



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (การปรับปรุงพันธุ์พืช)

ปริญญญา

การปรับปรุงพันธุ์พืช

เกษตร กำแพงแสน

สาขา

คณะ

เรื่อง

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) โดยใช้รังสีแกมมา

Induce Mutation in *Jatropha curcas* L. using Gamma Irradiation

นามผู้วิจัย

นางสาวอัญชิสา ปานแก้ว

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ณรงค์ลักษณ์ เทียนเสรี, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทน์เปรม, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสกสม อาตมากร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่

เดือน

พ.ศ.

สิงสถิตี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) โดยใช้รังสีแกมมา

Induce Mutation in *Jatropha curcas* L. using Gamma Irradiation

โดย

นางสาวอัญชิสา ปานแก้ว

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (การปรับปรุงพันธุ์พืช)

พ.ศ. 2555

อัญชิสา ปานแก้ว 2555: การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.)
โดยใช้รังสีแกมมา ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (การปรับปรุงพันธุ์พืช) สาขาวิชาการ
ปรับปรุงพันธุ์พืช คณะเกษตร กำแพงแสน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
อาจารย์นงลักษณ์ เทียนเสรี, Ph.D. 75 หน้า

เพาะเลี้ยงก้านดอกอ่อนและก้านใบอ่อนสบู่ดำพันธุ์โคราชบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี TDZ
ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่า ส่วนของก้านใบอ่อนพัฒนาเกิดเป็น
compact callus ได้ดีกว่าก้านดอกอ่อน โดยสูตรอาหารที่เหมาะสม คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่มี TDZ
ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิด compact callus 84.38 % มีน้ำหนักแคลลัสเท่ากับ 1.16
กรัม นำแคลลัสที่ได้ไปทดสอบต่อเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดบนอาหาร
แข็งสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 0 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารแข็งสูตร MS ที่มี
BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้แคลลัสเกิดเป็นยอดดีที่สุดเฉลี่ย 6.62 ยอด

เพื่อชักนำให้เกิดการความแปรปรวนทางพันธุกรรมกับสบู่ดำ นำแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบน
อาหารแข็ง MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ระดับ
ความเข้มข้นของรังสี 0 10 20 30 และ 40 เกรย์ พบว่า เมื่อระดับรังสีสูงขึ้น เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอด
จะลดลง โดยที่ระดับ 10 และ 20 เกรย์ แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ ยอดที่เกิดมีความสมบูรณ์
ส่วนที่ระดับ 30 และ 40 เกรย์ ยอดมีลักษณะแคระแกร็น และมีการเจริญเติบโตที่ช้า

ชักนำให้เกิดการความแปรปรวนทางพันธุกรรมกับกิ่งปักชำสบู่ดำ แบ่งการฉายรังสีแกมมา
เป็น 2 แบบ คือ แบบเรื้อรังครั้งเดียว ที่ระดับ 0 10 15 และ 20 เกรย์ และฉายซ้ำอย่างต่อเนื่องที่ระดับ 50
100 และ 150 เกรย์ พบว่า รังสีทุกระดับไม่ทำให้กิ่งปักชำตาย แต่ส่งผลเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะ
ทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ใบด่าง ก้านแดง รูปร่างใบผิดปกติ ความยาวของกิ่งเกิดใหม่เพิ่มขึ้นหรือ
ลดลง และพบว่า กิ่งปักชำที่ผ่านการฉายรังสีที่ระดับ 20 เกรย์ เพียงครั้งเดียว มีระยะเวลาการออกดอก
ที่เร็วที่สุด และเร็วกว่าชุดควบคุม 11 วัน เมื่อนำต้นสบู่ดำที่ได้รับการฉายรังสีทั้งที่ได้จากแคลลัสและ
กิ่งปักชำ มาตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค AFLP ด้วยไพรเมอร์ทั้งหมด 10 คู่
ไพรเมอร์ พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนทั้งหมด 1,227 และ 550 แถบ ตามลำดับ โดยทุกคู่ไพรเมอร์
เกิดโพลิมอร์ฟิซึม แสดงว่า มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น

Anchisa Pankaew 2012: Induce Mutation in *Jatropha curcas* L. using Gamma Irradiation. Master of Science (Plant Breeding), Major Field: Plant Breeding, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen. Thesis Advisor: Nongluk Tienseree, Ph.D.
75 pages.

Young peduncle and young petiole of physic nut cv. Korat were cultured *in vitro* on solid MS medium supplemented with various concentrations of TDZ and NAA in combination for callus induction. It was found that the young petiole has higher ability to develop compact callus than that of the young peduncle when was cultured on MS solid medium supplemented with 0.4 mg/l TDZ. This medium resulted 84.38% compact callus production with 1.16 g. average weight of callus. The calli were cultured on MS medium with 0 1 2 3 and 4 mg /l BA for multiple shoot induction. It was found that MS medium with 2 mg/l BA gave the highest average shoot number of 6.62.

To induce genetic variation, the calli induced on MS medium supplemented with 0.4 mg/l TDZ were acuted gamma irradiation at 0 10 20 30 and 40 Gray. When higher doses of gamma ray were applied, lower percentages of shoot survival were obtained. At 10 and 20 Gray, elongated and normal shoots were obtained. At 30 and 40 Gray, dwarf and slow growth shoot with yellow leave were obtained.

The induction of genetic variation in cutting was also done. Two gamma irradiation procedures were carried out, single-exposure chronic gamma irradiation at 0 10 15 and 20 Gray. The second procedure, an experimental subset of cutting underwent a second exposure at 50, 100 and 150 Gray. It was found that all cuttings survival irradiation. However, some morphological changes were noticed i.e. leaf mosaic, stem discoloration, deformed leaf shape and shorter or longer branch length. One physic nut cutting that received single exposure irradiation at 20 Gray showed 11 days earlier of flowering than in control. AFLP with 10 primer pairs was applied for detecting genetic variation. The irradiated calli and cutting yielded 1,227 and 550 DNA fragments, respectively. Every pair of primer generated polymorphic band of DNA.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. นงลักษณ์ เทียนเสรี และ รองศาสตราจารย์ ดร. สนธิชัย จันทรเปรม ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และกรรมการที่ปรึกษาร่วมเป็นอย่างสูงยิ่ง ที่กรุณาให้ความรู้ ให้คำปรึกษาวิธีการดำเนินการวิจัย และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ของวิทยานิพนธ์ ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี รวมทั้งช่วยเหลือในด้านอื่น ๆ เสมอ และขอกราบขอบพระคุณ ดร. บุปผา กงสมัย ประธานคณะกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ และ ผศ.ดร. กัญจนา แซ่เตียว ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ให้ความกรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากบริษัท โพรเทคเตอร์ นิวทริชั่น (ประเทศไทย) จำกัด ซึ่งสนับสนุนทุนวิจัยโครงการพัฒนาพันธุ์สบูดำ โดยที่ให้การสนับสนุนทุนบัณฑิตผู้ช่วยวิจัยและงบประมาณในการทำวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และห้องปฏิบัติการชีววิทยาโมเลกุล ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์เสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่สาวทั้งสอง รวมทั้งทุกคนในครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจ ให้คำปรึกษา ให้การส่งเสริมในด้านการศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์แก่ข้าพเจ้าด้วยดีเสมอมา

ท้ายที่สุดนี้ขอกราบขอบพระคุณบูรพาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ด้านต่าง ๆ ให้แก่ข้าพเจ้าตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

อัญชิสา ปานแก้ว

ตุลาคม 2555

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	27
อุปกรณ์	27
วิธีการ	29
ผลและวิจารณ์	40
สรุปและข้อเสนอแนะ	63
สรุป	63
ข้อเสนอแนะ	64
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	65
ภาคผนวก	73
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	75

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ NAA ในอาหารเลี้ยงสูตร MS สำหรับการชักนำการเกิดแคลลัสจากก้านดอกอ่อน และก้านใบอ่อนสับดำพันธุ์โคราช	30
2 คู่มือสำหรับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากยอดสับดำพันธุ์โคราชที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน โดยเพิ่มเบสคัดเลือกว่า 3' สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการทำพีซีอาร์ II	37
3 คู่มือสำหรับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากยอดของกิ่งปักชำสับดำพันธุ์โคราช ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรัง โดยเพิ่มเบสคัดเลือกว่า 3' สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการทำพีซีอาร์ II	38
4 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ NAA ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ก้านดอกอ่อนสับดำพันธุ์โคราช เป็นระยะเวลา 30 วัน	43
5 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ NAA ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ก้านใบอ่อนสับดำพันธุ์โคราช เป็นระยะเวลา 30 วัน	45
6 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก้านใบอ่อน สับดำพันธุ์โคราช เป็นระยะเวลา 30 วัน	48
7 จำนวนยอดที่พัฒนาจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงก้านใบอ่อนสับดำพันธุ์โคราช ในอาหารสูตร MS ที่มี TDZ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทดสอบบนอาหารเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน	51
8 จำนวนต้นสับดำพันธุ์โคราชที่พัฒนาและรอดชีวิตจากแคลลัสที่ได้รับรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในปริมาณรังสีต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 60 วัน หลังจากฉายรังสี	53

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
9 ความยาวกิ่งสับดำเมื่ออายุ 60 วัน หลังได้รับการฉายรังสีแบบเรื้อรัง ในปริมาณต่าง ๆ	57
10 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากยอคที่พัฒนาจากแคลลัสที่ได้รับการฉายรังสี ระดับต่าง ๆ แบบเจียบพลันโดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอฟแอลพี	60
11 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอฟแอลพี จากดีเอ็นเอของกิ่งสับดำพันธุ์โคราชที่ได้รับการฉายรังสีแบบเรื้อรัง ที่ปริมาณรังสีต่าง ๆ	62
ตารางผนวกที่	
1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962)	74

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แคลลัสสปุ่มดำพันธุ์โคราชจากการเพาะเลี้ยงส่วนของก้านดอกอ่อน บนอาหารแข็ง สูตร MS ที่มี TDZ ร่วมกับ NAA เลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน	44
2 แคลลัสสปุ่มดำพันธุ์โคราชจากการเพาะเลี้ยงส่วนของก้านใบอ่อน บนอาหารแข็ง สูตร MS ที่มี TDZ ร่วมกับ NAA เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน	46
3 แคลลัสสปุ่มดำพันธุ์โคราชจากการเพาะเลี้ยงส่วนของก้านใบอ่อน บนอาหารแข็ง สูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน	49
4 การเกิดยอดของสปุ่มดำพันธุ์โคราชจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ได้จากก้านใบอ่อน บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน	51
5 ยอดสปุ่มดำหลังจากได้รับการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ระดับความเข้มข้น 0 10 20 30 และ 40 เกรย์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 60 วัน หลังได้รับรังสี	53
6 ลักษณะใบด่างที่เกิดขึ้นหลังการฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรัง จำนวน 2 ครั้ง ที่ระดับ 10 เกรย์ และ 50 เกรย์ ตามลำดับ	55
7 ลักษณะก้านแดงที่เกิดขึ้นหลังการฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรัง จำนวน 2 ครั้ง ที่ระดับ 10 เกรย์ และ 100 เกรย์ ตามลำดับ	55
8 ต้นสปุ่มดำที่ 60 วันหลังได้รับรังสีแบบเรื้อรัง 2 ครั้ง ครั้งที่ 10 เกรย์ ครั้งที่ 2 ที่ 100 เกรย์	56

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AFLP	=	Amplified Fragment Length Polymorphism
BA	=	6-benzylaminopurine
DNA	=	Deoxyribose Nucleic Acid
IBA	=	indole-3-butyric acid
kn	=	kinetin
NAA	=	Naphthalene-1-Acetic Acid
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
TDZ	=	Thidiazuron

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) โดยใช้รังสีแกมมา

Induce Mutation in *Jatropha curcas* L. Using Gamma Irradiation.

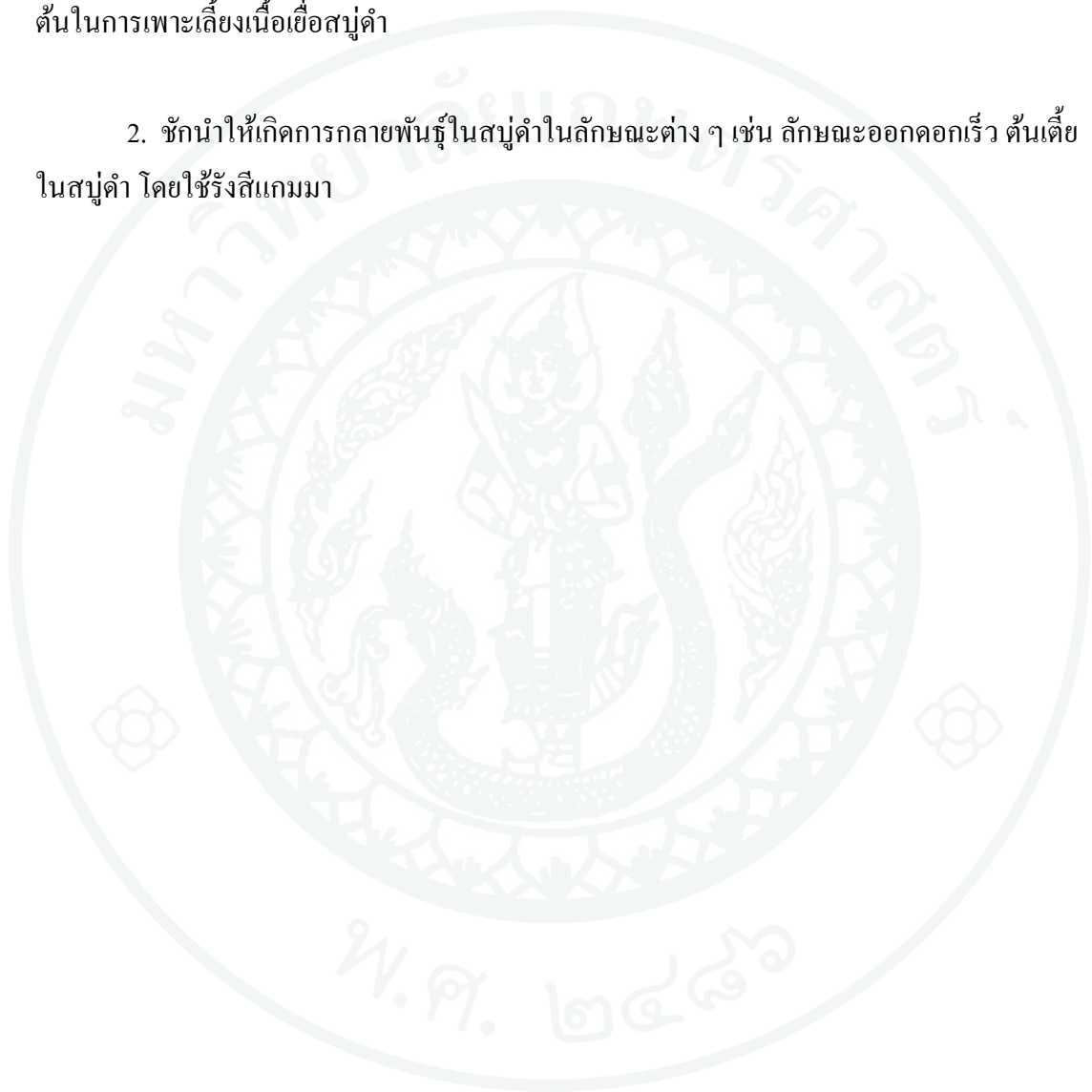
คำนำ

สบู่ดำเป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่งที่พบได้ทั่วไปในทุกภูมิภาคของประเทศไทย และมีการนำสบู่ดำมาใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรค แต่ที่สำคัญคือ น้ำมันที่สกัดได้จากเมล็ดสบู่ดำสามารถใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลทางการเกษตรได้ และเนื่องจากน้ำมันเมล็ดสบู่ดำประกอบด้วยกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวสูงประมาณ 78.72 เปอร์เซ็นต์ (ระพีพันธุ์, 2525) สบู่ดำจึงเป็นพืชที่น่าสนใจในการนำมาใช้เป็นพืชพลังงานทดแทนในสถานะที่น้ำมันดีเซลมีราคาสูง ปัจจุบันสบู่ดำที่พบมีพันธุ์กรรมที่ยังไม่เป็นที่ต้องการ เช่น การมีสารพิษ ผลผลิตต่ำ ผลมีขนาดเล็ก ปริมาณน้ำมันที่สกัดได้น้อยเมื่อเทียบกับพืชน้ำมันชนิดอื่น และปัญหาที่สำคัญคือ ลักษณะการทยอยสุกแก่ของผล ทำให้ค่าจ้างแรงงานในการเก็บเกี่ยวสูงเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิต (ทวีศักดิ์, 2548; Heller, 1996)

ฐานพันธุ์กรรมที่แคบของสบู่ดำเป็นปัญหาหลักด้านความก้าวหน้าในการปรับปรุงพันธุ์ การพัฒนาพันธุ์สบู่ดำเพื่อเพิ่มผลผลิตหรือปรับปรุงลักษณะอื่น ๆ ให้ดีขึ้น จำเป็นต้องเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้มากขึ้น เป็นการสร้างลักษณะใหม่ ๆ ที่พึงประสงค์ให้กับสบู่ดำ นอกจากการขยายพันธุ์สบู่ดำด้วยวิธีการปกติแล้วยังมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งรังสีแกมมาเป็นสิ่งก่อกลายพันธุ์ชนิดหนึ่งที่มักเป็นทางเลือกในลำดับต้น ๆ ที่นำมาใช้เพื่อเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมในพืชที่มีฐานพันธุ์กรรมแคบ เป็นการเพิ่มโอกาสการคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมที่ดีและเป็นที่ต้องการ เช่น ผลผลิตสูง ผลมีขนาดใหญ่ (Datta, 2009) จึงเป็นที่มาของการทำวิทยานิพนธ์เรื่องนี้เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในลักษณะต่าง ๆ ของสบู่ดำ เช่น ลำต้นเตี้ย การออกดอกเร็วขึ้น เป็นต้น เพื่อประโยชน์ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสนุ่นดำ
2. ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสนุ่นดำในลักษณะต่าง ๆ เช่น ลักษณะออกดอกเร็ว ต้นเตี้ยในสนุ่นดำ โดยใช้รังสีแกมมา



การตรวจเอกสาร

สบู่ดำ

สบู่ดำ (physic nut) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* L. เป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่ง โดยมีถิ่นกำเนิดที่อเมริกากลาง (Latin America) แพร่กระจายทั่วไปในแอฟริกาและเอเชีย สบู่ดำเป็นพืชที่เหมาะสมสำหรับบริเวณพื้นที่กึ่งแห้งแล้ง เพราะต้นสบู่ดำชอบขึ้นในบริเวณที่มีอากาศร้อน สภาพดินไม่ค่อยอุดมสมบูรณ์ ซึ่งเหมาะสมกับดินฟ้าอากาศในประเทศไทย ทำให้มีการปลูกสบู่ดำแพร่กระจายทั่วไปในทุกภูมิภาค สบู่ดำมีความเป็นพิษ โดยลำต้น ผล และเมล็ดมีกรดไฮโดรไซยานิก (hydrocyanic) นอกจากนี้ในเมล็ดสบู่ดำมีสาร curcin หรือ curcasin ซึ่งเป็นพิษกับมนุษย์และสัตว์ (ทวีศักดิ์, 2548) น้ำมันที่สกัดได้จากเมล็ดสบู่ดำสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันดีเซลกับเครื่องจักรกลทางการเกษตรได้ เมล็ดสบู่ดำมีปริมาณน้ำมันร้อยละ 35 ของน้ำหนักเมล็ด เมล็ดจำนวน 4 กิโลกรัม นำมาสกัดน้ำมันได้ 1 ลิตร และเหลือเป็นกาก จำนวน 3 กิโลกรัม โดยพบว่า น้ำมันที่สกัดได้มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ซึ่งจะทำให้น้ำมันมีคุณสมบัติที่ไม่แข็งตัวเมื่ออุณหภูมิต่ำ โดยน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำจะแข็งตัวที่อุณหภูมิ -7 องศาเซลเซียส ซึ่งเหมาะในการนำมาผลิตเป็นไบโอดีเซล (สุขสันต์และระพีพันธุ์, 2544)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ทวีศักดิ์ (2548) และ Heller (1996) รายงานถึงลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสบู่ดำโดยแบ่งออกเป็นส่วนต่าง ๆ ดังนี้

ราก (root) ต้นสบู่ดำที่เพาะจากเมล็ดจะมีรากแก้ว โดยมีการเจริญเติบโตในทางลึก แนวตั้งลงดิน หลังจากนั้นจะมีการแตกรากแขนง เมื่อต้นสบู่ดำมีอายุมากขึ้นจะมีรากฝอยกระจายทั่วไป

ลำต้น (stem) สบู่ดำเป็นไม้เนื้ออ่อน ไม่มีแก่น ลำต้นอวบเกลี้ยง ไม่มีขน ลำต้นอ่อนมีสีเขียว เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลปนเขียว ลำต้นและกิ่งจะมียาง (latex)

ใบ (leaf) สบู่ดำเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ใบเป็นใบเดี่ยว (simple leaf) โดยมีการเรียงตัวของเส้นใบแบบร่างแห (palmately netted venation) เส้นใบเรียงขนานกันออกจากฐานใบไปทาง

ปลายใบ และมีเส้นใบย่อยระหว่างเส้นใบนี้แตกแขนงหรือคล้ายประสานกันเป็นร่างแห ใบเรียงตัวแบบสลับ (alternate) รูปร่างใบคล้ายใบฝ้าย ใบพุดตาล หรือใบละหุ่ง แต่หนากว่า เพราะมีไข (cutin) เคลือบอยู่ที่ผิว แผ่นใบเรียบ ขอบใบหยักเป็นพู มี 5-7 แฉก พูข้างปลายมน พูปลายหรือพูกลางรูปหัวใจ ปลายใบมีขนาดกว้างประมาณ 6-10 เซนติเมตร และยาวประมาณ 15 เซนติเมตร ยอดและใบอ่อนมีสีม่วงแกมเขียว

