู่ภายในเซลล์ (ลูกศรชี้บ่ง) และเซลล์ที่เข้าสู่ระยะการชราภาพนั้น ภายในเซลล์มีแวคคิวโอลขนาดใหญ่ ยังคงเห็นออร์แกเนลล์อื่น ๆ บ้าง เช่น พลาสติดขนาดใหญ่ เห็นไมโทคอนเดรียที่มีรูปร่างและรูปร่างคล้ายดัมเบลดังลูกศรชี้บ่งในภาพที่ 34B ในภาพที่ 34C D และ E เป็นเซลล์ที่มีแวคคิวโอลขนาดใหญ่มากผนังเซลล์บาง ออร์แกเนลล์ต่าง ๆ ถูกแวคคิวโอลดันไปอยู่บริเวณขอบเซลล์ แต่ในบางเซลล์นิวเคลียสยังคงความสมบูรณ์ และมีพลาสติดจำนวนเล็กน้อย ภายในพลาสติดเห็นเม็ดแป้งขนาดใหญ่ 4 เม็ด (ลูกศรหนา และ ลูกศรบางชี้ที่ภาพที่ 34C) และพลาสติดไม่มีเม็ดแป้งอยู่ภายใน (ลูกศรหนา ภาพที่ 34E) และมีไมโทคอนเดรียให้เห็นภายในเซลล์บ้างเล็กน้อย (ลูกศรลูกศรบาง ภาพที่ 34D และลูกศรบางชี้บ่ง ภาพที่ 34 E)



ภาพที่ 34 โครงสร้างภายในเซลล์มีโซฟิลล์ของกลีบดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลึกก็ควาน เซลล์ที่พัฒนาในระยะแรก(A) เซลล์เข้าสู่ระยะการชราภาพ(B) และเซลล์ที่มีแวคิวโอลขนาดใหญ่(C-E)

สำหรับในภาพที่ 35 แสดงตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไมโทคอนเดรีย ซึ่งพบไมโทคอนเดรียมีรูปร่างแตกต่างกันไปหลายแบบ ดังเช่น ไมโทคอนเดรียรูปร่างค่อนข้างกลม ด้านกว้างคล้ายกับรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้า (ภาพที่ 35A และ B) ซึ่งรูปร่างสี่เหลี่ยมที่เห็นนี้ น่าจะเกิดจากการตัดเนื้อเยื่อ และไมโทคอนเดรียบางอันมีรูปร่างคัมเบล (ภาพที่ 35C) โดยรูปร่างที่เกิดแบบนี้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างกันของไมโทคอนเดรียแต่ละแบบ ซึ่งรูปร่างคัมเบลนี้อาจเกิดโครงสร้างไมโทคอนเดรียที่เปลี่ยนแปลงเนื่องมาจากการแบ่งตัว หรืออาจเกิดมาจากรวมตัวกันก็ได้ นอกจากนี้ในภาพที่ 35D มีไมโทคอนเดรียรูปร่างคล้ายเกือบทำให้เห็นบ้าง ไมโทคอนเดรียบางอันบริเวณวัตถุคิภายใน ถูกห่อหุ้มไว้ด้วยเยื่อต่างๆ (ภาพที่ 35E) นอกจากนี้ในทุกไมโทคอนเดรียพบว่าเมื่อออร์แกนัลลักษณะเม็ดกลมขนาดเล็ก มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนอยู่ภายใน (electron dense, ภาพที่ 35A - F) นอกจากนี้พบมีหลายไมโทคอนเดรียมีจำนวนเม็ดกลมเล็กเกิดเพิ่มขึ้นมาจากภายนอก ที่เข้ามาอยู่ภายในไมโทคอนเดรีย พบได้บริเวณรอบเยื่อหุ้ม ซึ่งเม็ดกลมเล็กเหล่านี้พบได้ทุกระยะของการพัฒนาเซลล์ เมื่อดูภาพที่มีกำลังขยายสูงมากขึ้น พบว่าเส้นรอบวงของเม็ดกลมเล็กถูกสร้างขึ้นที่บริเวณผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย ดังภาพที่ 35E มีเม็ดกลมเล็ก 2 อันที่อิเล็กตรอนหนาแน่น เห็นได้บริเวณด้านบนของภาพที่เชื่อมต่อกันกับบริเวณวัตถุคิภายในไมโทคอนเดรีย (ลูกศรชี้บอก) นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างอื่นที่พบได้ ดังในภาพที่ 35F มองเห็นการเชื่อมต่อที่คล้ายกันระหว่างเม็ดกลมเล็ก 2 อัน ที่ถูกสร้างขึ้นตรงกลางของไมโทคอนเดรีย เป็นการแสดงให้เห็นอย่างหนึ่งว่าไมโทคอนเดรียเข้าสู่ระยะการชราภาพ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดกลมเล็ก 4 อัน ขนาด $0.042 \mu\text{m}$ และตรงกลางมี cristae ขยายพื้นที่ขึ้นซึ่งเม็ดกลมที่เกิดอิเล็กตรอนหนาแน่นให้เห็นภายใน ไมโทคอนเดรียนั้นคือกรานูล (granule) ใช้สำหรับเป็นตัวชี้บอกว่าออร์แกนัลที่เห็นว่ามีกรานูลอยู่ภายในคือไมโทคอนเดรีย

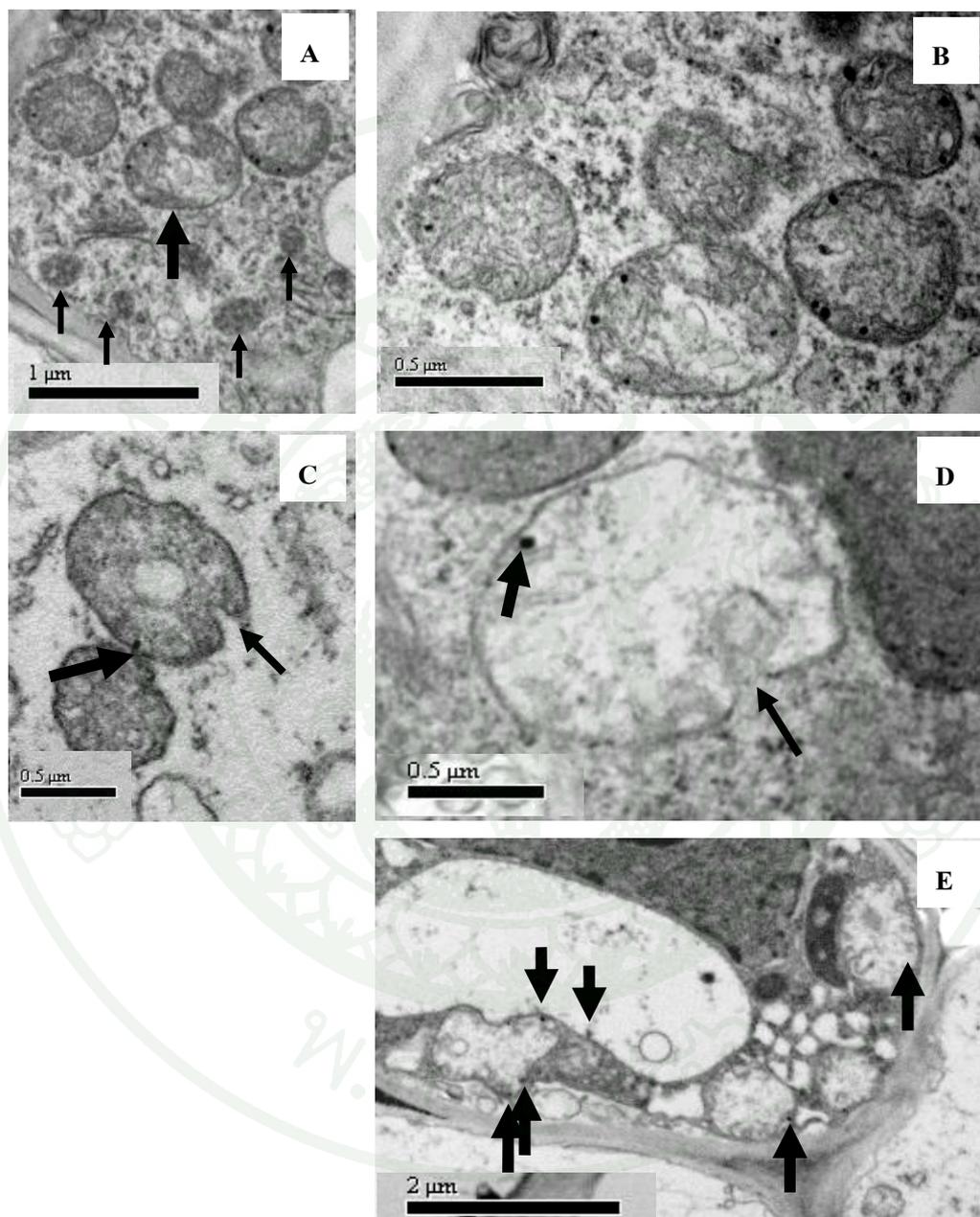


ภาพที่ 35 ไมโทคอนเดรียภายในเซลล์มีโซฟิลล์ของกลีบดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ถั่วกั่ว
 ไมโทคอนเดรียรูปทรงคล้ายสี่เหลี่ยมผืนผ้าและทรงกลม(A และ B) รูปทรงกลม
 และดัมเบล(C) รูปทรงคล้ายเกือกม้า(D) กราณูลที่มีอิเล็กตรอนหนาแน่น 2 อัน เชื่อมต่อ
 กันภายในไมโทคอนเดรียบริเวณเยื่อหุ้ม(E) บริเวณ cristae ขยายขนาดใหญ่ภายใน
 ไมโทคอนเดรีย และ กราณูลจำนวนหนึ่ง(F)

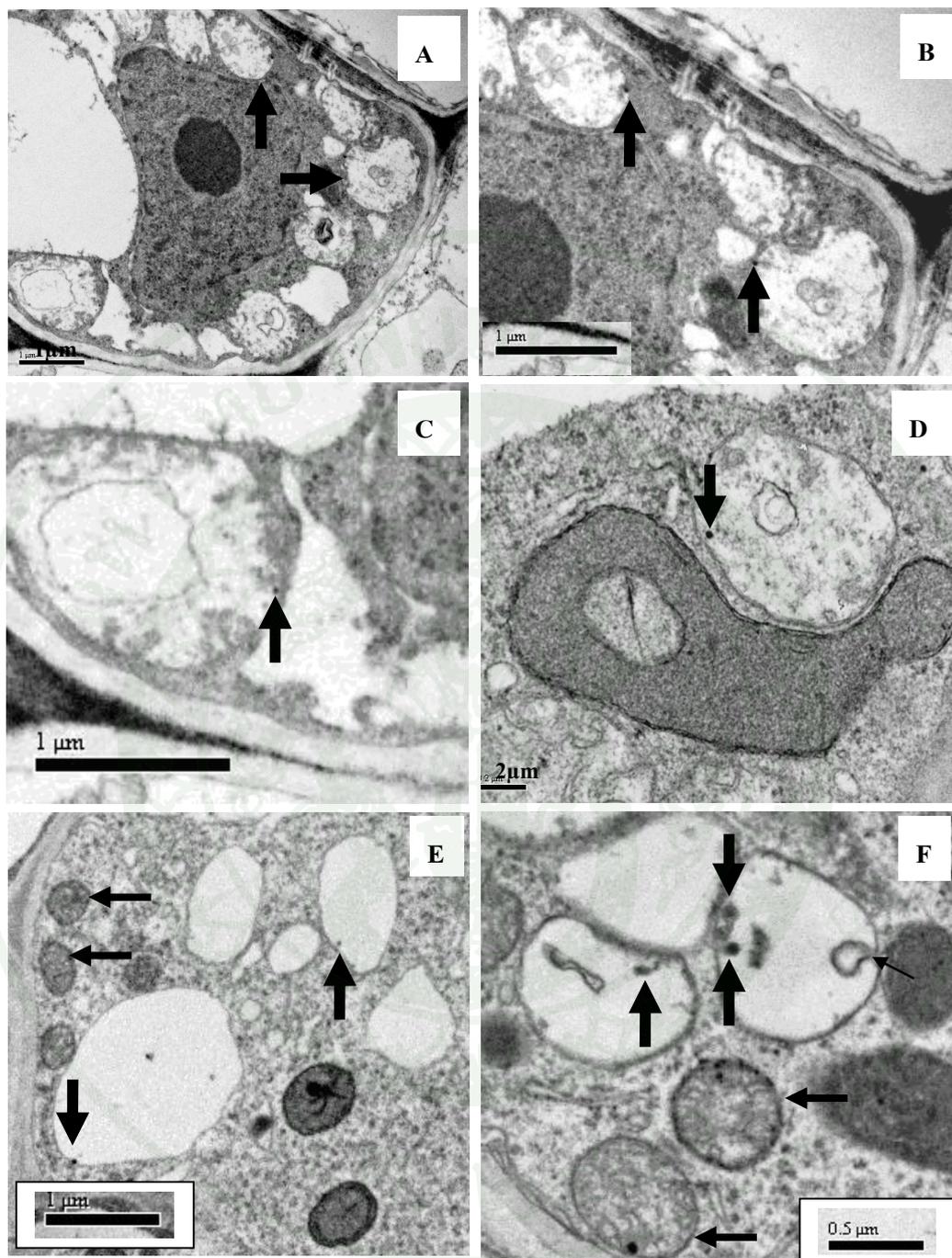
เมื่อศึกษาความเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในไมโทคอนเดรีย พบว่ามีการเสื่อมสภาพเกิดขึ้นให้เห็นได้ โดยทั่วไป ผนังของไมโทคอนเดรียประกอบด้วยเยื่อหุ้ม 2 ชั้น พื้นที่ว่างภายใน cristae ถูกสร้างขึ้นบริเวณรอยหยักโค้งภายในของเยื่อหุ้มชั้นใน และบริเวณส่วนที่เป็นวัตถุภายในไมโทคอนเดรีย คือส่วนของพื้นที่เยื่อหุ้มชั้นใน ภาพที่ 36 แสดงให้เห็นถึงไมโทคอนเดรียหลายระยะของการเสื่อมสภาพ ซึ่งภายในเซลล์มีทั้งไมโทคอนเดรียขนาดเล็กหลายอัน (จุดที่ลูกศรบางชี้ขึ้นบน) และมีไมโทคอนเดรียขนาดใหญ่ 5 อัน โดยอันหนึ่งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่กว่าอันอื่นด้วย (ลูกศรหนาชี้ขึ้น ภาพที่ 36A) เมื่อขยายภาพให้มีขนาดใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 36B) ในบริเวณที่มีไมโทคอนเดรียขนาดใหญ่ 5 อัน ในภาพเห็นได้ชัดว่ามีออร์แกเนลล์รูปร่างกลมอิเล็กตรอนหนาแน่นจำนวนมาก และเห็นโครงสร้างภายในไมโทคอนเดรียที่เกิดการเสื่อมสภาพ โดยเฉพาะบริเวณ cristae ที่สูญหายไป แต่ในภาพเดียวกัน มีไมโทคอนเดรียที่อยู่บริเวณซ้ายมือที่ภายในไมโทคอนเดรีย มีการเสื่อมสภาพเล็กน้อย และบริเวณด้านบนขวาของภาพนี้มีไมโทคอนเดรียที่เสื่อมสภาพภายในบริเวณพื้นที่ตรงกลาง ส่วนภาพที่ 36C ที่มีไมโทคอนเดรีย 2 อัน รูปร่างทรงกลม ซึ่ง 1 อัน จะอยู่ต่ำกว่ากรานูล (ลูกศรหนา) ไมโทคอนเดรียขนาดใหญ่ที่อยู่ข้างบนมองเห็นการเสื่อมสภาพของโครงสร้างบริเวณพื้นที่ตรงกลางซึ่งสร้างเวสซิเคิลขึ้นภายในไมโทคอนเดรีย นั้น และลูกศรบางชี้บอกถึงโครงสร้างภายนอกไมโทคอนเดรียที่มีการแบ่งแยกเป็นส่วนๆ สำหรับภาพที่ 36D บริเวณเยื่อหุ้มมีกรานูลจำนวนหนึ่ง (ลูกศรหนาชี้บอก) ภายในมีการเสื่อมสภาพทั้งหมด ขณะที่ภายนอกเห็นการแยกส่วนบริเวณเยื่อหุ้มชัดเจน ในภาพที่ 36E ชี้ให้เห็นว่าภายในเซลล์มีออร์แกเนลล์ที่มีลักษณะคล้ายแวคคิวโอล แต่ลูกศรชี้ให้เห็นว่าภายในนั้นมีกรานูลจำนวนหนึ่งบริเวณเยื่อหุ้ม (ลูกศรหนา) ภายในออร์แกเนลล์นั้นมีการแบ่งแยกเป็นส่วนๆ ให้เห็นได้ชัดเจน และสร้างเวสซิเคิลจำนวนหนึ่ง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าออร์แกเนลล์เหล่านั้นไม่ใช่แวคคิวโอล แต่ยืนยันได้ว่าเป็นไมโทคอนเดรียที่มีการเสื่อมสภาพรุนแรงในระยะหลังของการพัฒนาเซลล์

ภาพที่ 37A พบว่าภายในเซลล์มีออร์แกเนลล์ที่มีลักษณะคล้ายแวคคิวโอล (ลูกศร) และภาพที่ 37B เป็นภาพที่ขยายขนาดให้ใหญ่ขึ้น ยืนยันว่าออร์แกเนลล์นั้นเป็นไมโทคอนเดรีย เนื่องจากมีกรานูลที่มีอิเล็กตรอนหนาแน่นอยู่บริเวณเยื่อหุ้ม (ลูกศรชี้บอก) ซึ่งที่เห็นนี้ประกอบด้วยเวสซิเคิลเล็กๆ และออร์แกเนลล์ที่มีเวสซิเคิลขนาดใหญ่ (ภาพที่ 37C) ยืนยันผลการเสื่อมสภาพของไมโทคอนเดรีย และขยายขนาดให้ใหญ่ขึ้นในภาพที่ 37D มีเวสซิเคิลที่มีเยื่อหุ้มหลายชั้นอยู่ภายใน ส่วนภาพที่ 37E เห็น ออร์แกเนลล์คล้ายจะเป็นแวคคิวโอล แต่เป็นไมโทคอนเดรียที่เสื่อมสภาพรุนแรง (ลูกศรชี้ที่บริเวณ กรานูล) และลูกศรบางชี้บอกไมโทคอนเดรียขนาดเล็กที่ยังคงเป็นปกติ (ออร์แกเนลล์ที่เห็นขนาดใหญ่กว่าออร์แกเนลล์อื่นในภาพที่ 37D คือ พลาสติด) ภาพที่ 37F

เช่นเดียวกันที่เห็นออร์แกเนลล์ภายในเซลล์คล้ายแวคคิวโอลที่ภายในมีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น แต่พบว่ามีการนำลูอยู่บริเวณเยื่อหุ้ม จึงยืนยันว่าเป็นไมโทคอนเดรียที่เสื่อมสภาพรุนแรงไม่ใช่แวคคิวโอล



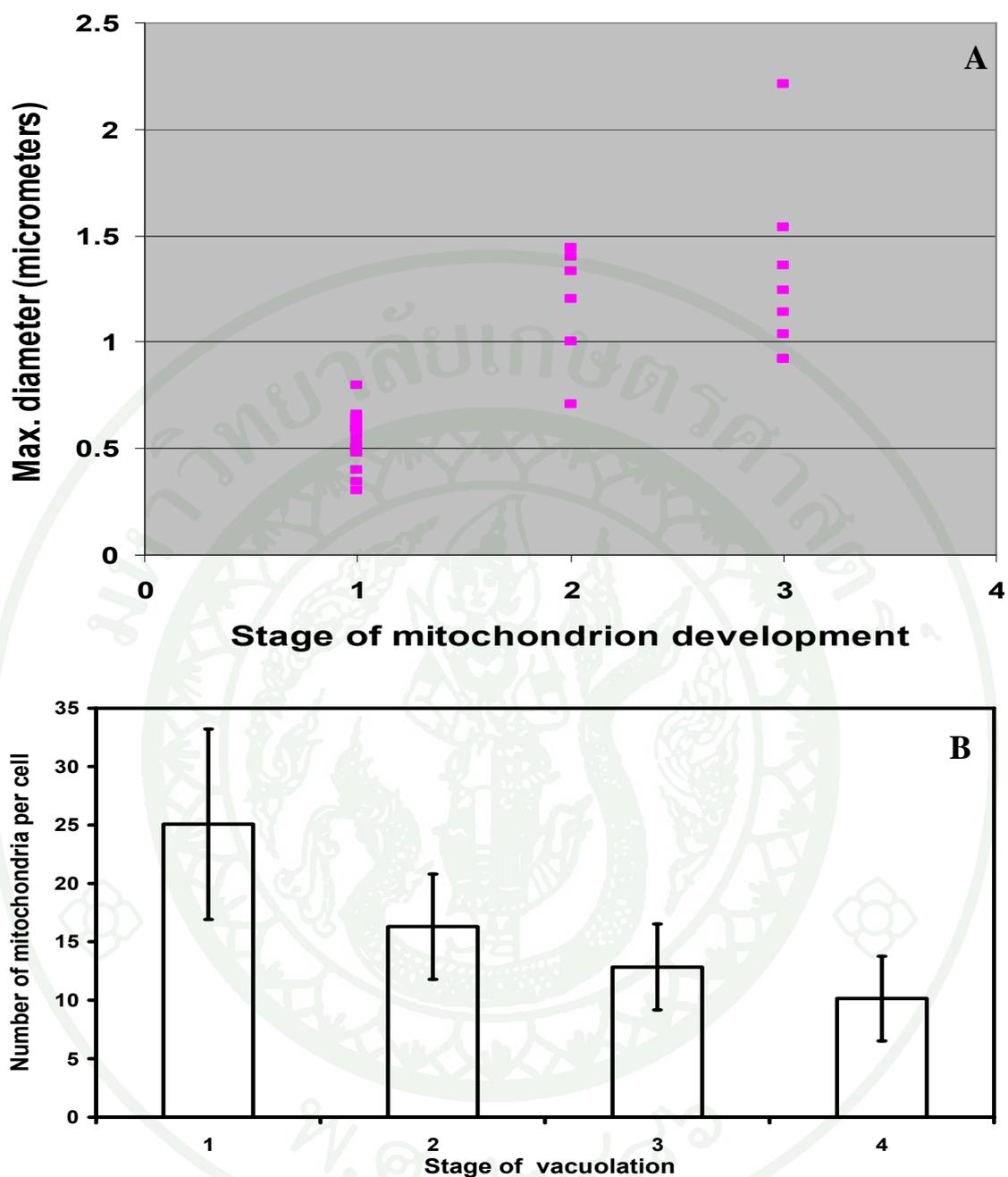
ภาพที่ 36 การเสื่อมสภาพของไมโทคอนเดรียภายในเซลล์มีโซฟิลล์ของกลีบดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ตักก็ควน ไมโทคอนเดรียขนาดต่างๆ (A) ภาพขยายไมโทคอนเดรียขนาดต่างๆ (B) ไมโทคอนเดรียที่มีเวสซิเคิลอยู่ตรงกลาง (C) โครงสร้างไมโทคอนเดรียเสื่อมสภาพ (D) โครงสร้างไมโทคอนเดรียคล้ายแวคคิวโอล (E)



ภาพที่ 37 การเสื่อมสภาพของไมโทคอนเดรียภายในเซลล์มีไซโทพลาสต์ของกลีบดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ตักก็ควน ไมโทคอนเดรียเสื่อมสภาพรุนแรงภายในเซลล์ (A) ภาพขยายภาพ A (B และ C) ภายในไมโทคอนเดรียที่มีเชื่อมหุ้มสองชั้นรอบเวสซิเคิล (D) แวกคิวโอลเสื่อมสภาพไปเป็นไมโทคอนเดรีย (E และ F)

ไมโทคอนเดรียที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่ที่สุด เป็นไมโทคอนเดรียที่อยู่ภายใต้สภาพที่ภายในเสื่อมสภาพแล้ว (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง $1.18 \mu\text{m}$) เมื่อเปรียบเทียบกับไมโทคอนเดรียที่ไม่เสื่อมสภาพ (ขนาดเฉลี่ย $0.54 \mu\text{m}$) และเส้นผ่าศูนย์กลางของแวกคิวโอลที่มีขนาดใหญ่ที่สุด หรือระยะสุดท้ายของการพัฒนาเซลล์ มีเม็ดกลมเล็กเฉลี่ยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ที่ $1.3 \mu\text{m}$ แต่ไม่มีนัยสำคัญว่ามีขนาดใหญ่กว่าไมโทคอนเดรียที่อยู่ในอยู่ภายใต้การเสื่อมสภาพ (ภาพที่ 38A) และจำนวนไมโทคอนเดรียมีปริมาณมากในช่วงการพัฒนาเซลล์ระยะแรก จากนั้นลดจำนวนลงตามระยะการพัฒนาเซลล์ที่เข้าสู่ระยะการชราภาพที่มากขึ้น (ภาพที่ 38)