ดอก (flower) ดอกจะออกบริเวณซอกใบเป็นช่อกระจุกบริเวณปลายของยอด ลักษณะเป็นช่อพวง ช่อยาวได้ถึง 12 เซนติเมตร ก้านช่อยาวประมาณ 6 เซนติเมตร ดอกมีขนาดเล็ก สีเหลือง มีกลิ่นหอมอ่อน ๆ โดยดอกจะเริ่มบานจากล่างขึ้นบน เป็นดอกไม่สมบูรณ์เพศ (imperfect) ในต้นเดียวกันมีทั้งดอกเพศผู้และดอกเพศเมีย (monoecious plant) อยู่ภายในช่อเดียวกัน ดอกเพศผู้มีประมาณร้อยละ 70 และดอกเพศเมียมีประมาณร้อยละ 30 โดยดอกเพศผู้มีกลีบเลี้ยงเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็นแฉกรูปไข่ มีต่อมน้ำหวานที่โคนกลีบด้านใน เกสรเพศผู้มี 10 อัน แบ่งออกเป็น 2 วง วงนอกแยกจากกัน วงในเชื่อมติดกัน อับเรณูมีสีเหลืองยาว 1.5 มิลลิเมตร ดอกเพศเมียมีขนาดใหญ่กว่าดอกเพศผู้ อยู่กลางของช่อย่อย กลีบเลี้ยงเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็นแฉกยาวประมาณ 4 มิลลิเมตร ลักษณะอื่นคล้ายดอกเพศผู้ มีรังไข่รูปกระสวย มี 3 พู ปลายก้านมียอดเกสรเพศเมียแยกเป็น 2 แฉก

ผล (fruit) ผลมีรูปร่างค่อนข้างป้อมคล้ายกระสวย ลักษณะเป็นแบบเปลือกแข็ง (capsule) เป็นพู (lobes) เกือบกลม กว้าง 2-3 เซนติเมตร ยาว 2.5-3.5 เซนติเมตร ผลอ่อนมีสีเขียวอ่อน ผลแก่จัดหรือสุกจะมีสีเหลืองและเปลี่ยนเป็นสีดำ หนึ่งผลมี 2-3 เมล็ด ส่วนใหญ่มีจำนวน 3 เมล็ด ผลสดหนึ่งผลมีน้ำหนักประมาณ 15 กรัม ผลแห้งน้ำหนักจะลดลงเหลือ 2.6 กรัม ระยะเวลาตั้งแต่ออกดอกจนผลแก่ใช้เวลาประมาณ 60-90 วัน

เมล็ด (seed) เมล็ดจากผลแก่มีสีดำผิวเรียบเป็นมัน แต่เมื่อเมล็ดแห้งผิวจะหยาบไม่เรียบ มีขนาดประมาณ 1.0x2.0 เซนติเมตร เปลือกสีดำแข็งหนาหุ้ม เมื่อกะเทาะเปลือกออกจะพบเนื้อในสีขาว (kernel) ซึ่งเป็นส่วนที่จะนำไปสกัดน้ำมัน โดยมีน้ำมันเป็นส่วนประกอบประมาณ 33-60 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเมล็ดแห้ง โดยในเมล็ดมีสารพิษหลายชนิดเช่น เคอร์ซิน (curcin) กรดไซยานิก (cyanic acid) และโฟโบเอสเตอร์ (phorbol ester)

ประโยชน์ของสับดูดำ สับดูดำมีประโยชน์หลายประการ โดยเกือบทุกส่วนของสับดูดำสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ (สุขสันต์และระพีพันธ์, 2544; ทวีศักดิ์, 2548; Heller, 1996; Reinhard, 2005) ตัวอย่างประโยชน์จากสับดูดำ ได้แก่

การปลูกสับดูดำเพื่อใช้เป็นรั้วล้อมรอบพื้นที่ที่ปลูกพืชเศรษฐกิจที่สำคัญเนื่องจากสับดูดำมีกรดไฮโดรไซยานิก (hydrocyanic) มีกลิ่นเหม็นเขียว สารเคมีจากต้นสับดูดำที่ปล่อยออกมาจะขับไล่แมลงศัตรูของพืชที่อยู่ใกล้เคียง และยังสามารถป้องกันสัตว์เลื้อยเข้ามาก่อความเสียหายต่อพืช นอกจากนี้รากของสับดูดำช่วยยึดเกาะผิวดิน เป็นการช่วยลดการกัดเซาะหน้าดินจากลมและน้ำ

การใช้เป็นอาหารของคนและสัตว์ โดยส่วนของใบอ่อนหรือยอดอ่อนสามารถรับประทานได้ โดยนำไปนึ่งด้วยไอน้ำร้อน เพื่อทำลายกรดไฮโดรไซยานิกซึ่งเป็นสารพิษ ในบางพื้นที่ของประเทศเม็กซิโกมีการนำเมล็ดสับดูดำมาต้มและคั่วด้วยความร้อนเพื่อนำรับประทาน นอกจากนี้กากสับดูดำ (press cake) ที่เหลือจากการสกัดน้ำมันมีคุณค่าทางอาหารสูง การใช้เป็นอาหารสัตว์นั้นจำเป็นต้องนำกากสับดูดำผ่านความร้อนร่วมกับการสกัดด้วยสารเคมี หรือการหมักกากสับดูดำด้วยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* เพื่อทำลายพิษของสับดูดำก่อนนำไปผสมเป็นอาหารสัตว์ เนื่องจากกากสับดูดำประกอบไปด้วยสารพิษมากมายเช่น เคอร์ซีน (curcin) โฟโบลิก เอสเตอร์ (phorbolic ester) แซฟโฟนิน (saponin) โปรตีเอส (protease) และไฟเทท (phytates)

การใช้เป็นยาสมุนไพรในการรักษาโรค มีการนำส่วนต่าง ๆ ของสับดูดำมาใช้เป็นยา รักษาโรค เช่น ลำต้นใช้เป็นยาถ่าย และเป็นยารักษาโรคทางหรือตาขโมย เปลือกใช้เป็นยาถ่าย ขับพยาธิ แก้ปวดท้อง กิ่งก้านใช้ห้ามเลือด รักษาโรคฟัน โรคผิวหนัง ใบใช้เป็นยารักษาอาการไอและมีฤทธิ์เป็นสารต้านจุลินทรีย์ แก้พิษตานซาง แก้ปากและลิ้นพุพอง แก้ลิ้นเป็นฝ้าละออง ถอนพิษที่ทำให้อ้วน เมล็ดใช้เป็นยาระบาย ยาถ่ายชนิดรุนแรง แก้ปวดตามข้อ แก้โรคผิวหนัง น้ำมันใช้เป็นยารักษาโรคผิวหนัง บรรเทาอาการเจ็บปวดจากโรคไขข้อหรือโรคปวดกล้ามเนื้อ และใช้เป็นยาถ่ายซึ่งมีฤทธิ์รุนแรง น้ำยางใช้เป็นยารักษาอาการของโรคปากนกกระจอก ห้ามเลือด ต่อต้านการติดเชื้อ แก้ปากเปื่อย พุพอง และผสมกับน้ำมันมะรดาควาดป้ายลิ้นเด็กที่มีฝ้าขาวหรือคอเป็นค่อม

การใช้สารสกัดในการกำจัดโรค แมลงศัตรูพืช และหอย ใช้สารสกัดจากเมล็ดสับดูดำในการใช้เป็นยาฆ่าแมลง สารสกัดจากใบสับดูดำสามารถควบคุมโรคพืชของ *Azolla* ที่มีสาเหตุจาก

เชื้อรา *Sclerotium* sp. และในประเทศฟิลิปปินส์ใช้สารสกัดจากสปูดำกำจัดหอยที่เป็นพาหะของ พยาธิในตับ (liver fluke) และใช้กำจัดหอยที่เป็นพาหะของพยาธิ *Fasciola gigantica*

การใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ ส่วนต่าง ๆ ของสปูดำสามารถนำมาทำเป็นปุ๋ยพืชสดได้ และ กากของสปูดำที่เหลือจากการสกัดน้ำมันสามารถนำมาทำปุ๋ยอินทรีย์สำหรับบำรุงดินโดยพบว่า กาก สปูดำมีอินทรีย์วัตถุสูงกว่าปุ๋ยชนิดอื่น ๆ เช่น มูลเป็ด มูลกระบือ ปุ๋ยหมักจากฟางข้าว โดยมี ไนโตรเจน 4.44 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัส 2.09 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียม 1.68 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อ เปรียบเทียบกับมูลไก่จะพบว่า กากสปูดำแม้จะมีฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมน้อยกว่า แต่กากสปูดำ มีปริมาณไนโตรเจนมากกว่ามูลไก่

การใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทน โดยน้ำมันที่สกัดได้จากเมล็ดของสปูดำสามารถ ใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลกับเครื่องยนต์ดีเซลรอบต่ำ และเครื่องยนต์ทางการเกษตรได้โดยไม่ต้องผสม กับน้ำมันดีเซล น้ำมันสปูดำมีค่าออกซิเจนสูงและมีสารหล่อลื่นให้เครื่องยนต์ทำงานได้มี ประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นและมีราคาไม่แพง ต่างจากน้ำมันชีวภาพอื่น ๆ เช่น น้ำมันมะพร้าว น้ำมัน ปาล์ม จะต้องผสมกับน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนที่เหมาะสมก่อนนำไปใช้ นอกจากนี้การใช้น้ำมันสปู ดำกับเครื่องยนต์ดีเซลยังให้ผลดีไม่มียางเหนียวติดที่ลูกสูบ

แอนนา และคณะ (2546) ได้ศึกษาแหล่งพันธุ์กรรมสปูดำและรวบรวมพันธุ์จากทั้ง 4 ภาค ของประเทศไทย สามารถรวบรวมพันธุ์กรรมสปูดำได้ทั้งหมด 83 accession นำมาปลูกเพื่อศึกษา ลักษณะต่าง ๆ ของแต่ละพันธุ์สปูดำจากแหล่งต่าง ๆ ที่พบสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม (ทวีศักดิ์, 2548)

กลุ่มที่ 1 พันธุ์ของสปูดำที่มีผลทรงกลม ขนาดของผลปานกลาง มีเปลือกหนาปาน กลาง

กลุ่มที่ 2 พันธุ์ของสปูดำที่มีผลทรงกลมหรือรูปทรงของผลยาวกว่ากลุ่มแรก เล็กน้อย ขนาดของผลปานกลาง และมีเปลือกหนากว่ากลุ่มแรก

กลุ่มที่ 3 พันธุ์ของสปูดำที่มีผลทรงกลมแต่มีขนาดเล็กกว่าสองกลุ่มแรก

การขยายพันธุ์สับดูดำ สามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธี ดังนี้ (ทวีศักดิ์, 2548; สมบัติ, 2548)

การเพาะเมล็ด เนื่องจากเมล็ดสับดูดำไม่มีระยะพักตัว จึงควรเพาะเมล็ดทันทีหลังเก็บเมล็ดมา ซึ่งการเก็บเมล็ดควรเก็บขณะที่ผลมีสีเหลืองแก่แก่มน้ำตาล นำเมล็ดมาเพาะในถุงเพาะหรือกระบะทราย อย่างน้อย 45-60 วัน จึงย้ายปลูก สำหรับต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดจะให้ผลผลิตหลังการย้ายปลูกประมาณ 8-10 เดือน

การเพาะเมล็ด เนื่องจากเมล็ดสับดูดำไม่มีระยะพักตัว จึงควรเพาะเมล็ดทันทีหลังเก็บเมล็ดมา ซึ่งการเก็บเมล็ดควรเก็บขณะที่ผลมีสีเหลืองแก่แก่มน้ำตาล นำเมล็ดมาเพาะในถุงเพาะหรือกระบะทราย อย่างน้อย 45-60 วัน จึงย้ายปลูก สำหรับต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดจะให้ผลผลิตหลังการย้ายปลูกประมาณ 8-10 เดือน

การปักชำ คัดเลือกท่อนพันธุ์ที่มีสีน้ำตาลปนเขียว ไม่อ่อนหรือแก่เกินไป ตัดเป็นท่อนยาวประมาณ 15-20 เซนติเมตร เพาะในถุงดำ หรือ 45-50 เซนติเมตร สำหรับเพาะในแปลง ใช้เวลาปักชำประมาณ 2 เดือน จึงนำไปปลูก โดยจะให้ผลผลิตหลังการย้ายปลูกประมาณ 6-8 เดือน

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยนำส่วนต่าง ๆ ของสับดูดำเช่น ใบ ก้าน ช่อ และยอด มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ และมีการควบคุมสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ให้เหมาะสม

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ การนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชไม่ว่าจะเป็นอวัยวะ เนื้อเยื่อหรือเซลล์ มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุ น้ำตาล วิตามินและสารควบคุมการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และอยู่ในสภาวะควบคุมสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ แสงและความชื้น โดยส่วนของพืชเหล่านี้มีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้หลายรูปแบบ คือ การพัฒนาเป็นต้นโดยตรง การเกิดเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo) หรือการเกิดเป็นเอ็มบริอยด์ (embryoid) และเมื่อตัดแบ่งเป็นชิ้น ๆ แล้วเปลี่ยนอาหารก็สามารถเพิ่มปริมาณได้ไม่มีที่สิ้นสุด และต้นพืชที่ได้จะมีลักษณะเหมือนกันทุกประการ (อรดี, 2539)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะประสบความสำเร็จมากน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างที่มีบทบาทควบคุมการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ ปัจจัยภายในพืช (endogenous factors) เช่น ลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (phytohormone) และปัจจัยภายนอก เช่น แสง (light) อุณหภูมิ (temperature) สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators) รวมถึงปัจจัยอื่น ๆ เช่น ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง สภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและส่วนประกอบของพืช (ไพบูลย์, 2524; สิริสุข, 2536)

มีงานวิจัยที่นำเอาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ในการพัฒนาต้นสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) และพืชในสกุล *Jatropha* โดยมีการทดสอบร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตหลายชนิด ซึ่งฮอร์โมน Thidiazuron (TDZ) และ 6-benzyladenine (BA) เป็นฮอร์โมนที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำเช่นกัน โดย TDZ และ BA เป็นฮอร์โมนที่อยู่ในกลุ่มไซโตไคนิน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแบ่งและการยืดตัวของเซลล์ ส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของตาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากคุณสมบัติข้างต้น มีการใช้ประโยชน์จากฮอร์โมน TDZ และ BA ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยใช้เติมในสูตรอาหารเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของแคลลัสและกระตุ้นให้แคลลัสพัฒนาเป็นยอดและต้น นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ในการเร่งการแตกตาของพืช ซึ่งมีประโยชน์ในด้านการควบคุมทรงพุ่มและเป็นประโยชน์ในการขยายพันธุ์พืชด้วยการติดตา (พีรเดช, 2537) งานวิจัยเกี่ยวกับสบู่ดำและพืชในสกุล *Jatropha* โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับฮอร์โมน TDZ และ BA และฮอร์โมนชนิดอื่น ได้แก่

Sujatha and Dhingra (1993) ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดตา ยอดจากชิ้นส่วนของ hypocotyls ก้านช่อดอกและใบในเข็มปัตตาเวีย (*J. integrerrima* Jacq.) โดยทดสอบในอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA และ IBA ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้ชิ้นส่วนต่าง ๆ ของเข็มปัตตาเวียเกิดเป็นตา ยอด คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

Sujatha and Mukta (1996) ทดสอบสูตรอาหารเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก จากส่วนของ hypocotyl และก้านใบของสบู่ดำ พบว่า อาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 2.22 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 4.90 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดตา ยอดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 6 สัปดาห์ และสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้แคลลัสจาก hypocotyl เกิดเป็นยอดได้ดีที่สุด คือ 43 เปอร์เซ็นต์ พบในอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 2.22

ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.49 ไมโครโมลาร์ และอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 0.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.49 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสที่ชักนำได้จากส่วนของก้านใบดีที่สุด คือ 67 เปอร์เซ็นต์

Sardana and Batra (2000) ทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำการเกิด somatic embryos ในสับดูดา โดยนำส่วนของใบมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS-Gamborg's ที่มี BA ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำใบให้เกิดเป็น embryogenic callus และ globular embryos คือ อาหารแข็งสูตร MS-Gamborg's ที่มี BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

Sujatra and Reddy (2000) ศึกษาการตอบสนองของเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ในเข็มปัตตาเวีย (*J. integririma* Jacq.) ได้แก่ ส่วนของลำต้น ก้านช่อดอก ใบ และ hypocotyl ที่มีต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน โดยทดสอบบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA, Kn และ zeatin พบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินประเภท BA ให้ผลดีที่สุดในการชักนำให้ส่วนของลำต้น ก้านช่อดอก ใบ และ hypocotyl เกิดยอดมากที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 19 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยส่วนที่เกิดยอดมากที่สุดคือส่วนของลำต้นและใบ

Rajore *et al.* (2002) ศึกษาการเพิ่มจำนวนยอดของสับดูดาโดยใช้ส่วนของข้อ (node) พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดมากที่สุด คือ อาหารแข็งสูตรดัดแปลงของ MS ที่มี Kn ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการให้ ascorbic acid ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร citric acid ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร adenine sulphate ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ glutamine ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

Qin *et al.* (2004) ศึกษาการเพิ่มจำนวนยอดของสับดูดา โดยการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากชิ้นส่วนของ epicotyl บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ร่วมกับ IBA พบว่า อาหารแข็ง MS ที่มี BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้ส่วนของ epicotyl เกิดยอดดีที่สุด

Rajore and Batra (2005) ศึกษาการเพิ่มจำนวนต้นของสับดูดาโดยใช้ส่วนปลายยอด (shoot tip) เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลงของ MS ที่มี BA, Kinetin และ indole-3-acetic acid (IAA) ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำปลายยอดให้เกิดยอด คือ อาหารแข็งสูตรดัดแปลงของ MS ที่มี BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำยอดให้เกิดรากคือ อาหารแข็งสูตรของ MS ที่มี IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นนำต้นที่ได้มาปลูกในแปลงทดลอง พบว่า มีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์

Sujatha *et al.* (2005) ศึกษาการเพิ่มจำนวนต้นสับดูดาในหลอดทดลอง โดยใช้ชิ้นส่วนตาข้าง (axillary bud) และใบของสับดูดาพันธุ์ไม่มีพิษ นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง ที่มีเกลือ ร่วมกับ BA kinetin และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นจึงย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี BA ความเข้มข้นตั้งแต่ 4.4-8.9 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเมื่อไม่คำนึงถึงความเข้มข้นของ BA ที่ใช้ พบว่า อัตราการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากที่เหมาะสม (เฉลี่ย 10-12.30 ยอด) พบในการเพาะเลี้ยงบนอาหารเริ่มต้นที่มี TDZ ความเข้มข้น 2.3-4.5 ไมโครโมลาร์ และประสิทธิภาพของการชักนำให้เกิดยอดจากส่วนใบ พบในการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 8.9-44.4 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 4.9 ไมโครโมลาร์ จากนั้นจึงย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 8.9 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์

นันทน์ภัส (2549) ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณของสับดูดาจากชิ้นส่วนยอดที่เกิดจากตาข้าง ก้านใบ และใบของสับดูดาในหลอดทดลอง โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA เพียงชนิดเดียวหรือร่วมกับ indole-3-butyric acid (IBA) ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยแบ่งการเพาะเลี้ยงเป็นสองรอบคือ รอบที่ 1 ชักนำการเกิดแคลลัส และการชักนำให้เกิดยอดในรอบการเพาะเลี้ยงที่ 2 โดยแต่ละรอบจะใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 30 วัน สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดที่ดีที่สุดจากส่วนของตาข้างคือ อาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 2.22 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.049 ไมโครโมลาร์ และอาหารสูตรที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดจากชิ้นส่วนก้านใบและใบคือ อาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 2.46 ไมโครโมลาร์ และ BA ความเข้มข้น 8.88 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 4.90 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดจากชิ้นส่วนก้านใบและชิ้นส่วนใบเท่ากับ 70 และ 83.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ศิริวรรณ และ รุ่งทิพย์ (2550) นำเนื้อเยื่อจากส่วนต่าง ๆ ของต้นสนับดำพันธุ์ FBR2-2 A16 A20 และ A21 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาและได้รับการคัดเลือกมาแล้ว ได้แก่ ส่วนของตายอด ตาข้าง ใบอ่อน ก้านใบ และ hypocotyl เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีฮอร์โมน kinetin, BA, NAA, 2,4-D, IBA, TDZ, putrescine และ picloram ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า เนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของต้นสนับดำที่นำมาใช้ทดลอง มีการตอบสนองต่ออาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงได้อย่างรวดเร็ว เนื้อเยื่อพัฒนาเป็นแคลลัสได้ง่าย แคลลัสที่มีลักษณะดีเป็นแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01-1 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่ได้เป็นชนิด embryogenic callus ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นต้นจำนวนมากได้

การกลายพันธุ์ของพืช

การกลายพันธุ์ (mutation) คือ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมของเซลล์ และหากมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างภายในยีน เรียกว่า การกลายพันธุ์ของยีน (gene mutation) แต่หากมีการแลกเปลี่ยน การสูญหาย หรือการเพิ่มขึ้นของส่วนของโครโมโซม เรียกว่า การกลายพันธุ์ของโครโมโซม (chromosome mutation) ซึ่งการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induced mutation) ในพืชเป็นวิธีการที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้เร็วขึ้นและสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไปได้ โดยทั่วไปแล้วการกลายพันธุ์สามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติมีอัตราการเกิดต่ำ จึงต้องมีการกระตุ้นเพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในอัตราที่สูงและเกิดขึ้นในระยะเวลาที่รวดเร็ว ก่อให้เกิดความแปรปรวนของลักษณะพันธุกรรมที่เป็นประโยชน์ในการคัดเลือกต่อไป การปรับปรุงพันธุ์จะทำให้ได้พืชพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะดีขึ้น เช่น ทนต่อโรคและแมลง ทนต่อสภาพที่ไม่เหมาะสม ทนต่อดินเค็มและทนแล้ง การชักนำการกลายพันธุ์เป็นที่นิยมไปทั่วโลก ปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์พืช การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเนื้อเยื่อนำมาเพาะเลี้ยงหรือแคลลัส ทำให้ได้ลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปช่วยเพิ่มโอกาสในการคัดเลือกลักษณะที่พึงประสงค์ได้มากขึ้น ทั้งยังช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย แรงงาน เวลาและประหยัดพื้นที่ในการเพาะเลี้ยง สิ่งก่อกลายพันธุ์ที่นำมาใช้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ (สิรินุช, 2536) Physical mutagen เช่น อุณหภูมิ และรังสีต่าง ๆ และ Chemical mutagen เช่น ethylmethane sulphonate (EMS), diethyl sulphate (dES)

รังสีที่ใช้เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์

รังสี (radiation) หมายถึง พลังงานที่ออกมาในรูปของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic wave) หรือโฟตอน (photon) หรือออกมาในรูปของอนุภาคที่มีขนาดเล็ก (particulate radiation) ซึ่งสามารถแบ่งรังสีตามพลังงานที่มีอยู่ในตัวออกเป็น 2 ประเภทคือ รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (non-ionizing radiation) และรังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) (สิรินุช, 2536)

1. รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน คือ รังสีที่มีพลังงานไม่มากพอที่จะทำให้เกิดไอออน แต่สามารถทำให้อะตอมหรือโมเลกุลอยู่ในสถานะที่เรียกว่า excitation ทำให้มีการกำจัดพลังงานออกจากอะตอมหรือโมเลกุลดังกล่าวต่อไป โมเลกุลหรืออะตอมเหล่านั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีหรือชีวเคมี รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออนได้แก่ รังสี UV (ultraviolet light) แสงสว่าง อินฟราเรด รังสีเลเซอร์ และไมโครเวฟ เป็นต้น รังสี UV มีพลังงานต่ำไม่สามารถทำให้เกิด ionization ได้ แต่สามารถทำให้สิ่งมีชีวิตตายหรือเกิดการกลายพันธุ์ได้โดยเฉพาะในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว เช่น แบคทีเรีย ราหรือเซลล์เนื้อเยื่อที่ถูกเพาะเลี้ยง (สิรินุช, 2536)

2. รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน คือ รังสีที่มีพลังสูงพอที่จะทำให้เกิด ion pair ในตัวกลางที่รังสีผ่านไป ซึ่งจะทำให้อะตอมหรือโมเลกุล เกิดการสูญเสียอิเล็กตรอนหรือได้อิเล็กตรอนเพิ่มขึ้นมา หากเกิดการสูญเสียอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่มีประจุบวก และหากได้อิเล็กตรอนเพิ่มขึ้นมาจะมีประจุลบจึงเรียกอะตอมหรือโมเลกุลที่มีประจุบวกหรือลบดังกล่าวว่าไอออน กระบวนการก่อให้เกิดไอออน เรียกว่า ไอออไนเซชัน (ionization) รังสีที่ก่อให้เกิดไอออนจัดเป็นรังสีประเภทอนุภาค ได้แก่ รังสีแอลฟา (alpha) รังสีบีตา (beta) รังสีนิวตรอน (neutron) ส่วนรังสีที่ก่อให้เกิดไอออนและเป็นรังสีในรูปโฟตอนหรือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ได้แก่ รังสีแกมมา (gamma) รังสีเอกซ์ (x-ray) (สิรินุช, 2536)

รังสีแกมมา เป็นรังสีคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นสั้นมาก มีอำนาจในการทะลุทะลวงสูง เกิดจากการสลายตัว (decay) ของนิวเคลียสของสารกัมมันตรังสี (radioactive substance) สารกัมมันตรังสีที่สลายตัวให้รังสีแกมมา ได้แก่ Cobalt-60 (Co-60), Cesium-137 (Cs-137) และ Manganese-56 (Mn-56) เป็นต้น รังสีแกมมาได้รับความนิยมในการใช้เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืช การฉายรังสีสามารถทำได้ 2 แบบ คือ การฉายรังสีแบบเฉียบพลัน (acute irradiation) เป็นการฉายรังสีให้เสร็จสิ้นในระยะเวลาอันสั้นโดยใช้รังสีปริมาณที่สูง นิยม

ฉายรังสีกับเมล็ด ละอองเกสรตัวผู้ และเนื้อเยื่อนำมาเพาะเลี้ยง โอกาสที่เซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ได้รับรังสีจะเกิดการกลายพันธุ์มีสูง แบบที่ 2 เป็นการฉายรังสีแบบเรื้อรัง (chronic irradiation) เป็นการฉายรังสีโดยใช้ระยะเวลาและใช้รังสีในปริมาณที่ต่ำ นิยมใช้ฉายรังสีกับพืชทั้งต้น หน่อ กิ่งตอน และกิ่งปักชำ เซลล์และเนื้อเยื่อจะมีโอกาสได้รับรังสีอย่างทั่วถึง นอกจากนี้เครื่องฉายรังสีแกมมายังมีหลายรูปแบบแบ่งตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน เช่น ไร่รังสีแกมมา เรือนกระจกรังสี เครื่องฉายรังสีแกมมาแบบปิด และห้องรังสีแกมมา เป็นต้น (สิรินุช, 2536)

ผลของรังสีต่อเซลล์

รังสีทำให้อะตอมต่าง ๆ ภายในเซลล์เกิดแตกตัวเป็นไอออน โดยเฉพาะการเกิด chemical radicals ที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาและก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีขึ้นภายในเซลล์ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าว อาจทำให้เกิดความเสียหายต่อการทำหน้าที่ต่าง ๆ ของเซลล์ อาจทำให้เซลล์ถูกทำลายหรือเกิดการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติ (สิรินุช, 2536)

สิรินุช (2536) ได้กล่าวถึงผลของรังสีที่มีต่อเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic cells) ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของข้อมูลทางพันธุกรรม เมื่อเนื้อเยื่อได้รับรังสีจะทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอเกิดการเปลี่ยนแปลงที่สามารถตรวจสอบได้ดังนี้

1. เกิดการสลายตัวของพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ที่เชื่อมระหว่างคู่เบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ
2. เกิดการตัดขาดระหว่างพันธะที่เชื่อมระหว่างฟอสเฟต ที่ทำหน้าที่เป็นสายหลัก (backbone) ของดีเอ็นเอ (phosphate diester bond) ทำให้เกิด single strand break และ double strand break
3. เกิดการแตกหักบริเวณพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) อื่น ๆ ของดีเอ็นเอ
4. เกิด cross-linkage ระหว่างสายภายในสายของดีเอ็นเอ

5. เกิด dimer ระหว่าง pyrimidine base ภายในสายดีเอ็นเอสายใดสายหนึ่ง เช่น เกิด TT หรือ CC เป็นต้น

6. เกิด DNA – protein crosslink เป็นการเชื่อมต่อระหว่างเบสและกรดอะมิโนด้วย sulfide linkage (SH)

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอ

หลังจากที่โมเลกุลของดีเอ็นเอได้รับรังสีแล้ว เซลล์จะมีคุณสมบัติเฉพาะในการซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอได้ กระบวนการซ่อมดีเอ็นเอมีหลายชนิดทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเสียหายของดีเอ็นเอว่าเกิดขึ้นมากน้อยเพียงใด หากมีความเสียหายเล็กน้อย เซลล์จะสามารถซ่อมแซมให้คืนสู่สภาพปกติได้ แต่หากเกิดความเสียหายมากการซ่อมแซมต้องใช้วิธีพิเศษประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้อง และบางครั้งไม่สามารถซ่อมแซมให้กลับเป็นปกติได้ แต่กลับทำให้เกิดความเสียหายมากขึ้น ถ้าความเสียหายนั้นยังคงอยู่และสามารถส่งความเสียหายต่อไปยังรุ่นลูกหลานได้จะเรียกว่า การกลายพันธุ์ (สิรินุช, 2536; อรุณี, 2550)

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับโครโมโซม

รังสีทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนหรือโครงสร้างของโครโมโซมได้ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าว เรียกว่า การกลายพันธุ์ของโครโมโซม ลักษณะที่เปลี่ยนแปลงเกิดจากการที่โครโมโซมแตกหักเนื่องจากรังสี และมีการเชื่อมต่อกันหรืออาจทำให้ชิ้นส่วนขาดหายไป (deletion) การขาดหายไปของโครโมโซมทำให้ชิ้นจำนวนหนึ่งหายไปด้วย สำหรับการเชื่อมต่อกันถ้าเชื่อมต่อกันเหมือนเดิมก็ไม่มีเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นกับสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ แต่การเชื่อมอย่างผิดปกติ เช่น มีชิ้นส่วนโครโมโซมเพิ่มขึ้นมา (duplication) การเชื่อมแบบกลับทิศ (inversion) หรือเกิดการเชื่อมสลับคู่ระหว่างโครโมโซมต่างคู่กัน (translocation) จะเป็นผลให้สิ่งมีชีวิตนั้น ๆ เกิดการเปลี่ยนแปลงไปได้ การเปลี่ยนแปลงนี้จะมีผลมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับชนิดของยีนและจำนวนยีนที่เกี่ยวข้อง (สิรินุช, 2536; อรุณี, 2550)

การฉายรังสีแกมมาเพื่อชักนำการกลายพันธุ์ในสับดูดำและพืชชนิดอื่น

มีรายงานเกี่ยวกับการชักนำการกลายพันธุ์ในสับดูดำเพื่อปรับปรุงลักษณะและคุณภาพของพืช ในการผลิตและสร้างเมล็ด ปริมาณน้ำมันในเมล็ดรวมถึงการเร่งการสุกแก่ของสับดูดำ โดยเป้าหมายหลักคือ ความต้องการไปโอดีเซล โดยใช้กิ่งของสับดูดำขนาดยาวประมาณ 30 เซนติเมตรนำไปฉายรังสีแกมมาที่ระดับ 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 กิโลเรด การคัดเลือกลักษณะจะเริ่มทำในรุ่น M_1V_2 พบว่า ปริมาณรังสีแกมมา 2.0 และ 2.5 กิโลเรด ส่งผลให้เกิดความเสียหายกับยีนที่ควบคุมการเจริญเติบโตและการพัฒนาของสับดูดำ ซึ่งจะแสดงลักษณะเตี้ยแคระ ผลผลิตน้อยและมีการเจริญเติบโตที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่อัตรารังสีที่ระดับ 1.0 กิโลเรด พบว่า สับดูดำมีการเจริญและน้ำหนักร้อยละมากกว่าชุดควบคุม 30 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นสับดูดำที่สภาวะดังกล่าวยังมีระยะเวลาในการสุกแก่เร็วกว่าชุดควบคุมอีกด้วย ซึ่งปริมาณรังสีที่ระดับ 1.0 ถึง 2.5 กิโลเรดเพียงพอต่อการชักนำให้เกิดการกลายในกิ่งปักชำสับดูดำ (Dwimahyani and Ishak, 2004)

นพรัตน์ (2552) ฉายรังสีแกมมาในกิ่งปักชำบานชื่นเลื้อยใบด่างที่ระดับ 10 ถึง 100 เกรย์ หลังฉายรังสี 60 วัน พบว่า รังสีแกมมาส่งผลต่อการเจริญเติบโตของบานชื่นเลื้อยใบด่าง ซึ่งเมื่อปริมาณรังสีสูงขึ้นมีผลให้อัตราการเจริญเติบโตในลักษณะความสูง ความกว้างทรงพุ่มและจำนวนกิ่งแขนงลดลง โดยค่า LD_{50} มีค่าเท่ากับ 31.5 เกรย์ และปริมาณรังสีที่ 19.02 เกรย์ ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตด้านความสูงลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (GR_{50})

Wang *et al.* (2009) ฉายรังสีแกมมาให้เมล็ดสับดูดำจากจีนและอินเดียที่ระดับ 0 100 150 200 250 และ 300 เกรย์ พบว่า LD_{50} ของระดับปริมาณรังสีแกมมาที่ใช้กับเมล็ดสับดูดำจากจีนค่อนข้างต่ำคือ อยู่ที่ระดับ 178 เกรย์ สำหรับเมล็ดสับดูดำจาก Guangdong และ 132 เกรย์ สำหรับเมล็ดสับดูดำจาก Hainan สำหรับเมล็ดสับดูดำจากประเทศอินเดียอยู่ที่ระดับ 198 เกรย์ และยังพบว่าปริมาณรังสีที่เพิ่มขึ้นแปรผันตรงกับลักษณะของรูปร่างใบที่เปลี่ยนแปลงในต้นกล้า M_1

Dhakshanamoorthy *et al.* (2010) ฉายรังสีแกมมากับเมล็ดสับดูดำ โดยปริมาณรังสีแกมมาที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์จะอยู่ในช่วง 50 ถึง 250 เกรย์ โดย พบว่า ปริมาณรังสีแกมมาที่ระดับ 50 เกรย์ ไม่มีผลในการกระตุ้นการงอก ขณะที่ 250 เกรย์ มีผลยับยั้งการงอก เนื่องจากเกิดความเสียหายในเนื้อเยื่อเมล็ดและความรุนแรงจะขึ้นอยู่กับปริมาณระดับรังสีที่ได้รับ โดยค่า LD_{50} คือ 425 เกรย์ และไม่แตกต่างกันในสับดูดำแต่ละพันธุ์ และยังพบว่า ลักษณะการออก

ดอกและอายุการเก็บเกี่ยวของประชากรที่ผ่านการฉายรังสีมีแนวโน้มที่เร็วขึ้น วันออกดอกวันแรกจะอยู่ในช่วง 255 ถึง 306 วัน โดยปริมาณรังสีแกมมาที่ 50 เกรย์ มีการออกดอกที่เร็วที่สุด และทุกระดับที่ฉายรังสีมีการออกดอกที่เร็วกว่าชุดควบคุม

Songsri *et al.* (2011) ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสับดูดาโดยการฉายรังสีแกมมา เพื่อหา ระดับของปริมาณรังสีแกมมาที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายและเป็นการเพิ่มลักษณะทางพันธุกรรมเพื่อใช้ประโยชน์จากลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปในการปรับปรุงพันธุ์สับดูดาให้ดีขึ้น โดยนำเมล็ดสับดูดามาฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ระดับ 0 20 40 60 80 และ 100 กิโลเรด พบว่าเมื่อปริมาณรังสีแกมมาสูงขึ้นที่ระดับ 20 ถึง 40 กิโลเรด ส่งผลให้การงอกของเมล็ดสับดูดาลดลง ซึ่งระดับที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเมล็ดสับดูดาจะอยู่ในช่วง 42.5 ถึง 43.0 กิโลเรด ส่วนที่ระดับ 60 ถึง 100 กิโลเรด จะส่งผลให้เกิดการตายทั้งหมด โดย LD_{50} อยู่ที่ 60 กิโลเรด และต้น M_1 ที่ได้มีความสูงลดลง

การชักนำการกลายพันธุ์โดยการฉายรังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ัญญา (2532) ศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อโดยการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันปริมาณ 5 10 15 20 25 30 35 40 และ 50 เกรย์ พบว่า ปริมาณรังสีที่สูงขึ้นมีผลทำให้การรอดชีวิตของแคลลัสลดลง และการออกรังสีขึ้นส่วนของพืชที่อายุ 1 7 14 21 และ 28 วัน พบว่า เมื่อขึ้นส่วนของพืชมีอายุมากขึ้นทำให้การรอดชีวิตสูงขึ้น และพบว่า รังสีมีผลต่อสัณฐานวิทยาโดยทำให้จำนวนใบและความยาวก้านใบของใบที่ 1 และ 2 ลดลงเมื่อแคลลัสได้รับรังสีปริมาณสูงขึ้น

สิรินุช และคณะ (2534) ฉายรังสีแกมมาในเมล็ดถั่วเขียวที่ระดับ 20 40 60 และ 80 กิโลเรด หลังจากนั้นนำเมล็ดที่ผ่านการฉายรังสีมาเพาะและตัดใบเลี้ยงจากต้นอ่อนอายุ 3 วัน นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่มี BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ปริมาณรังสีที่ระดับ 80 กิโลเรด มีผลในการยับยั้งการเกิดยอด และยอดที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาในเมล็ดที่ระดับ 40 กิโลเรด สามารถเกิดรากได้เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำราก

ชาญวิทย์ (2537) ชักนำการกลายพันธุ์ในอ้อยเพื่อให้ได้พันธุ์อ้อยที่มีลักษณะทนเค็มโดย นำม้วนใบอ่อนของอ้อยพันธุ์ Q83 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2, 4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ เพื่อศึกษาการรอดชีวิตและการเจริญพัฒนาเป็นต้นอ่อนของแคลลัสที่ได้ ทำการฉายรังสีแกมมา ที่อัตรา 0 10 20 30 40 50 และ 60 เกรย์ นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้สูงสุด เป็นแคลลัสที่ได้จากการฉายรังสีรังสี 1 กิโลเรด ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งมีอัตราการอยู่รอดสูงสุด ซึ่งมีอัตราการอยู่รอดถึง 100 เปอร์เซ็นต์

วิชชุตา (2537) ศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีต่อการกลายพันธุ์ของหน่วน้ำวพันธุ์ Double Spathe ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยฉายรังสีแกมมากับข้อและแคลลัสที่ระดับ 0 1 2 3 4 และ 5 เกรย์ พบว่า อัตราการรอดชีวิต การเกิดยอดใหม่และความสูงมีแนวโน้มลดลงเมื่อปริมาณรังสีสูงขึ้น รังสีทำให้ลักษณะใบ การเรียงตัวของใบ ความยาวปล้อง การแตกกิ่งข้างผิดปกติ และบางต้นเกิดลักษณะใบด่าง รังสีที่ระดับ 5 เกรย์ ทำให้เกิดลักษณะผิดปกติมากที่สุด ความยาวของปากใบของต้นที่ได้รับรังสี เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับรังสีไม่มีความแตกต่างกัน และจำนวนโครโมโซมไม่เปลี่ยนแปลง

นงลักษณ์ (2541) ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปิโกเนียเร็กซ์ในสภาพปลอดเชื้อและผลของรังสีแกมมาต่อการเจริญเติบโตและการกลายพันธุ์ ปริมาณรังสีที่ใช้ในช่วง 0-10 กิโลเรด หลังจากฉายรังสีแล้วตัดแบ่งส่วนแผ่นใบและก้านใบไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดและการเจริญเติบโตลดลงเมื่อปริมาณรังสีที่ให้เพิ่มขึ้น แต่การให้รังสีตั้งแต่ 4 กิโลเรด ขึ้นไปทำให้การตายเกิดขึ้น 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในรุ่น M_1V_1 พบว่า แผ่นใบและก้านใบจากต้นที่ผ่านการฉายรังสีมีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาเป็นยอดและจำนวนยอดเฉลี่ยน้อยกว่าต้นควบคุม

วิทยา และสมปอง (2541) นำแคลลัสที่ชักนำจากใบอ่อนสีแดงของมังคุด มาฉายรังสีแกมมาที่ระดับ 0 5 10 20 และ 40 เกรย์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า รังสีแกมมาที่ระดับ 20 และ 40 เกรย์ ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสลดลง เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานบางประการของต้นช่วงที่ 1 M_1R_1 พบว่า ต้นที่ได้หลังจากการฉายรังสีแกมมา 10 20 และ 40 เกรย์ มีขนาดเล็กเตี้ยลง และต้นที่ได้มีอัตราการรอดชีวิตหลังย้ายปลูกน้อยกว่าต้นในชุดเปรียบเทียบ และลักษณะผิดปกติทางสัณฐานที่พบเห็น คือ ปลายใบสองแฉก ขอบใบมีรอยหยัก การจัดเรียงตัวของใบผิดปกติ เกิดมังกุด

สามใบและเกิดกิ่งแขนง แสดงว่าการฉายรังสีในความเข้มข้นต่าง ๆ อาจชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้

ธิดากุล (2542) ชักนำการกลายพันธุ์ในละหุ่ง โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้รังสีแกมมา โดยใช้ส่วนต่าง ๆ ของละหุ่ง ได้แก่ ยอด ใบเลี้ยง และ hypocotyl ของละหุ่ง 2 พันธุ์ พบว่า พันธุ์และส่วนที่ใช้เพาะเลี้ยง มีผลต่อลักษณะสีและขนาดของแคลลัส โดยพบว่า ปริมาณรังสีที่ทำให้ต้นกล้าตาย 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{30} และ LD_{50} ตามลำดับ) เท่ากับ 43 และ 61 กิโลเรด และที่ทำให้ความสูงลดลง 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (GR_{30} และ GR_{50} ตามลำดับ) เท่ากับ 57 และ 82 กิโลเรด เมื่อศึกษาผลของรังสีต่อลักษณะของละหุ่งในลูกชั่วที่หนึ่ง (M_1) พบลักษณะใบต่าง บิดเบี้ยว ในละหุ่งบางพันธุ์ และในลูกชั่วที่สอง (M_2) พบว่า มีผลต่อจำนวนข้อต่อต้น และความสูงของต้น มากกว่าความยาวช่อดอกและน้ำหนัก 100 เมล็ด แต่ทั้ง 4 ลักษณะมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก และไม่พบการเปลี่ยนแปลงในลักษณะสีของต้น การมีไข และลักษณะใบ

อัญชลี (2546) ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมและผลของรังสีแกมมาที่มีต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยบัวสีส้ม พบว่า กล้วยบัวสีส้มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA 2.5 และ 10 ppm จะมีการพัฒนาของหน่อมากกว่า และเมื่อนำปลายยอดกล้วยบัวมาฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 0 5 10 15 20 25 และ 30 เกรย์ เมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น การรอดชีวิตและการแตกหน่อจะลดลง โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดที่ 30 และ 50 (LD_{30} และ LD_{50}) เท่ากับ 25.5 และ 28.5 เกรย์ ตามลำดับ และกล้วยบัวสีส้มเมื่อได้รับรังสีแกมมา 30 เกรย์ จะใช้เวลาในการปลูกจนออกดอกสิ้นสุด 197.14 วัน นอกจากนั้นสีของใบประดับจางลงจากเดิม ส่วนกล้วยบัวสีส้มที่ได้รับรังสีปริมาณสูงขึ้นจะมีลักษณะที่ผิดปกติไป เช่น ใบประดับเชื่อมติดกัน ก้านเกสรตัวเมียและเกสรตัวเมียหักเป็นคลื่น