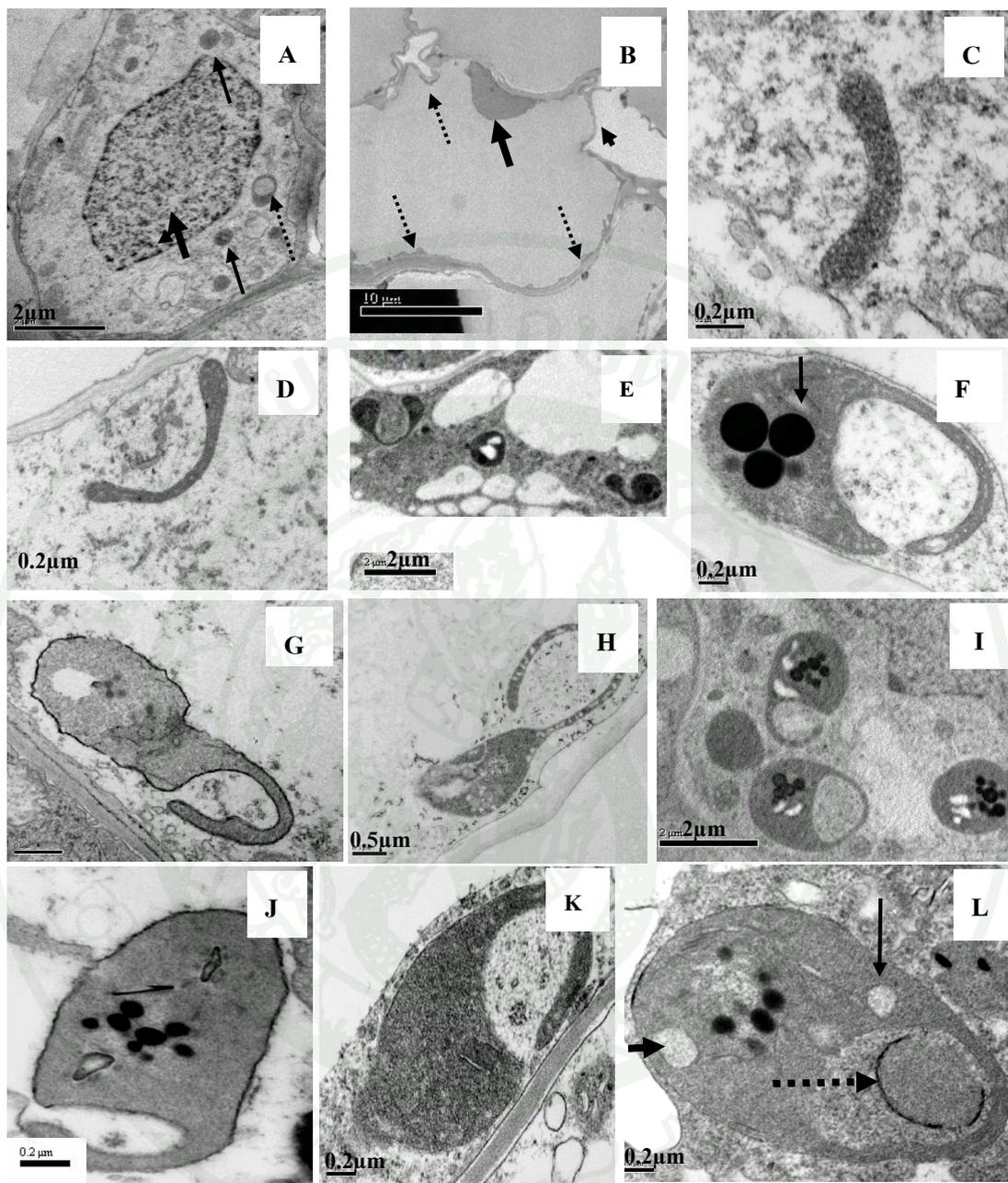
ภาพที่ 38 ขนาดไมโทคอนเดรียแต่ละระยะการพัฒนาภายในเซลล์มีโซพิลล์ของกลีบดอกกล้วยไม้
 หวายพันธุ์ลูกก๊วย (A) และจำนวนไมโทคอนเดรียแต่ละระยะการพัฒนาเซลล์ (B)
 [อัตราส่วนระหว่างพื้นที่แวกคิวโอลต่อพื้นที่เซลล์ (ไม่รวมผนังเซลล์) จัดเป็น 4 ระยะ
 (ระยะ 1: อัตราส่วน ≤ 0.25 , ระยะ 2: อัตราส่วน 0.26-0.50, ระยะ 3: อัตราส่วน 0.51-
 0.75, ระยะ 4: อัตราส่วน 0.76-1.0)]

ในช่วงหลังจากดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลี้ก๊ววนบานเต็มที่ ภายในเซลล์กลีบดอกไม้ยังคงมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง และภายในเซลล์มีการเปลี่ยนออร์แกเนลล์บางชนิดตลอดเวลาอย่างชัดเจน ซึ่งกระบวนการเปลี่ยนแปลงภายในออกเนลเหล่านี้ จึงมีความสำคัญต่อการศึกษาลักษณะของเนื้อเยื่อไปจากไมโทคอนเดรีย มีพลาสติดซึ่งเป็นออร์แกเนลล์อีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญมากเนื่องจากบ่งบอกการมีชีวิตของเซลล์พืชและพลาสติดเป็นออร์แกเนลล์ที่สามารถจำลองตัวเองได้ มีกิจกรรมอยู่ในกระบวนการที่สำคัญทางชีววิทยา โดยทางสัณฐานวิทยาพลาสติดทุกอันประกอบไปด้วยเยื่อหุ้มสองชั้น คือชั้นนอกมีหน้าที่เคลื่อนย้ายโปรตีน และเยื่อหุ้มชั้นในเกี่ยวข้องกับระบบการขนส่งสารภายในเซลล์พืช ภายในประกอบไปด้วยไลโปโปรตีนที่อยู่ในรูปของ plastoglobules ทำหน้าที่สะสมไขมันในช่วงที่พลาสติดมีการสร้างเยื่อหุ้ม ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของพลาสติดที่เกิดจากการเสื่อมสภาพภายในเซลล์ จึงมีความสำคัญต่อการประเมินการมีชีวิตของเซลล์ได้ ผลการทดลองนี้ สามารถชี้บ่งบอกได้อย่างละเอียดในแต่ละขั้นตอนการเปลี่ยนแปลง อันเนื่องมาจากการเสื่อมสภาพของเซลล์ที่มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่เริ่มต้น จนกระทั่งเกิดการเสื่อมสภาพของพลาสติดภายในเซลล์ โดยศึกษาในกลีบดอกกล้วยไม้หวายที่เพิ่งบาน เซลล์บริเวณกลีบดอกประกอบไปด้วยเซลล์มีไซฟิลล์ที่มีขนาดแตกต่างกันไปตามระยะต่าง ๆ ของการพัฒนาเซลล์ ซึ่งมีความสัมพันธ์กันระหว่างอายุทางสรีรวิทยาและระยะการเปลี่ยนแปลงในการพัฒนาเซลล์พืชที่เกิดขึ้นจริงในเซลล์กลีบดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ผลการทดลองในภาพที่ 39A พบว่า บางเซลล์ในชั้นเซลล์มีไซฟิลล์ที่อยู่บริเวณใกล้ ๆ ท่อลำเลียงภายในเซลล์ไม่พบแวคคิวโอลหรือมีแวคคิวโอลขนาดเล็ก ๆ แต่เซลล์เหล่านี้ประกอบไปด้วยพลาสติดและไมโทคอนเดรียหลายอัน (ลูกศรชี้บ่ง) แต่เซลล์ที่เสื่อมสภาพอยู่บริเวณเซลล์มีไซฟิลล์ถัดไปจากบริเวณท่อลำเลียง พบว่าภายในเซลล์มี แวกคิวโอลขนาดใหญ่ดันออร์แกเนลล์ต่างๆ ไปไว้บริเวณผนังเซลล์ (ลูกศรชี้ ภาพที่ 39B) แต่นิวเคลียสยังคงสภาพสมบูรณ์เป็นปกติ (ลูกศรหนาในภาพที่ 39B) และเซลล์รอบข้างแสดงถึงระยะการพัฒนาสุดท้ายของเซลล์และแวคคิวโอล พบว่ามีรูปแบบแวคคิวโอลที่มองเห็นช่องว่างกระจายอย่างสม่ำเสมออยู่ภายในเซลล์ และมีความหนาแน่นของอิลECTRอนน้อยภายในแวคคิวโอล (ภาพที่ 39B) สำหรับผลการทดลองที่กล่าวถึงในอันดับต่อไปนี้จะแยกอธิบายเป็นส่วนๆ ดังนี้คือ

1) พลาสติดกลืนกินวัตถุภายในเซลล์

พลาสติดภายในเซลล์ทุกระยะของการพัฒนา เห็นได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พลาสติดมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางสูงสุด และมีค่าความแปรปรวนของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 0.3-5.7 μm . ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของพลาสติดเฉลี่ยเป็น 1.64 μm

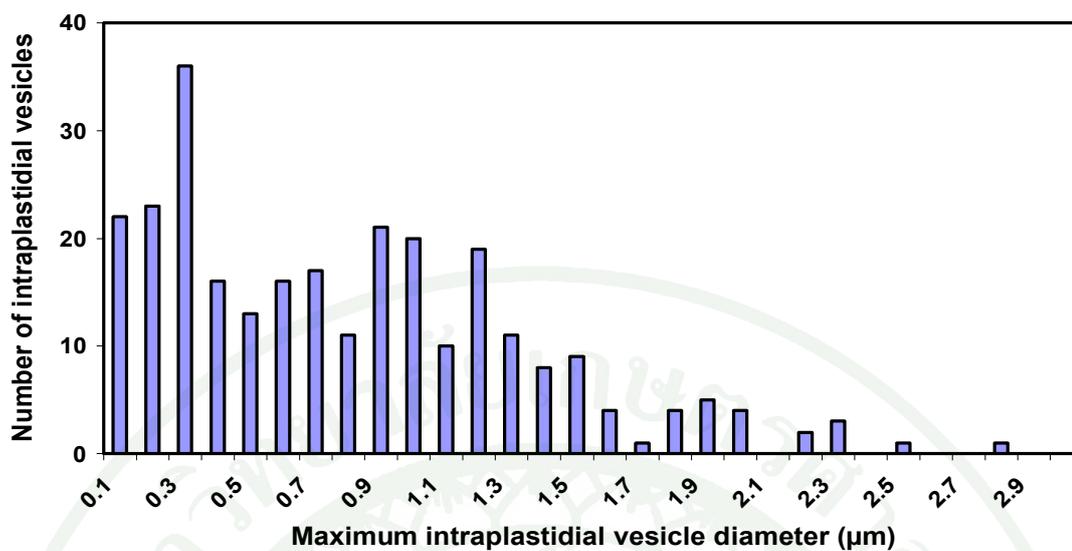
(จากจำนวนพลาสติกทั้งหมด 298 อัน) มีพลาสติกหลายขนาดกระจายตัวให้เห็นได้ ดังในภาพที่ 39A (ในภาพไม่รวมพลาสติกขนาดเล็กกับพลาสติกที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่กว่า 5.2 μm) ภายในเซลล์พบว่าพลาสติกบางอัน เปลี่ยนแปลงรูปร่างให้มีความโค้งเล็กน้อย (ภาพที่ 39C) หรือโค้งเป็นครึ่งวงกลม (ภาพที่ 39D) เป็นเสมือนการเตรียมความพร้อมก่อนโอบล้อมไซโตพลาสซึม ในขณะที่อันอื่น ๆ โค้งได้สมบูรณ์จนเกือบล้อมรอบส่วนของไซโตพลาสซึม (ภาพที่ 39E-K) เป็นลักษณะการกลืนไซโตพลาสซึมเกิดขึ้นให้เห็น ตั้งเป็นสมมติฐานความเป็นไปได้อย่างน้อยที่สุด 3 แนวทางคือ 1) พลาสติกห่อหุ้มส่วนของไซโตพลาสซึมทั้งหมดโดยยื่นส่วนของพลาสติกที่คล้ายแขนสองข้างออกไปโอบล้อม (ภาพที่ 39 E และ F) 2) พลาสติกพัฒนารูปร่างคล้ายแขนออกมาเป็นรูปโค้งและโอบล้อมไซโตพลาสซึมและไปเชื่อมโยงกับแขนอีกครั้งหนึ่งของพลาสติกอีกอัน (ภาพที่ 39G และ H) หรือ 3) พลาสติกเจริญเติบโตยื่นส่วนอวัยวะที่คล้ายขาออกมา 1 ข้างมาห่อหุ้มบางส่วนของไซโตพลาสซึม (ภาพที่ 39I J และ K) สำหรับลักษณะแรกของการกลืนนั้นสังเกตได้ในส่วนประกอบของพลาสติกที่แนวระนาบของเนื้อเยื่อจากการตัดชิ้นส่วน มีเม็ดแป้ง (ภาพที่ 39E) และหรือ plastoglobuli จำนวนไม่มากอยู่ในด้วย (มีลูกศรชี้บอกในภาพที่ 39F) ลักษณะที่เกิดขึ้นนี้พบได้ในเซลล์ที่มีอายุทางสรีรวิทยาน้อย ส่วนลักษณะที่ 2 พบว่ามี plastoglobuli เพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 39G และ H) และลักษณะที่ 3 มีเม็ดแป้งและ plastoglobuli จำนวนหนึ่ง ซึ่งออร์แกเนลล์ทั้ง 2 ชนิดนี้ใช้เป็นเครื่องหมายบอกว่าออร์แกเนลล์นั้นเป็นพลาสติก ในบางพลาสติกประกอบไปด้วย plastoglobuli จำนวนมาก (ภาพที่ 39F I J และ L) และบางครั้งเห็นเม็ดแป้งอยู่ด้วย (ภาพที่ 39I) สำหรับภาพที่ 39L แสดงถึงพลาสติกที่โอบล้อมไซโตพลาสซึมอย่างสมบูรณ์ ภายในปรากฏเยื่อหุ้ม



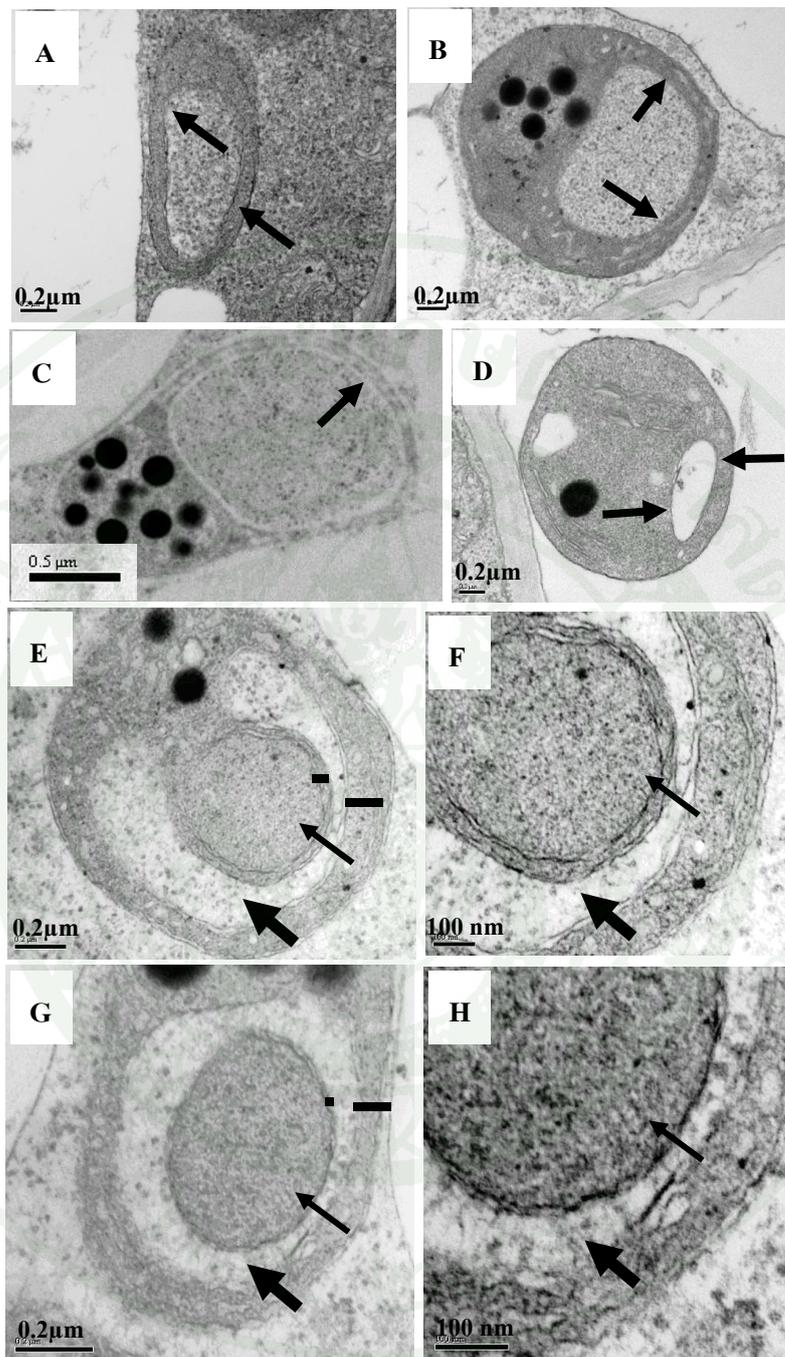
ภาพที่ 39 โครงสร้างภายในเซลล์มีโซฟิลล์ของกลีบดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ลึกกึ่งควน(A) เซลล์มีแวกคิวโอลขนาดใหญ่ และมีเส้นรอบนอกของไซโตพลาสซึมที่บางมาก(B) พลาสต์ที่มีลักษณะโค้งให้เห็น 2 ระดับ(C และ D) รูปแบบที่พลาสต์โอบล้อมวัตถุคิบของไซโตพลาสซึมแต่ละลักษณะ (E-L)

2) ขนาดและโครงสร้างภายในของ intraplastidial vesicle

หลังจากที่พลาสติดีโอโบลล์ไมโทพลาสซึมอย่างสมบูรณ์นั้น มีผลให้องค์ประกอบของพลาสติดีมีความสัมพันธ์มากกับปริมาณเวสซิเคิลที่อยู่ภายใน (เรียกสิ่งทีพลาสติดีโอโบลล์อยู่ภายในนั้นว่า intraplastidial vesicle (ลูกศรชี้ ภาพที่ 41A) ขนาดของ intraplastidial vesicle มีเส้นผ่าศูนย์กลางค่าความแปรปรวนอยู่ที่ 0.14-2.9 μm และค่าเฉลี่ย 0.77 μm (จากจำนวน intraplastidial vesicle ทั้งหมด 277 อัน) ขนาดของ intraplastidial vesicle มีการกระจายตัวที่ 2 จุดคือที่ 0.3 และ 1 μm (ภาพที่ 40) ในบางครั้งถ้าเวสซิเคิลเหล่านี้มีผลมาจากการโอโบลล์ส่วนของไมโทพลาสซึม มันควรถูกล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้มซ้อนกัน 2 ชั้น (ภาพที่ 41B) แต่ก็ขึ้นกับความไม่แน่นอนของการย้อมสีเนื้อเยื่อของกระบวนการเตรียมตัวอย่างด้วย ซึ่งจากภาพมองเห็นเยื่อหุ้ม 2 ชั้นได้ชัดเจนที่บริเวณผิวของพลาสติดี (ภาพที่ 41E-H) แต่ก็พบบ่อยครั้งที่เยื่อหุ้ม 2 ชั้น ไม่ได้ล้อมรอบอยู่ภายในพลาสติดี แต่ผลที่ได้คล้าย ๆ กับการพิจารณาเฉพาะเจาะจงว่าเป็น intraplastidial vesicle ได้เช่นกัน ในความเป็นจริง เยื่อหุ้ม 2 ชั้น ที่มองเห็นในภาพนั้น ล้อมรอบไมโทพลาสซึมไว้หรืออาจเป็นส่วนหนึ่งของเวสซิเคิลก็ได้ ดังเช่น ในภาพที่ 41A-D มีลูกศรชี้บอก และภาพที่ 41E และ H พบว่าภายในทั้งหมดเป็นโครงสร้างที่เหมือนเวสซิเคิลรูปทรงกลมที่ปรากฏให้เห็นว่าเข้าไปอยู่ใกล้ ๆ กับบริเวณที่เป็นเยื่อหุ้ม 2 ชั้น ขณะเดียวกันมีเวสซิเคิลอยู่ระหว่างชั้นเยื่อหุ้มให้เห็นด้วยเช่นกัน และโครงสร้างที่เหมือนเวสซิเคิลที่อยู่ภายในพลาสติดีบริเวณเยื่อหุ้มชั้นใน มีความสมบูรณ์เป็นโครงสร้างหลักของพลาสติดีด้วย (ภาพที่ 41E และ F) และยังพบพลาสติดีอันอื่นๆ ที่ไม่สมบูรณ์อยู่ภายในเซลล์ด้วยเช่นกัน (ภาพที่ 41G) ข้อมูลเหล่านี้อธิบายได้ 2 ขั้นตอนในการกลืน การกลืนอันแรกจะเริ่มด้วยการผลิตโครงสร้างทรงกลมชั้นใน และการกลืนอันต่อมาจะผลิตโครงสร้างรูปทรงกลมชั้นนอกขึ้น โอบล้อมอันแรก ซึ่งในภาพที่ 41 G และ H มีโครงสร้างชั้นนอกล้อมรอบ intraplastidial vesicle (ซึ่งพลาสติดีชั้นส่วนแขนออกมาโอบปิดไมโทพลาสซึมอย่างสมบูรณ์)



ภาพที่ 40 จำนวนและขนาดของ intraplastidial vesicle ภายในเซลล์มีโซพิลล์ของกลีบดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ลี้ก๊กิควน



ภาพที่ 41 Intraplastidial vesicles ภายในพลาสต์ที่ชั้นเซลล์มีไซโทพลาสต์ของกลีบดอกกล้วยไม้หวาย พันธุ์ล็กก็่ควน มีเยื่อหุ้มสองชั้นที่ล้อมรอบ intraplastidial vesicle (A B และ D) ชั้นในของเวสซิเคิล (ลูกศรบาง) และช่องว่างของ vesicle ชั้นนอก (ลูกศรหนา) (E และ G) อิเล็กตรอนหนาแน่นมากภายในโครงสร้างที่มีรูปร่างกลม (ลูกศรบาง) (F และ H)

3) จำนวนของ intraplastidial vesicle ภายในพลาสติด

ช่องว่างภายในของ intraplastidial vesicle ประกอบไปด้วย ribosome จำนวนมาก (ภาพที่ 42A C และ D) และเยื่อหุ้มที่เป็นรูปทรงกลมบริเวณที่พบ vesicle (ภาพที่ 42A B และ D) โครงสร้างที่เชื่อมสภาพพบภายในช่องว่างของ intraplastidial vesicle มีให้เห็นในภาพที่ 42C อาจเป็นเศษที่เหลือของเวสซิเคิลที่เสื่อมสลาย ส่วนในภาพที่ 42B ภายใน intraplastidial vesicle เสื่อมสลายไปคงเหลือเฉพาะเวสซิเคิลอยู่ในช่องว่างของ intraplastidial ที่ถูกล้อมรอบโดยเยื่อหุ้ม 2 ชั้น แต่ในภาพที่ 42D ภายใน intraplastidial vesicle เห็นเป็นช่องว่างหลายอัน แต่พบได้อย่างน้อยที่สุด 1 อัน ที่ถูกล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้ม 2 ชั้น สำหรับภาพที่ 42E กล่าวได้ว่าภายใน vesicle มีไมโทคอนเดรียอยู่ (ลูกศรชี้บอกที่กรานูล) แต่โครงสร้างอาจเป็นจุดเริ่มต้นที่แตกต่างกับพลาสติด แต่ไมโทคอนเดรียน่าจะถูกล้อมรอบไว้ และภายใน intraplastidial vesicle ส่วนอื่นน่าจะประกอบไปด้วยวัตถุดิบที่เป็นของพลาสติด (ภาพที่ 42F) นอกจากนี้เห็นพลาสติดที่มีรูปร่างแบบเมล็ดถั่วประกบกันอยู่ภายใน intraplastidial vesicle ด้วย ดูได้จากภาพที่ 42G (ลูกศรชี้บอก) ซึ่งอาจเป็นส่วนของพลาสติดที่โครงสร้างเป็นวัตถุดิบของพลาสติดเอง และโครงสร้างอื่นไม่สามารถกำจัดออกไปได้ ในทางตรงกันข้ามไม่มีการพิสูจน์หลักฐานว่ามี golgi bodies หรือ nuclei ให้เห็นใน intraplastidial vesicle (ภาพที่ 42) สำหรับวัตถุดิบที่อยู่ในพลาสติดนั้น หลายครั้งที่เหมือนกับมีการสร้างเพิ่มขึ้นจากการโอบล้อมไซโทพลาสซึมเพิ่มเข้ามา สภาพเช่นนี้เป็นการชี้บอกว่าเกิดการเสื่อมสภาพของโครงสร้างเพียงเล็กน้อยภายในพลาสติดเฉพาะจุดในช่วงเวลาหนึ่ง (ตัวอย่างดังในภาพที่ 42A-C และภาพที่ 42A และ D) มีโครงสร้างภายในเสียหายเพียงเล็กน้อยภายในช่องว่างของ intraplastidial vesicle ส่วนพลาสติดอื่นๆ ประกอบไปด้วยวัตถุดิบที่เสื่อมสภาพเล็กน้อย หรือมีการสร้างเพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอ (ภาพที่ 42C) นอกจากนี้ยังเกิดการย่อยสลายขึ้นมากในทั้ง 2 รูปแบบอย่างสม่ำเสมอของวัตถุดิบในช่องว่างของ intraplastidial vesicle (ตัวอย่างในภาพที่ 35D และภาพที่ 42B H และ I) ส่วนพลาสติดที่เห็นในภาพที่ 42H เป็น intraplastidial vesicle ที่มีความสัมพันธ์มากกับความหนาแน่นของอิเล็กตรอน แต่ในทางตรงกันข้าม พบว่าช่องว่างบางอันของ intraplastidial vesicle เกือบทั้งหมดเป็นอิเล็กตรอนที่แสงทะลุผ่านได้ (ภาพที่ 42B และ I) ในภาพที่ 42 J มี intraplastidial vesicle หลายอัน ที่แสดงให้เห็นว่าพลาสติดที่ปรากฏการกลืนไซโทพลาสซึมที่เกิดขึ้นในภายหลัง (intraplastidial vesicle ที่อยู่เหนือขึ้นไปมีลูกศรหนาชี้บอก) และช่องว่างมีอิเล็กตรอนลักษณะขุ่นมัวมาก คล้ายคลึงกันกับการกลืนของพลาสติดอันที่เกิดขึ้นก่อน (โครงสร้างภายในทั้งหมดที่เป็นรูปทรงกลม) ซึ่งพลาสติดที่กลืนไซโทพลาสซึมอันใหม่ๆ นั้น เกิดขึ้นโดยการล้อมรอบจากส่วนของพลาสติดที่ยื่นออกมาข้างนอก (ลูกศรหนา) ส่วนช่องว่างเกิดขึ้นใหม่