สุมน (2546) ศึกษาการเจริญของหน่อกิ่งนี้สีม่วงในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตรต่าง ๆ พบว่า อาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอาหารสูตรที่เหมาะสมกับการชักนำฐานใบอ่อนให้เกิดแคลลัส และอาหารแข็งสูตร MS ที่มี kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ casine hydrolysate 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอาหารสูตรที่เหมาะสมกับการชักนำเมล็ดให้เกิดแคลลัส และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเมล็ดให้เกิดยอดหลายยอด คือ MS ที่มีน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ kinetin 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ casine hydrolysate 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดมากที่สุด คือ 5.75 ยอด เมื่อนำยอดไปฉายรังสีที่ปริมาณ

0 10 20 และ 30 เกรย์ แล้วนำมาเพาะบนอาหารคัดเลือกที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ พบว่าต้นหญ้าที่ฉายรังสี 20 เกรย์ สามารถปรับตัวให้เจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ได้และเมื่อนำต้นหญ้าไปปลูกในสภาพธรรมชาติ พบว่า มีอัตราการรอด 26.92 เปอร์เซ็นต์ซึ่งปริมาณรังสีและปริมาณโซเดียมคลอไรด์ทำให้การรอดชีวิตของหญ้ามลดลง

เจริญ (2549) ศึกษาผลของการใช้รังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของบอนสีพันธุ์อัสราสวรรค์ (*Caladium bicolor* Vent.) จากการทดลองหาปริมาณรังสีที่ทำให้เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของบอนสีมีอัตราการตายร้อยละ 50 (LD_{50}) มีค่าเท่ากับ 32.5 เกรย์ และเมื่อย้ายบอนสีออกปลูกในสภาพแวดล้อมธรรมชาติเป็นเวลา 180 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่า ปริมาณรังสี 0 กับ 5 เกรย์ ทำให้บอนสีมีความสูงของต้นและความยาวของใบเฉลี่ยมากกว่าบอนสีที่ได้รับปริมาณรังสี 20 30 40 และ 50 เกรย์ อย่างมีนัยสำคัญ และมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะและรูปร่างของใบ สีของใบและสีของก้านใบ โดยเฉพาะปริมาณรังสี 30 เกรย์ สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของบอนสีเป็นอย่างมากซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ของบอนสี

กาญจนา และคณะ (2550) ปรับปรุงพันธุ์ออนูเบียส *Anubias nana* Engler และ *Anubias congensis* N.E. Brawn โดยการหาปริมาณรังสีที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยนำต้นออนูเบียสอายุ 4 สัปดาห์ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณที่แตกต่างกัน 7 ระดับคือ 0 20 40 60 80 100 และ 120 เกรย์ หลังจากฉายรังสีเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณรังสีที่เหมาะสมสำหรับชักนำให้ *A. nana* และ *A. congensis* มีการเจริญเติบโตลดลง 30 เปอร์เซ็นต์ (GR_{30}) เท่ากับ 34.56 เกรย์ และ 28.30 เกรย์ ตามลำดับ รังสียังมีผลให้ความสูง จำนวนยอดและจำนวนรากลดลง ศึกษาลักษณะการกลายพันธุ์โดยนำต้นออนูเบียสไปฉายรังสีแกมมาในระดับ 0- GR_{30} คัดเลือกพันธุ์กลายในสภาพปลอดเชื้อรุ่นที่ 6 (M_1V_6) พบว่า ต้นออนูเบียสที่เกิดการกลายมีลักษณะต้นเตี้ยลง หรือต้นแคระ มีการเปลี่ยนแปลงขนาด รูปร่าง และสีของใบ

การตรวจสอบพันธุกรรมพืชโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี

สุรินทร์ (2545) กล่าวว่าเครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular markers) สามารถนำไปใช้ในการศึกษาเพื่อจำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยใช้เครื่องหมาย (marker) เพื่อบ่งชี้ความแตกต่าง

และความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิตทั้งทางปริมาณและคุณภาพ ทั้งระหว่างสปีชีส์และภายในสปีชีส์ (inter and intra-species) ระหว่างประชากรและภายในประชากร (inter and intra-populations) หรือระหว่างแต่ละตัว (inter and intra-individuals) เครื่องหมายที่ใช้จำแนกความแตกต่างมี 2 ประเภท คือ

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) การบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตด้วยวิธีการเปรียบเทียบลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยาหรือทางสรีรวิทยา ซึ่งลักษณะที่ตรวจสอบนี้มักขึ้นกับสภาพแวดล้อมทำให้ตรวจสอบผลผิดพลาดได้ บางครั้งต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยายังมีความจำเป็นต้องทำเป็นอันดับแรก แล้วจึงใช้วิธีอื่นประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ หรือแก้ปัญหาในกรณีที่ไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว

2. เครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular marker) เครื่องหมายทางโมเลกุลมี 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีนเป็นการตรวจสอบที่โมเลกุลของโปรตีนชนิดต่าง ๆ และระดับดีเอ็นเอ ซึ่งตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

2.1 เครื่องหมายโปรตีน (protein marker) เป็นการตรวจสอบสิ่งมีชีวิตโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลของโปรตีน ใช้วิธีแยกโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิค อิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วจึงย้อมดูแถบของโปรตีนจำเพาะ เช่น การตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนในเลือด โปรตีนสะสมในเมล็ดพืช เป็นต้น นอกจากนี้ยังนิยมตรวจสอบรูปแบบของเอนไซม์บางชนิด หรือไอโซไซม์ต่าง ๆ ข้อดีของการตรวจสอบโปรตีน คือ สามารถตรวจได้หลายตำแหน่ง ค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก และแถบของโปรตีนหรือไอโซไซม์นี้ยังมีการข่มร่วมกับแบบ codominant ช่วยให้แยกความแตกต่างระหว่างแถบโปรตีนแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้

2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ บนโครโมโซม (nuclear DNA) หรือ ดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ (mitochondrial DNA หรือ Chloroplast DNA) การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือเกิดโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ การตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมีข้อดีกว่า

การตรวจสอบโปรตีน คือ โมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรมากกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นระยะเวลายาวนานได้ และเนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อใด ๆ ระยะการเจริญเติบโตหรือสภาพทางสรีรวิทยาใดก็ได้โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนก็ได้ จะมีการแสดงออกหรือไม่ก็ได้ จึงตรวจสอบได้โดยไม่จำกัด ครอบคลุมทั้งจีโนม ประกอบกับมีวิธีตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่าง ๆ ให้เลือกมากมาย ทำให้การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายทำได้อย่างกว้างขวาง ประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ได้ไม่จำกัด

เอเอฟแอลพี (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism) เป็นเทคนิคของเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบหนึ่ง ได้รับการพัฒนาโดย Vos *et al.* (1995) พื้นฐานของเอเอฟแอลพี คือ การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR, Polymerase Chain Reaction) ดังนั้น จึงรวมเอาความน่าเชื่อถือของเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) และประสิทธิภาพของพีซีอาร์เข้าด้วยกัน แต่เทคนิคเอเอฟแอลพีไม่เหมาะสำหรับใช้เปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่างกันมาก ๆ เนื่องจากจะมีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (common band) ค่อนข้างน้อย และไม่เหมาะสมกับสิ่งมีชีวิตที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกันมาก เนื่องจากจะพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันค่อนข้างน้อยอาจเกิดการผิดพลาดในการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นได้ (วิภา, 2544)

ขั้นที่ 1 หลักการทำเอเอฟแอลพี (สุรินทร์, 2545) คือ การนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด นิยมใช้เอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส ซึ่งจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งห่างกันประมาณ $4^6 (=4,096)$ คู่เบส เรียกว่า rare cutter ร่วมกับเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส ซึ่งจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งห่างกันประมาณ $4^4 (=256)$ คู่เบส เรียกว่า frequent cutter แล้วเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter ของเอนไซม์ทั้งสองชนิดเพื่อให้เป็นที่จับของไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์ในขั้นต่อไป การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด จะทำให้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอพอเหมาะและมีข้อดีอีกหลายประการดังนี้

1. เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เป็น frequent cutter จะตัดดีเอ็นเอได้ชิ้นขนาดเล็ก ซึ่งจะเพิ่มปริมาณได้ดีในการทำพีซีอาร์และอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับแยกด้วยวิธี อิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ denaturing polyacrylamide gel

2. เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เป็น rare cutter มีตำแหน่งที่จะตัดดีเอ็นเอได้น้อย จึงช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณจากการทำพีซีอาร์ลง เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมดหรือเกือบทั้งหมดเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นตำแหน่งตัดของเอนไซม์ที่เป็น rare cutter และอีกด้านหนึ่งเป็น frequent cutter ชิ้นดีเอ็นเอที่มี ปลายทั้ง 2 ด้านเป็นตำแหน่งของเอนไซม์แบบ frequent cutter เมื่อเชื่อมต่อกับ adapter แล้วจะมีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำ (inverted repeat) เมื่อถูกทำให้เสียสภาพเป็นสายเดี่ยว สามารถกลับมาจับกันเองโดยเบสคู่สม เกิดเป็นโครงสร้างแบบ stem-loop ทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถเข้ามาจับได้ ส่วนชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ที่เป็น rare cutter ทั้ง 2 ด้านมักจะมียาวมาก จึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในสภาวะที่ใช้ทดลอง

3. การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดในการทำพีซีอาร์ จะใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดเช่นเดียวกันทำให้สามารถเลือกติดฉลากเพียงสายเดี่ยว เมื่อนำไปแยกขนาดโดย denaturing polyacrylamide gel ดีเอ็นเอทั้ง 2 สายอาจจะเคลื่อนที่ไปได้ระยะทางไม่เท่ากัน เกิดเป็นแถบดีเอ็นเอ 2 แถบคู่กัน (double) การวิเคราะห์ผลจึงยุ่งยาก ในกรณีที่มีการติดฉลากเพียงสายเดี่ยว จะตรวจพบแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวทำให้วิเคราะห์ได้ง่ายขึ้น

4. การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ช่วยให้การปรับจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณมีความยืดหยุ่นดี โดยปรับจำนวนเบสเพื่อคัดเลือกว่าไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน

5. สามารถทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้จำนวนมาก โดยใช้กลุ่มสมของไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดจำนวนน้อย เช่น มีไพรเมอร์ชนิดละ 5 แบบ จากการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ถึง 25 แบบ

ขั้นที่ 2 คือ การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ ไพรเมอร์ที่ใช้มีลำดับเบสทางปลาย 5' เหมือนกับลำดับเบสของ adapter ต่อด้วยลำดับเบสบริเวณจดจำหรือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ และเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3' อีกส่วนหนึ่งเพื่อให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางชิ้น ส่วนไพรเมอร์ที่เหมือนกัน adapter และบริเวณจดจำของเอนไซม์ เรียกว่า common part ส่วนเบสที่เพิ่มเข้าที่ปลาย 3' เรียกว่า selective part จำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณลง โดยชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณได้ต้องมีลำดับเบสที่อยู่ตรงกับตำแหน่งจำเพาะของเอนไซม์สอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไป ถ้าเพิ่มเบสเพื่อ

คัดเลือกรากขึ้น จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณจะลดลงประมาณ 4 เท่าต่อทุก ๆ เบสที่เพิ่มขึ้นในการศึกษาจีโนมขนาดเล็กหรือโคลนที่อยู่ในพลาสมิด คอสมิดหรือ BAC (Bacterial Artificial Chromosome) ไม่จำเป็นต้องเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก เนื่องจากจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีจำนวนน้อยอยู่แล้ว สิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดเล็กไม่ใหญ่มาก เช่น แบคทีเรีย หรือเชื้อราจะเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก 1-2 เบส ส่วนพวกที่มีจีโนมขนาดใหญ่จะเพิ่มเบสมากกว่า 2 เบสที่ไพรเมอร์ทั้งสองชนิด ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกที่ปลาย 3' จะเรียกว่าไพรเมอร์ +1, +2, +3 และ +4 ตามลำดับ เช่น ไพรเมอร์ปลาย *EcoRI* adapter จะเรียกว่า *EcoRI* +1, *EcoRI* +2, *EcoRI* +3, *EcoRI* +4 เป็นต้น

การทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสที่ปลาย 3' มากกว่า 2 เบส จะทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ 2 ครั้ง ครั้งแรกเรียกว่า preselective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบให้มากขึ้นและช่วยให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกต้อง มีการทดลองเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพียงครั้งเดียว โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก +1, +2, +3 และ +4 เบสตามลำดับ พบว่า จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ลดลงเป็นลำดับจากการใช้ไพรเมอร์แบบ +1, +2, +3 แสดงถึงประสิทธิภาพในการคัดเลือกที่ถูกต้อง แต่ไพรเมอร์ +4 ให้ผลไม่สอดคล้องกัน สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอจำนวนมากที่ไม่ตรงกับแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์ (mismatch) ในตำแหน่งที่อยู่ห่างจากปลาย 3' 3 เบส หรือเบสคัดเลือกรั้งเดียว 3 เบส ก็ทำให้เกิดการจับคู่ไม่จำเพาะของเบสที่เพิ่มขึ้นตัวแรกสุดได้เช่นเดียวกัน แต่เกิดในความถี่ต่ำ ดังนั้นถ้าต้องการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกตั้งแต่ 3 เบสขึ้นไป จึงต้องใช้วิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 2 ครั้ง โดยครั้งแรกใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกรั้งเดียว 1-2 เบส และครั้งที่ 2 จึงใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกรั้งต่อจากไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในครั้งแรกอีก 1-2 เบส รวมเบสที่เพิ่มเพื่อการคัดเลือก 3-4 เบสตามที่ต้องการ

การทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็น 2 ขั้นนอกจากเป็นการประกันว่าการคัดเลือกเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่ใช้เป็นไปอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพสูงสุด นอกจากนั้นยังช่วยลด background ที่เป็นพื้นค่าในลายพิมพ์ดีเอ็นเอ อาจทำ preselective amplification โดยใช้ไพรเมอร์ที่ไม่มีเบสคัดเลือก ได้ในกรณีการวิเคราะห์จีโนมขนาดเล็กที่ต้องใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกรั้งจำนวนน้อย เพื่อให้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้นและสามารถตรวจสอบแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนขึ้น

ขั้นที่ 3 คือ การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้โดยทำอิเล็กโทรโฟริซิสใน denaturing polyacrylamide gel แบบเดียวกับที่ใช้หาลำดับเบสของดีเอ็นเอ แถบดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการแยกโดยวิธีนี้อยู่ในช่วง 50-100 แถบ การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นใช้วิธีติดฉลากไพโรเมอร์ ชนิดใดชนิดหนึ่งด้วยสารกัมมันตรังสี หลังจากทำอิเล็กโทรโฟริซิสเสร็จแล้ว ตรวจสอบโดยใช้เครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ (automated sequencer) ก็ได้ จากการที่ต้องตรวจสอบผลการทำเอเอฟแอลพีโดยใช้สารกัมมันตรังสีหรือใช้เครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ ทำให้เกิดข้อจำกัดในห้องปฏิบัติการหลายแห่ง เนื่องจากขาดประสบการณ์และระบบปฏิบัติงานที่ใช้สารกัมมันตรังสี มีการใช้วิธีตรวจสอบเอเอฟแอลพีด้วยการไฮบริดเซชันโดยใช้ probe ที่ติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี (non radioactive label) หรือ วิธีย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท (silver staining) ซึ่งให้ผลดีและสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการ

การนำเทคนิคเอเอฟแอลพีมาใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เทคนิคเอเอฟแอลพีสามารถบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่เป็นชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์และยังสามารถจำแนกลักษณะที่เกิดจากการกลายพันธุ์ได้ (Liscum and Briggs, 1995)

กฤษณา (2546) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหญ้าเนเปียร์ (*Pennisetum* sp.), หญ้ารุซี่ (*Brachiaria ruziziensis*) และหญ้ากินนีสีม่วง (*Panicum maximum* TD58) และตรวจสอบหญ้าเนเปียร์แคะที่ผ่านการฉายรังสีเปรียบเทียบกับหญ้าเนเปียร์แคะที่ไม่ได้ฉายรังสีโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี พบว่า การศึกษาหญ้าในสกุล *Pennisetum* โดยใช้ไพโรเมอร์ 15 คู่ ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 930 แถบ ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของหญ้าเนเปียร์สอดคล้องกับลักษณะภายนอก คือ หญ้าชนิดที่มีลำต้นเดี่ยวและชนิดที่มีลำต้นสูงจัดอยู่คนละกลุ่ม และเมื่อนำหญ้าเนเปียร์แคะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและไม่ได้ฉายรังสีมาเปรียบเทียบกับหญ้าเนเปียร์แคะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสี และหญ้าเนเปียร์แคะที่เพาะจากเมล็ด โดยใช้ไพโรเมอร์ 11 คู่ พบว่าหญ้าเนเปียร์แคะที่ผ่านการฉายรังสีมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นเมื่อดูจากแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดของแถบแตกต่างไปจากหญ้าเนเปียร์แคะดั้งเดิมที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสี และเมื่อนำมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ พบว่า หญ้าเนเปียร์แคะดั้งเดิมที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสี แยกตัวออกจากกลุ่มที่ฉายรังสีอย่างชัดเจน และในการศึกษาหญ้ารุซี่ โดยใช้ไพโรเมอร์ 10 คู่ ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 862 แถบ พบว่า มีความแปรปรวนสูงในแต่ละกลุ่มประชากร และมีการกระจายตัวของตัวอย่างจากแต่ละจังหวัดปะปนกัน ยกเว้นตัวอย่างจากจังหวัดลำปางที่มีความแปรปรวนภายในกลุ่มประชากรต่ำและ

จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วนการศึกษาหญาทินีสีม่วง โดยใช้ไพรเมอร์ 10 คู่ พบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เหมือนกันเกือบทั้งหมด แสดงว่าหญาทินีสีม่วงมีความแปรปรวนในสายพันธุ์น้อยเนื่องจากเป็น พืช apomixis จากผลการทดลองทั้งหมดที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่า เทคนิคเอเอฟแอลพีเป็นเทคนิคที่มี ประสิทธิภาพมีความเหมาะสมในการใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชอาหารสัตว์ และยังสามารถใช้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นได้

รังสัน (2549) ศึกษาการจัดจำแนกชนิดพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฝั พบว่า ยังมีข้อ จำกัดไม่สามารถจำแนกชนิดพันธุ์ของฝับางชนิดได้อย่างชัดเจน เนื่องจากปัญหาความ แปรปรวนของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการขาดคอกในการจำแนก งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์เอา เทคนิคเอเอฟแอลพีมาใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของฝัจำนวนทั้งหมด 26 ชนิด โดยเก็บ รวบรวมจากแปลงรวบรวมพันธุ์ฝั สถานีทดลองปลูกพรรณไม้ หินลับ อ. บ่อพลอย จ. กาญจนบุรี โดยได้ทำการพัฒนา และคัดเลือกหาคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมจากทั้งหมด 64 คู่ไพรเมอร์ที่ได้จากการ combinations พบว่า มี 14 คู่ไพรเมอร์ ที่แสดงความแตกต่างและมีความเป็น polymorphism สามารถ นำมาศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของฝัและชนิดได้

Qi-Bao *et al.* (2008) ศึกษาความหลากหลายของพันธุ์สบู่ดำที่เก็บรวบรวมได้ในประเทศ จีนและมาเลเซีย 58 accessions โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพีในการจัดจำแนกพันธุ์กรรมและเพื่อ นำไปใช้ประโยชน์ วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 17 คู่ พบความแตกต่าง (polymorphic) 70 ตำแหน่ง คิดเป็น 14.3 เปอร์เซ็นต์ ของความแตกต่างทั้งหมด การจัดจำแนกความแตกต่างด้วย เทคนิคเอเอฟแอลพีแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำที่รวบรวมได้

Sudheer *et al.* (2008) จำแนกความแตกต่างในสบู่ดำโดยใช้ polymorphic markers ในการ จำแนกระหว่างพันธุ์สบู่ดำที่มีพิษและไม่มีพิษด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 1,442 ไพรเมอร์ พบว่า มี 238 ไพรเมอร์ ที่ให้ความแตกต่าง คิดเป็น 16.49 เปอร์เซ็นต์ จากทั้งหมด แสดง ให้เห็นว่าพันธุ์ทั้งสองมีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกัน

Tatikonda *et al.* (2009) นำเทคนิคเอเอฟแอลพีมาใช้เพื่อประเมินความหลากหลายในการ เก็บรวบรวมเชื้อพันธุกรรมของสบู่ดำ 48 accessions จากที่ต่าง ๆ 6 รัฐในประเทศอินเดีย ใช้ ไพรเมอร์ทั้งหมด 7 ไพรเมอร์ แบบ combination พบว่า 88% แสดงผลเป็น polymorphism ซึ่ง accessions ที่ได้จากรัฐ Andhra Pradesh พบความหลากหลายที่กระจายซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่

ต่างจากกลุ่มอื่น ในขณะที่ accessions ที่ได้จากรัฐ Chhattisgarh พบว่า มีชิ้นส่วนที่แตกต่างและ
ไม่พบในพันธุ์อื่น ๆ จำนวนมาก ความหลากหลายทางโมเลกุลที่ได้เหล่านี้รวมถึงข้อมูลลักษณะทาง
สัณฐานวิทยาและทางการเกษตรอื่น ๆ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการคาดคะเนสำหรับการเลือก
accessions ที่เหมาะสมในการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบมาตรฐาน
รวมทั้งวิธีการปรับปรุงพันธุ์ในระดับโมเลกุล



อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชทดลอง

สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) พันธุ์โคราช ซึ่งเป็นพันธุ์แนะนำให้เกษตรกรนำไปปลูกและเป็นพันธุ์ที่ได้รับความนิยม มีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดีและให้ผลผลิตสูง โดยใช้ชิ้นส่วนก้านดอกอ่อนและก้านใบอ่อนเพื่อใช้ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและกึ่งปักชำเพื่อใช้ในการฉายรังสีโดยตรง

2. วัสดุและอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและให้สิ่งก่อกลายพันธุ์

- 2.1 เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น ขวดแก้วขนาด 4 ออนซ์ บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต
- 2.2 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
- 2.3 (hot air oven)
- 2.4 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
- 2.5 เครื่องชั่งน้ำหนัก
- 2.6 เตาไมโครเวฟ (microwave oven)
- 2.7 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar air flow cabinet)
- 2.8 มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว (Petri dish) และตะเกียงแอลกอฮอล์
- 2.9 ชั้นวางขวดเนื้อเยื่อพืช
- 2.10 เครื่องฉายรังสีเครื่องแกมมาเตอร์ สำหรับฉายรังสี โดยมีธาตุซีเซียม-137

เป็นแหล่งกำเนิดรังสีแกมมา

3. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์เอเอฟแอลพี

- 3.1 โกร่งบดตัวอย่าง
- 3.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) และเครื่อง vortex
- 3.3 เครื่อง Thermal Cycler สำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

- 3.4 เครื่องอิเล็กโทรโฟริซิส (electrophoresis)
- 3.5 อุปกรณ์เตรียมเจล (gel caster)
- 3.6 เครื่องถ่ายภาพเจล (gel document)
- 3.7 เครื่อง denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

4. สารควบคุมการเจริญเติบโตและสารเคมี

- 4.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) (ตารางภาคผนวกที่ 1)
- 4.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต naphthalene-1-acetic acid (NAA), Thidiazuron (TDZ) และ 6-benzylaminopurine (BA)
- 4.3 สารเคมีปรับความเป็นกรด-ด่าง คือ 1N HCl และ 1N NaOH
- 4.4 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ ไฮเตอร์ และ Tween 20[®]
- 4.5 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากพืช เช่น CTAB (cetyltrimethyl ammoniumbromide), PVP (polyvinylpyrrolidone), α -mercaptoethanol, ไนโตรเจนเหลว, EDTA, Tris HCl, chloroform, isoamyl alcohol, isopropanol และ 70% ethanol เป็นต้น
- 4.6 สารเคมีที่ใช้ในการทำเอเอฟแอลพี
 - 4.6.1 สารเคมีในปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการต่อกด้วย adapter เช่น เอนไซม์ *EcoRI*, *MseI*, T4 ligase, *EcoRI* adapter, *MseI* adapter และ ATP เป็นต้น
 - 4.6.2 สารเคมีในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ เช่น *EcoRI* primer, *MseI* primer, $MgCl_2$, dNTP และ *Taq* polymerase เป็นต้น
 - 4.6.3 สารเคมีในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดย agarose gel เช่น agarose gel electrophoresis, loading dye และ 0.5x TBE เป็นต้น
 - 4.6.4 สารเคมีในการแยกดีเอ็นเอโดย denaturing polyacrylamide gel electrophoresis เช่น polyacrylamide gel, ammonium persulfate, TEMED, acetic acid, silvernitrate, sodium carbonate, sodiumthiosulfate, formaldehyde, sequencing dye, 5x TBE และ 0.5xTBE เป็นต้น

5. โปรแกรมสำหรับการทำเอเอฟแอลพีดังตารางที่ 2 และ 3

6. อุปกรณ์และวัสดุสำหรับปลูกพืชในกระถาง ได้แก่

ถุงเพาะชำขนาด 15 x 20 เซนติเมตร กระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว วัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของ ดิน:ขี้เถ้าแกลบ:ปุ๋ยหมัก ในสัดส่วน 1 : 1 : 1 และปุ๋ยสูตร 15-15-15

วิธีการ

1. หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.1 นำส่วนก้านดอกอ่อนที่มีความยาวประมาณ 2.0-2.5 เซนติเมตร และก้านใบอ่อนลำดับที่ 2 และ 3 นับจากยอดของสับดูดำพันธุ์โคราชแช่ในแอลกอฮอล์ 70% 1 นาที หลังจากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮเตอร์ 20% (ไฮเตอร์ 20 มิลลิลิตร+น้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร) และ 10% (ไฮเตอร์ 10 มิลลิลิตร+น้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร) ครั้งละ 10 นาที ตามลำดับ แล้วล้างด้วยน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาทีทำในสภาพปลอดเชื้อ ตัดแต่งชิ้นส่วนด้วยมีดผ่าตัดที่ปลอดเชื้อให้มีขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำชิ้นส่วนที่ได้ไปวางบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี TDZ ในระดับความเข้มข้น 0 0.2 0.4 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ในระดับความเข้มข้น 0 0.01 0.02 และ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 1) หลังจากนั้นทำการทดลองเพิ่มเติมโดยนำชิ้นส่วนของก้านใบอ่อนสับดูดำเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีเฉพาะ TDZ ในระดับความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 8 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ชิ้นต่อหนึ่งขวด เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน สังเกตและบันทึกข้อมูลจำนวนชิ้นที่เกิดแคลลัส น้ำหนักแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ลักษณะและเปอร์เซ็นต์การเกิด compact callus โดยคิดจากพื้นที่การเกิด compact callus ต่อพื้นที่ทั้งหมดของเนื้อเยื่อ วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT (Duncan's Multiple Range Test)

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ NAA ในอาหารแข็งสูตร MS
สำหรับการชักนำการเกิดแคลลัสจากก้านดอกอ่อนและก้านใบอ่อนสับดูดำพันธุ์โคราช

สูตร MS	ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	TDZ	NAA
1	0	0.00
2	0	0.01
3	0	0.02
4	0	0.03
5	0.2	0.00
6	0.2	0.01
7	0.2	0.02
8	0.2	0.03
9	0.4	0.00
10	0.4	0.01
11	0.4	0.02
12	0.4	0.03
13	0.6	0.00
14	0.6	0.01
15	0.6	0.02
16	0.6	0.03

1.2 หาสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุด โดยคัดเลือกแคลลัสที่ดีที่สุดที่เกิดจากสูตรอาหารจากการทดลองข้างต้น (วิธีการที่ 1.1) ไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลอง 13 ซ้ำ โดยวาง 1 ชิ้นต่อหนึ่งขวด เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน สังเกตและบันทึกจำนวนยอดที่เกิดขึ้น อาหารที่นำมาทดสอบมีการปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเป็น 5.6-5.8 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันและเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 อาทิตย์

2. หาระดับที่เหมาะสมของปริมาณรังสีแกมมาในการชักนำการกลายพันธุ์ในแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและกิ่งปักชำของสับดูต้า

2.1 นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีฮอร์โมน TDZ หรือ TDZ ร่วมกับ NAA ในระดับความเข้มข้นที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุด (วิธีการที่ 1.1) ไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ระดับ 0 10 20 30 และ 40 เกรย์ นำแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA ในระดับความเข้มข้นที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงที่สุดเพื่อกระตุ้นให้เกิดยอด (วิธีการที่ 1.2) เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน หาค่าอัตราการตายร้อยละ 50 (LD_{50}) จากนั้นฉายรังสีกับแคลลัสชุดใหม่ที่ระดับน้อยกว่าค่า LD_{50} บันทึกอัตราการรอดชีวิตและลักษณะที่ผิดปกติ

2.2 ปักชำกิ่งสับดูต้าโดยเลือกท่อนพันธุ์สับดูต้าที่มีลักษณะสีเขียวปนน้ำตาลเล็กน้อย (ไม่อ่อนและแก่เกินไป) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 นิ้ว ตัดให้มีความยาวท่อนละประมาณ 20-25 เซนติเมตร ปักลงในถุงเพาะชำขนาด 15 x 20 เซนติเมตร ซึ่งใส่ดินผสมที่ประกอบด้วย ดิน: จีเล้า: แกลบ: ปุ๋ยหมัก ในอัตรา 1:1:1 ปักชำจนออกรากและแตกใบ 5-6 ใบ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 45 วัน นำกิ่งปักชำสับดูต้ามาฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรัง โดยแบ่งการฉายเป็น 2 แบบ คือ ฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรังครั้งเดียว ที่ระดับ 0 10 15 และ 20 เกรย์ และฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรัง 2 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 ฉายที่ระดับ 0 10 15 และ 20 เกรย์ และฉายซ้ำที่ระดับ 50 100 และ 150 เกรย์ ในครั้งที่ 2 ภายหลังการฉายรังสีทั้งสองแบบ ย้ายกิ่งปักชำลงกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว ที่บรรจุดินผสม ที่ประกอบด้วย ดิน: จีเล้า: แกลบ: ปุ๋ยหมัก ในอัตรา 1:1:1 นำกิ่งชำมาดูแลในเรือนเพาะ โดยให้

น้ำทุกวัน วันละหนึ่งครั้ง และให้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 กระถางละ 10 กรัม ทุก 30 วัน สังเกตและบันทึกการเจริญเติบโตและลักษณะผิดปกติต่าง ๆ

3. ตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยใช้เทคนิคเอแฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)

3.1 ตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคเอแฟแอลพี เพื่อการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระดับดีเอ็นเอ ขั้นตอนแรกสกัดดีเอ็นเอจากใบของต้นสบู่ดำพันธุ์โคราชที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาทั้งจากยอดที่เกิดจากแคลลัสและจากกิ่งปักชำ โดยใช้วิธี CTAB ซึ่งดัดแปลงมาจาก Aldrich and Cullis (1993) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

3.1.1 นำชิ้นส่วนใบสบู่ดำ 2-3 ใบ บดในโกร่งที่เย็น โดยเติมไนโตรเจน เหลวแล้วบดให้ละเอียดจนเป็นผง แล้วถ่ายใส่หลอดเซ้นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติม CTAB extraction buffer (2% CTAB, 2% PVP, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2% (v/v) α -mercaptoethanol) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที โดยกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง ทุก 15 นาที

3.1.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสย้ายใส่หลอดใหม่ เติมสารละลาย choroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมา ประมาณ 5-6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10-15 นาที

3.1.3 ดูดสารละลายใสชั้นบนย้ายใส่หลอดใหม่ เติม Rnase (DNase-free) (US Biological, USA) 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที

3.1.4 เติมสารละลาย choroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10-15 นาที

3.1.5 คูดสารละลายใส่ใส่หลอดใหม่ เติม 5M NaCl 0.2 เท่าและ Isopropanol 1 เท่าของสารละลายใส่ ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาอย่างเบา ๆ บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10-15 นาที

3.1.6 เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ทำซ้ำขั้นตอนนี้ 2 ครั้ง จากนั้นตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.1.7 ละลายตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย TE buffer (1mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 20-30 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 การตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอทำโดยนำดีเอ็นเอที่เตรียมไว้มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ซึ่งโมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์จะเข้าไปแทรกในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ และเมื่อนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจะเกิดการเรืองแสง โดยที่ความเข้มของแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นจะสามารถบอกปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างโดยประมาณได้ ซึ่งปริมาณที่ตรวจสอบได้เป็นระดับนาโนกรัม นอกจากนี้ยังสามารถบอกคุณภาพ ดีเอ็นเอได้ด้วยว่ามี การปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอหรือไม่ ถ้าหากมีอาร์เอ็นเอปนอยู่จะเห็นเป็นแถบเคลื่อนที่ไปเร็วกว่าดีเอ็นเอ โดยมีขั้นตอนการตรวจสอบดังนี้

3.2.1 เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8% ในบัฟเฟอร์ 0.5x TBE จากนั้นหลอมอะกาโรสจนละลายหมด วางทิ้งไว้ให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เทลงในถาดที่เตรียมไว้ให้เจลมีความหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร และรอให้เจลแข็งที่อุณหภูมิห้อง

3.2.2 นำสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye (bromophenol blue 0.25%, glycerol 30%) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยดลงไปในแผ่นเจล พร้อมกับหยอดดีเอ็นเอมาตรฐานที่บอกความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เช่น 50, 100 และ 200 นาโนกรัม

3.2.3 ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กทรอนิกส์ ปรับกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลานาน 30 นาที

3.2.4 นำแผ่นเจลมาเชื่อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลานาน 10 นาที จากนั้นล้างเอธิเดียมโบรไมด์โดยการแช่แผ่นเจลในน้ำ deionized เป็นเวลานาน 10 นาที

3.2.5 นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ด้วยเครื่อง gel document ถ่ายรูปบันทึกผล และบันทึกปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.3 การวิเคราะห์เอเอฟแอลพี นำดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบมาทำปฏิกิริยาตามขั้นตอน ดังนี้

3.3.1 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและต่อกับ adapter นำดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการตรวจสอบ ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด พร้อมกัน คือ *EcoRI* ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีความถี่ในการตัดต่ำ มีตำแหน่งจดจำ 6 เบส และเอนไซม์ *MseI* ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีความถี่ในการตัดสูง มีตำแหน่งจดจำ 4 เบส จากนั้นนำ *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter ซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอสายคู่สั้น ๆ มีความจำเพาะกับปลายของดีเอ็นเอสายคู่ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *MseI* โดย adapter จะเข้ามาต่อกับปลายทั้งสองด้านของชิ้นดีเอ็นเอ เพื่อใช้เป็นตำแหน่งจับของไพรเมอร์ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและต่อกับ adapter ทำโดยนำดีเอ็นเอต้นแบบ 200 นาโนกรัม มาตัดส่วนปลายด้วยเอนไซม์ *EcoRI* 1 ไมโครลิตร (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร, บริษัท Fermentas) และเอนไซม์ *MseI* 1 ไมโครลิตร (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร, บริษัท Fermentas) พร้อมกับ 10x บัฟเฟอร์ A (บริษัท Roche Diagnostics Corporation) 3 ไมโครลิตร พร้อมทั้งเติมเอนไซม์ T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร ATP (10 มิลลิโมลาร์) 1.5 ไมโครลิตร ร่วมกับ *EcoRI* adapter (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร และ *MseI* adapter (50 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 30 ไมโครลิตร ด้วยน้ำ deionized นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

ตำแหน่งจดจำและจุดตัดของเอนไซม์ *EcoRI* และเอนไซม์ *MseI* เป็นดังนี้ คือ

เอนไซม์ *EcoRI* 5'-G AATTC-3'
3'-CTTAA G-5'

เอนไซม์ *MseI* 5'-T TAA-3'
3'-AAT T-5'

ลำดับเบสของ *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter เป็นดังนี้ คือ

EcoRI adapter 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'

MseI adapter 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
3'-TACTCAGGACTCAT-5'

3.3.2 การทำพีซีอาร์ I หรือ preselective amplification เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่ต้องการ ทำโดยนำดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและต่อกับ adapter เรียบร้อยแล้วมาเจือจางลง 30 เท่า ด้วยน้ำ deionize เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยา โดยใช้ดีเอ็นเอที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับไพรเมอร์ *EcoRI* และไพรเมอร์ *MseI* ที่เพิ่มเบสคัดเลือกว่าปลาย 3' จำนวน 1 เบส เพื่อเพิ่มความจำเพาะในการคัดเลือกรั้งดีเอ็นเอ ชนิดละ 0.5 ไมโครลิตร (5 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร) พร้อมกับ 10x บัฟเฟอร์ (10 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM KCl) 1 ไมโครลิตร 1.5 mM MgCl₂ 0.6 ไมโครลิตร dNTP 2 ไมโครลิตร (1 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร) และเอนไซม์ *Taq* polymerase 0.2 ไมโครลิตร (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปรับปริมาตรสุทธิเป็น 10 ไมโครลิตร ด้วยน้ำ deionize แล้วนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง Thermal Cycler โดยกำหนดโปรแกรมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ I ดังนี้

pre-denature	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที
25 รอบ : denature	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที
annealing	ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที

extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที
1 รอบ : final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

ไพรเมอร์ที่ใช้ในขั้นตอนนี้ ประกอบด้วยลำดับเบส 3 ส่วน คือ เบสหลัก (core base) ลำดับเบสของเอนไซม์ (enzyme base) และเบสคัดเลือกว่าต่อด้านปลาย 3' (extension base) ซึ่งแต่ละไพรเมอร์มีองค์ประกอบ คือ

	core base	enzyme base	extension base
<i>EcoRI</i> primer	5'-GACTGCGTACC	AATTC	NNN-3'
<i>MseI</i> primer	5'-GATGAGTCCTGAG	TAA	NNN-3'

3.3.3 การทำพีซีอาร์ II หรือ selective amplification นำผลผลิตที่ได้จากการทำพีซีอาร์ I มาเจือจางลง 30 เท่า ด้วยน้ำ deionize เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา โดยใช้ดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วปริมาณ 2 ไมโครลิตร เป็นดีเอ็นเอต้นแบบทำปฏิกิริยากับ *EcoRI* ไพรเมอร์ และ *MseI* ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกว่าต่อด้านปลาย 3' จำนวน 3 เบส (ตารางที่ 2) เพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอ ชนิดละ 0.5 ไมโครลิตร (5 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร) พร้อมกับ 10x บัฟเฟอร์ (10 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM KCl) 1 ไมโครลิตร 1.5 mM MgCl₂ 0.6 ไมโครลิตร dNTP 2 ไมโครลิตร (1 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร) และเอนไซม์ *Taq* polymerase 0.2 ไมโครลิตร (5 หน่วยต่อไมโครลิตร) ปรับปริมาตรสุทธิเป็น 20 ไมโครลิตร ด้วยน้ำ deionize แล้วนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง Thermal Cycler โดยกำหนด โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ II ดังนี้

pre-denature	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที
13 รอบ : denature	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที
annealing	ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที (ลดอุณหภูมิลง 0.7 องศาเซลเซียสต่อรอบ หลังจากเสร็จรอบแรก)
extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที
25 รอบ : denature	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที
annealing	ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที
extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที

(เพิ่มเวลารอบละ 1 วินาที)

1 รอบ : final extension

ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

ตารางที่ 2 คู่ไพรเมอร์สำหรับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากยอดสบู่ดำพันธุ์โคราชที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน โดยเพิ่มเบสคัดเลือกว่า 3' สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการทำพีซีอาร์ II

คู่ที่	<i>Eco</i> RI primer	<i>Mse</i> I primer
1	E-TCG	M-GCC
2	E-TCG	M-GTA
3	E-TCG	M-GTC
4	E-TAC	M-GCC
5	E-TAC	M-GTA
6	E-TAC	M-GTC
7	E-CGT	M-GTA
8	E-CGT	M- GTC
9	E-CAG	M-GTA
10	E-CAG	M-GTC

หมายเหตุ E คือ *Eco*RI primer

M คือ *Mse*I primer

ตารางที่ 3 คู่ไพรเมอร์สำหรับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากยอดของกิ่งปักชำสบู่ดำพันธุ์โคราชที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรัง โดยเพิ่มเบสคัดเลือกว่าปลาย 3' สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการทำพีซีอาร์ II

คู่ที่	<i>Eco</i> RI primer	<i>Mse</i> I primer
1	E-AAA	M-CTG
2	E-AAA	M-CAT
3	E-ACG	M-CAT
4	E-ACG	M-CAG
5	E-AAA	M-TGA
6	E-ACA	M-TGA
7	E-TCG	M-GTA
8	E-TCG	M-GTC
9	E-TAC	M-GCC
10	E-TAG	M-GCC

หมายเหตุ E คือ *Eco*RI primer

M คือ *Mse*I primer

3.3.4 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.3.4.1 นำดีเอ็นเอตัวอย่างที่ได้จากการทำพีซีอาร์ II มาใส่ sequencing dye (98% formamide, 10 mM EDTA, 0.01% (w/v) bromophenol blue, 0.01 (w/v) xylene cyanal) 10 ไมโครลิตร

3.3.4.2 ตรวจสอบผลโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบน denaturing polyacrylamide gel ความเข้มข้น 4.5% ในบัฟเฟอร์ 0.5x TBE แยกขนาดดีเอ็นเอ โดยใช้กำลังไฟฟ้าคงที่ 95 วัตต์ เป็นเวลา 100 นาที หรือจนกว่าสีของ xylene cyanal (สีที่อยู่ด้านบน) เคลื่อนที่ลงมาประมาณ 2 ใน 3 ของเจล

3.3.4.3 ย้อมเจดด้วยวิธี silver staining โดยนำแผ่นกระจกเจลมาแช่ในสารละลายอะซิดิก เข้มข้น 10% เป็นเวลา 20 นาที และล้างด้วยน้ำ deionize 2 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที

3.3.4.4 นำแผ่นกระจกเจลไปย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (1% silvernitrate, 0.56% formaldehyde) บนเครื่องเขย่านาน 30 นาที ย้ายแผ่นกระจกไปล้างด้วยน้ำ deionize อย่างรวดเร็วเพื่อล้างซิลเวอร์ไนเตรทส่วนเกินออก

3.3.4.5 นำแผ่นกระจกเจลไปแช่ในสารละลาย develop (30% sodium carbonate, 0.1% sodium thiosulfate, 0.56% formaldehyde) ที่แช่เย็น เขย่าอย่างสม่ำเสมอประมาณ 5-10 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบของดีเอ็นเอปรากฏขึ้นอย่างชัดเจน

3.3.4.6 หยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นกระจกเจลไปแช่ในสารละลายอะซิดิก เข้มข้น 10% เป็นเวลา 3-5 นาที และล้างด้วยน้ำ deionize นาน 10 นาที นำไปผึ่งให้แห้งในตู้ดูดควัน

3.3.5 การอ่านผลจากการทำเอเอฟแอลพี

เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันของทุกตัวอย่าง แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏให้สัญลักษณ์ “1” และแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏให้สัญลักษณ์ “0” แล้วนำข้อมูลที่ได้อ่านมาเปรียบเทียบหาความเหมือนและความแตกต่างทางพันธุกรรม

4. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืชและถ่ายยีน และห้องปฏิบัติการชีววิทยาโมเลกุล ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

5. ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง

เดือน พฤษภาคม 2550 ถึง เดือน ตุลาคม 2555

ผลและวิจารณ์

1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นของ สับดาพันธุ์โคราชโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