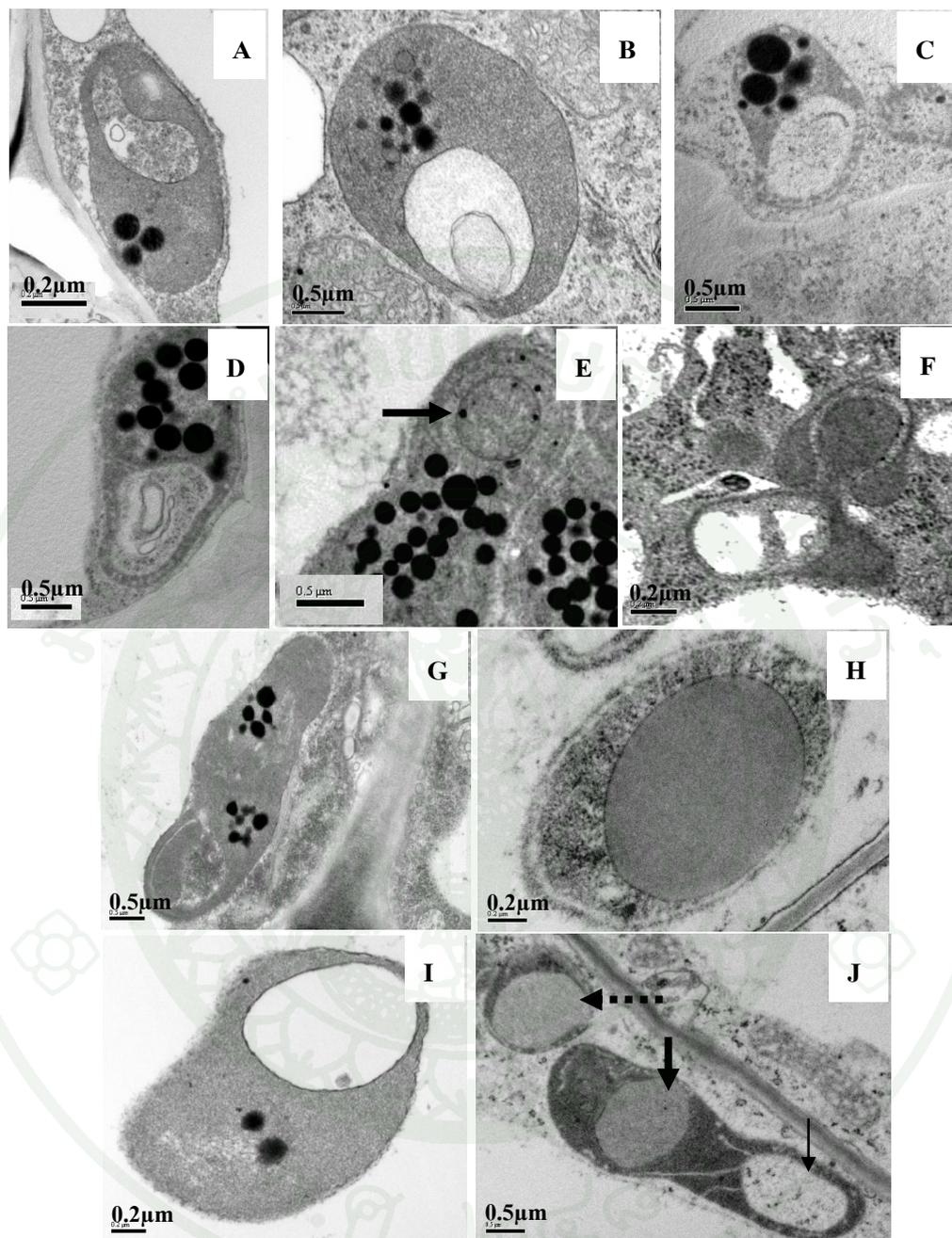
ภายใน intraplastidial vesicle นั้น เป็นลักษณะโครงสร้างที่คล้ายกับการล้อมรอบ ไชโตพลาสซึม เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 42E-H)

4) โครงสร้างของพลาสต์ติดส่วนอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ intraplastidial vesicle

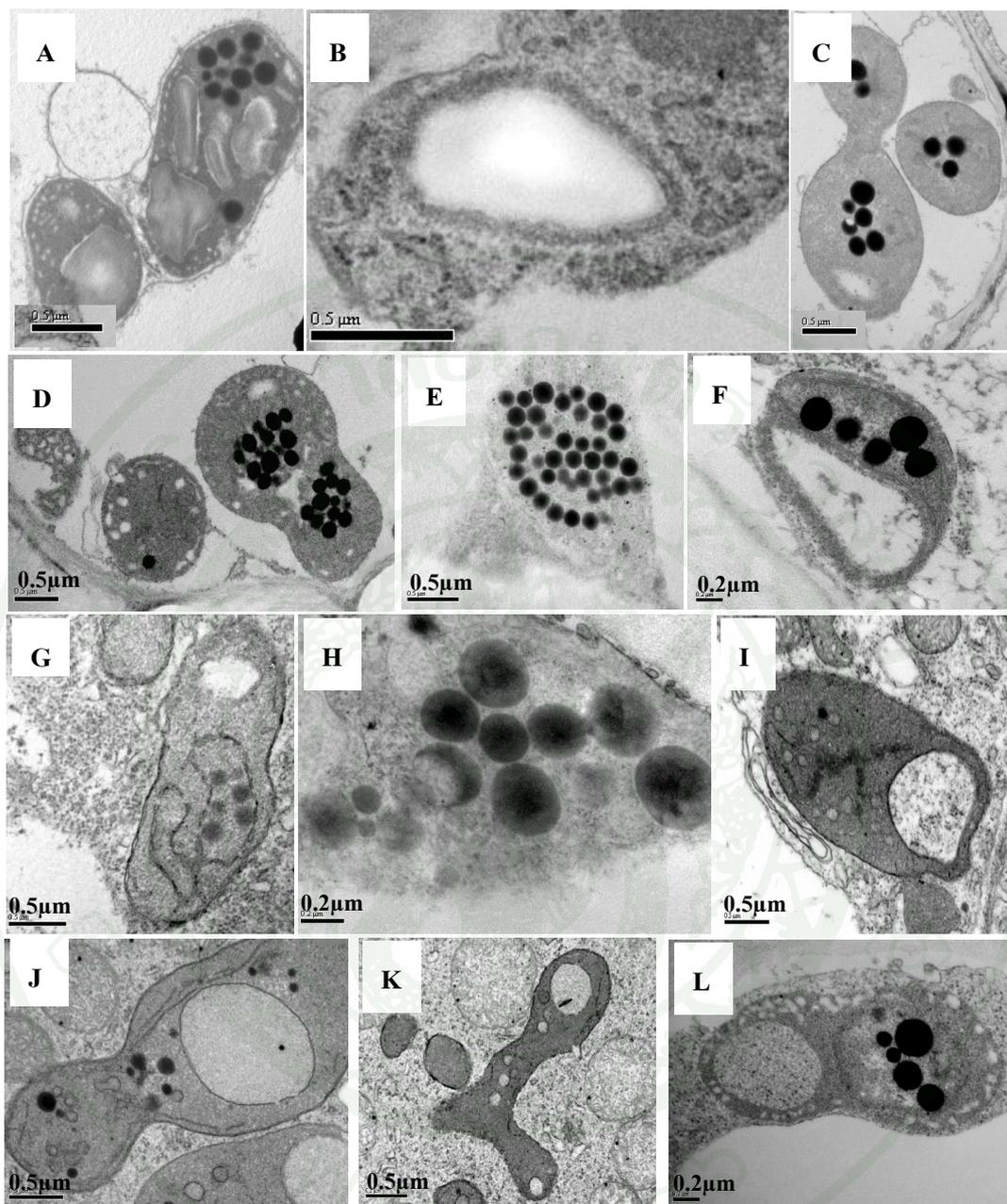
เม็ดแป้งทั้งหมดที่พบมีรูปร่างกลมเป็นเม็ดเดี่ยว ๆ ขนาดใหญ่อยู่ในพลาสต์ติด (ภาพที่ 43B) บางพลาสต์ติดเม็ดแป้งขนาดเล็กอาจมีมากกว่า 1 อัน และเห็นมากที่สุดถึง 4 อัน (ภาพที่ 43A) ในบางส่วนเม็ดแป้งกลมเหล่านั้นยังคงอยู่แทนที่ทั้งหมดของพื้นที่ภายในพลาสต์ติด (ลูกศรชี้บอกในภาพที่ 43B อยู่ตรงจุดที่เป็นเยื่อหุ้มพลาสต์ติดชั้นนอก) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดแป้งมีค่าเฉลี่ยที่ $0.5 \mu\text{m}$ (จากจำนวนเม็ดแป้งทั้งหมด 21 อัน) และขนาดเม็ดแป้งมีความแปรปรวนอยู่ระหว่าง $0.1\text{-}0.9 \mu\text{m}$ ซึ่งขนาดของเม็ดแป้งมีการกระจายตัว เมื่อเปรียบเทียบขนาดเม็ดแป้งพบว่ามีความสัมพันธ์มากกับพลาสต์ติด นอกจากนี้ยังพบว่าความสัมพันธ์ของพลาสต์ติดกับจำนวนของ plastoglobule มีความแปรปรวนสูง เริ่มตั้งแต่ 0-40 อัน โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่ที่สุดของ plastoglobule พิจารณามีค่าความแปรปรวนอยู่ระหว่าง $0.03\text{-}0.48 \mu\text{m}$. และค่าเฉลี่ยเป็น $0.15 \mu\text{m}$ (จากจำนวนทั้งหมด 705 อัน) มีการกระจายตัวของขนาด plastoglobule ว่าจำนวนมากที่สุดมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ $0.125 \mu\text{m}$ และอันอื่น ๆ มีขนาดประมาณ $0.175 \mu\text{m}$ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่ง plastoglobules รวมกลุ่มกันอยู่ตรงกลางภายในพลาสต์ติด หรือตรงกลางของแต่ละส่วนภายในพลาสต์ติดที่มีรูปร่างคล้ายคิมเบล (ภาพที่ 43C-F) กลุ่มของ plastoglobule เหมือนถูกล้อมรอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวงกลม (ภาพที่ 43D-G และ L) ในบางพลาสต์ติดมีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น เป็นเส้นคู่บริเวณพื้นที่มี plastoglobule แสดงในภาพที่ 43F แต่มีอย่างหนึ่งที่ปรากฏให้เห็นเป็นเยื่อหุ้ม 2 ชั้นอยู่ใกล้ออร์แกนเนลล์ที่เหมือนเป็น plastoglobule และบางส่วนอยู่ไกลไปจากบริเวณนั้นด้วย (ภาพที่ 4G) ซึ่ง plastoglobule ทั้งหมดเป็นรูปทรงกลมและมีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนสม่ำเสมอ แต่บางรูปแบบเห็นเป็นรูปทรงพระจันทร์ครึ่งเสี้ยว หรือมีพื้นที่ที่มีอิเล็กตรอนหนาแน่นสูงกว่าหรือต่ำกว่าปกติ (ภาพที่ 43H) ส่วนอิเล็กตรอนที่มีความขุ่นมัว มีความสัมพันธ์กับพลาสต์ติดเพียงเล็กน้อย วัตถุคิบภายในนั้นเห็นเป็นเส้นตรง และพบบ่อยที่เส้นเหล่านี้แตกแขนงผิดปกติ (ภาพที่ 43I) และภายในพลาสต์ติดหลายอันพบว่ามีความสัมพันธ์กับโครงสร้างบางอย่างที่คล้ายคลึงว่าเป็น plastoglobule (ภาพที่ 43 I-K) ในภาพที่ 44 J มีช่องว่างของเวสซิเคิลขนาดใหญ่ มีความสัมพันธ์กับอิเล็กตรอนที่ขุ่นมัว ส่วนเวสซิเคิลอื่น ๆ ขนาดเล็กหลายอันมีความสัมพันธ์กับอิเล็กตรอนที่โปร่งแสง (ภาพที่ 43K) โดยเวสซิเคิลทั้งสองชนิดไม่มีความชัดเจนว่า ได้รับผลมาจากการกลืน ไชโตพลาสซึมโดยพลาสต์ติด แต่แน่นอนว่าพลาสต์ติดมีความสัมพันธ์กับ plastoglobule ซึ่งอาจมีจุดกำเนิดมาจากแหล่งอื่น และมีพลาสต์ติดเพียงเล็กน้อยที่ประกอบด้วยโครงสร้างคล้ายคลึงกันกับ

การยึดตัวของเยื่อหุ้มเอนโดพลาสมิกเรติคิวลัม ซึ่งอาจเป็นสิ่งที่คล้ายกันกับไทลาคอยด์ในคลอโรพลาสต์ (ภาพที่ 43J ลูกศรบาง) นอกจากนี้ยังมีความสัมพันธ์กับโครงสร้างเล็กๆ ที่มีอิเล็กตรอนโปร่งแสง แต่ไม่ถูกล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้ม สังเกตได้จากส่วนของพลาสติดที่ยื่นออกมา (ภาพที่ 43J และ K) พลาสติดส่วนที่ยื่นออกมาแล้ว พลาสติดจะกลืนไซโตพลาสซึมอย่างสมบูรณ์ เห็นเป็นเส้นรอบวงทั้งหมดเป็นของพลาสติด (ภาพที่ 43L)





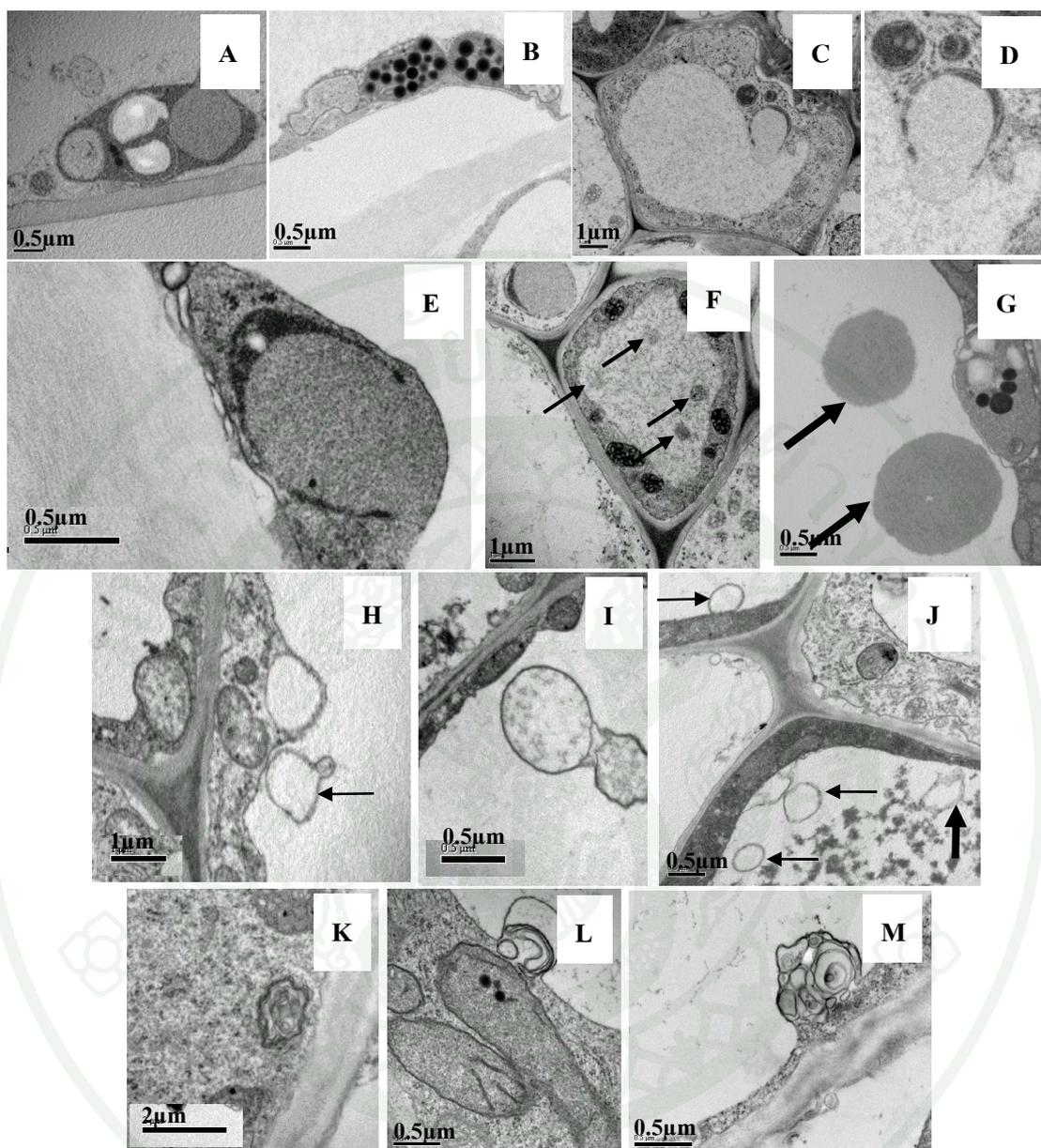
ภาพที่ 42 พลาสต์ติคภายในชั้นเซลล์มีโซฟิลล์ของกลีบดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ลี้กี้ดวน
 เชื้อหุ้ม Intraplastidial vesicles สองชั้น และ plastoglobuli ที่มีอิเล็กตรอนหนาแน่นมาก
 ใน พลาสต์ติค (A-E) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายใน intraplastidial vesicle (C-E)
 พลาสต์ติคเสื่อมสภาพ (I) intraplastidial vesicle ที่มีอิเล็กตรอนหนาแน่นน้อย (G และ H)
 โครงสร้างภายใน intraplastidial vesicle เสื่อมสภาพ (I และ J)



ภาพที่ 43 โครงสร้างอื่นๆ ภายในพลาสติดที่ชั้นเซลล์มีโซฟิลล์ของกลีบ ดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ ลักกี้ควน มีเม็ดแป้ง (A และ B) Plastoglobuli เป็นกลุ่มในพลาสติดรูปทรงคัมเบล (C และ D) เชื่อมหุ้มสองชั้นติดกับขอบของกลุ่ม Plastoglobuli (E-G) อิเล็กตรอนหนาแน่น น้อยใน Plastoglobuli (H) โครงสร้างคล้าย เวสซิเคิลขนาดเล็กภายในพลาสติด (I-L)

5) การปลดปล่อย intraplastidial vesicle เข้าสู่ศูนย์กลางของแวคคิวโอล

การตรวจสอบความจริงว่ามีความคล้ายคลึงกันของกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของวัตถุดิบใน intraplastidial vesicle พบได้จากเนื้อเยื่อจากการตัดชิ้นส่วนเพียง 1 ชิ้นเท่านั้นที่เป็น intraplastidial vesicle มีความสม่ำเสมอของวัตถุดิบภายในนั้น และยังคงเหลือให้เห็นอยู่ภายในพลาสติด เยื่อหุ้มพลาสติดเสื่อมสภาพเกิดขึ้น มีลักษณะการเคลื่อนตัวของ intraplastidial vesicle คล้ายจะออกจากพลาสติด (ภาพที่ 44A) ส่วนในเนื้อเยื่อจากการตัดชิ้นส่วนอื่นพบ intraplastidial vesicle ไม่สมบูรณ์ แต่ถูกล้อมรอบด้วยส่วนที่ยื่นออกมาของพลาสติด หรืออาจกล่าวได้ว่ามันเป็นส่วนที่เหลืออยู่ในพลาสติดก็ได้ (ภาพที่ 44B) ภาพที่ 44C และ E แสดงถึงพลาสติดที่เข้าไปใกล้กับเยื่อหุ้มแวคคิวโอล แต่เยื่อหุ้มที่สังเกตได้ในภาพนั้น ไม่เป็นที่ยอมรับในการสรุปว่าเกิดการรวมกันระหว่างเยื่อหุ้มแวคคิวโอลกับเยื่อหุ้มพลาสติด เยื่อหุ้มแวคคิวโอลค่อนข้างล้อมรอบ intraplastidial vesicle เป็นไปได้ว่ามีส่วนของไซโตพลาสซึมถูกนำไปรวมไว้ด้วย (ภาพที่ 38D และ E) สำหรับสิ่งที่เห็นนี้ไม่สนับสนุนความคิดที่ว่าเป็นส่วนของพลาสติดและมีแวคคิวโอลเข้าไปอยู่ข้างในนั้น แต่พบว่าแวคคิวโอลประกอบด้วยโครงสร้างกลม ๆ ที่ไม่มีเยื่อหุ้มล้อมรอบ (ภาพที่ 44F) มีลูกศรชี้ และภาพที่ 44G มีลูกศรชี้บอก ซึ่งคาดว่าจะเป็นเวสซิเคิลที่มาจากพลาสติดปลดปล่อย intraplastidial vesicle เข้าไปในแวคคิวโอลมากกว่า ส่วนเวสซิเคิลถูกล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้ม 1 หรือ 2 ชั้น (ภาพที่ 44H I และ J) เป็นข้อยืนยันได้ว่ามีเวสซิเคิลอยู่ภายในแวคคิวโอล แต่ไม่มีข้อมูลที่สามารถชี้เป็นตัวบ่งชี้ได้ว่าในช่องว่างของแวคคิวโอลมีส่วนที่เหลือของพลาสติด หรือเป็นอิเลคตรอนที่หนาแน่นและมีวัตถุดิบ เช่น plastoglobules อยู่ภายใน แต่พบได้ว่าภายในไซโตพลาสซึมมีเวสซิเคิลบางอันที่มีเยื่อหุ้มหลายชั้น (ภาพที่ 44K) และพบในเนื้อเยื่อจากการตัดชิ้นส่วนหลายอัน นอกจากนี้ยังมีเวสซิเคิลบางอันที่มีเยื่อหุ้มหลายชั้นเชื่อมต่อกับพลาสติด ยื่นส่วนนูนเข้าไปในแวคคิวโอลที่มีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 44 และ M) สำหรับเนื้อเยื่อจากการตัดชิ้นส่วนในภาพที่ 44 และ M อาจคาดได้ว่าเป็นภาพของ micro-autophagy ที่เกิดจากวิธีที่เยื่อหุ้มแวคคิวโอลหุ้มล้อมรอบเป้าหมายและรวมตัวกันกับตัวของมันเองบริเวณ ไซโตพลาสซึมของเป้าหมายนั้น



ภาพที่ 44 โครงสร้างของพลาสต์ติคและ Intraplastidial vesicles ที่บริเวณชั้นเซลล์มีไซฟิลของกليبดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลี้กักควน intraplastidial vesicles เคลื่อนออกไปจากพลาสต์ติค(A) พลาสต์ติคที่ไม่มี Intraplastidial vesicles (B) intraplastidial vesicle และเวคคิวโอลขนาดใหญ่ (C) ภาพขยายจากภาพ C (D) เศษที่เหลือของเยื่อหุ้ม (E) intraplastidial vesicle ที่ไม่มีเยื่อหุ้มในเวคคิวโอล (F) ภาพขยาย intraplastidial vesicle ที่ไม่มีเยื่อหุ้ม (G) เวซิเคิลที่ภายในบรรจุด้วยเส้นใยเชื่อมต่อกัน (H-J) เวซิเคิลที่ล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้มหลายชั้น (K-M)

6) พลาสต์พัฒนาเป็นแวคคิวโอล

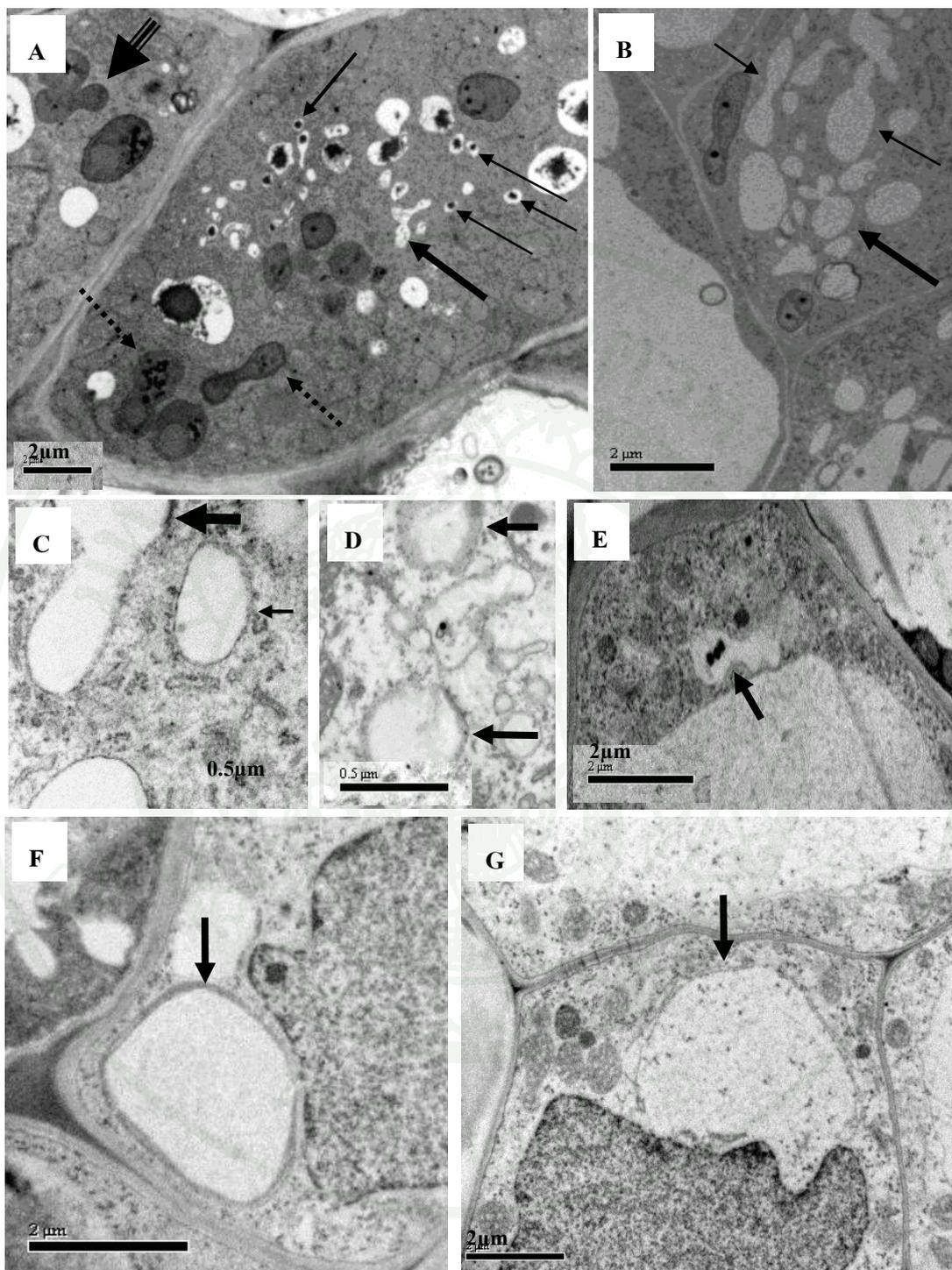
ในการศึกษาพบการพัฒนาพลาสต์ระยะสุดท้ายในภาพที่ 45 A มี 2 เซลล์ที่มีแวคคิวโอลขนาดเล็กจำนวนมาก ขนาดและรูปร่างของแวคคิวโอล มีความคล้ายคลึงกับพลาสต์มาก ภาพที่ 45A (ลูกศรชี้บอก) มีพลาสต์ 3 อัน และภาพที่ 45B (ลูกศรหนา) แสดงให้เห็นแวคคิวโอลกับรูปร่างที่คล้ายคลึงกับพลาสต์ 3 อันที่รวมอยู่ใกล้กันหรือรวมตัวกันและแวคคิวโอลอื่นๆ มีรูปร่างแบบคัมเบล (ภาพที่ 45B ลูกศรบาง และภาพที่ 45C ลูกศรหนา) คล้ายคลึงกันกับที่พบพลาสต์เดี่ยวๆและแวคคิวโอลหลายอัน (ภาพที่ 45C ลูกศรบาง และภาพที่ 45D ลูกศรชี้บอก) นอกจากนี้ยังมีส่วนที่เหลือของเยื่อหุ้มรอบนอกของแวคคิวโอลที่พบในพลาสต์ ที่มีความสัมพันธ์กันกับ intraplasmic vesicle (ภาพที่ 45F) และมีแวคคิวโอลหลายอันที่มีรูปร่างคล้ายพลาสต์ ที่ประกอบไปด้วยแวคคิวโอลซึ่งก็คือ plastoglobules ที่มีอิเล็กตรอนบวม พบว่าเป็นแวคคิวโอลของพลาสต์ที่อยู่ในแวคคิวโอล (ภาพที่ 45A และE) ซึ่งแวคคิวโอลที่พบนั้น ไม่พบในเซลล์บริเวณอื่น ยกเว้นในพลาสต์เท่านั้นที่มี plastoglobules และแวคคิวโอลหลายอัน บ่อยครั้งที่พบว่าภายในมี plastoglobuli หรือเห็นเป็นอิเล็กตรอนที่หนาแน่นมาก (ภาพที่ 45A ลูกศรบาง และภาพที่ 45E) นอกจากนี้พบ intraplasmic vesicle ขนาดใหญ่ที่อยู่ในเซลล์ คาดว่าเกิดจากพลาสต์ปลดปล่อยเข้ามาสู่แวคคิวโอลของเซลล์นั่นเอง (ภาพที่ 45F ลูกศร) และหลังจากนั้นภายในพลาสต์เสื่อมสลายไปเกือบหมดคงเหลือไว้เพียง plastoglobules จากนั้นพลาสต์จึงมีการพัฒนาไปเป็นแวคคิวโอลรูปร่างต่างๆ สำหรับภาพที่ 45G แสดงให้เห็นถึงเยื่อหุ้มสองชั้นอยู่ล้อมรอบโครงสร้างที่เหมือนกับแวคคิวโอล อาจเป็นระยะการพัฒนาของพลาสต์ต่อไป

7) ความสัมพันธ์ของจำนวนพลาสต์และโครงสร้างภายในพลาสต์กับการชราภาพ

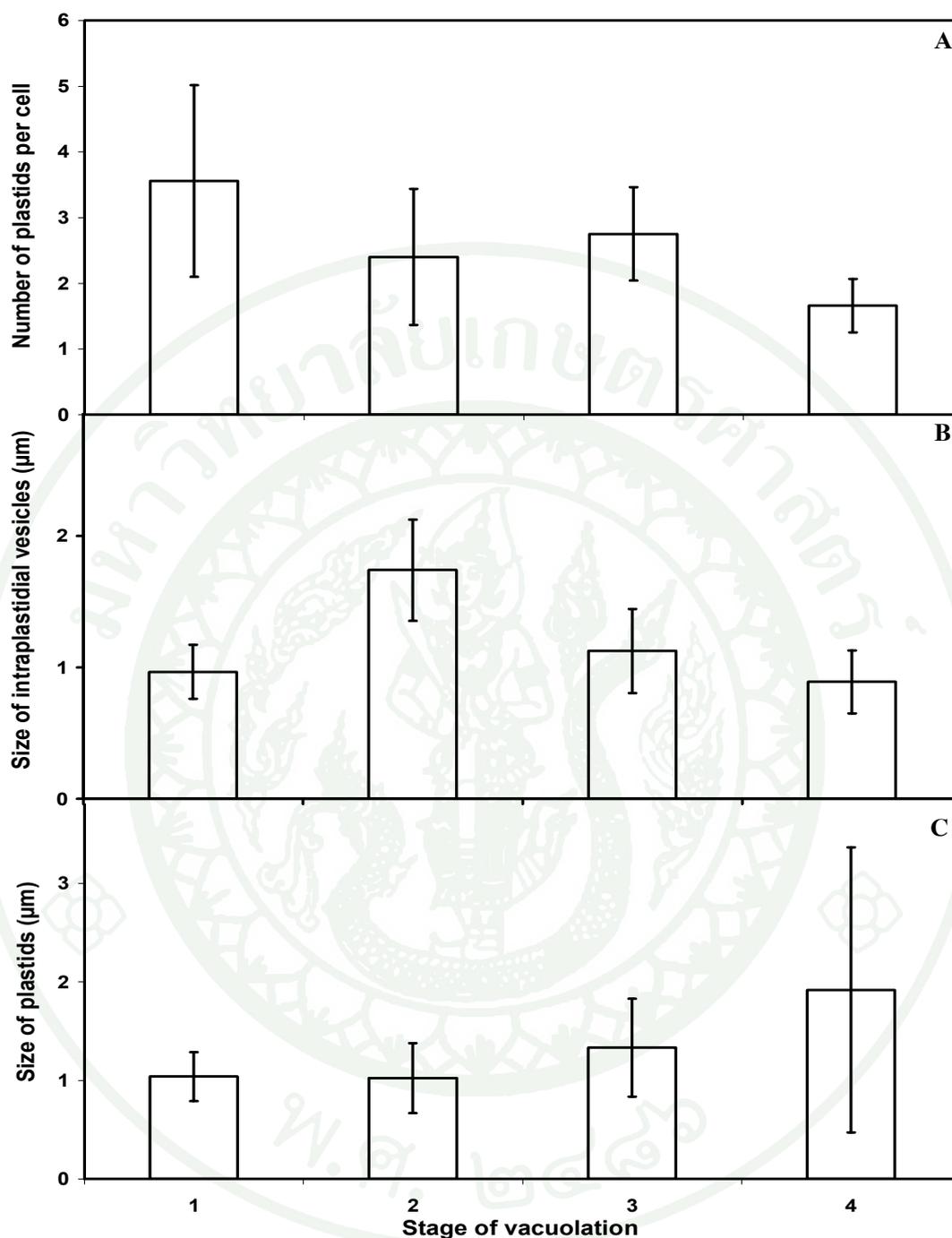
จำนวนและขนาดของพลาสต์ รวมถึง intraplasmic vesicle ได้ถูกวัดและจัดกลุ่มเป็นระดับการพัฒนาของเซลล์แต่ละระยะ โดยใช้อัตราส่วนของแวคคิวโอลต่อขนาดของเซลล์ (ไม่รวมผนังเซลล์) (ภาพที่ 46A) ซึ่งโครงสร้างภายในหลักๆ ของพลาสต์ประกอบด้วย intraplasmic vesicle และเวสซิเคิลสามารถพบได้ในทุกระยะของการพัฒนาเซลล์ ดังนั้นจำนวนของ intraplasmic vesicle ทั้ง 4 ระยะของการพัฒนาเซลล์มีความคล้ายคลึงกับจำนวนของพลาสต์ต่อระยะการพัฒนาเซลล์ และเส้นผ่าศูนย์กลางของ intraplasmic vesicle สูงที่สุด พบที่ระยะที่ 2 ของระยะการพัฒนาเซลล์ และลดลงที่ 2 ระยะหลังของการพัฒนาเซลล์ (ภาพที่ 46C) ที่ระยะสุดท้ายของการพัฒนาเซลล์เป็นระยะที่เซลล์เสื่อมสภาพ (พื้นที่รวมแวคคิวโอลต่อพื้นที่รวมเซลล์ภายในผนังเซลล์ แปรปรวนระหว่าง 0.76-1) รวมในช่วงเวลาที่แน่นอนว่ามีเซลล์ตาย การตายเป็นลักษณะ

ที่เกิดการยุบของเยื่อหุ้มแวกคิวโอลแต่ไม่พบทั้งหมดของเซลล์ คุณภาพที่พบไม่ชัดเจนในการเปลี่ยนแปลง ไม่มีความชัดเจนเกี่ยวกับพลาสติกหรือโครงสร้างภายในว่ามีลักษณะเช่นไรก่อนที่เซลล์มีไซโทลัสจะยุบตัว เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเซลล์ที่มีความแปรปรวนในช่วงกลางของระยะการพัฒนา





ภาพที่ 45 พลาสต์พัฒนาไปเป็นแวคคิวโอลบริเวณชั้นเซลล์มีโซฟิลล์ของก้านดอกกล้วยไม้หวาย พันธุ์ลึกก็๋ควน (A และ B) แวกคิวโอลรูปทรงคัมเบล (C) แวกคิวโอลมีวัตุดิบล้อมรอบ (D) แวกคิวโอลบรรจุด้วย plastoglobules สามอันที่มีอิเล็กตรอนหนามาก (E) intraplastidial vesicle และนิวเคลียส ขนาดใหญ่ (F และ G)

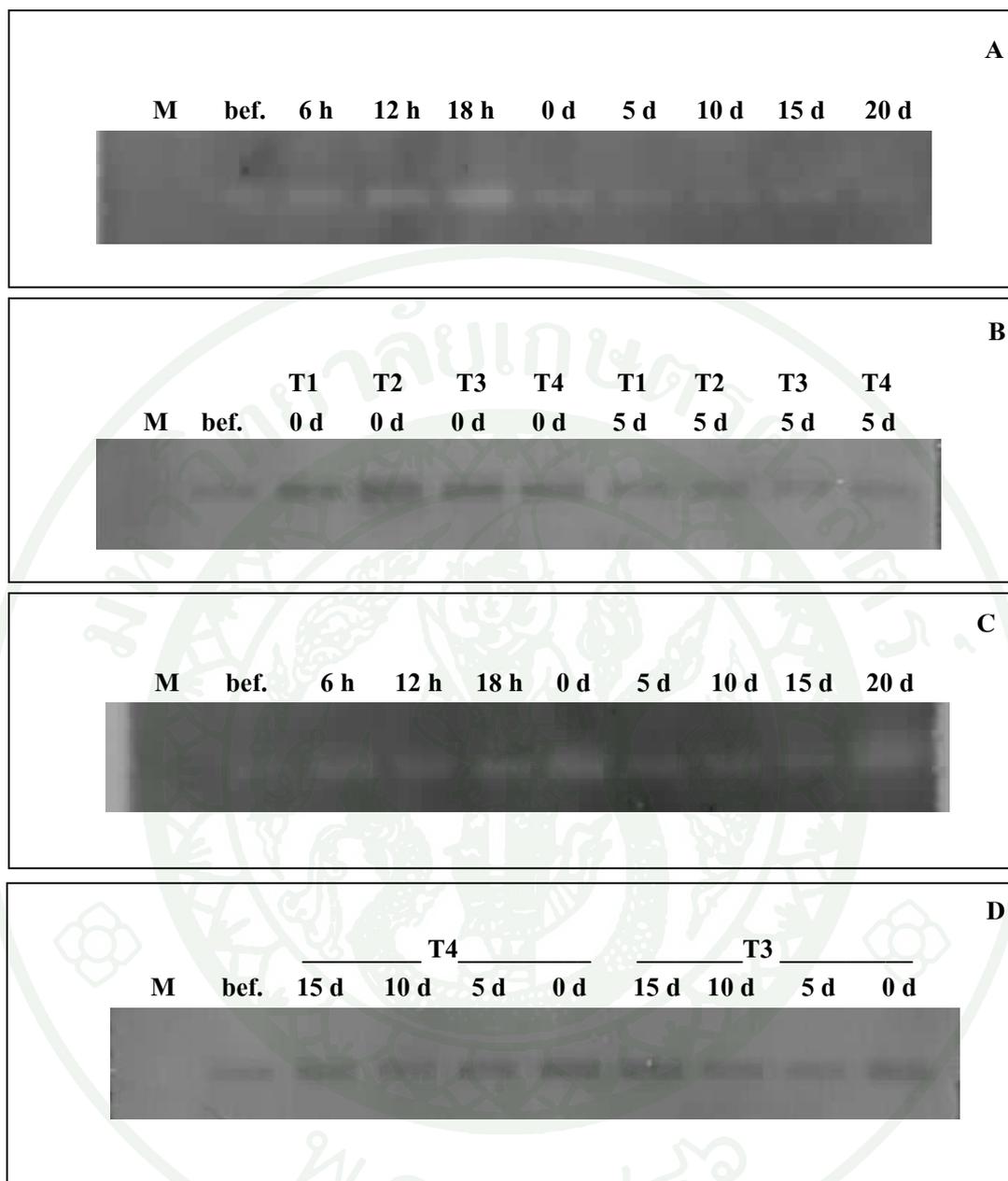


ภาพที่ 46 จำนวนพลาสติด (A) ขนาดของ intraplastidial vesicles (B) และขนาดพลาสติด (C) ในเซลล์บริเวณชั้นเซลล์มีไซพิลล์ของกลีบดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ถักก็ควน ทุกระยะของการพัฒนาเซลล์คือพื้นฐานบนค่าอัตราส่วนของพื้นที่แวกคิวโอลต่อพื้นที่เซลล์ (ไม่รวมผนังเซลล์) จัดเป็น 4 ระยะ (ระยะ 1: อัตราส่วน ≤ 0.25 , ระยะ 2: อัตราส่วน 0.26 -0.50, ระยะ 3: อัตราส่วน 0.51- 0.75, ระยะ 4: อัตราส่วน 0.76-1.0)

3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์และโมเลกุลของดอกกล้วยไม้สกุลหวายในระหว่างการชราภาพ

3.1 การทดลองการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ DNase ของดอกกล้วยไม้สกุลหวายในระหว่างการชราภาพ

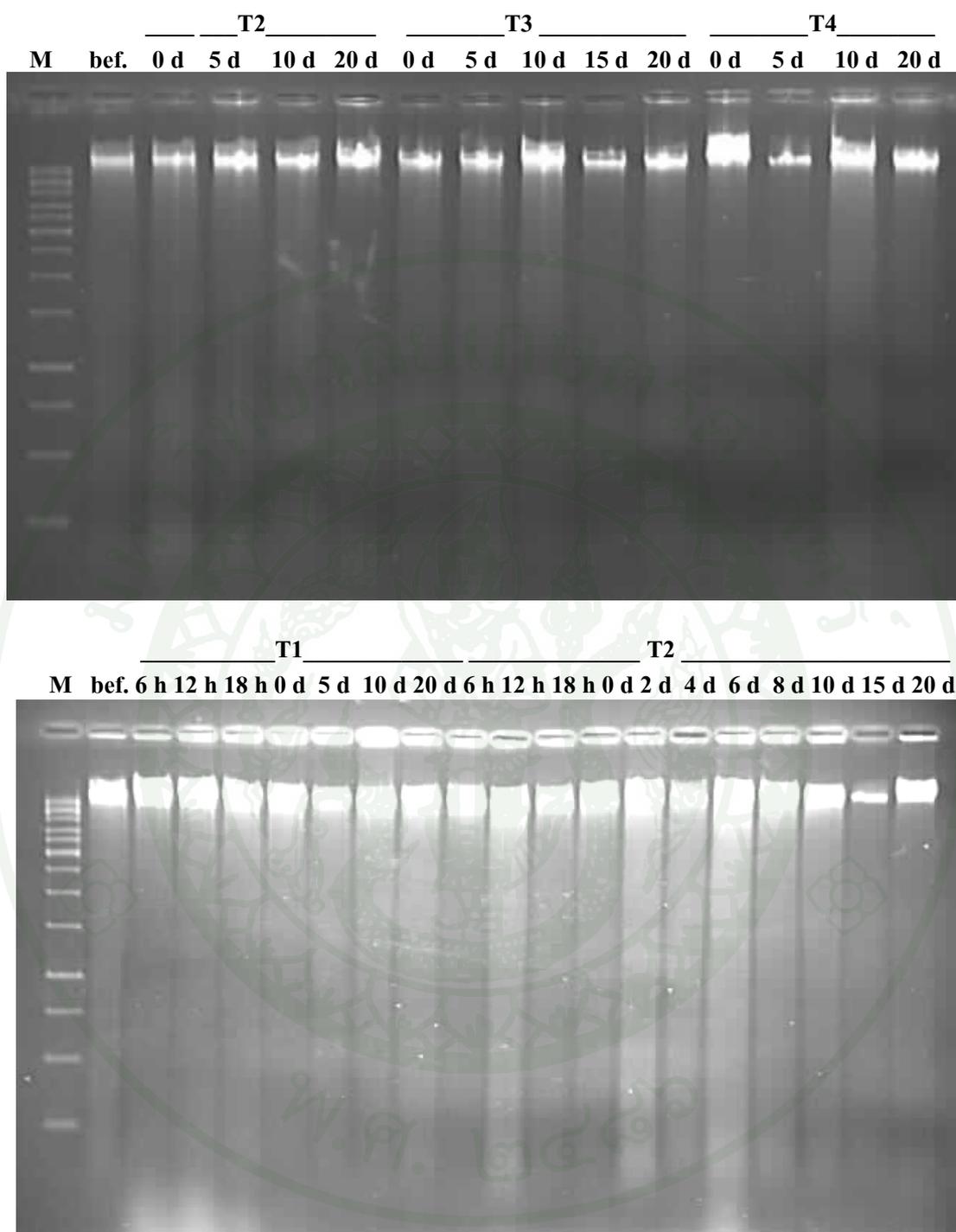
ดอกกล้วยไม้พันธุ์ลัคกี้ควอน ที่ไม่ได้รับเอทิลีน พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามวันที่เพิ่มขึ้น และเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อวางดอกกล้วยไม้ไว้นานวันขึ้น หลังจากนั้นกิจกรรมลดลงและคงที่จนกระทั่งถึง 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 47A) ดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับเอทิลีน ได้รับเอทิลีน ได้รับ 1-MCP และ ได้รับ 1-MCP ร่วมกับเอทิลีน เมื่อเปรียบเทียบกันทั้ง 4 ทริทเมนต์ พบว่าดอกไม้ที่ได้รับเอทิลีนลักษณะแถบสีเข้มและหนา ในขณะที่ทริทเมนต์อื่นที่เวลาเดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่ทั้ง 4 ทริทเมนต์ นาน 5 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า แถบสีจะมีสีจางลง และมีเพียงทริทเมนต์ ที่ได้รับเอทิลีนเท่านั้นที่แถบสีเข้มกว่าทริทเมนต์อื่นเล็กน้อย (ภาพที่ 47 B) แต่ถ้าเปรียบเทียบเฉพาะดอกกล้วยไม้ที่ได้รับเอทิลีนในเวลาต่างกัน พบว่าแถบสีเข้มหลังการได้รับเอทิลีน 24 ชั่วโมง และลดลงอย่างคงที่ถึง 5 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนกระทั่งถึง 15 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่แถบสีเข้มและหนาขึ้น 20 วัน หลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 47C) และเมื่อทำการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ เมื่อดอกกล้วยไม้ได้รับ 1-MCP และ 1-MCP ร่วมกับเอทิลีน พบว่าดอกกล้วยไม้ที่ยังไม่ได้รับทริทเมนต์ใด มีขนาดแถบสีขนาดเล็กและจางกว่าดอกกล้วยไม้ที่ได้รับทั้ง 2 ทริทเมนต์ หลังจากได้รับทริทเมนต์ 24 ชั่วโมงจนถึง 15 วันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แถบสีและขนาดไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 47D)



ภาพที่ 47 แสดงกิจกรรมเอนไซม์ DNase ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลี้กี่ควน ที่ไม่ได้รับเอทิลีน (T1; A) ได้รับทุกทริทเมนต์ (T1-T4; B) ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (T2; C) ได้รับ 1-MCP 500 nL/L (T3; D) และ ได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (T4; D) (bef. คือ ดอกกล้วยไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์; h คือจำนวนชั่วโมงหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ d คือ จำนวนวันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

3.2 การทดลองการเปลี่ยนแปลงในระดับชีวโมเลกุลของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ในช่วงชราภาพ

ดอกกล้วยไม้หลังจากได้รับเอทิลีน 24 ชั่วโมง ถึงวันที่ 20 พบว่า การเกิดแถบของ DNA เป็นปื้นมากตั้งแต่หลังการได้รับเอทิลีน 24 ชั่วโมง และการเกิดแถบของ DNA ลดลงตั้งแต่วันที่ 5 10 และ 20 ตามลำดับ ในขณะที่ดอกกล้วยไม้ที่ได้รับ 1-MCP และได้รับ 1-MCP ร่วมกับเอทิลีน ตั้งแต่หลังที่ได้รับทริทแมนต์ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งวันที่ 20 การแตกหักของ DNA ไม่มีความแตกต่างกัน โดยในดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับเอทิลีน การแตกหักของ DNA ไม่มีความแตกต่างกันในช่วงแรก มีเพิ่มมากขึ้นเมื่อเก็บดอกกล้วยไม้ไว้นาน 10 วัน และเพิ่มมากขึ้นอีก เมื่อเก็บดอกกล้วยไม้ไว้นานถึง 20 วัน สำหรับการแตกหักของ DNA ในดอกกล้วยไม้ที่ได้รับเอทิลีน พบว่าดอกกล้วยไม้ที่ได้รับเอทิลีนเพียง 6 ชั่วโมง การแตกหักของ DNA มีน้อย และการแตกหักของ DNA ไม่แตกต่างกันในช่วงจำนวนชั่วโมงที่เพิ่มขึ้นหลังจากดอกกล้วยไม้ได้รับเอทิลีน แต่เมื่อวางดอกกล้วยไม้ไว้ถึงวันที่ 4 การแตกหักของ DNA เพิ่มขึ้นและเกิดสูงสุดในวันที่ 6 แต่เริ่มลดลงในวันที่ 8 หลังจากนั้นการแตกหักของ DNA ลดลงเมื่อวางดอกกล้วยไม้ไว้นานขึ้น (ภาพที่ 48)



ภาพที่ 48 แสดง DNA fragmentation ของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลัคกี้ควอนที่ไม่ได้รับเอทิลีน (T1) ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (T2) ได้รับ 1-MCP 500 nL/L (T3) และ ได้รับ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ (T4) (bef. คือ ดอกกล้วยไม้ก่อนได้รับทริทเมนต์; h คือจำนวนชั่วโมงหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ d คือ จำนวนวันหลังได้รับทริทเมนต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

วิจารณ์

การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา

การศึกษาผลของเอทิลีนที่มีต่อกล้วยไม้สกุลหวาย 6 พันธุ์ คือ ลักกี้ควน ทับทิม ขาวสนาน เรดบอมโจ มีสทิน และ ซากุระ พันธุ์ที่ไวต่อเอทิลีนคือ พันธุ์ ลักกี้ควน และพันธุ์ที่ไม่ไวต่อเอทิลีนคือ พันธุ์ 'Red Bomjo' โดยในพันธุ์ลักกี้ควน หลังจากได้รับเอทิลีน 24 ชั่วโมง กลีบดอกแสดงการลุ่ลีดอกซีด และเกิดเส้นเวนอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าเอทิลีนสามารถชักนำการเกิดชราภาพในดอกกล้วยไม้สกุลหวายได้ (Woltering and van Doorn, 1988) นอกจากนี้ความเข้มข้นของเอทิลีนที่แตกต่างกัน ส่งผลให้การเกิดชราภาพแตกต่างกันด้วย เอทิลีนที่ระดับความเข้มข้นสูง ทำให้กลีบดอกกล้วยไม้พันธุ์ลักกี้ควนเกิดการลุ่ลีได้มากกว่าที่ระดับความเข้มข้นต่ำ เนื่องจากเอทิลีนความเข้มข้นต่ำที่ให้กับพืชจากภายนอกนั้น ถูกרבกวนจากเอทิลีนที่พืชสร้างขึ้นเองด้วย มีผลให้การทำงานของเอทิลีนมีประสิทธิภาพลดลง (Reid and Wu, 1992) ในขณะที่เอทิลีนความเข้มข้นสูงมีประสิทธิภาพการทำงานเต็มที่ ส่งผลต่อการกระตุ้นกลไกการทำงานของกระบวนการชราภาพต่างๆ ภายในเซลล์ของดอกไม้ ทำให้เซลล์สูญเสียแรงต่งและมีการปลดปล่อยน้ำออกมาจากเซลล์อย่างช้าๆ ซึ่งมีกระทบต่อเนื้อก่อก่อให้เกิดการยุบตัวของเซลล์และผนังเซลล์ยืดขยายตัวออก ดอกไม้จึงแสดงอาการเหี่ยว (Stead and van Doorn, 1994) โดยเยื่อหุ้มเซลล์เสื่อมสภาพไปนั้น ทำให้เกิดการรั่วไหลของประจุ คลอโรฟิลล์และเม็ดสีอื่น ๆ และสลายตัวไปพร้อมกับการสลายตัวของสารบางชนิดภายในแวคคิวโอล (Matile *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2001 and van Doorn and Woltering, 2008) ลักษณะเช่นนี้ พบได้เช่นเดียวกันในดอก *Alstroemeria* (Wagstaff *et al.*, 2005), liliales (Nicholes, 1977) และ *Sandersonia* (O' Donoghue *et al.*, 2002) นอกจากนี้เอทิลีนยังทำให้เกิดการสูญเสียโปรตีน มีการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ซึ่งเป็นลักษณะทางปริมาณที่ตรวจวัดได้ของดอก *Sandersonia* (Eason and Webster, 1995)

การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาค

เมื่อนำดอกกล้วยไม้ส่วนกลีบดอกบนของดอกกล้วยไม้พันธุ์ลักกี้ควนหลังจากได้รับเอทิลีนแล้ว มาทำการศึกษากายวิภาค พบว่า บริเวณเซลล์มีโซฟิลล์มีการยุบตัว มองเห็นเป็นช่องว่างขนาดใหญ่ และการยุบตัวเกิดขึ้นอย่างชัดเจนในวันที่ 5 หลังจากได้รับเอทิลีน (ภาพที่ 15) ซึ่งอาการนี้เป็นช่วงระยะเวลาเดียวกันกับการที่กลีบดอกแสดงอาการลุ่ลีอย่างมากด้วยเช่นกัน (ภาพที่ 12) สาเหตุที่เอทิลีนส่งผลกระทบท่อดอกกล้วยไม้ทำให้เกิดการชราภาพเร็วขึ้นนั้น เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma

membrane) แตกและแยกตัวออกจากผนังเซลล์ (cell wall) ทำให้มีการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มมากขึ้น หรือเกิดการแตกของผนังแวคคิวโอล หลังจากนั้นแวคคิวโอลเกิดการยุบตัว (Matile, 1997; Jones, 2001; van Doorn and Woltering, 2005) มีรายงานว่าในพืชบางชนิด เอทิลีนทำให้เพิ่มอัตราส่วนระหว่าง sterol : phospholipid ส่งผลให้เกิดการสูญเสีย phospholipid ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ดังเช่นในดอกคาร์เนชั่นที่เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไลปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์จึงนำไปสู่การสูญเสียระบบการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ มีผลให้เซลล์เสื่อมสภาพตามมาในภายหลัง (Thompson *et al.*, 1982) และเอทิลีนยังทำให้ปริมาณของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในผนังเซลล์ลดลงด้วย (van Doorn and Woltering, 2008) โดย Lee and Chen (2002) รายงานว่าบริเวณเซลล์มีไซฟิลล์เป็นเสมือนแหล่งความจำที่สมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และดำเนินกิจกรรมของเซลล์ที่เกิดขึ้นกับพืช จนกระทั่งพืชเข้าสู่การชราภาพ และเมื่อพืชชราภาพบริเวณมีไซฟิลล์จะเป็นบริเวณที่รับรู้ได้และเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา พบลักษณะเช่นเดียวกันนี้ในใบถั่วที่ชราภาพ ซึ่งภายในเซลล์มีไซฟิลล์ทั้งหมดเป็นส่วนของไซโตพลาสซึมที่เกิดการสูญเสียสภาพของพลาสมาเลมมา และมีการสร้าง vesicle ขนาดเล็กจำนวนหนึ่งขึ้น รวมถึงการเสื่อมสภาพของออร์แกเนลล์ต่างๆ เช่น พลาสติด ไมโทคอนเดรีย และไรโบโซม ซึ่งมีการปล่อยเอนไซม์ ไฮโดรไลติก และเอนไซม์ที่ปล่อยออกมาเพิ่มปริมาณขึ้นไปมีผลต่อการย่อยเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ต่างๆ ทำให้วัตถุดิบในออร์แกเนลล์ไหลออกมาสู่ภายนอก และเกิดกระบวนการกำจัดออกจากเซลล์ ทำให้เซลล์เสื่อมสภาพไป (Barton, 1966) นอกจากนี้ยังมีเหตุผลที่สนับสนุนว่า อาการที่เกิดขึ้นนี้เป็นเพราะผนังเซลล์แห้งและเสื่อมสภาพลงในช่วงที่เกิด PCD สารประกอบหลักของผนังเซลล์บริเวณนี้สูญหายไป และสูญเสียโครงสร้างของเส้นใย (Arunika *et al.*, 2007) ลักษณะการตายของเซลล์แสดงอาการให้เห็นการฉีกขาดที่บริเวณเซลล์มีไซฟิลล์ โดยมีลักษณะที่คล้ายกันนี้เกิดขึ้นในดอก *Sandersonia*, *Alstroemeria*, *Hemerocallis* และ *Iris* (O' Donoghue *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2003 and van Doorn *et al.*, 2003) ส่วนในดอกกล้วยไม้ พบว่า เซลล์ในบริเวณเยื่อชั้นผิว (epidermis cells) มีการยุบตัวเพียงเล็กน้อยหลังจากได้รับเอทิลีนในวันที่ 5 ซึ่งคล้ายกันกับที่พบในพืชชนิดอื่นที่แสดงจุดเริ่มต้นของการเกิด PCD ครั้งแรกอยู่ที่เซลล์มีไซฟิลล์ แต่ไม่เกิดที่เซลล์อพิเดอมิส เช่นในดอก *Alstroemeria* และคาร์เนชั่น (Smith *et al.*, 1992 and Wagstaff *et al.*, 2003)

การเปลี่ยนแปลงทางเซลล์วิทยา

กล้วยไม้พันธุ์ลัคกีคววน หลังได้รับเอทิลีนมีการเปลี่ยนแปลงในออร์แกเนลล์ต่าง ๆ เกิดขึ้น โดยเฉพาะไมโทคอนเดรียซึ่งเป็นแหล่งของพลังงาน และเป็นศูนย์กลางที่ควบคุมการตายของเซลล์ (Wen and Chase, 1999 and Desagher and Martinou, 2000) เมื่อเซลล์พืชถูกกระตุ้นจากเอทิลีนความ

เข้มข้นสูง มีผลกระทบต่อ การเปลี่ยนแปลงขนาดและรูปร่างภายในไมโทคอนเดรียให้ผิดปกติไปจากเดิม โดยเฉพาะบริเวณรอบ ๆ cristae มีการขยายพื้นที่เพิ่มมากขึ้นมากกว่าปกติและเกิดรูหรือช่องว่างบริเวณชั้นนอกของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย (Huang et al, 1997; Tiwari et al, 2002; Vilolainum et al, 2002 and Selga et al., 2005) มีรายงานที่สอดคล้องกันในพืชอื่นที่มีการใช้สารเอทิฟอนชักนำการชราภาพ มีผลทำให้ไมโทคอนเดรียขยายขนาดเพิ่มขึ้น หรืออีกนัยหนึ่งคือกระตุ้นการเพิ่มพื้นที่บริเวณรอบ cristae ให้มีพื้นที่เพิ่มขึ้นจนกระทั่งมีมากเกินไป และเสียดสภาพไปในที่สุด นอกจากนี้ยังมีงานทดลองกับดอกกล้วยไม้ *Phalaenopsis* ที่ถูกชักนำให้อยู่ในสภาวะ PCD โดยการเพิ่มความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลในช่วงการเพาะเลี้ยงเซลล์กล้วยไม้ให้มากกว่าปกติ พบว่าบริเวณรอบ cristae บวมและเกิดเป็นลักษณะที่เห็นรูปสามเหลี่ยม ซึ่งเป็นลักษณะที่ซับซ้อนกว่ามีสัญญาณการตายของเซลล์เกิดขึ้น (Ernst et al., 1971 and Selga et al., 2005) นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะที่เกิดขึ้น คล้ายกับอาการเกิดในเซลล์ด้วยเช่นกันในช่วงชราภาพ โดยเริ่มมีช่องว่างเพิ่มมากขึ้นบริเวณรอบ cristae และส่วนประกอบภายในไมโทคอนเดรียถูกทำลายเกือบทั้งหมด (Rapoport and Schewe, 1986 and Terman et al., 2003) สาเหตุในเซลล์สัตว์นั้น เกิดเนื่องจากความผิดพลาดของกระบวนการทำงานภายในเซลล์ ช่วงเวลาที่นำไมโทคอนเดรียที่ชราภาพกลับมาใช้งานอีกครั้ง (Terman et al., 2003) ในขณะที่ในหลายเซลล์ช่วงที่ดอกไม้ชราภาพมีการสร้างเวสซิเคิลจำนวนมากเกิดขึ้นในไซโทพลาสซึม (ภาพที่ 34) เวสซิเคิลที่เกิดขึ้นนั้น อาจเกิดได้จากหลายกรณี บางกรณีอาจเกิดขึ้นจากไมโทคอนเดรีย โดยไมโทคอนเดรียมีการเคลื่อนตัวเข้าใกล้เวคคิวโอล โดยเคลื่อนมายังบริเวณเยื่อหุ้มเวคคิวโอลก่อน หลังจากนั้นไมโทคอนเดรียบางส่วนเปลี่ยนสภาพไปเป็น multivesicular bodies และไมโทคอนเดรียส่วนที่เหลืออยู่ กระจายไปอยู่บริเวณล้อมรอบ golgibody และเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม โดยมีศูนย์กลางการเกิดอยู่บริเวณที่ใกล้กับเวคคิวโอล ซึ่งเหตุการณ์เหล่านี้เป็นกลไกที่ส่งเสริมและชักนำการเกิด PCD (Selga et al., 2005 Vitale and Hinz, 2005; Sanmartín et al., 2008) ในขณะที่เดียวกันพบว่าภายในเซลล์มีไมโทคอนเดรียส่วนที่เหลืออยู่ มีอิเล็กตรอนหนาแน่นเกิดขึ้นด้วย ลักษณะที่เกิดขึ้นนี้มีความสอดคล้องกันกับลักษณะที่เกิดขึ้นภายในไมโทคอนเดรียของเซลล์สาหร่าย หลังจากที่เซลล์ได้รับเกลือความเข้มข้นสูงเพื่อกระตุ้นให้เกิด PCD และเกิดอิเล็กตรอนหนาแน่นในไมโทคอนเดรียเพิ่มขึ้นจากเดิม (Affenzeller et al., 2009) ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกันที่เกิดกับดอกบานชื่น ในช่วงเวลาที่เซลล์มีไซฟิลล์เปลี่ยนไปเป็น tracheary element นั้น เกิดการยุบตัวขึ้นก่อนบริเวณเยื่อหุ้มเวคคิวโอล และทรินเทเมนต์ที่ให้ betulinic acid เพื่อกระตุ้นให้เกิด PCD มีผลให้อิเล็กตรอนหนาแน่นเพิ่มขึ้นเล็กน้อยบริเวณของเหลวภายในไมโทคอนเดรีย (Konar et al., 1972a) นอกจากนี้ยังพบว่าภายในเซลล์ดอกกล้วยไม้มีการสร้างไมอีลินบอดี (Myelin bodies) ในทุกช่วงของการพัฒนา (ภาพที่ 32 และ 33) ซึ่งการปรากฏของไมอีลินบอดีเป็นออร์แกเนลล์ที่บอกได้ว่าโปรตีนภายในเซลล์ถูกย่อยสลาย มีผลทำให้เซลล์

เสื่อมสภาพลง และในพืชบางชนิดการที่เซลล์สร้างไมอิลินบอดีขึ้นนั้น ส่งผลต่อเนื้อให้เกิดการกระตุ้นให้มีการสร้างไมอิลิน บอดีเพิ่มปริมาณมากขึ้นจากเดิมด้วย ซึ่งลักษณะการเกิดนี้พบในดอกกล้วยไม้ *Phalaenopsis* พันธุ์ 'Doris' ที่ได้รับน้ำตาลกาแลคโตสเข้าสู่เซลล์มากเกินไปจนเกิดความ ต้องการในสภาพปลอดเชื้อทำให้โครมาตินและเยื่อหุ้มนิวเคลียสแตก เกิดการรั่วไหลของสารต่างๆ ออกมาสู่ไซโตพลาสซึม มีผลให้ภายในไซโตพลาสซึม มีการสร้าง vesicle และไมอิลินบอดี รวมถึง เม็ดแป้งเพิ่มขึ้น (Ernst *et al.*, 1971)

ผนังเซลล์เป็นอีกออร์แกเนลล์หนึ่ง que เห็นการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจนหลังจากดอกกล้วยไม้พันธุ์ ลักก็ควนได้รับเอทิลีน เมื่อเกิดการชราภาพ ผนังเซลล์บางลงกว่าปกติ เนื่องจากในช่วงที่เซลล์ ชราภาพ เซลล์มีการสร้างเอนไซม์ไฮโดรเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีผลต่อการย่อยสลาย เพิ่มมากขึ้น กว่าเดิมมีผลในการย่อยเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ขณะเดียวกันพบว่าแวคคิวโอลขยายขนาดเพิ่มขึ้นอย่าง ชัดเจน เนื่องมาจากเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และเยื่อหุ้มแวคคิวโอล (tonoplast) ที่เสื่อมสภาพลง ทีละน้อย และเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในเวลาต่อมาจนกระทั่งเสื่อมอย่างสมบูรณ์ อาการนี้พบใน ดอกผักบุ้งฝรั่ง ซึ่งเมื่อชราภาพมีการเปลี่ยนแปลงของแวคคิวโอลเกิดขึ้นอย่างชัดเจน เนื่องจาก แวคคิวโอลเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญของการเสื่อมสภาพที่มีผลต่อเนื่องกับการเปลี่ยนแปลง ออร์แกเนลล์อื่นๆ ตามมา (van Doorn and Woltering, 2008) ดังเช่นเกิดการเปลี่ยนแปลงกับ พลาสติกที่ปรากฏในเซลล์กลีบดอกกล้วยไม้หลังดอกบานเต็มที่ ซึ่งพลาสติกที่พบมีหลายๆ อัน ที่ภายในประกอบด้วยเยื่อหุ้มสองชั้นล้อมรอบวัตถุคิบบางอย่างไว้ ซึ่งคาดว่าเป็นวัตถุคิบบางอย่าง ไซโตพลาสซึมเรียกโครงสร้างที่เกิดขึ้นนั้นว่า intraplasmidial vesicle และเมื่อเยื่อหุ้มพลาสติก เสื่อมสภาพลงได้ปลดปล่อย intraplasmidial vesicle เข้าสู่แวคคิวโอลของเซลล์ ยังไม่มีรายงาน สันนิษฐานว่าช่วงเวลา que พลาสติกเสื่อมนั้น มีการปลดปล่อย intraplasmidial vesicle เข้าสู่แวคคิวโอล พบเพียงแต่ว่ามีเวสซิเคิลอยู่ภายในแวคคิวโอลขนาดเล็กและขนาดใหญ่ จึงตั้งเป็นสมมติฐานไว้ หลายแนวทางคือ 1) แวคคิวโอลที่ถูกสร้างขึ้นนั้นมีขนาดและรูปร่างเป็นเหมือนพลาสติกเดี่ยวๆ หรือพลาสติกที่รวมตัวกันเป็นกลุ่ม และ 2) มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนที่เป็นของ plastoglobules อยู่ภายในแวคคิวโอล ซึ่งไม่พบสิ่งเหล่านี้อยู่ในเซลล์ พบว่ามี plastoglobules เฉพาะภายในพลาสติก เท่านั้น จึงชี้บอได้ว่า autophagosome ของพลาสติกมีการพัฒนาเปลี่ยนไปเป็นแวคคิวโอล โดย autophagosome ที่เกิดขึ้นกับพลาสติกนั้น ได้มีผู้วิจัยที่ศึกษาถึงความเชื่อมโยงไปถึงสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำที่ มีการดำรงชีวิตแบบ endosymbiont จากแบคทีเรีย cyanobacteria (Keeling, 2004; Reyes-Prieto *et al.*, 2007) ที่แบคทีเรียมีการสร้างเยื่อหุ้มพิเศษขึ้นสองชั้น เพื่อล้อมรอบไซโตพลาสซึม ซึ่งเกิดขึ้น ภายหลังการสร้างเยื่อหุ้มสองชั้นในครั้งแรก (Reyes-Prieto *et al.*, 2007) มีวิวัฒนาการของพลาสติก ที่นำเข้าไปโปรตีนและยีนจากเซลล์ จากนั้นจึงย้ายสารเหล่านี้ออกจาก endosymbiont ไปสู่นิวเคลียส

ของเซลล์ที่อาศัย เพื่อเป็นการรักษาสภาพการคงอยู่ของ endosymbiont ไว้ มากกว่าการชักนำไปสู่การตายของเซลล์ นอกจากนี้ใน พลาสต์ของเซลล์ *Karenia* พบว่าเป้าหมายที่พลาสต์ดีโอปัลลอมไซโตพลาสต์หรือรวมตัวกับเซลล์อาศัย โดยสร้างเยื่อหุ้มพิเศษขึ้นสองชั้น เช่นเดียวกัน เพื่อต้องการยีน โปรตีน และแหล่งของอาหารจากเซลล์อาศัยนั้น (Takishita *et al.*, 2002; Hackett *et al.*, 2003) และในเซลล์ของ chlorarachniophytes เช่นเดียวกันที่คลอโรพลาสต์มีเยื่อหุ้มพิเศษสองชั้นล้อมรอบเยื่อหุ้มสองชั้นที่มีอยู่เดิม และบริเวณระหว่างเยื่อหุ้มชั้นที่สองและสามนั้น มีการโคลนยีนเกิดขึ้น และวัตถุที่เหลื่ออยู่ภายในนั้นพิสูจน์ได้ว่าเป็นของไซโตพลาสต์ของ endosymbiont ที่ถูกใช้เข้าไปเป็นสารตั้งต้นในการจำลองตัวเอง (McFadden *et al.*, 1994) สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับพืชชั้นสูง พบว่ากระบวนการที่เกิดขึ้นเหล่านี้มีคล้ายคลึงกับช่วงการชราภาพของใบไม้ ที่มีพลาสต์ชนิดหนึ่งเสื่อมสภาพและเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในระดับจุลภาค ชีวเคมี และคุณสมบัติการทำหน้าที่ชัดเจนคือคลอโรพลาสต์ (chloroplast) ช่วงเวลานี้ได้เปลี่ยนรูปไปเป็นจีรอนโตพลาสต์ (gerontoplast) และไม่มีการแบ่งตัวของพลาสต์เกิดขึ้น แต่เกิดในช่วงเวลาที่เซลล์มีไซฟิลล์ของใบพืชยุบตัวในเห็นอย่างชัดเจน การเกิดนั้นพบว่าพลาสต์มีการโอปัลลอมรอบแวกคิวโอลโดยกระบวนการ phagocytosis หรืออาจเกิดจากการรวมตัวกันของเยื่อหุ้มพลาสต์ด้วยกันที่ภายในบรรจุไว้ด้วย autophagosome กับแวกคิวโอล และหลังจากนั้นพลาสต์มีการปลดปล่อยเวสซิเคิลที่ภายในบรรจุวัตถุของปากใบและ globules ที่เป็นส่วนประกอบเดิมของไทรลาโคอยด์เข้าสู่ไซโตพลาสต์ ซึ่งการปลดปล่อย globules จะเกิดขึ้นในเซลล์ที่พัฒนาระยะหลัง เนื่องจากเป็นช่วงที่เซลล์ชราภาพและเสื่อมสภาพ เยื่อหุ้มพลาสต์ยุบตัวและนิ่มขาด สำหรับโปรตีนชนิดอื่นที่อยู่นอก พลาสต์ มีการเสื่อมสลายตามมาในภายหลัง โดยเฉพาะการสลายตัวคลอโรฟิลล์เกิดขึ้นเนื่องจากการสลายตัวของ apoprotein ที่เป็นโปรตีนรวมของเม็ดสี (Krupinska, 2007) และมีลักษณะการเกิดที่คล้ายคลึงกันนี้กับช่วงระยะการพัฒนาของเซลล์ระยะหลังที่บริเวณเนื้อเจริญปลายรากของถั่วแดง (*Phaseolus vulgaris*) ที่แสดงให้เห็นว่า พลาสต์กลืนวัตถุของไซโตพลาสต์ไว้ (Newcomb, 1967) และมีข้อสนับสนุนอีกอย่างหนึ่งในงานวิจัยของ Pyke (2009) แสดงให้เห็นเซลล์ปลายยอด *Arabidopsis* มีพลาสต์อย่างน้อยที่สุด 1 อัน ที่แสดงถึงโครงสร้างภายในมีขนาดใหญ่มากเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของเซลล์ คล้ายกับที่พบในดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ซึ่งนำมาใช้ยืนยันได้ว่า พลาสต์กลืนไซโตพลาสต์เช่นกัน และ Buvat and Robert (1979) กล่าวถึงพลาสต์กับ intraplastidial vesicle ในเซลล์ปลายรากข้าวบาเลย์ที่ภายใน พลาสต์ประกอบไปด้วยวัตถุที่คล้ายกับไซโตพลาสต์ ซึ่งแน่นอนว่าพลาสต์ได้กลืนบางส่วนของไซโตพลาสต์ไว้ รวมถึงในเซลล์สัตว์ด้วย (Marty, 1999; Xie and Klionsky, 2007) ในงานทดลองนี้ยืนยันได้ว่าเกิด macro-autophagy ขึ้นมาก มีลักษณะของ autophagosome ซึ่งการเกิด macro-autophagy ในกลีบดอกกล้วยไม้เป็นเหมือนการย้อนกลับคืนสภาพเดิมของออร์แกเนลล์ เนื่องจากจำนวนพลาสต์ที่

นับได้นั้นลดลงก่อนที่เซลล์ตายและไม่พบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างพลาสติกเกิดขึ้นทันที ก่อนเซลล์ตาย ข้อมูลนี้จึงเป็นไปในทางที่เป็นสาเหตุของการนำไปสู่การยุบตัวของเซลล์หรือ อาจเป็นไปในทางตรงกันข้ามว่า macro-autophagy ไม่เกี่ยวกับการตายของเซลล์หรือเป็นการชะลอการตายของเซลล์ ซึ่งในเซลล์สัตว์มีการศึกษามาก่อนพืช และมีผลที่สามารถชี้บอถึงความสัมพันธ์ของพลาสติกกับการชราภาพและกระบวนการเกิด PCD โดยช่วงที่เกิด PCD ในเซลล์สัตว์นั้น มีการเปลี่ยนแปลงภายในพลาสติกเพิ่มปริมาณของ macro-autophagy โดย autophagosome ในช่วงที่เซลล์พัฒนาระยะต่างๆ ซึ่งในช่วงนี้มีการแสดงออกของยีน autophagy เพิ่มขึ้นถึงระดับที่ชักนำเซลล์ตายด้วย (Scott *et al.*, 2007) แต่ในแมลงและไส้เดือนฝอย ที่เกิด macro-autophagy ไม่ได้เป็นสาเหตุการตายของเซลล์ แต่มีความสำคัญสำหรับการตาย (Barry and Baehrecke, 2007) และในคลอโรพลาสต์ของสาหร่าย สีเขียวที่ถูกโอบล้อมด้วย eukaryotic phagotroph ที่มีการสร้างเยื่อหุ้มพิเศษสองชั้นขึ้นนั้น เพื่อชะลอความรุนแรงจากการเสื่อมสภาพของเซลล์ (McFadden, 2001) สำหรับงานทดลองในพืช ศึกษาการแสดงออกของยีน autophagy สามารถชี้บ่งได้ว่าการเกิด macro-autophagy และ micro-autophagy เป็นชะลอกระบวนการเกิด PCD ในช่วงที่ใบไม่มีการพัฒนา มากกว่าเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์ตาย (van Droon and Woltering, 2008) ดังเช่นเดียวกับผลจากการทดลองกับดอกผักบุ้งฝรั่งที่มีการให้สาร 3-methyladenine เพื่อยับยั้งการเกิด macro-autophagy เพื่อสร้างความแปรปรวนให้กับกระบวนการเกิด PCD กับกลีบดอกไม้ ผลสามารถชี้ยืนยันได้ว่าการเกิด macro-autophagy เป็น การชะลอการตายของเซลล์กลีบดอกไม้มากกว่าเป็นสาเหตุของการชักนำให้เซลล์ตาย (Yamada *et al.*, 2009)

การเปลี่ยนแปลงทางชีวโมเลกุล

การเสื่อมสภาพของกล้วยไม้พันธุ์ล็กก็่ควน พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ DNase เพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 0 หรือ 24 ชั่วโมง หลังได้รับเอทิลีน และลดลงมาอยู่ในระดับคงที่ในช่วงเวลาหนึ่งจนกระทั่งวันที่ 20 กิจกรรมของ DNase จึงเพิ่มขึ้นอีกครั้งหนึ่ง ในดอกกล้วยไม้พันธุ์ล็กก็่ควน กิจกรรมของ DNase ไม่ชัดเจนในความสัมพันธ์กับการเกิดการแตกหักของ DNA (ภาพที่ 40 และ 41) แต่หลังได้รับเอทิลีนมีการรวมตัวของโครมาตินอย่างหนาแน่นเกิดขึ้นอย่างชัดเจนภายในนิวเคลียส ซึ่งเป็นอาการที่มีความสัมพันธ์กับการแตกหักของ DNA (DNA fragmentation) ช่วงเวลานี้เห็นปื้นหนาชัดเจนบนเจลที่ส่องดูภายใต้แสง UV เกิดเนื่องจาก internucleosomal ถูกตัดเป็นท่อนเล็ก ๆ ด้วยเอนไซม์นิวคลีเอส เป็นการย่อยแบบสุ่ม โดยอาการทั้งคู่นี้จะเกิดขึ้นพร้อม ๆ กัน ในพืชที่ชราภาพ (Stein and Hanson, 1999 and van Doorn and Woltering, 2008) และการแตกหักของ DNA ในดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับเอทิลีน การแตกหักของ DNA เกิดขึ้นน้อยในช่วงแรก และเกิดเพิ่มมาก