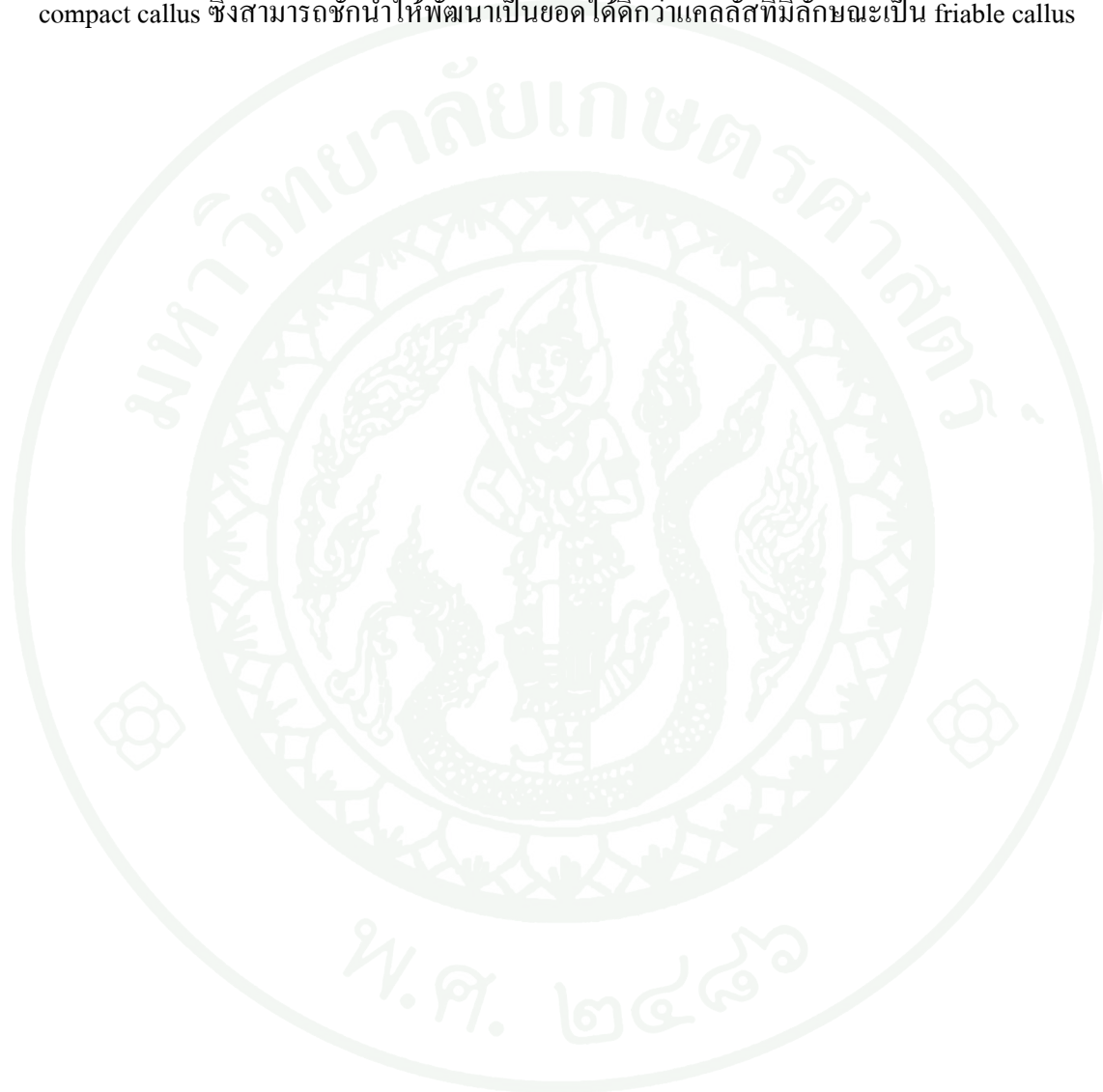
ในขั้นตอนแรกได้ทำการทดลองเฉพาะการเพาะเลี้ยงส่วนของก้านดอกอ่อนและก้านใบอ่อนของสับดาพันธุ์โคราช เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป ขั้นตอนแรกที่ใช้ทดสอบคือ ส่วนของก้านดอกอ่อนสับดา เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี TDZ ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (ตารางที่ 1) พบว่า เนื้อเยื่อมีการแบ่งเซลล์และขยายขนาดเกิดเป็นแคลลัสภายใน 1-2 สัปดาห์ โดยพบแคลลัสทั้งชนิด friable callus และ compact callus แต่แคลลัสที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะเป็น friable callus ที่มีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์เกาะกันแบบหลวม ๆ สีขาว แคลลัสที่มีลักษณะแบบ friable callus นี้จะไม่สามารถชักนำให้กลายเป็นต้นได้ และจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในสัปดาห์ที่ 3 ส่งผลให้เกิดการตายของชิ้นส่วนในที่สุดภายในสัปดาห์ที่ 4 (ภาพที่ 1) การตายของชิ้นส่วนอาจเนื่องจากการออกดอกของไม้ผลหลายชนิดถูกควบคุมโดยปริมาณจิบเบอเรลลินและเอทิลินที่พืชสร้างขึ้น ในช่วงที่มีการออกดอก พบว่าจิบเบอเรลลินซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ส่งเสริมให้พืชเติบโตทางด้านกิ่งใบจะมีปริมาณที่ลดระดับลง และขณะเดียวกันจะมีการสร้างเอทิลินที่มากขึ้น (สมบุญ, 2544) ปริมาณเอทิลินที่มีอยู่สูงในชิ้นส่วนก้านดอกเริ่มต้นอาจส่งผลให้เกิดการแบ่งเซลล์รวมทั้งการเจริญเติบโตในระดับที่ค่อนข้างต่ำและช้า และอาจส่งผลให้เกิดการตายที่เร็วขึ้นของเนื้อเยื่อเมื่อนำมาเพาะเลี้ยง ทั้งนี้การพัฒนาของก้านดอกอ่อนไปเป็น compact callus จะพบเฉพาะชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีฮอร์โมนร่วมกันทั้งสองชนิดเท่านั้น และจะมีปริมาณที่แตกต่างกันในแต่ละสูตรอาหารที่ใช้ทดสอบ เนื่องจากการเกิดดอกของพืชจะต้องอาศัยการกระตุ้นจากฮอร์โมนกลุ่มออกซิน และยังกระตุ้นการโตขึ้นของรังไข่เพื่อพัฒนาเป็นผล ดังนั้นออกซินที่พืชสร้างขึ้นจะถูกทำลายเพื่อนำไปใช้ในการเกิดเป็นดอกและพัฒนาเป็นผล อาจทำให้ปริมาณของออกซินบริเวณส่วนก้านดอกลดต่ำลงมาก นอกจากนี้ฮอร์โมนกลุ่มออกซินจะไปกระตุ้นการเกิดเอทิลินอีกด้วย (สมบุญ, 2544) เมื่อนำส่วนของก้านดอกอ่อนมาเพาะเลี้ยงจึงมีอัตราการเจริญที่ค่อนข้างต่ำและเกิดการตายอย่างรวดเร็ว ดังนั้นถ้าต้องการชักนำให้เกิดแคลลัสจึงต้องใช้ปริมาณของ NAA และ TDZ ที่ค่อนข้างสูงจึงจะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิด compact callus จากส่วนของก้านดอกอ่อนสับดา คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิด compact callus ได้ดีที่สุด มีคะแนนเปอร์เซ็นต์การ

เกิด compact callus 64.16 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแคลลัสเท่ากับ 4.87 กรัม (ตารางที่ 4) โดยแคลลัสที่มีลักษณะแบบ compact callus เป็นลักษณะของแคลลัสที่ต้องการเนื่องจากสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ และเมื่อนำแคลลัสจากทุกสูตรอาหารไปเพาะเลี้ยงบนสูตรชักนำยอด พบว่า แคลลัสที่มีลักษณะแบบ compact callus สามารถพัฒนาเป็นยอดได้ แต่ยอดที่เกิดขึ้นมีจำนวนน้อยมาก มีลักษณะเป็นยอดสั้น ๆ ไม่ยืดยาวมีการเจริญเติบโตช้า ยอดสีเขียวใสฉ่ำน้ำ ส่วนแคลลัสที่มีลักษณะแบบ friable callus จะไม่สามารถชักนำยอดได้เลย โดยชิ้นส่วนจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ซึ่งจะส่งผลให้ยอดที่พัฒนาจาก compact callus ในบริเวณใกล้เคียงตายในที่สุด

การเพาะเลี้ยงก้านใบอ่อนสับดูบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี TDZ ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงทุกสูตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นมีทั้งชนิด friable callus และ compact callus เช่นเดียวกับส่วนของก้านดอกอ่อน โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่มีลักษณะเป็น compact callus มีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่น สีขาวปนเขียว โดย compact callus จะเกิดได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี TDZ เพียงชนิดเดียวซึ่งได้แก่อาหารสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0.2 0.4 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตรที่ 5, 9 และ 13 ตามลำดับ) (ตารางที่ 5) อาจเนื่องจากส่วนของก้านใบอ่อนมักมีระดับของฮอร์โมนออกซินที่ค่อนข้างสูง ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่พืชสามารถสร้างได้เองตามธรรมชาติ ส่วนที่มีการสร้างออกซิน ได้แก่ บริเวณเนื้อเยื่อเจริญ โดยเฉพาะบริเวณปลายยอด ซึ่งออกซินมีคุณสมบัติเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต กระตุ้นการขยายขนาดและการยึดตัวของเซลล์ (สมบุญ, 2544) ดังนั้นในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนของก้านใบอ่อนจึงต้องการปริมาณออกซินที่ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากเนื้อเยื่อเริ่มต้นมีออกซินสะสมอยู่มาก จึงต้องการเฉพาะฮอร์โมนไซโตไคนิน ทั้งนี้การชักนำให้เกิดแคลลัส การเจริญเติบโตของแคลลัส รวมทั้งลักษณะของแคลลัสยังขึ้นอยู่กับชนิดพืช ชนิดของเนื้อเยื่อ แสง และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช โดยเฉพาะออกซิน และไซโตไคนินที่นิยมนำมาใช้ชักนำให้เกิดการพัฒนาของแคลลัส (Afshari *et al.* 2011) การทดลองนี้ อาหารสูตร MS ที่มี TDZ สามารถการชักนำให้เกิด compact callus แคลลัสได้ดี และยังพบว่า อาหารที่ใช้ TDZ ร่วมกับ NAA ในปริมาณที่สูงจะส่งผลให้เกิดแคลลัสที่มีลักษณะเป็น friable callus ซึ่งไม่สามารถชักนำให้เป็นยอดได้ (ภาพที่ 2)

จากผลการทดลองข้างต้น ก้านดอกอ่อนและก้านใบอ่อนสับดูมีความสามารถในการเกิดเป็นแคลลัสได้ต่างกันในแต่ละสูตรอาหาร การเพาะเลี้ยงพืชชนิดเดียวกันแต่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกันอาจเนื่องมาจากพืชที่นำมาทดลองเจริญเติบโตในสถานะที่แตกต่างกัน รวมถึงตำแหน่งของชิ้นส่วนที่ใช้ต่างกัน เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทำให้มีผลต่อการเจริญเติบโต

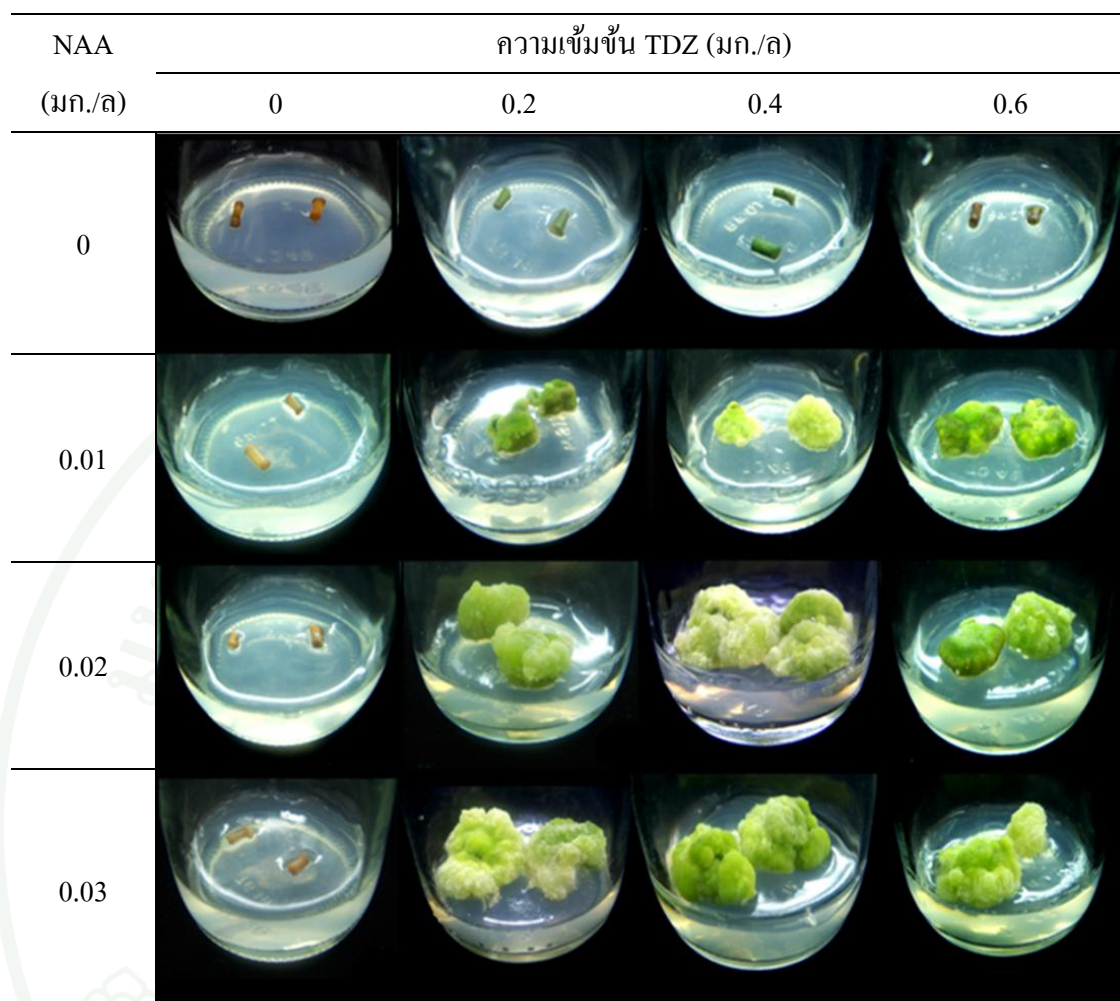
ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับพันธุกรรมภายในพืช ปัจจัยของฮอร์โมนในชั้นส่วนพืชเริ่มต้นที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะสารในกลุ่มออกซินและไซโตไคนินที่มีอิทธิพลโดยตรงต่อการเกิดแคลลัสของชั้นส่วนที่นำมาทดสอบ (สมพร, 2549) ในการทดลองครั้งนี้ส่วนของก้านใบอ่อนมีความสามารถในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าส่วนของก้านดอกอ่อน โดยแคลลัสที่ได้ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็น compact callus ซึ่งสามารถชักนำให้พัฒนาเป็นยอดได้ดีกว่าแคลลัสที่มีลักษณะเป็น friable callus



ตารางที่ 4 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ NAA ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกิ่งานดอก
อ่อนสนูป่าพันธุ์โคราช เป็นระยะเวลา 30 วัน

สูตร	สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล)		การเกิด แคลลัส (%)	น้ำหนักแคลลัส (ก./ชิ้น)	compact callus (%)
	TDZ	NAA			
1	0	0	25	0.09 c ^{1/}	0 c ^{2/}
2	0	0.01	25	0.03 c	0 c
3	0	0.02	75	0.04 c	0 c
4	0	0.03	75	0.04 c	0 c
5	0.2	0	12.5	0.04 c	0 c
6	0.2	0.01	100	3.09 b	51.65 ab
7	0.2	0.02	100	4.97 a	43.80 ab
8	0.2	0.03	100	4.78 a	35.13 b
9	0.4	0	25	0.05 c	0 c
10	0.4	0.01	100	2.55 b	56.97 ab
11	0.4	0.02	100	4.64 a	57.37 ab
12	0.4	0.03	100	4.87 a	64.16 a
13	0.6	0	12.5	0.04 c	0 c
14	0.6	0.01	100	2.26 b	65.18 a
15	0.6	0.02	100	2.96 b	57.44 ab
16	0.6	0.03	100	3.63 ab	53.29 ab
F-test				**	**
CV (%)				62.58	68.46

^{1/, 2/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test)

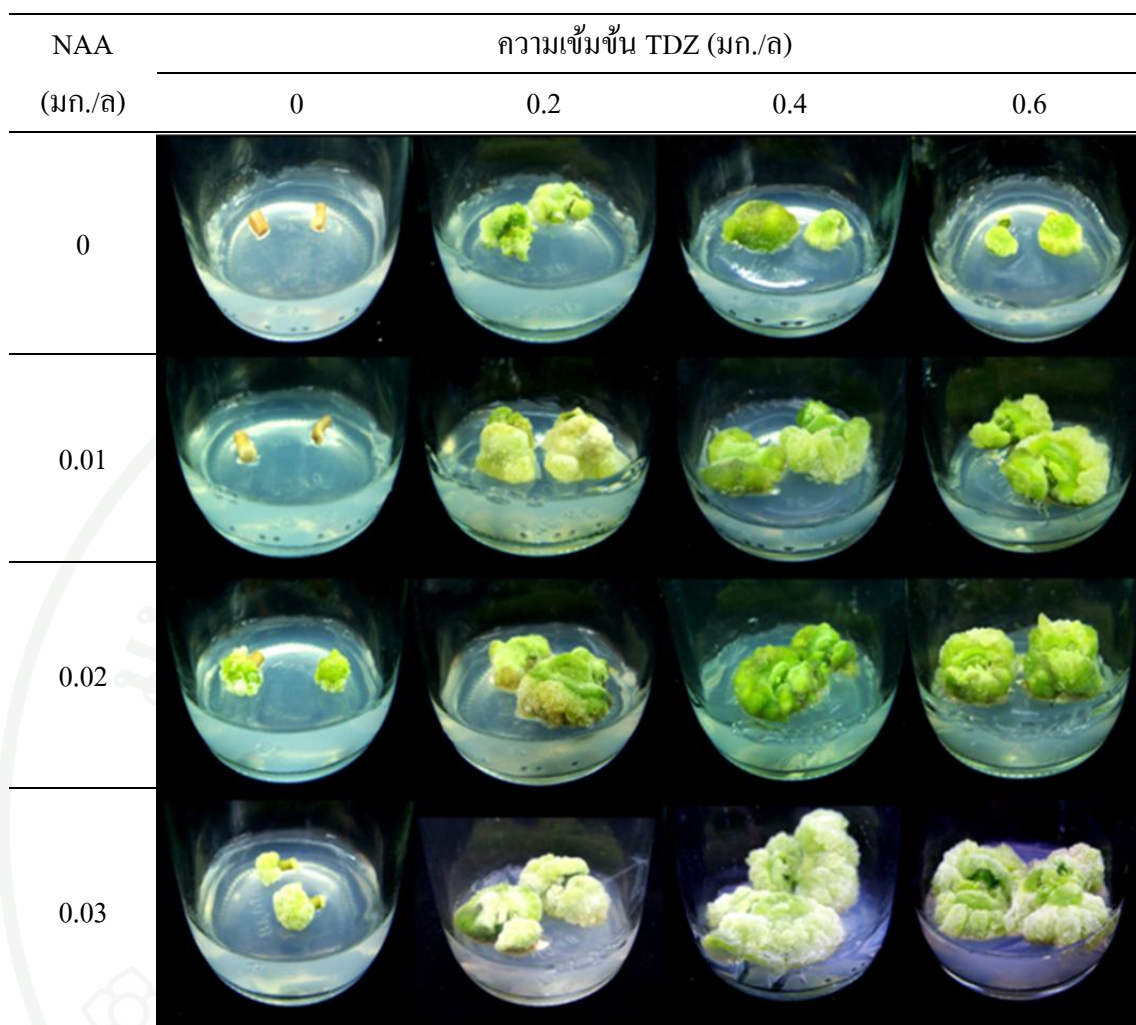


ภาพที่ 1 แคลลัสสปุ่มดำพันธุ์โคราชจากการเพาะเลี้ยงส่วนของก้านดอกอ่อน บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี TDZ ร่วมกับ NAA เลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน

ตารางที่ 5 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ NAA ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกิ่งานใบอ่อน
 สบู่ดำพันธุ์โคราช เป็นระยะเวลา 30 วัน

สูตร	สารควบคุมการ เจริญเติบโต (มก./ล)		การเกิด แคลลัส	น้ำหนักแคลลัส	compact callus
	TDZ	NAA	(%)	(ก./ล)	(%)
1	0	0	87.5	0.09 e ^{1/}	39.17 e ^{2/}
2	0	0.01	100	0.15 e	75.83 abc
3	0	0.02	100	0.37 e	74.17 abc
4	0	0.03	100	0.37 e	67.81 bc
5	0.2	0	100	1.37 de	89.85 ab
6	0.2	0.01	100	3.83 c	89.69 ab
7	0.2	0.02	100	5.60 b	69.81 bc
8	0.2	0.03	100	5.50 b	79.88 abc
9	0.4	0	100	2.33 d	95.70 a
10	0.4	0.01	100	5.38 b	67.88 bc
11	0.4	0.02	100	5.63 b	64.04 cd
12	0.4	0.03	100	10.03 a	37.35 e
13	0.6	0	100	2.05 d	94.33 a
14	0.6	0.01	100	6.04 b	81.12 abc
15	0.6	0.02	100	5.02 bc	90.00 ab
16	0.6	0.03	100	8.93 a	45.83 de
F-test				**	**
CV (%)				34.64	26.38

^{1/, 2/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test)



ภาพที่ 2 แคลลัสสปูดำพันธุ์โคราชจากการเพาะเลี้ยงส่วนของก้านใบอ่อน บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี TDZ ร่วมกับ NAA เลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน

ดังนั้นเพื่อยืนยันถึงผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก้านใบอ่อนของสับปะรด จึงคัดเลือกส่วนของก้านใบอ่อนสับปะรด ลำดับที่ 2 และ 3 นับจากยอดและอาหารสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยนำส่วนของก้านใบอ่อนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี TDZ เพียงชนิดเดียว ซึ่ง TDZ เป็นฮอร์โมนที่อยู่ในกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinins) เกี่ยวข้องกับการแบ่งและการยืดตัวของเซลล์ ส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของตาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (พีรเดช, 2537) โดยเพิ่มระดับความเข้มข้นของ TDZ ให้สูงขึ้นกว่าการทดลองข้างต้น ระดับความเข้มข้นของ TDZ ที่ใช้ ได้แก่ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิด compact callus

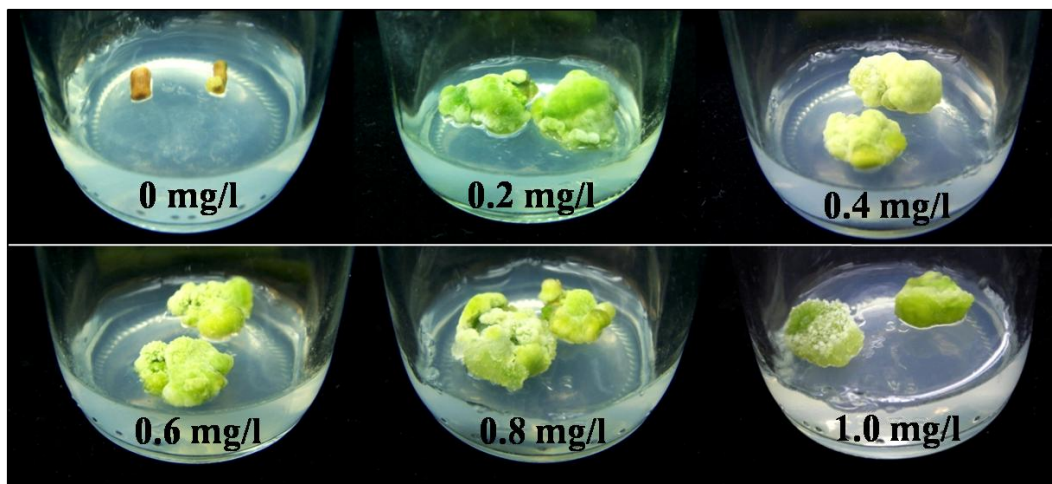
จากการทดลอง พบว่า ทุกสูตรอาหารที่ทดสอบสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เมื่อพิจารณา ลักษณะและการเจริญเติบโตของแคลลัส พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบอ่อนบนอาหาร ทดสอบประมาณ 1 สัปดาห์ ชิ้นส่วนของก้านใบมีลักษณะบวมและมีแคลลัสเกิดขึ้น โดยแคลลัสจะ เกิดบริเวณรอยตัดทั้ง 2 ข้างก่อน เนื่องจากกลไกการทำงานของพืช เมื่อพืชเกิดบาดแผลจะมีการ ชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ ซึ่งถูกกระตุ้นโดยฮอร์โมนภายในเนื้อเยื่อพืช (endogenous hormone) และสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่เติมลงในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (บุษราภรณ์, 2548) แคลลัสที่เกิดขึ้นบริเวณรอยตัดมีขนาดไม่เท่ากันคือ บริเวณรอยตัดของก้านด้าน ที่ติดกับกิ่งสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดีกว่าด้านที่ติดกับแผ่นใบ แคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็น กลุ่มเซลล์ที่เกาะกันแน่น (compact callus) สีเขียวปนขาว และมีกลุ่มเซลล์ที่เกาะกันหลวม ๆ (friable callus) สีขาวใสเพียงเล็กน้อย โดยพบว่า อาหารแ่งสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0.2 0.4 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี แคลลัสที่เกิดขึ้นเกือบทั้งหมดมีลักษณะเป็น compact callus ซึ่งแคลลัสที่สภาวะดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้เกิดตายอดได้ดีเช่นกัน แต่เมื่อ พิจารณาน้ำหนักแคลลัสที่ได้จากสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีค่า น้อยรวมทั้งปริมาณการเกิดเป็น compact callus ก็น้อยกว่าเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารแ่ง สูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0.4 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่น้ำหนักแคลลัสและคะแนน เปอร์เซ็นต์การเกิด compact callus จากอาหารแ่งสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0.4 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าใกล้เคียงกัน สำหรับอาหารแ่งสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่มีลักษณะแบบ friable callus (ภาพที่ 3) ซึ่งไม่สามารถ ชักนำให้กลายเป็นยอดได้ โดยจะกลายเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด ขณะที่ชิ้นส่วนก้านใบอ่อนของ สบู่ดำที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแ่งสูตร MS โดยไม่มีการเติมฮอร์โมน TDZ สามารถชักนำให้เกิด แคลลัสได้เพียงเล็กน้อย แคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็น friable callus ซึ่งแคลลัสที่เกิดขึ้นรวมถึง ชิ้นส่วนของก้านใบจะกลายเป็นสีน้ำตาลในสัปดาห์ที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงและตายในที่สุด เมื่อนำ ข้อมูลของน้ำหนักแคลลัส จากสูตรอาหารต่าง ๆ ที่ทดสอบไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยพบว่า อาหารแ่งสูตร MS ที่มีการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.2 ถึง 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลที่ไม่มีความ แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.01$) แต่เปอร์เซ็นต์ลักษณะการเกิด compact callus ในสูตรที่มี TDZ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าสูงสุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.01$) (ตารางที่ 6) แสดงว่าอาหารแ่งสูตร MS ที่มีการเติมฮอร์โมน TDZ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียง พอที่จะสามารถชักนำให้เกิด compact callus จากชิ้นส่วนของก้านใบอ่อนสบู่ดำพันธุ์โคราช โดย น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสที่ได้มีค่าเท่ากับ 1.16 กรัม และมีคะแนนการเกิดเปอร์เซ็นต์ compact callus เท่ากับ 84.38 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของศิริวรรณและรุ่งทิพย์ (2550) ที่รายงานว่า การชักนำ

ให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของสับค้ำได้แก่ ส่วนของตายอด ตาข้าง ใบอ่อน
ไฮโปคอติลและก้านใบ จะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดื่บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีฮอร์โมน
TDZ ความเข้มข้น 0.01-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแคลลัสที่ได้สามารถพัฒนาเป็นต้นจำนวนมาก
ต่อไปได้

ตารางที่ 6 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก้านใบอ่อนสับค้ำพันธุ์
โคราช เป็นระยะเวลา 30 วัน

ความเข้มข้น TDZ (มก./ล)	การเกิดแคลลัส (%)	น้ำหนักแคลลัส (ก./ชิ้น)	compact callus (%)
0.0	87.5	0.08 b ^{1/}	2.25 e ^{2/}
0.2	100	0.74 ab	52.50 c
0.4	100	1.16 a	84.38 a
0.6	100	0.89 a	64.38 b
0.8	100	1.44 a	49.38 c
1.0	100	1.25 a	37.50 d
F-test		**	**
CV (%)		72.99	21.82

^{1/}, ^{2/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น
99% วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test)



ภาพที่ 3 แคลลัสสปุ่มดำพันธุ์โคราชจากการเพาะเลี้ยงส่วนของก้านใบอ่อน บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน

การทดลองต่อมา คือ หาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากแคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงก้านใบอ่อนของสปุ่มดำ ในการทดลองชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากครั้งนี้ได้ทดสอบโดยใช้ฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนินเพียงชนิดเดียว ซึ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการทดลองได้แก่ BA นำแคลลัสสปุ่มดำพันธุ์โคราชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 4 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตรที่มี BA ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ (ภาพที่ 4) โดยยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีลักษณะเป็นยอดเล็ก ๆ ยอดที่ได้มีลักษณะไม่ยืดยาว ไม่สามารถตัดแยกออกมาเป็นยอดเดี่ยว ๆ ได้อย่างชัดเจน อาจเนื่องจากอาหารแข็งสูตร MS มีธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช แต่ถ้าไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือเติมในปริมาณที่น้อยเกินไป ยอดใหม่ที่เกิดขึ้นจะไม่มี การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น จึงจำเป็นต้องเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในปริมาณที่เหมาะสมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (สมบุญ 2544; คำบุญ 2544) ส่วนยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มี BA ความเข้มข้น 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดมีลักษณะสมบูรณ์และยืดยาวกว่าสามารถตัดแยกออกมาเป็นยอดเดี่ยว ๆ ได้อย่างชัดเจน โดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตรที่มี BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 6.62 ยอด (ตารางที่ 7) และยอดที่เกิดขึ้นมีลักษณะที่สมบูรณ์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sujatha and Reddy (2000) พบว่า การใช้ BA สามารถชักนำให้แคลลัสจากชิ้นส่วนใบ

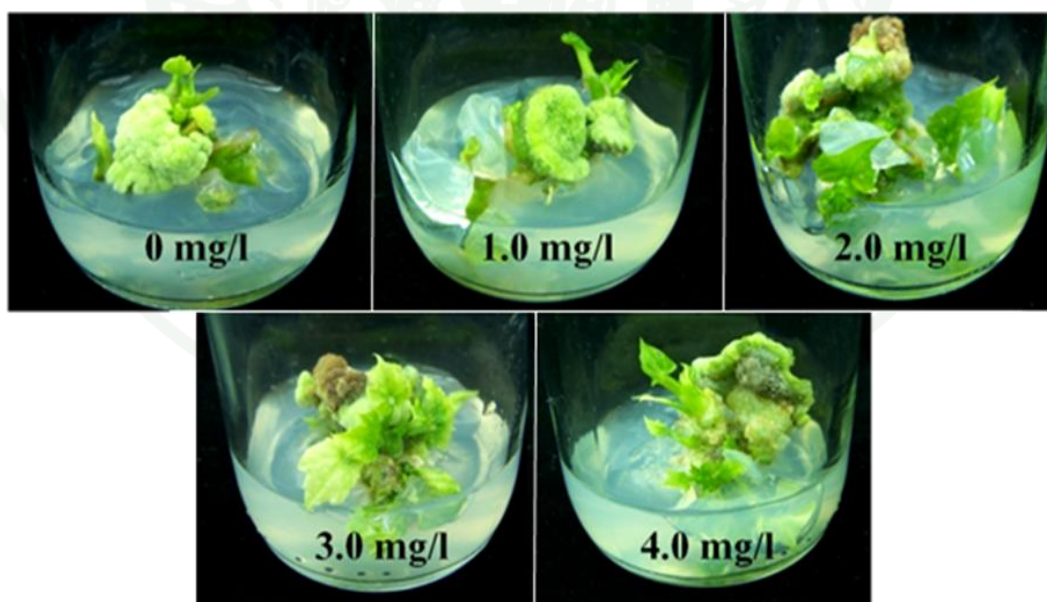
ของ *Jatropha integerrima* เกิดยอดได้ดีที่สุด ยอดที่เกิดจากแคลลัสจากชิ้นส่วนก้านใบมักจะเกิดบริเวณด้านในขอบริมของรอยตัด โดยเกิดเป็นตายอดขนาดเล็กประมาณ 0.5-1.0 มิลลิเมตร และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rajore and Batra (2005) ที่พบว่า การใช้อาหารเลี้ยงสูตร MS ที่มีการเติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากส่วนของปลายยอดสุมุดำ (shoot tip) และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่ผ่านมา พบว่า จำนวนยอดที่ดีที่สุดที่เกิดขึ้นในการทดลองครั้งนี้ คือ 6.62 ยอด ซึ่งได้มาจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบอ่อนของสุมุดำบนอาหารเลี้ยงสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงชนิดเดียวสามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากกว่างานทดลองอื่น ๆ ที่มีการทดสอบโดยใช้ฮอร์โมนหลายชนิดร่วมกันเพื่อชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนของสุมุดำ ได้แก่ การทดลองของนันท์นภัสและคณะ (2549) ชักนำให้เกิดยอดทวีคูณในหลอดทดลอง จากชิ้นส่วนของยอดที่ได้จากตาข้างสุมุดำ พบว่า อาหารเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เกิดยอดสูงสุด 5.9 ยอดและชักนำการเกิดแคลลัสและยอดทวีคูณจากชิ้นส่วนก้านของใบที่ 2 3 และ 4 ของสุมุดำ พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เกิดยอดทวีคูณคือ อาหารเลี้ยงสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดทวีคูณได้ดีที่สุดคือ 5.4 4.1 และ 2.2 ยอด ตามลำดับ

สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ BA เป็นฮอร์โมนที่อยู่ในกลุ่มไซโตไคนิน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแบ่งและการยึดตัวของเซลล์ ส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของตาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากคุณสมบัติข้างต้น มีการใช้ประโยชน์จากฮอร์โมน TDZ และ BA ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยใช้ผสมในสูตรอาหารเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของแคลลัสและกระตุ้นให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น ชักนำการเกิดยอด และยังช่วยส่งเสริมการสร้าง RNA และเอนไซม์ที่จำเป็นต่อขบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (meiosis) ส่งผลให้เกิดการแบ่งและการขยายตัวของเซลล์ พร้อมกับส่งเสริมการสร้างและการเจริญของตาข้าง รวมทั้งช่วยในการควบคุมวงจรเซลล์ (cell cycle) ในระยะ G1/M, G2/M และระยะ S นอกจากนี้ยังพบว่า BA เป็นสารในกลุ่มไซโตไคนินที่ให้ผลดีที่สุดในการเกิดยอด (พีรเดช, 2537; นพดล, 2537; คำบุญ, 2544)

ตารางที่ 7 จำนวนยอดที่พัฒนาจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงก้านใบอ่อนสับุดำพันธุ์โคราชในอาหารสูตร MS ที่มี TDZ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทดสอบบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน

ความเข้มข้น BA (มก./ล)	จำนวนยอด (ยอด/ชิ้น)													เฉลี่ย
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
0	6	2	3	8	2	3	2	4	9	4	2	4	3	4.0
1	3	3	7	5	3	10	9	4	4	6	7	3	8	5.54
2	3	12	7	3	7	14	4	7	6	7	3	6	7	6.62
3	9	2	3	5	3	6	8	4	5	1	8	6	7	5.25
4	6	4	4	6	1	1	3	7	9	7	2	3	0	4.42
F-test														ns
CV (%)														53.88

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ



ภาพที่ 4 การเกิดยอดของสับุดำพันธุ์โคราชจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ได้จากก้านใบอ่อน บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้นต่าง ๆ เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน

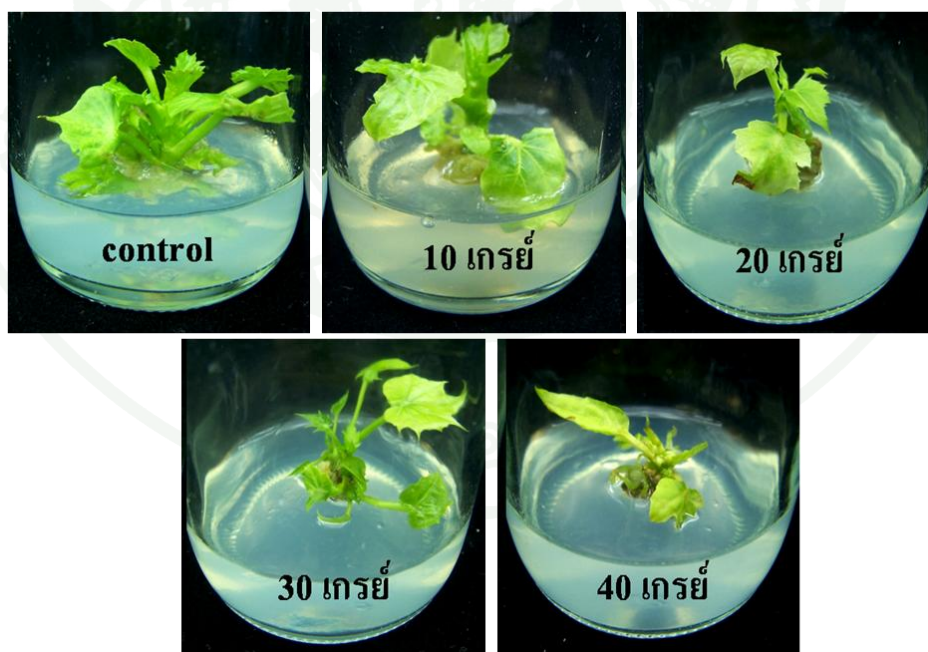
2. ผลจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและแบบเรื้อรังในกิ่งปักชำของสนูปดำพันธุ์โคราช

2.1 ปริมาณรังสีแกมมาที่เหมาะสมต่อการชักนำการกลายพันธุ์ในเซลล์สนูปดำพันธุ์โคราช โดยเซลล์ที่ใช้ฉายรังสีเป็นเซลล์สนูปดำอายุ 30 วัน ที่ได้จากการทดลองข้างต้น (การเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร) หลังจากฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันให้กับเซลล์ในปริมาณต่าง ๆ คือ 0 10 20 30 และ 40 เกรย์ และนำกลับมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร 7 วัน หลังจากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 53 วัน พบว่าหลังฉายรังสีเป็นระยะเวลา 30 วัน รังสีแกมมามีผลทำให้ต้นสนูปดำตายเมื่อได้รับปริมาณรังสีตั้งแต่ 10 เกรย์ ขึ้นไป และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 60 วันหลังฉายรังสี พบว่า ต้นสนูปดำมีการเจริญเติบโตแตกต่างกันตามระดับรังสีแกมมาที่ฉาย (ภาพที่ 5) โดยปริมาณรังสีแปรผกผันกับอัตราการเจริญเติบโต คือ เมื่อให้ปริมาณรังสีที่สูงขึ้นกับเซลล์ส่งผลให้การเจริญเติบโตของเซลล์สนูปดำลดน้อยลง โดยปริมาณรังสีที่ระดับ 0 10 และ 20 เกรย์ เซลล์มีการแบ่งเซลล์และพัฒนาเป็นยอดจำนวนมาก ยอดที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นยอดที่สมบูรณ์ ยืดยาวสามารถตัดยอดที่เกิดขึ้นออกจากเซลล์เพื่อนำมาเพาะเลี้ยงต่อได้ และเมื่อเวลาผ่านไป 60 วันหลังการฉายรังสี ยอดที่ได้สามารถเจริญเติบโตได้ดีตามปกติ และเซลล์ที่ได้รับปริมาณรังสี 30 และ 40 เกรย์ เซลล์มีการเจริญเติบโตแบ่งเซลล์ มีการพัฒนาเป็นยอดและการแตกใบที่ลดลง บางใบมีสีเหลืองและบางใบมีรูปร่างที่ผิดปกติ ยอดที่ได้แคระแกร็นและเจริญเติบโตช้า โดยเฉพาะปริมาณรังสีที่ 40 เกรย์ ยอดแคระแกร็นและเจริญเติบโตช้ามาก รวมตัวกันเป็นกลุ่มแยกออกจากกันได้ไม่ชัดเจน และเมื่อระยะเวลาผ่านไป 30 วัน ยอดสนูปดำที่ได้จากเซลล์ที่ผ่านการฉายรังสีที่ระดับกว่า 30 และ 40 เกรย์ เริ่มมีการตายเกิดขึ้น (ตารางที่ 8) สาเหตุที่ต้นสนูปดำตายเมื่อได้รับรังสีโดยเฉพาะรังสีในปริมาณที่สูงนั้น เนื่องจากรังสีปริมาณสูงทำให้เซลล์หยุดชะงักการแบ่งตัวอย่างถาวร และไม่มีการฟื้นคืนกลับมาทำหน้าที่ได้อย่างเดิม ในที่สุดเซลล์จะตาย เซลล์อื่นที่ไม่ตายอาจแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเข้ามาแทนที่เซลล์ที่ตายได้ ในบางกรณี พบว่า เซลล์ที่ผ่านการฉายรังสีสามารถแบ่งตัวตามปกติได้หลายครั้ง หลังจากนั้นเซลล์จึงจะตาย (สิรินุช, 2527) ผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับงานทดลองของ Lamseejan *et al.* (2003) ที่ฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันกับเบญจมาศในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่ปริมาณ 0-40 เกรย์ พบว่า เมื่อปริมาณรังสีสูงขึ้นอัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตจะลดลง ผลของรังสีจะทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืช ผิดปกติจะเกิดกับรูปร่างลักษณะของพืชที่ได้รับรังสี อาจเกิดขึ้นกับราก ลำต้น ใบ ดอก ผล เช่น รังสีไปยับยั้งการแบ่งเซลล์ในบริเวณยอด และยับยั้ง

การยึดตัวของเซลล์บริเวณปล้อง ทำให้ต้นแคระแกร็น และรังสียังไปยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช เป็นผลจากเนื้อเยื่อเจริญถูกทำลายโดยตรง (อรุณี, 2530)

ตารางที่ 8 จำนวนต้นสับดูคำพันธุ์โคราชที่พัฒนาและรอดชีวิตจากแคลลัสที่ได้รับรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในปริมาณรังสีต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 60 วัน หลังจากฉายรังสี

ปริมาณรังสี (เกรย์)	จำนวนต้นที่ได้หลังการชักนำ		จำนวนต้นที่รอดชีวิต	% ความอยู่รอด
	ยอด		ทั้งหมด	
0	20		20	100
10	20		19	95
20	20		18	90
30	20		15	75
40	20		11	55



ภาพที่ 5 ยอดสับดูคำหลังจากได้รับการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ระดับความเข้มข้น 0 10 20 30 และ 40 เกรย์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 60 วัน หลังได้รับรังสี