ขึ้น เมื่อดอกไม้มีอายุนานวันขึ้น แต่ในดอกกล้วยไม้ที่ได้รับเอทิลีน มีการแตกหักของ DNA มากตั้งแต่วันแรกและเพิ่มขึ้นเป็นระยะเวลาหนึ่ง หลังจากนั้นจึงลดลงเรื่อยๆ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าในวันหลังๆ นั้น DNA ของดอกกล้วยไม้ที่ชราภาพได้เสื่อมสภาพไปหมดแล้ว และระยะการแตกหักของ DNA ก็มีความแปรปรวน อาจเห็นเป็นแถบบนเจลหรืออาจไม่เห็นก็ได้ (van der Kop, 2003) ดังนั้นวิธีการตรวจสอบการชราภาพหรือการเกิด PCD ในพืช โดยใช้วิธีตรวจสอบการแตกหักของ DNA และกิจกรรมของเอนไซม์ DNase เพื่อบอกถึงกระบวนการเกิด PCD อาจเป็นวิธีการไม่เหมาะสมสำหรับกล้วยไม้เหมือนในดอกผักบุ้งฝรั่ง พบว่ามีปริมาณการแตกหักของ DNA ลดลงแต่ในขณะที่กิจกรรมเอนไซม์ DNase กลับแสดงผลเพิ่มสูงขึ้นในช่วงที่ดอกไม้ชราภาพ (van Doorn and Woltering, 2008) แต่ในขณะที่พืชอีกหลายชนิดสามารถใช้วิธีชี้บอกระบวนการเกิด PCD ในช่วงการชราภาพได้ เช่น Snapdragon, Daisy และ Petunia hybrid เป็นต้น (Martin *et al.*, 1994 ; Yamada *et al.*, 2006)

กลไกการเกิด PCD ในช่วงการชราภาพของดอกกล้วยไม้หวาย

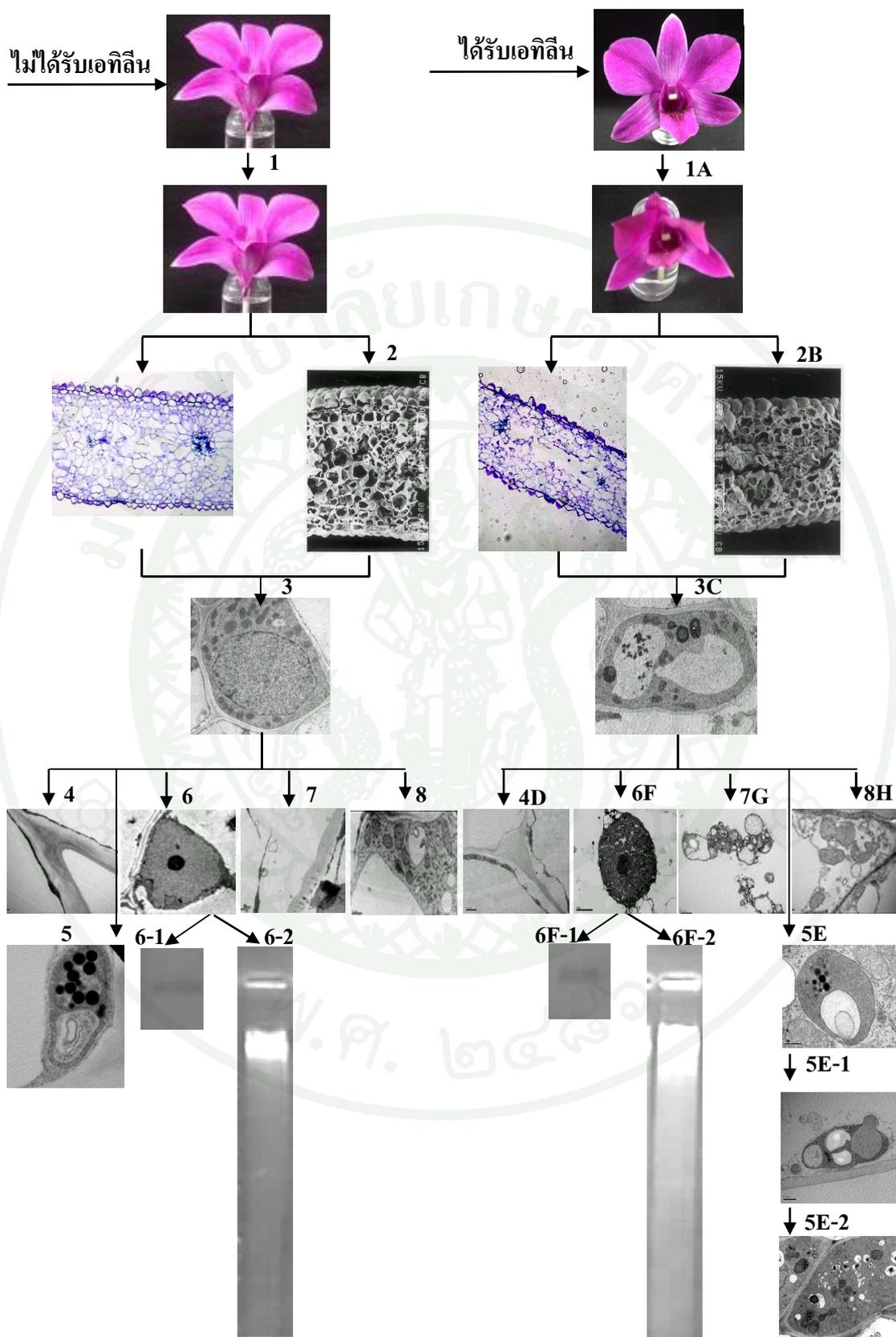
ดอกกล้วยไม้หวายเมื่อดอกบานเต็มที่หลังเก็บเกี่ยว ได้รับเอทิลีนส่งผลให้ดอกกล้วยไม้แสดงอาการร่วง และทำให้ดอกกล้วยไม้เสื่อมสภาพเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับเอทิลีน เนื่องจากเอทิลีนมีผลต่อการสูญเสียแรงตึงและปลดปล่อยน้ำออกจากเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์บริเวณชั้นมีโซฟิลล์และอพิคอมิสมีการเสื่อมสภาพ เยื่อหุ้มเซลล์แตกและแยกตัวออกจากผนังเซลล์ ในขณะที่ผนังเซลล์ยืดขยายตัวออกสูญเสียส่วนของพลาสมาเลมมา ทำให้ผนังเซลล์บางลง และการทำงานของเซลล์ผิดปกติไปจากเดิม คาดว่ามีการกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์ไฮโดรไลติกภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น เอนไซม์ไฮโดรไลติกที่ถูกสร้างขึ้นมามากกว่าปกติ ทำให้มีการย่อยสลายเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ต่างๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ และเอนไซม์ไฮโดรไลติกเข้าสู่ออร์แกเนลล์ กระตุ้นให้ออร์แกเนลล์บางชนิดสร้างเอนไซม์ไฮโดรไลติกเพิ่มขึ้น และย่อยสลายวัตถุภายในออร์แกเนลล์ทำให้เกิดการย่อยสลายเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย และทำให้บริเวณ cristae มีพื้นที่เพิ่มมากขึ้น ขณะที่เยื่อหุ้มชั้นนอกเสื่อมสภาพบางลงเนื่องจากถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไฮโดรไลติกภายในเซลล์ ทำให้ไมโทคอนเดรียขยายขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเดิม ในช่วงเวลาเดียวกันนิวเคลียสถูกย่อยสลายเยื่อหุ้ม เยื่อหุ้มนิวเคลียสแตก นิวเคลียสเสื่อมสภาพ ภายในนิวเคลียสถูกกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์นิวคลีเอสเพิ่มสูงขึ้นเป็นช่วงๆ โครมาตินภายในนิวเคลียสถูกย่อยเกิดการแตกหักเสียสภาพและมีการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนเกิดขึ้น และในช่วงที่เซลล์เสื่อมสภาพ ผนังแวคคิวโอลถูกย่อยสลายและบางลงกว่าปกติมีผลให้ แวกคิวโอลขยายขนาดเพิ่มขึ้น เป็นช่วงเวลาเดียวกันกับที่เยื่อหุ้มพลาสติดเสื่อมสภาพหลังจากกลืนกินไซโทพลาสซึมแล้ว มีการปลดปล่อย intraplasmic vesicle

เข้าสู่แวกคิวโอล เกิดเป็นเวสซิเคิลจำนวนมาก และบางครั้งรวมตัวกันเป็นกลุ่มเกิดเป็น
มัดติเวสซิควาร์บอดี บางเวสซิเคิลมีการสร้างเยื่อหุ้มล้อมรอบหลายชั้นเกิดเป็น ไมอิลินบอดีขึ้น
ภายในเซลล์ และพลาสติกที่เสื่อมสภาพมีการรวมตัวกันพัฒนาไปเป็นแวกคิวโอลด้วยเช่นกัน
ในช่วงที่เซลล์เข้าสู่การชราภาพ ซึ่งเป็นกระบวนการกินเซลล์ (autophagy) คล้ายที่เกิดขึ้นใน
จุลินทรีย์และสัตว์ กลไกของการเสื่อมสภาพและนำไปสู่การตายของเซลล์ที่เกิดขึ้นนี้ สามารถแสดง
ให้เห็นได้ดังภาพที่ 49



ภาพที่ 49 กลไกการเกิด PCD ในช่วงการชราภาพของดอกกล้วยไม้หวายที่ถูกกระตุ้นด้วยเอทิลีน

- | | |
|---|--|
| 1 ดอกไม้ปกติ | 1 A ดอกไม้ตูม (เสื่อมสภาพ) |
| 2 ชั้นเซลล์มีไซโทพลาสต์และอพิเดอมิสปกติ | 2 B ชั้นเซลล์มีไซโทพลาสต์และอพิเดอมิสยุบตัวและฉีกขาด |
| 3 เซลล์ปกติ | 3 C เซลล์ชราภาพ |
| 4 ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มปกติ | 4 D ผนังเซลล์บางและเยื่อหุ้มแยกจากผนังเซลล์ |
| 5 พลาสต์ปกติ | 5 E พลาสต์ตกินไซโตพลาซึม |
| | 5 E-1 พลาสต์ปล่อย intraplastidial vesicle |
| | 5 E-2 พลาสต์พัฒนาเป็นแวคคิวโอล |
| 6 โครมาตินในนิวเคลียสปกติ | 6 F โครมาตินในนิวเคลียสแตกหัก |
| 6-1 เอนไซม์นิวคลีเอสน้อย | 6 F-1 เอนไซม์นิวคลีเอสมาก |
| 6-2 ดีเอ็นเอปกติ | 6 F-2 ดีเอ็นเอแตกหักมาก |
| 7 มัลติเวสซิкулярน้อย | 7 G มัลติเวสซิкулярมาก |
| 8 ไมโทคอนเดรียขนาดปกติและมีจำนวนมาก | 8 H ไมโทคอนเดรียขนาดใหญ่และมีจำนวนน้อย |



สรุป

การศึกษาการเกิด PCD ในช่วงการชราภาพของดอกกล้วยไม้สกุลหวายโดยให้เอทิลีนเป็นสารกระตุ้น สามารถสรุปการทดลองได้ดังนี้คือ

1. ดอกกล้วยไม้ 6 พันธุ์ คือ ลักกี้ควอน เรดบอม โจ มีสทิน ทับทิม ซาคุระ และขาวสนาน ที่ได้รับเอทิลีนระดับต่าง ๆ ดอกกล้วยไม้พันธุ์ลักกี้ควอนเป็นพันธุ์ที่ไวต่อเอทิลีนมากที่สุด โดยแสดงอาการร่วงตามมาด้วยเส้นเวนชัดเจน และสีช็อคของดอกกล้วยไม้หลังได้รับเอทิลีน 24 ชั่วโมง ขณะที่พันธุ์เรดบอมโจตอบสนองน้อยที่สุด การใช้สาร 1-MCP สามารถยับยั้งการชราภาพในดอกกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ แต่เมื่อทำการวิเคราะห์การร่วงไหลของประจุ พบว่าไม่มีความแตกต่างในทุกทริทเมนต์

2. การศึกษาภายใต้กล้อง LM โดยเนื้อเยื่อกลีบดอกของพันธุ์ลักกี้ควอนเปรียบเทียบกับพันธุ์เรดบอมโจ ที่ไม่ได้รับเอทิลีน ได้รับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ 1-MCP 500 nL/L และ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ เอทิลีนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อกลีบดอกพันธุ์ลักกี้ควอน บริเวณชั้นเซลล์มีโซฟิลล์ยวบตัวและนิกชาดมองเห็นช่องว่างขนาดใหญ่ชัดเจนระหว่างท่อลำเลียง แต่บริเวณชั้นอีพิเดอมิสเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย เนื้อเยื่อกลีบดอกที่ไม่ได้รับเอทิลีนเห็นช่องว่างขนาดเล็ก และพันธุ์เรดบอมโจที่ได้รับเอทิลีน ชั้นเซลล์มีโซฟิลล์มีการยวบตัวของเซลล์เล็กน้อย ส่วนบริเวณเซลล์อีพิเดอมิสไม่มีการเปลี่ยนแปลง และทั้ง 2 พันธุ์ ที่ได้รับ 1-MCP 500 nL/L และ 1-MCP 500 nL/L ร่วมกับเอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$ ภายในเซลล์มีโซฟิลล์เปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในช่วงวันสุดท้ายที่ดอกกล้วยไม้หมดอายุการใช้งาน

3. การศึกษาพื้นผิวและรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้อง SEM เนื้อเยื่อกลีบดอกกล้วยไม้พันธุ์ลักกี้ควอนที่ได้รับเอทิลีน บริเวณชั้นเซลล์อีพิเดอมิสและพารังโครมาที่อยู่ระหว่างท่อลำเลียงเกิดการยวบตัว ในขณะที่ทริทเมนต์อื่นทุกชั้นเซลล์ยังคงเป็นปกติ

4. การศึกษาออร์แกเนลล์ภายในเซลล์เนื้อเยื่อกลีบดอกกล้วยไม้พันธุ์ลักกี้ควอน ภายใต้กล้อง TEM เอทิลีนส่งผลให้ออร์แกเนลล์ภายในเซลล์เสื่อมสภาพ แวกิวโอลขยายขนาดใหญ่มากขึ้นกว่าปกติ ผนังเซลล์บางและเยื่อหุ้มเซลล์แยกตัวจากผนังเซลล์ ผนังนิวเคลียสแตก โครมาตินภายในนิวเคลียสแตกหักและรวมตัวเป็นกลุ่มก้อนหนาแน่น มีการสร้างมัดดีเอ็นเอเพิ่มเติมมากขึ้นกว่าปกติ ในขณะที่ดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับเอทิลีนและได้รับ 1-MCP ร่วมกับเอทิลีนมีความผิดปกติภายในเซลล์เกิดขึ้นช้า แต่ดอกกล้วยไม้ที่ได้รับ 1-MCP เพียงอย่างเดียว ยังคงเป็นปกติ

5. การศึกษาอย่างละเอียดของออร์แกนเซลล์บางชนิดในทุกระยะการพัฒนาเซลล์ของเนื้อเยื่อกลีบดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลี้กี้ควน พบมีกรานูลใช้เป็นสัญลักษณ์จับบอกลูกภายในไมโทคอนเดรียทุกอัน ในเซลล์ช่วงชราภาพไมโทคอนเดรียขนาดขยายใหญ่ ภายในไมโทคอนเดรียเกิดการเสื่อมสภาพ บริเวณพื้นที่ระหว่าง cristae ขยายตัวเพิ่มขึ้น และมีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนเกิดขึ้น และภายในสร้างเยื่อหุ้ม 2 ชั้นขึ้นรอบล้อมเวสซิเคิล ในขณะที่พลาสติดสร้างเยื่อหุ้มสองชั้น โอบล้อมรอบส่วนของไซโทพลาสซึม และพลาสติดเสื่อมสภาพเกิดการพัฒนาวงไปเป็นแวคคิวโอล

6. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ดีเอ็นเอส พบการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นหลังจากดอกกล้วยไม้ได้รับเอทิลีนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นอีกครั้งช่วงดอกกล้วยไม้หมดอายุการใช้งาน และทรีทเมนต์อื่นไม่มีการเปลี่ยนแปลง

7. การศึกษาในระดับโมเลกุล พบแถบดีเอ็นเอเป็นป็นยาวเพิ่มมากขึ้นในดอกกล้วยไม้ไม่ได้รับเอทิลีน และมีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นบ้างหลังจากดอกกล้วยไม้ได้รับเอทิลีนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่แถบดีเอ็นเอเน่ยที่สุดในช่วงที่ดอกกล้วยไม้หมดอายุการใช้งาน สำหรับดอกกล้วยไม้ที่ได้รับ 1-MCP และ 1-MCP ร่วมกับเอทิลีน การเกิดแถบดีเอ็นเอเห็นเป็นป็นบาง ๆ ไม่ชัดเจนและไม่มีความแตกต่างกัน

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมศุลกากร. 2553. สถิติการนำเข้าและส่งออกดอกกล้วยไม้สด ปี 2552. กรุงเทพฯ.

จริงแท้ สิริพานิช. 2549. ชีววิทยาหลังการเก็บเกี่ยวการหายใจของพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 453 หน้า.

จริงแท้ สิริพานิช. 2538. สรีรวิทยาและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวผักและผลไม้. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ. นครปฐม. 398 หน้า.

ณรงค์ จึงสมานญาติ. 2529. หลักการและเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน ภาควิชาสัตวศาสตร์. คณะสัตวแพทยศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 212 หน้า.

สายชล เกตุษา. 2531. เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวของดอกไม้. สารมวลชน. กรุงเทพฯ. 291 หน้า.

Affenzeller J, Darehshouri A, Andosch A, Lutz C, Lütz-Meindl U. 2009. Salt stress-induced cell death in the unicellular green alga *Micrasterias denticulata*. **J. Exp. Bot.** 60: 939-954.

Armstrong JS. 2006. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. **Bioas.** 28: 253-260.

Aubert S, Gout E, Bligny R, Marty-Mazars D, Barrieu F, Alabouvette J, Marty F, Douce R. 1996. Ultrastructural and biochemical characterization of autophagy in higher plant cells subjected to carbon deprivation: control by the supply of mitochondria with respiratory substrates. **J. Cell Biol.** 133: 1251-1263.

Aubrey D, de Grey, NJ. 1997. A proposed refinement of the mitochondrial free radical theory of aging. **Bioas.** 19: 161-166.

- Azad AK, Ishikawa T, Ishikawa T, Sawa Y, Shibata H. 2008. Intracellular energy depletion triggers programmed cell death during petal senescence in tulip. **J. Exp. Bot.** 59: 2085–2095.
- Baba M, Takeshige K, Baba N, Ohsumi Y. 1994. Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. **J. Cell Biol.** 124, 903-913.
- Baba M, Osumi M, Ohsumi Y. 1995. Analysis of the membrane structures involved in autophagy in yeast by freeze-replica method. **Cell Struct. Func.** 20: 465-471.
- Bailly C, Corbinean F, van Doorn WG. 2001. Free radical scavenging and senescence in *Iris* petals. **Plant Physiol. Biochem.** 39: 649-656.
- Baker JE, Elfvin LG, Biale JB, Honda SI. 1968. Studies on ultrastructure and purification of isolated plant mitochondria. **Plant Physiol.** 43: 2001-2022.
- Balk J, Chew SK, Leaves C, McCabe PF. 2003. The intermembrane space of plant mitochondria contains a DNase activity that may be involved in programmed cell death. **Plant J.** 34: 573-583.
- Barton R. 1966. Fine structure of mesophyll cells in senescencing leaves of *Phaseolus*. **Planta** 71: 314-325.
- Baumgartner B, Kende H, Matile P. 1975. Ribonuclease in senesing morning glory. Purification and demonstration of *de novo* synthesis. **Plant Physiol.** 55: 734-737.
- Beers EP, Woffenden BJ, Zhao, C. 2000. Plant proteolytic enzymes : possible roles during programmed cell death. **Plant Mol. Biol.** 44: 399-415.

- Belenghi B, Salomon M, Levine A. 2004. Caspase-like activity in the seedlings of *Pisum sativum* eliminates weaker shoots during early vegetative development by induction of cell death. **J. Exp. Bot.** 55: 889-897.
- Bernard R. 2000. Regulation of cell death in flower petals. **Plant Mol. Biol.** 44: 303-318.
- Berry DL, Baehrecke EH. 2007. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. **Cell** 131: 1137-1148.
- Bethke PC, Swanson SJ, Hillmer S, Jones RL. 1998. From storage compartment to lytic organelle: the metamorphosis of the aleurone protein storage vacuole. **Ann. Bot.** 82: 399-412.
- Beyer Jr EM. 1976. A potent inhibitor of ethylene action in plants. **Plant Physiol.** 58: 268-271.
- Bieleski RL. 1995. Onset of phloem export from senescence petals of daylily. **Plant Physiol.** 109: 557-565.
- Blank A, McKeon TA. 1991. Three RNases in senescent and nonsenescent wheat leaves: characterization by activity staining in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. **Plant Physiol.** 97: 1402-1408.
- Blankenship SM, Dole JM. 2003. 1-methylcyclopropene : a review. **Postharvest Biol. Technol.** 28:1-25.
- Brooks RM, Bradley MV, Anderson TI. 1950. **Plant Microtechnique Manual**. Division of Pomology, Davis. University of California.
- Borochoy A, Woodson, WR. 1989. Physiology and biochemistry of flower petal senescence. **Hort. Rev.** 11: 15-43.

- Borora A, Pancaldi S, Gualandri R, Fasulo MP. 2000. Carotenoid and ultrastructure variations in plastids of *Arum italicum* Miller fruit during maturation and ripening. **J. Exp. Bot.** 51 : 873-884.
- Brennick JL, Shuangyi B, Michelle LJ. 2005. Increase in DNA fragmentation and inducing of a senescence – specific nuclease are delayed during corolla senescence in ethylene-insensitive (*etr1-1*) transgenic petunias. **J. Exp. Bot.** 56 : 15-23.
- Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink D. 2003. The molecular analysis of leaf senescence a genomics approach. **Plant Biotechnol. J.** 1: 3-22.
- Butler RD. 1967. The fine structure of senescing cotyledons of cucumber. **J. Exp. Bot.** 18: 535-543.
- Buvat R, Robert G. 1979. Vacuole formation in the actively growing root meristem of barley (*Hordeum sativum*). **American J. Bot.** 66: 1219-1237.
- Callis J. 1995. Regulation of protein degradation. **Plant Cell** 7: 845-857.
- Casolo V, Petrusa E, Krajčůvková J, Macri F, Vianello A. 2005. Involvement of the mitochondrial K1 ATP channel in H₂O₂- or NO-induced programmed death of soybean suspension cell cultures. **J. Exp. Bot.** 56: 997–1006.
- Celikel FG, Dodge LL, Reid MS. 2002. Efficacy of 1-MCP (1-methylcyclopropene) and Promalin for extending the post-harvest life of oriental lily (*Lilium* 'Mona Lisa' and 'Stargazer'). **Scientia Horti.** 93: 149-155.
- Cheung AY, Wu H-M. 2000. Programmed cell death in plant reproductive development. **Plant Mol. Biol.** 44: 267-281.

- Chida Y, Ueda K. 1992. Changes in the lysosome structure during the formation of zoospores in *Trebouxia potteri*. **Protoplasma** 171: 19-27.
- Contento AL, Xiong Y, Bassham DC. 2005. Visualization of autophagy in Arabidopsis using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AtATG8e fusion protein. **Plant J.** 42: 598 – 608.
- Curtis JT. 1943. An unusual pollen reaction in *Phalenopsis*. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 11: 258-260.
- Danon A, Delorme V, Mailhac N, Gallois P. 2000. Plant programmed cell death : A common way to die. **Plant Physiol. Biochem.** 38: 647-655.
- Desagher S, Martinou JC. 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biol.** 10(9): 369–377.
- Eason JR, Bucknell TT. 2001. Processing during tepal senescence of *Sandersonia aurantiaca*. **Acta Hort.** 543: 143-146.
- “_____”, Johnston JW, de Vre LA, Sinclair BK, King GA. 2000. Amino acid metabolism in senescing *Sandersonia aurantiaca* flowers : cloning and characterization of asparagine synthetase and glutamine synthetase cDNA. **Aus. J. Plant Physiol.** 27: 389-396.
- “_____”, Ryan JR, Pinkney TT, O’Donoghue EM. 2002b. Programmed cell death during flower senescence: isolation and characterization of cysteine proteinases from *Sandersonia aurantiaca*. **Func. Plant Biol.** 29, 1055–1064
- “_____”, de Vre LA, Somerfield SD, Heyes JA. 1997. Physiological changes associated with *Sandersonia aurantiaca* flower senescence in response to sugar. **Postharvest. Biol. Technol.** 12: 43-50.

- “_____”, Pinkney, TT, Johnston JW. 2002. DNA fragmentation and nuclear degradation during harvest-induced senescence of asparagus spears. **Postharvest Biol. Technol.** 26: 231-235.
- “_____”, Webster D. 1995. Development and senescence of *Sandersonia aurantiaca* (Hook.) flowers. **Scientia Hort.** 63: 113-121.
- Ernst R, Arditti J, Healey PL. 1971. Carbohydrate physiology of orchid seedling. II. Hydrolysis and effects of oligosaccharides. **Amer. J. Bot.** 58: 827-835.
- Esau K. 1977. **Anatomy of Seed Plants**, 2nd Ed, John Wiley, New York, NY.
- Faragher JD, Wachtel E, Mayak S.. 1987. Changes in the physical state of membrane lipids during senescence of rose petals. **Plant Physiol.** 83: 1037-1042.
- Feinberg AP, Vogelstein B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Anal. Biochem.** 132:6-13.
- Field TS, Lee DW, Holbrook NM. 2001. Why leaves in turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. **Plant Physiol.** 127: 566-574.
- Fletcher MJ, Sanadi DR. 1961. The turnover of rat-liver mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta** 51: 356-360.
- Fletcher JS. 1972. Heterogeneous population of mitochondria in higher plant cells. **Nature** 238: 466-467.
- Fluton TM, Chunwond J, Tamksley SD. 1995. Minipep protocol for expression of DNA from tomato and herbaceous plants. **Plant Mol. Rep.** 13 : 207-209

Foundation items: Jun Zheng Fudation of Peking University. 2001. Programmed cell death during leaf senescence in *Eucomia ulmoides* Oliv. 240-249.

Frigerio L, Hinz G, Robinson DG. 2008. Multiple vacuoles in plant cells: rule or exception?

Traffic 9: 1564-1570.

Fukuda H. 1996. Xylogenesis : initiation, progression and cell death. **Ann. Rev. Plant Physiol.**

Plant Mol. Biol. 47: 299-325.

“_____”. 2000. Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. **Plant**

Mol. Biol. 44: 245-253.

Gietl CM, Schmidand D, Simpson. 2000. Ricinosomes and aleurain containg vacuoles (ACVs) : protease-storing organelles, pp. 90-111. In:Robinson, D.C. and J.C. Rogers (eds.).

Vacuolar Compartments (Annual Plant Review) 5, Academic Press, Sheffield.

Graham IA, Denby KJ, Leaver CJ. 1994. Carbon catabolite repression regulates glyoxylate cycle gene expression in cucumber. **Plant Cell** 6: 761-772.

Gray MW, Burger G, Lang BF. 2001. The origin and early evolution of mitochondria. **Genome**

Biol. 2: 1018.1–1018.5

Grimm S. 2003. **Genetics of Apoptosis**. pp. 309. BIOS Scientific Publishers Ltd., U.K.

Gunawardena AHLAN, Pearce DM, Jackson MB, Hawes CR, Evans DE. 2001. Characterisation of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of mize (*Zea mays* L.). **Planta** 221: 607-618.

Gulewicz K T, Tykarska W, Wysocki J, Augstynowicz K, Zurowska, Kuras M. 2004.

Developmental and ultrastructural effect of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC extract on the paprika *Capsicum annuum* L. **Ind. Crop Prod.** 19: 59-67.

- Hackett JD, Maranda L, Yoon HS, Bhattacharya D. 2003. Phylogenetic evidence for the cryptophyte origin of plastid of *Dinophysis* (Dinophysiales, Dinophyceae). **J. Phycol.** 39: 440-448.
- Halevy AH. 1998. Recent advance in postharvest physiology of flowers. **J. Kor. Soc. Hort. Soc.** 39: 652-655.
- He X, Kermode AR. 2003. Nuclease activities and DNA fragmentation during programmed cell death of megagametophyte cells of white spruce (*Picea glauca*) seeds. **Plant Mol. Biol.** 51: 509-521.
- Hoh B, Hinz G, Jeong BK, Robinson DG. 1995. Protein storage vacuoles form de novo during pea cotyledon development. **J. Cell Sci.** 108: 299-310.
- http://orchidnet.doae.go.th/home/technic_orchid.php?c=1&d=1&id=3.
- http://www.rdi.ku.ac.th/kasetfair49/Plant/p_57.
- Huang FY, Philosoph-Hadas S, Meir S, Callaham DA, Sabato R, Zelcer A, *et al.* 1997. Increases in cytosolic Ca²⁺ parsley mesophyll cells correlate with leaf senescence. **Plant Physiol.** 115: 51-60.
- Huang XM, Wang HC, Yuan WQ, Lu JM, Yin JH, Luo S, Huang HB. 2005. A study of rapid senescence of detached lichi : roles of water loss and calcium. **Postharvest Biol. Technol.** 36: 177-189.
- Hunter DA, Lange NE, Reid MS. 2004. Physiology of flower senescence, pp. 307-316. In : L.D. Nooden (ed.). **Plant Cell Death Process**. Academic Press, San Diego.
- Jeong SY, Seol DW. 2008. The role of mitochondria in apoptosis. **BMB Reports** 41: 11-22.

- Jones A.M. 2001. Programmed cell death in development and defense. **Plant Physiol.** 125: 94-97.
- Jones AM, Dangl JL. 1996. Logjavy at the styx, programmed cell death in plants. **Trends in Plant Sci.** 1: 114-119.
- Joseph A, 1992. **Fundamentals of Orchid Biology** John Wiley and Sons, Inc. USA. 691 p.
- Jutras I, Desjardins M. 2005 Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. **Ann. Rev. Cell Dev. Biol.** 21: 511-527.
- Keeling PJ. 2004. Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. **Amer. J. Bot.** 91: 1481-1493.
- Kiššová I, Deffieu M, Manon S, Camougrand N. 2004. Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. **J. Biol. Chem.** 279: 39068–39074.
- Konar RN, Thomas E, Street HE. 1972a. Origin and structure of embryoids arising from epidermal cells of stem of *Ranunculus sceleratus* L. **J. Cell Sci.** 2: 77-93.
- Kraft C, Reggiori F, Peter M. 2009. Selective types of autophagy in yeast. **Biochim. Biophys. Acta** 1778: 1404-1412.
- Kroemer G, Levine B. 2008. Autophagic cell death: the story of a misnomer. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.** 9: 1004-1010.
- Krupinska K. 2007. Fate and activities of plastids during leaf senescence. pp. 433-449 In Robert R, Hooper KJ (eds.). **Advances in photosynthesis and respiration.** Spink Link, USA.

- Krysko DV, Brouckaert G, Kalai M, Vandenabeele P, D'Herde K. 2003. Mechanisms of internalization of apoptotic and necrotic L929 cells by a macrophage cell line studied by electron microscopy. **J. Morphol.** 258: 336-345.
- Langston BJ, Bai S, Jones ML. 2005. Increases in DNA fragmentation and induction of a senescence-specific nuclease are delayed during corolla senescence in ethylene-insensitive (*etr1-1*) transgenic petunias. **J. Exp. Bot.** 56(409): 15-23.
- Lam E, Kato N, Lawton M. 2001. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. **Nature** 411: 848-853.
- “_____”, Pontier D, del Pozo O. 1999. Die and let live - programmed cell death in plants. **Curr. Opin. Plant Biol.** 2: 502-507.
- Lay-Yee M, Stead AD, Reid MS. 1992. Changes accompanying flower senescence in daylily (*Heemerocallis*). **Physiol. Plant.** 86: 308-314.
- Lee RH, Chen Shu-chen G. 2002. Programmed cell death during rice leaf senescence is nonapoptotic. **New Phytol.** 155: 25-32.
- Leon P, Arroyo A, Mackenzie S. 1998. Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 49: 453-480.
- Lerslerwong L, Ketsa S, van Doorn WG. 2009. Protein degradation and peptidase activity during petal senescence in *Dendrobium* cv. Khao Sanan. **Postharvest Biol. Technol.** 1: 84-90.
- Leshem Y, Halevy AH, Frenkel C. 1986. Process and control of plant senescence. **Dev. Crop Sci.** 8: 142-161.

- Leverentz M, Wagstaff C, Stead A, Chanasut U, Silkowski H, Thomas B, Weichert H, Fensner I, Griffiths G. 2002. Characterisation of novel lipoxygenase-independent senescence mechanism in *Alstromeria peruviana* floral tissue. **Plant Physiol.** 130: 273-283.
- Levine B, Yuan J. 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict? **J. Clinical Invest.** 11: 2679-2688.
- Liu Y, Schiff M, Czymbek K, Tallóczy Z, Levine B. 2005. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. **Cell** 121: 567-577.
- Logan DC. 2006a. Plant mitochondrial dynamics. **Biochim. Biophys. Acta** 1763: 430-441.
- Logan DC. 2006b. The mitochondrial compartment. **J. Exp. Bot.** 57: 1225-1243.
- Lukaszewski TA, Reid MS. 1989. Bulb-type flowers senescence. **Acta Hort.** 261: 59-62.
- Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. 2005. Autophagy in metazoans: Cell survival in the land of plenty. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.** 6: 439-448.
- Lv W, Zheng X, Yang M, Zhang Y, Liu Y, Liu J. 2006. Virus removal performance and mechanism of a submerged membrane bioreactor. **Proc. Biochem.** 41: 299-304.
- Martin SJ, Green Dr, Cotter TG. 1994. Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. **Trend Biochem. Sci.** 19: 26-30.
- Marty F. 1978. Cytochemical studies on GERL, provacuoles, and vacuoles in root meristematic cells of *Euphorbia*. **Proceed. National Acad. Sci. USA** 75: 852-856.
- Marty F. 1999. Plant vacuoles. **Plant Cell** 11, 587-599.

- Matile P. 1997. The vacuole and cell senescence. In: Callow JA, ed. **Advances and Botanical Research**, Vol. 25. Academic Press, San Diego.
- Matile P, Hortensteiner S, Thomas H. 1999. Chlorophyll degradation. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 50: 67-95.
- Matile P, Winkenbach F. 1971. Function of lysosomes and lysosomal enzymes in the senescing corolla of morning glory. **J. Exp. Bot.** 22: 759-771.
- Mayak S, Tirosh T, Thomson JE, Ghosh S. 1998. The fate of ribulose-1,5 biphosphate carboxylase subunit during development of carnation petals. **Plant Physiol. Biochem.** 36: 835-841.
- McFadden GI, Gilson PR, Hofmann CJB, Adcock GJ, Maier Uwe-G. 1994. Evidence that an amoeba acquired a chloroplast by retaining part of and engulfed eukaryotic alga. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91: 3690-3694.
- _____. 2001. Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastid. **J. Phycol.** 37: 951-959.
- McPhee CK, Baehrecke EH. 2009. Autophagy in *Drosophila melanogaster*. **Biochim. Biophys. Acta** 1778: 1452-1460.
- Menzies RA, Gold PH. 1971. The turnover of mitochondria in a variety of tissues of young adult and aged rats. **J. Biol. Chem.** 246: 2425-2459.
- Michelle LT, Paul BL, William RW. 1995. Ethylene-regulated expression of a carnation cysteine proteinase during flower petal senescence. **Plant Mol. Biol.** 28: 505-512.

- Min-Long C, Keita T, Biao M, Hiroshi E. 2004. Overexpression of mutated melon ethylene receptor gene *Cm-ETR1 / H69A* confers reduced ethylene sensitivity in a heterologous plant, *Nemesia strumosa*. **Plant Sci.** 167: 253-258.
- Mizushima N. 2005. The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. **Cell Death Diff.** 12: 1535-1541.
- Mizushima N. 2007. Autophagy: process and function. **Gen. Dev.** 21: 2861-2873.
- Mizushima N, Yamamoto A, Matano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, Tokuhiya T, Ohsumi Y, Yoshimori T. 2001. Dissection of autophagosome formation using *Atg5*-deficient mouse embryonic stem cells. **J. Cell Biol.** 152: 657-668.
- Newcomb EH. 1967. Fine structure of protein storing vacuoles in bean root tips. **J. Cell Biol.** 33: 143-163.
- Nichols R, Ho LC. 1975a. Effects of ethylene and sucrose on translocation of dry matter and ^{14}C sucrose in the cut flower of the glasshouse carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. **Ann. Bot.** 39: 287-296.
- “_____”. 1975b. An effects of ethylene on the distribution of ^{14}C sucrose from the petals to other flower parts in the senescent cut inflorescence of *Dianthus caryophyllus*. **Ann. Bot.** 39: 433-438.
- “_____”. 1977. Sites of ethylene production in the pollinated and unpollinated senescing carnation (*Dianthus caryophyllus*) inflorescence. **Planta** 135: 155-159.
- Nooden LD. 2004. Introduction, pp. 1-18. In L.D. Nooden (ed.). **Plant Cell Death Processes**. Academic Press, San Diego.

- O' Donoghue EM, Somerfield SD, Heyes JA. 2002. Organization of cell walls in *Sandersonia aurantiaca* floral tissue **J. Exp. Bot.** 53: 513-523.
- Okamoto K, Shaw JM. 2005. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. **Biochim. Biophys. Acta** 864: 471-495.
- O'neil SD. 1997. Pollination regulation of flower development. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 48: 547-574.
- Orzaez D, Granell A. 1997. The plant homologue of the *defender against apoptotic death* gene in down-regulated during senescence of flower petals. **FEBS Lett.** 404: 275-278.
- Page T, Griffith G, Buchanan-Wollaston V. 2001. Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. **Plant Physiol.** 125: 718-722.
- Paliyath G, Droillard MJ. 1992. The mechanisms of membrane deterioration and disassembly during senescence. **Plant Physiol. Biochem.** 30: 789-812.
- Panavas T, Rubinstein B. 1998. Oxidation events during programmed cell death of daylily (*Heimerocallis* hybrid) petals. **Plant Sci.** 133: 125-138.
- '_____', Vangie L, Mistler R, Reid JPD, Rubinstein B. 2000. Activities of nucleases in senescing daylily petals. **Plant Physiol. Biochem.** 38: 837-843.
- Parsons DF, Bonner WD, Verboon JG. 1965. Electron microscopy of isolated plant mitochondria and plastids using both the thin-section and negative staining techniques. **Can. J. Bot.** 43: 647-655.
- Passos JF, von Zglinicki T, Kirkwood TBL. 2007. Mitochondria and ageing: winning and losing in the numbers game. **BioEss.** 29: 908-917.

- Pennell RI, Lamb C. 1997. Programmed cell death in plants. **Plant Cell** 9: 1157-1168.
- Phyllips Jr HL, Kende H. 1980. Structural changes in flowers of *Ipomea tricolor* during flower opening and cloning. **Photoplasma** 102: 199-215.
- Porat R, Borochoy A, Halevy AH. 1993. Enhancement of petunia and *Dendrobium* flower senescence by jasmonic acid methyl ester is via the promotion of ethylene production. **Plant Growth Regul.** 13: 297-301.
- Porat R, Rriss N, Atzon R, Halevy AH, Borochoy A. 1995. Examination of the possible involvement of liporygenase and jasmonates in pollination-induced senescence of *Phalaenopsis* and *Dendrobium* orchid flowers. **Physiol. Plant.** 95: 205-210.
- Pyke K. 1994. Arabidopsis-its use in the genetic and molecular analysis of plant morphogenesis. **New Phytol.** 128: 19-37.
- Pyke K. 2009. **Plastid Biology.** Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Raikhel N, Rojo E. 2007. Divergent functions of VTI12 and VTI11 in trafficking to storage and lytic vacuoles in *Arabidopsis*. **Proc. Nation. Acad. Sci. USA.** 104: 3645-3650.
- Ranganath, R.M. and N.R. Nagashyee. 2000. Selective cell elimination during microsporogenesis in sedges. **Sex. Plant Reprod.** 13: 53-60.
- Rapoport SM, Schewe T. 1986. The maturational breakdown of mitochondria in reticulocytes. **Biochim. Biophys. Acta** 864: 471-495.
- Reid MS, Wu MJ. 1992. Ethylene and flower senescence. **Plant Growth Regul.** 11: 37-43.
- Renate M, Bjarne SM. 2003. Genetic regulation of ethylene perception and signal transduction related to flower senescence. **Food Agri. Env.** 1: 87-94.

- Reyes-Prieto A, Weber APM, Bhattacharya D. 2007. The origin and establishment of the plastid in algae and plants. **Ann. Rev. Gen.** 41: 147-168.
- Rich KA, Burkett C, Webster P. 2003. Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy. **Cell Microbiol.** 5, 455-468.
- Rien I, Wolter-Arts M, Derksen J, Mariani C. 2003. Ethylene regulates the timing of anther dehiscence in tobacco. **Planta** 217: 131-137.
- Rogers JH. 2006. Programmed cell death in floral organs : How and why do flowers die? **Ann. Bot.** 97: 309-315.
- Ron M. 1998. Cell death in plant. pp. 504 In Richard AL, Zahra Z, Jonathan LT (eds.). **When Cell Die, A Comprehensive Evolution of Apoptosis and Programmed Cell Death.** Wiley-Liss Inc., New York.
- Rose TL, Bonneau L, Der C, Marty-Mazars D, Marty F. 2006. Starvation-induced expression of autophagy-related genes in *Arabidopsis*. **Biol. Cell** 98: 53-67.
- Rubinstein B. 2000. Regulation of cell death in flower petals. **Plant Mol. Biol.** 44: 303-318.
- Saetersdal TS, Myklebust R, Berg Justesen NP, Engedal H, Cato Olsen W. 1977. Calcium containing particles in mitochondria of heart muscle cells as shown by cryo-ultramicrotomy and X-ray microanalysis. **Cell Tiss. Res.** 182: 17-31.
- Samara C, Syntichaki P, Tavernarakis N. 2008. Autophagy is required for necrotic cell death in *Caenorhabditis elegans*. **Cell Death Diff.** 15: 105-112.
- Sanmartín M, Ordóñez A, Sohn EJ, Robert S, Sánchez-Serrano JJ, Surpin MA, Scott I, Logan DC. 2008. Mitochondrial morphology transition is an early indicator of subsequent cell death in *Arabidopsis*. **New Phytol.** 177: 90-101.

- Satochi K, Yukio H, Masaya S, Ericand D, Shunnosuke A. 2004. Co-expression of and ethylene receptor gene, *ERS*, and ethylene signaling regulator gene, *CTR1*, in *Delphinium* during abscission of florets. **Plant Physiol. Biochem.** 42:745-751.
- Satoh S, Shibuya K, Waki K, Kosugi Y. 2005. Mechanism of senescence in Canation flower. **Acta Hort.** 669: VIII.
- Scarlatti F, Granata R, Meijer AJ and P. Codogno 2009. Does autophagy have a licence to kill animal cells? **Cell Death Diff.** 16: 12-20.
- Scott RC, Juhász G, Neufeld TP. 2007. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. **Curr. Biol.** 17: 1-11.
- Sekai WS. 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant materials using toluidine blue o. **Stain Technol.** 48:247-249.
- Selga T, Selga M. 1993. Effect of ethylene producer camposan M on the genome and morphogenesis of plants. **Proc. Latv. Acad Sci.** 12: 71-73.
- Selga T, Selga M, Pavila V. 2005. Death of mitochondria programmed cell deth of leaf mesophyll cells. **Cell Biol. Inter.** 29: 1050-1056.
- Serek M, Tamari G, Sisler EC, Borochoy A. 1995c. Inhibition of ethylene-induced cellular senescence symptom by 1-methylcyclopropene, a new inhibitor of ethylene action. **Physiol. Plant.** 94: 229-232.
- Serek M, Sisler EC, Reid MS. 1995. Effects of 1-MCP on the vase life and ethylene response of cut flower. **Plant Growth Regul.** 16:93-97.
- Serek M, Sisler EC, Reid MS. 1996. Ethylene and the postharvest performance of miniature roses. **Acta Hort.** 424: 145-149.

- Shibuga K, Yoshioka T, Hashiba T, Satoh S. 2000. Role of the gymnoecium in natural senescence of carnation (*Dianthus caryophyllus*) flowers. **J. Exp. Bot.** 51: 2067-2073.
- Simeonova E, Sikora A, Charzzyńska, AM, Mostowska A. 2000. Aspects of programmed cell death during leaf senescence of mono- and dicotyledonous plant. **Protoplasma** 214: 93-101.
- Sisler EC, Reid MS, Fujino DW. 1983. Investigation of the mode of action of ethylene in carnation senescence. **Acta Hort.** 141: 229-234.
- “_____”, Serek M, Dupille E. 1996. Comparison of cyclopropene, 1-methylcyclopropene, and 3,3-dimethylcyclopropene as an ethylene antagonist in plants. **Plant Growth Reg.** 18: 169-175.
- Smart CM. 1994. Gene expression during leaf senescence. **New Phytol.** 126: 419-448.
- Smith MT, Saks Y, van Steden J. 1992. Ultrastructural changes in petals of senescing flowers of *Dianthus caryophyllus* L. **Ann. Bot.** 69: 277-285.
- Stead AD, van Doorn WG, 1994. Strategies of flower senescence : a review, pp. 245-265. In : Scott, R.J. and Stead, A.D. (eds.). **Developmental Mutants in Higher Plants**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sugiyama M, Ito J, Aoyagi S, Fukada H. 2000. Endonucleases. **Plant Mol. Biol.** 44: 387-397.
- Suttle JC, Kende H. 1980. Ethylene action and loss of membrane integrity during petal senescence in *Tradescantia*. **Plant Physiol.** 65: 1067-1072.

- Takichita K, Koike K, Maruyama T, Okata T. 2002. Molecular evidence for plastid robbery (kleptoplastidy) in *Dinophysis*, a dinoflagellate causing diarrhetic shellfish poisoning. **Protist** 153: 293-302.
- Terman A, Dalen H, Eaton JW, Neuzil J, Brunk UT. 2003. Mitochondrial recycling and aging of cardiac myocytes: the role of autophagocytosis. **Exp. Geront.** 38: 863-876.
- Thomas H, Qugham HJ, Wagstaff C, Stead AD. 2003. Defining senescence and death. **J. Exp. Bot.** 54: 1127-1132.
- Thomas H, Sadras VO. 2001. The capture and gratuitous disposal of resources by plants. **Func. Ecol.** 15: 3-12.
- Thomas H, Stoddart JL. 1980. Leaf senescence. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 31: 83-111.
- Thompson JE, Mayak S, shinitzky M, Abraham HH. 1982. Acceleration of membrane senescence in cut carenation flowers by treatment with ethylene. **Plant Physiol.** 69: 859-863.
- Thomson WW, Whatley JM. 1980. Development of nongreen plastids. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 31: 375-394.
- Tiwari BS, Belenghi B, Levine A. 2002. Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. **Plant Physiol.** 128: 1271-1281.
- Toyooka K, Matsuoka K. 2006. Autophagy and non-classical vacuolar targeting in tobacco BY-2 cells. pp. 167-180. In: Tobacco BY-2 cells: from cellular dynamics to omics (Nagata T, Matsuoka K, Inzé D, eds.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry** Vol. 58. Springer, Berlin.

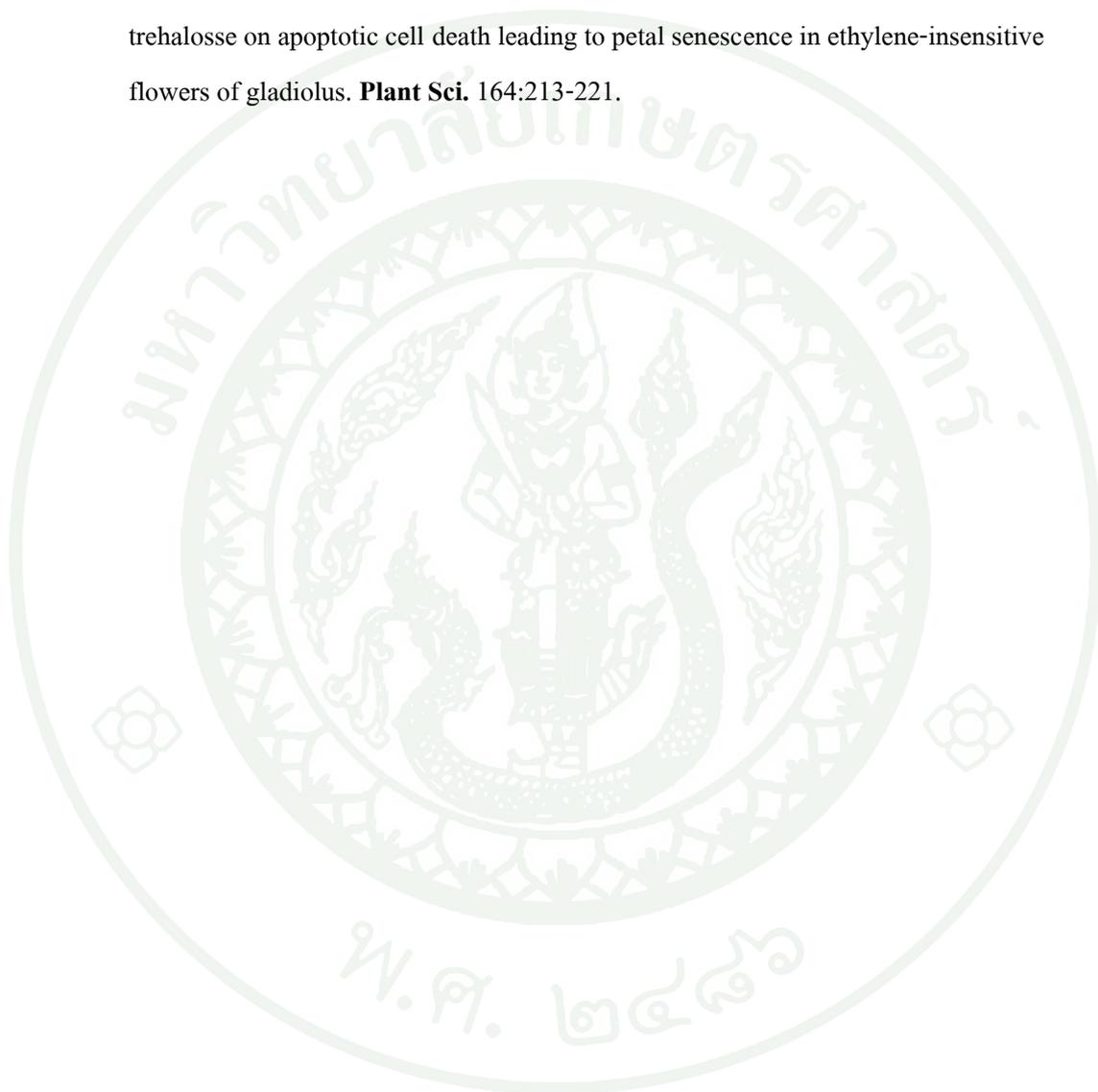
- Toyooka K, Moriyasu Y, Goto Y, Takeuchi M, Fukuda H, Matsuoka K. 2006. Protein aggregates are transported to vacuoles by a macroautophagic mechanism in nutrient-starved plant cells. **Autophagy** 2: 96-106.
- Twig G, Hyde B, Shirihai OS. 2008. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: The bioenergetic view. **Biochim. Biophys. Acta** 1777: 1092-1097.
- Van der Kop Dam, Ruys G, Dee, van der Schoot C, de Bore A, van Doorn WG. 2003. Expression of defender against apoptotic death (DAD-1) in *Iris* and *Dianthus* petals. **Physiol. Plant.** 117, 256-263.
- Van Doorn WG. 1997. Effects of pollination on floral attraction and longevity. **J. Exp. Bot.** 48: 1615-1622.
- “_____”. 2005. What kinds of programmed cell death occur in plant ? **Plant Sci.** 10: 117-122.
- “_____”, Woltering EJ. 2004. Senescence and programmed cell death : substance or semantics?. **J. Exp. Bot.** 55: 2147-2153.
- “_____”, Balk PA , van Houwelingen AM, Hoerberichts FA, Hall RD, Vorst O, van der Schoot C, van Wordragen MF. 2003. Gene expression during anthesis and senescence in *Iris* flowers. **Plant Mol. Biol.** 53: 845-863.
- “_____”, Woltering EJ. 2005. Many ways to exit? Categories of programmed cell death in plants. **Trends in Plant Sci.** 10: 117-122.
- “_____”, Woltering EJ. 2008. Physiology and molecular biology of petal senescence. **J. Exp. Bot.** 59: 453-480.

- “_____”. 2004. Is petal senescence due to sugar starvation? **Plant Physiol.** 134: 35-42.
- Vitale A, Hinz G. 2005. Sorting of proteins to storage vacuoles: how many mechanisms? **Trends in Plant Sci.** 10:316-323.
- Veen H, van de Geijin SC. 1978. Mobility and ionic form of silver as related to longevity of cut carnations. **Planta** 140: 93-96.
- Virolainen, E., Blockhina, O. and Fagerstedt, K. 2002. Ca²⁺ - induced high amplitude swelling and cytochrome c release from wheat (*Triticum aestivum* L.) **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 50: 67-95.
- Wagstaff C, Malcolm P, Rafiq A, Leverentz M, Griffiths G, Thomas B, *et al.* 2003. Programmed cell death (PCD) process begin extremely early in *Alstroemeria* petal senescence. **New Phytol.** 160: 49-59.
- Walker PR, Sikorska M. 1994. Endonuclease activities, chromatin structure, and DNA fragmentation in apoptosis. **Biochem. Cell Biol.** 72: 615-623.
- “_____”, Blanc JL, Sikorska M. 1993. Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. **Biotechniques** 15: 1032-1040.
- Wang YS, Tian SP, Xu Y. 2005. Effect of high oxygen concentration on pro- and anti-oxidant enzymes in peach fruits during postharvest periods. **Food Chem.** 91: 99-104.
- Wen L, Chase CD. 1999. Mitochondrial gene expression in developing male gametophytes of male-fertile and S male-sterile maize. **Sex Plant Reprod.** 11: 323-330.

- Wojciechowska M, Olszewska MJ. 2003. Endosperm degradation during seed development of *Echinocystis lobata* (Cucurbitaceae) as a manifestation of programmed cell death (PCD) in plants. *Folia Histo. Cytol.* 41: 41-50.
- Woltering EJ, van Doorn WG. 1988. Role of ethylene in senescence of petal morphological and taxonomical relationship. *J. Exp. Bot.* 208: 1605-1616.
- “_____”, De Jong AJ, Yakimov ET. 1999. Apoptotic cell death in plants : The role of ethylene, pp.484 In: Kanellis, A.K., Chang, C., Klee, H., Bleecher, A.B., Pech, J.C. and D. Grierson (eds.). **Biology and Biotechnology of Plant Hormone Ethylene II**. Kluner Academic Publishers, Dordrecht.
- Woodson WR. 1994. Molecular biology of flower senescence in carnation, pp. 255-267. In: Scott and A.D., Steard (eds.). **Molecular and cellular Aspects of Plant Reproduction**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Woodson WR, Lawton KA. 1988. Ehtylene-induced gene expression in carnation petals relationship to autocatalytic ethylene production and senescence. *Plant Physiol.* 87: 498-503.
- Wright M, Simon EW. 1973. Chilling injury in cucumber leaves. *J. Exp. Bot.* 24: 400-411.
- Wyllie AH, 1987. Apoptosis : cell death in tissue regulation. *J. Pathol.* 153: 313.
- Xie Z, Klionsky DJ. 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. **Nature Cell Biol.** 9: 1102-1109.
- Xu Y, Hanson MR. 2000. Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in petunia. *Plant Physiol.* 122: 1323-1333.

Yamada T, Ichimura K, Kanekatsu M, van Doorn WG. 2009. Homologs of genes associated with programmed cell death in animal cells are differentially expressed during senescence in *Ipomoea nil* petals. **Plant Cell Physiol.** 50: 610-625.

Yamada T, Takatsu Y, Manabe T, Kasumiand M, Marubashi W. 2003. Suppressive effect of trehalose on apoptotic cell death leading to petal senescence in ethylene-insensitive flowers of gladiolus. **Plant Sci.** 164:213-221.





ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 การเกิดสีซีดของกล้วยไม้หวายพันธุ์ลักกี้ควน เรดบอมโง ขาวสนาน ซากูระ มีสีพื้น และทับทิม

พันธุ์	วันหลังเก็บเกี่ยว					
	1	5	10	15	20	25
ลักกี้ควน	1.00c	4.80a	5.95b	6.15b	6.25b	7.00a
มีสีพื้น	1.00c	2.35c	3.35c	3.65d	5.10d	7.00a
ซากูระ	1.50a	2.75bc	5.40b	7.00a	5.65c	5.95c
ขาวสนาน	1.00c	2.85bc	5.65b	6.10b	7.00a	6.65b
เรดบอมโง	1.00c	2.45bc	7.00a	4.20c	4.60d	5.9c
ทับทิม	1.25b	2.95b	7.00a	6.30b	7.00a	7.00a
<i>F</i> -test	**	**	**	**	**	**
C.V. (%)	32.81	31.57	15.45	14.53	11.12	6.55

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

** = ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางผนวกที่ 2 การเหี่ยวของกล้วยไม้หวายพันธุ์ล็กกี้ควน เรดบอมโใจ ขาวสนาน ซากูระ มีสีพื้น และทับทิม

พันธุ์	วันหลังเก็บเกี่ยว					
	1	5	10	15	20	25
ล็กกี้ควน	3a	4.75a	5.5ab	5.9b	6.35b	7a
มีสีพื้น	1.75b	3.2bc	4.1c	4.75c	5.8c	7a
ซากูระ	1.65b	3.5b	5b	5.1c	5.7c	6.75b
ขาวสนาน	1c	3c	5.05ab	5.75b	6.6ab	7a
เรดบอมโใจ	1c	1.2e	2.5d	3.2d	3.95d	5.85c
ทับทิม	1c	2.15d	5.7a	6.7a	7a	7a
<i>F</i> -test	**	**	**	**	**	**
C.V. (%)	19.76	21.49	23.99	15.82	11.11	4.1

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

** = ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางผนวกที่ 3 การเกิดเส้นแวนของกล้วยไม้หวายพันธุ์ล็กี่ควน เรดบอมโจ ขาวสนาน ซากูระ มีสีพื้นและ ทับทิม

พันธุ์	วันหลังเก็บเกี่ยว					
	1	5	10	15	20	25
ล็กี่ควน	1c	4.1a	5.5c	5.9b	6.35b	7a
มีสีพื้น	1c	2.15c	3.25d	4c	5.35c	7a
ซากูระ	1.5b	3.3b	5.8bc	5.85b	7a	6b
ขาวสนาน	1.65a	3.8ab	7a	7a	7a	7a
เรดบอมโจ	1c	2.05c	2.55e	3d	3.9d	7a
ทับทิม	1c	3.3b	6.25b	6.7a	7a	7a
<i>F</i> -test	**	**	**	**	**	**
C.V. (%)	19.53	30.47	20.18	14.6	7.9	3.11

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

** = ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางผนวกที่ 4 การเกิดสีซีดของกล้วยไม้หวายที่ไม่ได้รับเอทิลีน และได้รับเอทิลีนระดับความเข้มข้น 0.2 0.4 และ 0.8 $\mu\text{L/L}$

ทรีทเมนต์	วันหลังเก็บเกี่ยว					
	1	5	10	15	20	25
Control	1.0b	1.4c	4.23c	4.1c	4.93c	6.0c
C ₂ H ₄ 0.2 $\mu\text{L/L}$	1.03b	2.76b	5.5b	5.5b	6.0b	6.4b
C ₂ H ₄ 0.4 $\mu\text{L/L}$	1.06b	3.86a	6.56a	6.36a	6.33ab	6.8a
C ₂ H ₄ 0.8 $\mu\text{L/L}$	1.4a	4.06a	6.6a	6.26a	6.46a	7.0a
<i>F</i> -test	**	**	**	**	**	**
C.V. (%)	32.81	31.57	15.45	14.53	11.12	6.55

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

** = ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางผนวกที่ 5 การเหี่ยวของกล้วยไม้หวายที่ไม่ได้รับเอทิลีน และได้รับเอทิลีนระดับความเข้มข้น 0.2 0.4 และ 0.8 $\mu\text{L/L}$

ทรีทเมนต์	วันหลังเก็บเกี่ยว					
	1	5	10	15	20	25
Control	1.0c	1.06d	2.1c	3.26c	4.73c	6.5c
C ₂ H ₄ 0.2 $\mu\text{L/L}$	1.5b	2.56c	4.2b	5.13b	5.83b	6.7b
C ₂ H ₄ 0.4 $\mu\text{L/L}$	2.0a	3.6b	5.9a	6.36a	6.36a	6.8b
C ₂ H ₄ 0.8 $\mu\text{L/L}$	1.7b	4.5a	6.2a	6.36a	6.66a	7.0a
<i>F</i> -test	**	**	**	**	**	**
C.V. (%)	19.76	21.49	23.99	15.82	11.11	4.1

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

** = ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางผนวกที่ 6 การเกิดเส้นแวนของกล้วยไม้หวายที่ไม่ได้รับเอทิลีน และได้รับเอทิลีนระดับ
ความเข้มข้น 0.2 0.4 และ 0.8 $\mu\text{L/L}$

ทริทเมนต์	วันหลังเก็บเกี่ยว					
	1	5	10	15	20	25
Control	1.0c	1.66d	3.26c	3.83c	5.4c	6.56c
C ₂ H ₄ 0.2 $\mu\text{L/L}$	1.0c	2.46c	4.86b	5.4b	6.06b	6.76b
C ₂ H ₄ 0.4 $\mu\text{L/L}$	1.16b	3.8b	5.93a	6.03a	6.4a	7.0a
C ₂ H ₄ 0.8 $\mu\text{L/L}$	1.6a	4.53a	6.16a	6.36a	6.5a	7.0a
<i>F</i> -test	**	**	**	**	**	**
C.V. (%)	19.53	30.47	20.18	14.6	7.9	3.11

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

** = ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางผนวกที่ 7 ค่า EC ของส่วนกลีบดอกและเส้าเกสรของกล้วยไม้ล็กที่ควนที่ไม่ได้รับเอทิลีน และเอทิลีนระดับความเข้มข้น 0.4 $\mu\text{L/L}$

ทริทเมนต์	เวลาหลังให้ทริทเมนต์ (ชั่วโมง)							
	6	12	18	24	36	48	60	72
กลีบดอก	5.52c	7.3b	7.2b	7.41b	8.01c	6.34b	6.3b	6.9b
กลีบดอก + เอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$	5.59c	7.14b	8.87b	6.91b	9.81cb	7.22b	7.2b	7.7b
เส้าเกสร	13.54a	15.14b	16.14a	16.78a	14.7b	10.86a	10.86a	10.9a
เส้าเกสร + เอทิลีน 0.4 $\mu\text{L/L}$	9.97b	12.65a	14.17a	15.08a	20.03a	15.51a	13.8ab	11.9a
<i>F</i> -test	**	**	**	**	**	**	**	**
C.V. (%)	15.69	13.05	11.42	25.33	21.43	16.56	28.34	6.44

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

** = ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

โครงสร้างและองค์ประกอบของเซลล์

เซลล์ (Cell) เป็นองค์ประกอบหรือหน่วยที่เล็กที่สุด ของส่วนต่าง ๆ ของพืชหรือสัตว์ ประกอบด้วยผนังเซลล์ (Cell wall) เป็นโครงสร้างที่แข็งแรง ห่อหุ้มเซลล์ ป้องกันไม่ให้ของเหลวต่าง ๆ ภายในเซลล์ได้รับอันตรายพบในเซลล์พืช และแบคทีเรีย องค์ประกอบทางเคมีเป็นเซลลูโลส (cellulose) เป็นส่วนมาก และมีสารโปรตีน และลิกนิน (lignin) บ้าง เซลล์สัตว์ไม่มีผนังเซลล์แต่จะมี extracellular matrix (ECM) แทน ECM ประกอบไปด้วย สารพวก glycoproteins รวมทั้ง คาร์โบไฮเดรตสายสั้นๆ ฝังอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะเป็นเยื่อบาง ๆ ห่อหุ้มทุกสิ่งทุกอย่างภายในเซลล์ ทำหน้าที่ป้องกันการรั่วไหลของสารประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ คัดเลือกสารอาหารและสารอื่นที่จะเข้าหรือออกจากเซลล์ (semipermeable membrane) องค์ประกอบทางเคมี คือ โปรตีน และไขมัน ปัจจุบันนี้เชื่อกันว่ามีโครงสร้างเป็นแบบ Fluid Mosaic Membrane ภายในเซลล์มีสารโปรโตพลาสซึม (Protoplasm) และ Organelle เล็ก ๆ

โปรโตพลาสซึมประกอบด้วย ไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) มีลักษณะเป็นของเหลวส่วนใหญ่จะเป็น โปรตีน กรดนิวคลีอิก สาร อินทรีย์ และสารอินทรีย์เล็ก ๆ หน้าที่มีหลายอย่าง เช่น การสังเคราะห์ หรือสลายตัวของสารประกอบต่าง ๆ ที่ได้มาจากอาหาร เป็นแหล่งที่มีปฏิกิริยาทางเคมีเกิดขึ้นอยู่เป็นจำนวนมาก และนิวเคลียส (Nucleus) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความสำคัญที่สุดของเซลล์ เป็นที่อยู่ของสารพันธุกรรมส่วนใหญ่ มีลักษณะเป็นรูปกลมหรือรูปไข่ เซลล์ทั่วไปจะมีหนึ่งนิวเคลียส ประกอบไปด้วย เยื่อหุ้มนิวเคลียส โครมาติน และนิวคลีโอลัส

ออร์แกเนลล์มีหลายชนิดที่ทำหน้าที่ต่าง ๆ กันไป ดังเช่น

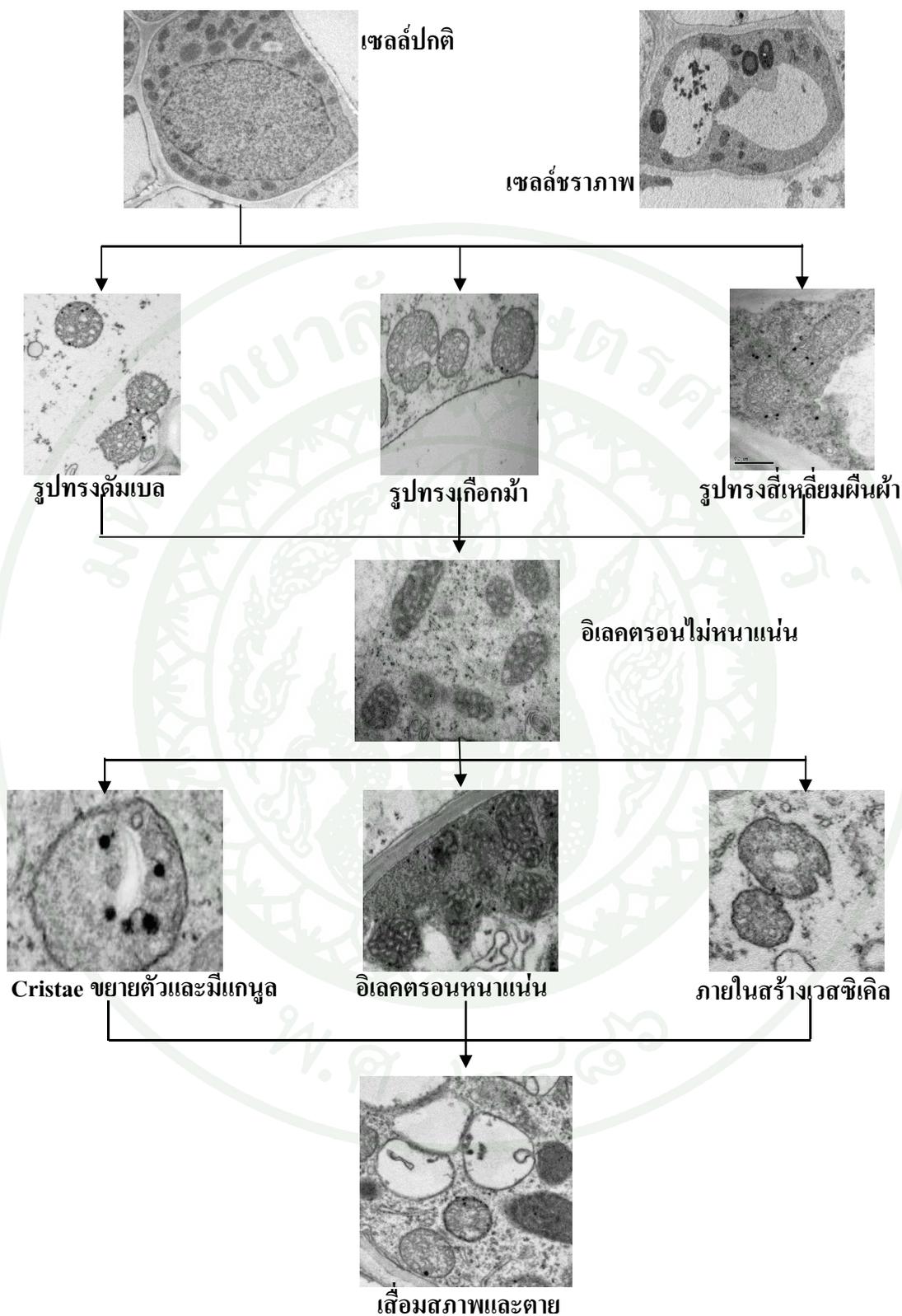
1) ไมโทคอนเดรีย ประกอบไปด้วยโปรตีน ไขมัน DNA RNA และไรโบโซม รูปร่างไม่แน่นอน อาจจะเป็นก้อน (granular) เป็นท่อนยาว ๆ (filamentous) หรือ คล้ายกระบอง (club shape) ก็ได้ มีเยื่อหุ้มสองชั้น ภายในมีเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (aerobic respiration) หลายชนิด เป็นแหล่งผลิตพลังงานให้เซลล์ มีความสำคัญต่อการสันดาปอาหาร

2) พลาสติด แบ่งออกเป็นหลายชนิด เช่น คลอโรพลาสต์ (Chloroplast) เป็นพลาสติดมีรงควัตถุสีเขียว เรียกว่า คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) โครโมพลาสต์ (Chromoplast) มีรงควัตถุสีเหลือง ส้ม และแดง เรียกว่า คาร์โรทีนอยด์ (Carotenoids) และอะมัยโลพลาสต์ (Amyloplast) ทำหน้าที่สะสมแป้ง เป็นต้น

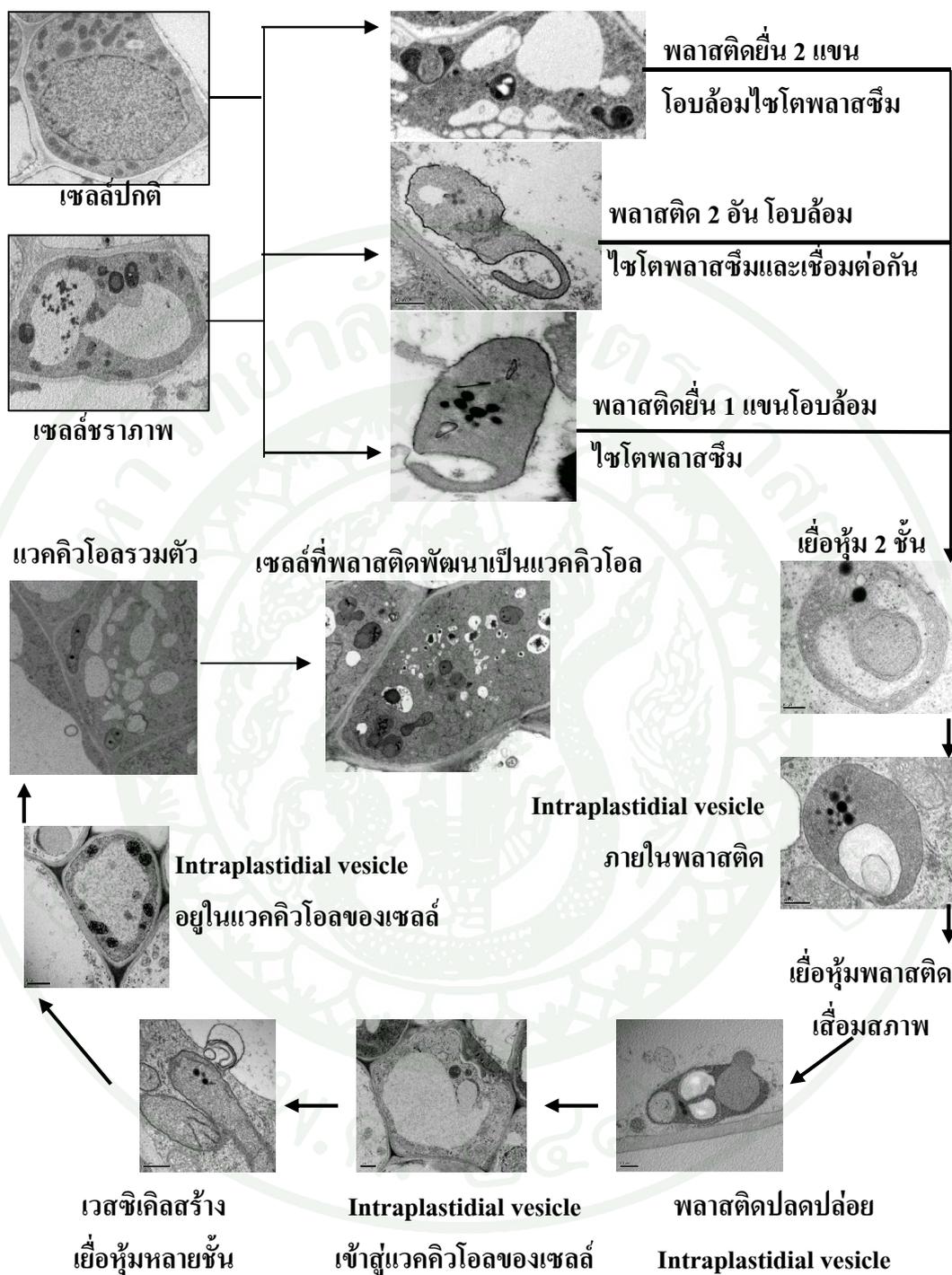
3) แวกคิวโอล (vacuole) ลักษณะเป็นก้อนกลมใส ๆ มีเยื่อบาง ๆ ล้อมรอบ มองเห็นได้ชัดเจน ทำหน้าที่ได้แตกต่างกันเช่น Food vacuole Contractile vacuole Central vacuole

4) ไรโบโซม (Ribosome) เป็นออร์แกเนลล์ที่ประกอบด้วยโปรตีนและ rRNA พบทั้งในโปรคาริโอตและยูคาริโอตแต่มีขนาดต่างกัน ในแบคทีเรียมี 2 หน่วยย่อย คือ ขนาด 30S และ 50S ซึ่งจะรวมกันเป็นไรโบโซมขนาด 70S ส่วนในยูคาริโอต มี 2 หน่วยย่อย คือ ขนาด 40S และ 60S ซึ่งจะรวมกันเป็นไรโบโซมขนาด 80S ในคลอโรพลาสต์และไมโทคอนเดรียมีไรโบโซมเป็นของตนเอง ซึ่งคล้ายไรโบโซมของแบคทีเรียแต่มีความซับซ้อนน้อยกว่า หน้าที่คือเป็นแหล่งที่เกิดการอ่านรหัสจากยีนในนิวเคลียส ซึ่งถูกส่งออกจากนิวเคลียสในรูป mRNA มาสร้างเป็นโปรตีน

5) เป็นออร์แกเนลล์ ที่มีผนังบาง 2 ชั้น มีความหนาน้อยกว่าเยื่อหุ้มเซลล์ มีลักษณะ เป็นท่อขดพับไปมา เป็นออร์แกเนลล์ ที่เกี่ยวข้องกับ การสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งไรโบโซม จะเกาะทางด้านไซโทซอลของเยื่อหุ้ม โปรตีนถูกสังเคราะห์ ข้ามเยื่อหุ้ม ของเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม นอกจากจะเป็น ที่ให้ไรโบโซมเกาะอยู่แล้ว ยังทำหน้าที่สังเคราะห์สาร (sterols) และ phospholipids เป็นสารที่จำเป็น ของทุกๆเยื่อหุ้ม เอนโดพลาสมิก เรติคูลัม ยังทำหน้าที่ขนถ่ายเอนไซม์ และโปรตีนโมเลกุล เรียกว่า การหลั่งสาร หรือกระบวนการขับสาร ออกนอกเซลล์ (secetion) ประกอบด้วย โครงสร้างระบบท่อ ที่มีการเชื่อมประสานกัน ทั้งเซลล์ส่วนของท่อยังติดต่อกับเยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มนิวเคลียส และกอลจิบอดีด้วย ภายในท่อมี่ของเหลวซึ่งเรียกว่า ไฮยาโลพลาซึม (hyaloplasm) บรรจุอยู่ และพบในยูคาริโอตเท่านั้น(http://www.neutron.rmutphysics.com/science-news/index.php?option=com_content&task=view&id=852&Itemid=4)



ภาพผนวกที่ 1 กระบวนการเปลี่ยนแปลง โครงสร้างระดับจุลภาคภายในไมโทคอนเดรียของเซลล์กลีบดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ลี้กี้ควนหลังดอกไม้บานจนกระทั่งเกิดการชราภาพ



ภาพผนวกที่ 2 กระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาคภายในplastidของเซลล์กลีบดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์คึกคักที่ควนหลังดอกไม้อานจนกระทั่งเกิดการชราภาพ

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ -นามสกุล	นางสาวกาญจนา กิระศักดิ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	6 กันยายน 2511
สถานที่เกิด	จังหวัดนครราชสีมา
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักวิชาการเกษตร ชำนาญการ
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น จ.ขอนแก่น กรมวิชาการเกษตร
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	—
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	Postgraduate Education and Research Development Project in Postharvest Technology, KU (ADB Project)