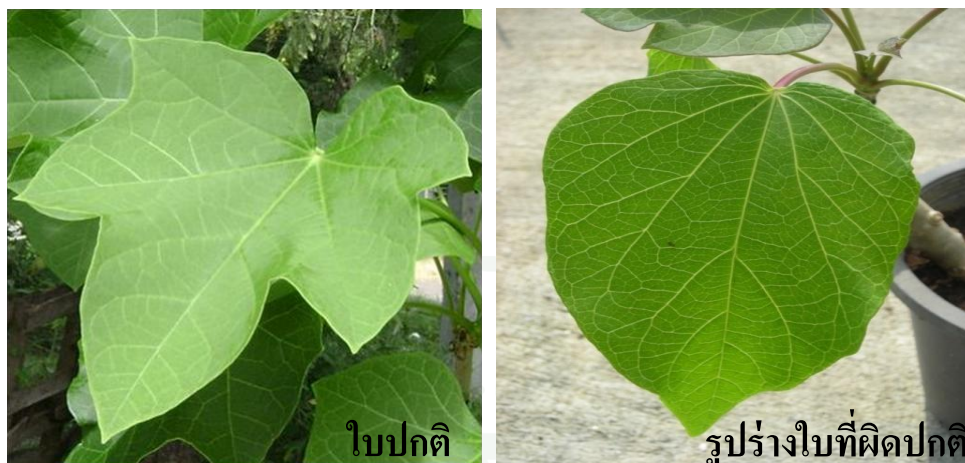
2.2 ปริมาณรังสีแกมมาแบบเรื้อรังที่เหมาะสมต่อการชักนำการกลายพันธุ์ในกิ่งปักชำสับดูดำพันธุ์โคราช กิ่งสับดูดำทั้งหมดที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาที่ระดับต่าง ๆ สามารถเจริญเติบโตได้ในทุกระดับที่ฉายรังสี และยังพบการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานบางลักษณะ โดยมีหลายรูปแบบ ได้แก่ ลักษณะใบด่าง ก้านแดง รูปร่างลักษณะของใบที่เปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งลักษณะการออกดอกที่เร็วขึ้น และจำนวนครั้งในการออกดอกที่มากขึ้น รวมถึงความยาวกิ่งที่เพิ่มขึ้นหรือสั้นลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ลักษณะทางสัณฐานที่เปลี่ยนแปลงไปนี้บางชนิดต้องตรวจสอบทางเซลล์วิทยา บางชนิดสามารถตรวจวัดในทางปริมาณได้ เช่น ความสูงของต้น ความยาวกิ่ง ความยาวของราก ความกว้างของใบ บางชนิดก่อให้เกิดปฏิกิริยากับพืชทั้งต้น เช่น ลักษณะแคระแกร็น รูปร่างใบผิดปกติบิดเบี้ยว เกิดลักษณะใบด่างหรือจุด ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางสรีระ อาจมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม หรือไม่เกี่ยวข้องกับโครโมโซมก็ได้ (อรุณี, 2550) ลักษณะใบด่าง (ภาพที่ 6) ที่เกิดขึ้นพบในต้นสับดูดำที่ได้รับการฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรัง 2 ครั้ง คือฉายครั้งที่ 1 ที่ระดับ 10 เกรย์ และฉายซ้ำครั้งที่ 2 ที่ระดับ 50 เกรย์ ลักษณะใบด่างนี้จะหายไปเมื่อมีการแตกยอดใหม่ แสดงว่าลักษณะใบด่างหรือจุด เกิดเนื่องจากคลอโรฟิลล์บางส่วนถูกทำลาย ซึ่งเป็นความเสียหายทางสรีระวิทยา (physiological damage) จากการฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรัง และจะปรากฏให้เห็นก่อนความเสียหายแบบอื่น ซึ่งเกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมถูกขัดขวาง ทำให้กิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ไม่สามารถดำเนินไปได้ตามปกติหรืออาจมีประสิทธิภาพลดลง แต่ลักษณะที่เกิดขึ้นไม่สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไปได้ (สิรินุช, 2540) ส่วนลักษณะก้านแดงนั้น (ภาพที่ 7) พบว่ายอดที่แตกออกมาใหม่ในชุดที่ 2 หรือชุดหลังจากนั้น ยังคงปรากฏลักษณะก้านแดงในกิ่งใหม่ที่เกิดขึ้น รวมถึงลักษณะของรูปร่างใบที่เปลี่ยนแปลงไปจากการได้รับรังสีแกมมา (ภาพที่ 8) พบแผ่นใบไม่มีหยักเกิดขึ้น ซึ่งมีผลดีต่อทรงพุ่มของต้น ลดการบดบังแสงแดดกับใบอื่น ๆ ภายในต้นและต้นอื่น ๆ ทำให้สามารถรับแสงแดดได้อย่างทั่วถึงส่งผลให้การสังเคราะห์แสงมีประสิทธิภาพ และลักษณะรูปร่างใบที่เปลี่ยนแปลงยังคงปรากฏให้เห็นในใบของยอดที่แตกใหม่เช่นกัน แสดงให้เห็นว่ารังสีแกมมาส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ อาจเกิดจากการกลายที่ตำแหน่งของยีนหรือโครโมโซมก็ได้ (อรุณี, 2550)



ภาพที่ 6 ลักษณะใบด่างที่เกิดขึ้นหลังการฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรัง จำนวน 2 ครั้ง ที่ระดับ 10 เกรย์ และ 50 เกรย์ ตามลำดับ



ภาพที่ 7 ลักษณะก้านแดงที่เกิดขึ้นหลังการฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรัง 60 วัน จำนวน 2 ครั้ง ที่ระดับ 10 เกรย์ และ 100 เกรย์ ตามลำดับ



ภาพที่ 8 ต้นสบู่ดำที่ 60 วันหลังได้รับรังสีแบบเรื้อรัง 2 ครั้ง ครั้งแรกที่ 10 เกรย์ ครั้งที่ 2 ที่ 100 เกรย์

รังสีแกมมา นอกจากจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในลักษณะดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังมีผลต่อความยาวกิ่ง (ตารางที่ 9) โดยต้นหมายเลขที่ 8 แสดงลักษณะเตี้ยแคระอย่างชัดเจน มีความยาวกิ่ง 5.5 เซนติเมตร ซึ่งมีความยาวกิ่งน้อยกว่าชุดควบคุมที่ยาว 46 เซนติเมตร สอดคล้องกับการทดลองของ Songsri *et al.* (2011) ที่พบว่า การฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในเมล็ดสบู่ดำ ต้น M_1 ที่ได้มีความสูงลดลง ลักษณะความสูงที่ลดลงจะส่งผลดีในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวที่ง่ายและสะดวกขึ้น และสามารถเพิ่มจำนวนต้นต่อพื้นที่ปลูกได้มากขึ้น ส่วนต้นหมายเลขที่ 6 มีความยาวกิ่งสูงสุดคือ 80 เซนติเมตร ซึ่งยาวกว่าชุดควบคุมถึง 28.5 เซนติเมตร โดยกิ่งสบู่ดำทั้งสองเกิดจากต้นสบู่ดำที่ได้รับรังสีแกมมาในระดับที่เท่ากัน คือ ฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรังจำนวน 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 ที่ระดับ 10 เกรย์ และฉายซ้ำที่ระดับ 50 เกรย์ จากการทดลองครั้งนี้รังสีแกมมาส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐาน ได้แก่ ลักษณะใบต่าง ก้านแดง รูปร่างใบที่ผิดปกติ และเกิดการเปลี่ยนแปลงของความยาวกิ่ง ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะพบในการฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรัง 2 ครั้ง ซึ่งเป็นการฉายรังสีซ้ำโดยการฉายรังสีกับพืชที่เคยฉายรังสีมาแล้ว เพื่อสะสมความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้กับตัวอย่างนั้น ๆ ลักษณะทางสัณฐานที่เปลี่ยนแปลงไปจึงมักปรากฏให้เห็นในการฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรัง 2 ครั้งมากกว่าการฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรังเพียงครั้งเดียว และลักษณะที่เกิดขึ้นจะแตกต่างกัน เนื่องจากการฉายรังสีแกมมาเป็นการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่ม ไม่สามารถคาดคะเนผลที่จะเกิดขึ้นได้ แม้จะฉายรังสีในระดับที่สูงหรือต่ำหรือฉายที่ระดับเดียวกันผลที่ได้อาจไม่เหมือนกัน (อรุณี, 2550)

ตารางที่ 9 ความยาวกิ่งสับค้ำเมื่ออายุ 60 วัน หลังได้รับการฉายรังสีแบบเรื้อรังในปริมาณต่าง ๆ

หมายเลข	ต้น-กิ่งที่	ฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรัง (เกรย์)		ความยาวกิ่ง (ซม.)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
1	10-1	10	-	13
2	16-1	15	-	64
3	23-1	20	-	15.5
4	25-1	20	-	23.5
5	31-1	10	50	37
6	33-1	10	50	80
7	34-1	10	50	32
8	34-2	10	50	5.5
9	36-1	10	100	28
10	40-1	10	100	56
11	41-1	15	150	50
12	42-1	15	150	57
13	47-1	15	50	42
14	52-1	20	100	25
15	53-1	20	100	50
16	53-2	20	100	65
17	56-1	20	150	21
18	57-1	20	150	7.5
19	59-1	20	150	66
20	C3-1	-	-	51.5

จากการทดลองครั้งนี้ยังพบว่า หลังจากสิ้นสุดการฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรังไปแล้ว 60 วัน พบต้นสับค้ำที่ออกดอกเร็วขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยต้นสับค้ำที่ได้รับการฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรัง ที่ระดับ 20 เกรย์ เพียงครั้งเดียวมีการออกดอกเร็วที่สุดและเร็วกว่าชุดควบคุมต้นแรกที่ออกดอก 11 วัน ซึ่งดอกชุดแรกนี้จะไม่ติดผลเนื่องจากดอกร่วงทั้งหมดแต่จะติดผลในดอกอีกรุ่นถัดมา เมื่อนำต้นสับค้ำที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรังทั้งหมดไปปลูกเลี้ยงต่อ

พบว่า กิ่งสนูปดำที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรังมีการออกดอกเกือบทุกกิ่ง และมีจำนวนครั้งในการออกดอกที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ขณะที่การทดลองของ Dwimahyani and Ishak (2004) ได้ศึกษาการกลายพันธุ์ในสนูปดำโดยการฉายรังสีแกมมาในกิ่งปักชำ พบว่า ระดับ 10 เกรย์ ส่งผลให้สนูปดำมีอายุการสุกแก่ที่เร็วขึ้น น้ำหนักร้อยละเมล็ดมากกว่าชุดควบคุม 30 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณรังสีที่ระดับ 10 ถึง 25 เกรย์ เพียงพอต่อการชักนำให้เกิดการกลายในกิ่งปักชำสนูปดำ ขณะที่

Dhakshanamoorthy *et al.* (2010) ฉายรังสีแกมมาที่เมล็ดสนูปดำ โดยปริมาณรังสีแกมมาที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์จะอยู่ในช่วง 50 ถึง 250 เกรย์ โดยพบว่า ปริมาณรังสีแกมมาที่ระดับ 50 เกรย์ ไม่มีผลในการกระตุ้นการงอก ขณะที่ 250 เกรย์ มีผลยับยั้งการงอก เนื่องจากเกิดความเสียหายในเนื้อเยื่อเมล็ดและความรุนแรงจะขึ้นอยู่กับปริมาณระดับรังสีที่ได้รับ โดยค่า LD_{50} คือ 425 เกรย์ ซึ่งไม่แตกต่างกันในสนูปดำแต่ละพันธุ์ และยังพบว่า ลักษณะการออกดอกและอายุการเก็บเกี่ยวของประชากรที่ผ่านการฉายรังสีมีแนวโน้มที่เร็วขึ้น วันออกดอกวันแรกจะอยู่ในช่วง 255 ถึง 306 วัน โดยปริมาณรังสีแกมมาที่ 50 เกรย์ มีการออกดอกที่เร็วที่สุด และทุกระดับที่ฉายรังสีมีการออกดอกที่เร็วกว่าชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับ Songsri *et al.* (2011) ที่พบว่า เมื่อปริมาณรังสีแกมมาสูงขึ้นที่ระดับ 200 ถึง 400 เกรย์ ส่งผลให้การงอกของเมล็ดสนูปดำลดลง ซึ่งระดับที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเมล็ดสนูปดำจะอยู่ในช่วง 425 ถึง 430 เกรย์ ส่วนที่ระดับ 600 ถึง 1000 เกรย์ จะส่งผลให้เกิดการตายทั้งหมด โดย LD_{50} อยู่ที่ 600 เกรย์ แต่จากการศึกษาของ Wang *et al.* (2009) พบว่า LD_{50} ของระดับปริมาณรังสีแกมมาที่ใช้กับเมล็ดสนูปดำจากจีนและอินเดียค่อนข้างต่ำกว่าคืออยู่ที่ระดับ 178 ถึง 198 เกรย์ ขณะที่ นพรัตน์ (2552) ฉายรังสีแกมมาในกิ่งปักชำบานชื่นเฉลี่ยใบด่างที่ระดับ 10 ถึง 100 เกรย์ หลังฉายรังสี 60 วัน พบว่า รังสีแกมมามีผลต่อการเจริญเติบโตของบานชื่นเฉลี่ยใบด่าง ซึ่งเมื่อปริมาณรังสีสูงขึ้นมีผลให้อัตราการเจริญเติบโตในลักษณะความสูง ความกว้างทรงพุ่มและจำนวนกิ่งแขนงลดลง และปริมาณรังสีที่ 19 เกรย์ ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตด้านความสูงลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (GR_{50}) ผลที่เกิดขึ้นจากการฉายรังสีแกมมาในส่วนต่าง ๆ ของพืช และในพืชแต่ละชนิด ผลที่ได้อาจมีความแตกต่างกันเนื่องมาจากความทนทานต่อรังสีของพืชชนิดต่าง ๆ หรือของส่วนต่าง ๆ ของพืชแตกต่างกัน และการฉายรังสีแกมมาเป็นการชักนำให้เกิดการกลายแบบสุ่ม โดยอาจมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม รวมทั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย (Shah *et al.*, 2008)

3. ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นสับดูดำจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและกิ่งปักชำ หลังการฉายรังสีแกมมาโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP)

3.1 ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นสับดูดำที่พัฒนาจากแคลลัสที่ได้รับ รังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน

ตรวจสอบความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของต้นสับดูดำที่ได้รับรังสีด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี ใช้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 35 คู่ โดยมี 10 คู่ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลิมอร์ฟิซึมพบว่า ในต้นที่ได้รับรังสีเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนทั้งหมด 1,227 แถบ ที่ระดับปริมาณรังสี 20 เกรย์ ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลิมอร์ฟิซึมมากที่สุด คือ 325 แถบ ส่วนที่รังสี 10 เกรย์ ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลิมอร์ฟิซมน้อยที่สุด คือ 273 แถบ ส่วนที่ 30 และ 40 เกรย์ ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลิมอร์ฟิซึมเท่ากับ 316 และ 313 ตามลำดับ (ตารางที่ 10) การเกิดโพลิมอร์ฟิซึมไม่ได้ผันแปรตรงตามปริมาณรังสีที่สูงขึ้น อาจเนื่องจากเมื่อปริมาณรังสีที่สูงขึ้นจะทำให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดลดลง ต้นที่พัฒนาขึ้นภายหลังส่วนใหญ่จึงเป็นต้นที่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมน้อย ทำให้การเกิดโพลิมอร์ฟิซึมเกิดน้อย แม้จะใช้ระดับรังสีที่สูงขึ้นก็ตาม

ตารางที่ 10 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากยодที่พัฒนาจากแคลสส์ที่ได้รับการฉายรังสีระดับต่าง ๆ แบบ
เขียนพลัน โดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอฟแอลพี

คู่ไพรเมอร์	แถบ DNA ทั้งหมด ที่เป็นโพลีเมอร์ฟิซึม	จำนวนแถบดีเอ็นเอเป็นโพลีเมอร์ฟิซึมที่ปริมาณรังสี ระดับต่าง ๆ			
		10 เกรย์	20 เกรย์	30 เกรย์	40 เกรย์
CAG/GTA	146	34	36	39	37
CAG/GTC	113	26	30	29	28
CGT/GTA	77	17	21	21	18
CGT/GTC	61	12	19	16	14
TAC/GCC	173	38	41	50	44
TAC/GTA	211	48	54	53	56
TAC/GTC	120	32	31	28	29
TCG/GCC	122	19	37	34	32
TCG/GTA	117	27	34	28	28
TCG/GTC	87	20	22	18	27
รวม	1,227	273	325	316	313

3.2 ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกิ่งปักชำหลังได้รับรังสีแกมมาแบบ เรื้อรัง

ตรวจสอบความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของกิ่งสนูปดำที่ได้รับรังสีแกมมาด้วย
เทคนิคเอฟแอลพี โดยใช้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 35 คู่ โดยมี 10 คู่ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็น
โพลีเมอร์ฟิซึม โดยต้นที่ได้รับรังสีทุกอัตราและทุกรูปแบบของการให้รังสีเกิดแถบดีเอ็นเอรวม
ทั้งสิ้นจำนวน 550 แถบ ต้นที่ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลีเมอร์ฟิซึมมากที่สุด ต้นหมายเลขที่ 18 ซึ่ง
ได้รับรังสีแกมมาแบบเรื้อรังจำนวน 2 ครั้ง คือ ที่ระดับ 20 เกรย์ และ 150 เกรย์ ตามลำดับ โดยให้
แถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลีเมอร์ฟิซึม 34 แถบ ส่วนต้นหมายเลขที่ 7 ซึ่งได้รับรังสีแกมมาแบบเรื้อรัง
จำนวน 2 ครั้ง คือ ที่ระดับ 10 เกรย์ และ 50 เกรย์ ตามลำดับ ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลีเมอร์ฟิซีน้อย
ที่สุด คือ 21 แถบ (ตารางที่ 11) การฉายรังสีแบบเรื้อรังในกิ่งปักชำสนูปดำทั้งการฉายเพียงครั้งเดียว
และการฉาย 2 ครั้ง แบบฉายซ้ำ ไม่ทำให้เกิดการตายในกิ่งปักชำ ทุกกิ่งสามารถเจริญเติบโตเป็นต้น

ที่สมบูรณ์ได้ อาจเนื่องจากปริมาณรังสีแกมมาที่ใช้มีระดับที่ต่ำกว่าค่า LD_{50} ของกิ้งปักษ์สาบุดำมาก ดังนั้นจากการทดลองเมื่อให้ปริมาณรังสีที่สูงขึ้นกับกิ้งปักษ์ พบว่า โพลีเมอร์ฟิซึมไม่ได้เพิ่มขึ้นตาม โดยเฉพาะเมื่อฉายรังสีเพียงครั้งเดียว แต่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณรังสีรวม (จากการฉายรังสี 2 ครั้ง) เพิ่มขึ้น กิ้งปักษ์ทุกกิ้งที่รอดชีวิตมักเป็นต้นที่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมน้อย ดังนั้น ต้นที่รอดจึงเป็นต้นที่ค่อนข้างปกติ ซึ่งถ้าเพิ่มปริมาณรังสีให้สูงขึ้นจนถึงระดับ LD_{50} อาจจะส่งผลให้การกลายเกิดเพิ่มมากขึ้นและจะสามารถตรวจพบโพลีเมอร์ฟิซึมเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน

ตารางที่ 11 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอฟแอลพีจากดีเอ็นเอของกิ้งสาบุดำพันธุ์โคราชที่ได้รับการฉายรังสีแบบเรื้อรังที่ปริมาณรังสีต่าง ๆ

ต้นหมายเลขที่	จำนวนแถบดีเอ็นเอเป็น โพลีเมอร์ฟิซึมของแต่ละตัวอย่าง																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
ปริมาณรังสีแกมมา (เกรย์)	ครั้งที่ 1	10	15	20	20	10	10	10	10	10	10	15	15	15	20	20	20	20	20	
	ครั้งที่ 2	-	-	-	-	50	50	50	50	100	100	150	150	50	100	100	100	150	150	
คู่ไพรเมอร์	รวม	แถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่เป็น โพลีเมอร์ฟิซึม																		
AAA/CTG	53	2	2	3	2	3	3	2	3	2	2	3	3	2	2	3	5	3	4	4
AAA/CAT	41	1	2	3	1	3	3	1	2	1	1	3	3	1	2	3	4	1	4	2
ACG/CAT	102	5	6	6	6	5	6	6	6	4	6	5	6	6	6	6	6	6	4	1
ACG/CAG	12	0	0	2	0	2	2	0	0	0	0	2	2	0	0	2	0	0	0	0
AAA/TGA	54	3	3	2	3	2	2	2	4	3	3	2	0	3	3	2	3	4	5	5
ACA/TGA	39	3	1	3	1	3	3	0	2	1	1	3	3	0	0	3	3	3	3	3
TCG/GTA	35	2	3	2	1	2	2	0	3	1	1	2	2	1	2	1	2	3	2	3
TCG/GTC	64	3	4	3	5	3	3	4	4	4	4	4	3	3	4	3	2	3	2	3
TAC/GCC	49	3	2	4	3	3	2	3	3	2	2	3	3	3	1	1	3	2	4	2
TAG/GCC	101	6	5	5	6	7	7	3	6	5	4	6	7	3	5	5	5	5	6	5
Total	550	28	28	33	28	33	33	21	33	23	24	33	32	22	25	29	33	30	34	28

จากการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของแคลลัสและกิ้งปักษ์ที่ได้รับการฉายรังสีแกมมาด้วยเทคนิคเอฟแอลพี พบว่า จำนวนโพลีเมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นระหว่างแคลลัสและกิ้งปักษ์ที่ผ่านการฉายรังสีมีจำนวนต่างกันมาก และใช้คู่ไพรเมอร์ในการตรวจสอบต่างกัน เนื่องจากคุณภาพของดีเอ็นเอเริ่มต้นที่นำมาใช้ต่างกัน โดยพบว่ายอดที่พัฒนามาจากแคลลัสมีขายน้อยมาก และเมื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ จะได้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์มากกว่าดีเอ็นเอที่สกัดจากยอดของกิ้งปักษ์ เนื่องจากยอดของกิ้งปักษ์มีขยาภายในเนื้อเยื่อเริ่มต้นจำนวนมาก เมื่อยอดนำมาสกัดดีเอ็นเอ อาจมีการปนเปื้อนของขยา ดีเอ็นเอที่ได้จึงมีความบริสุทธิ์น้อยกว่า และเมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคเอฟแอลพีทำให้ความสามารถในการทำปฏิกิริยาของไพรเมอร์แต่ละคู่แตกต่างกัน

ชนิดของคูโพรเมอร์ที่เหมาะสมในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมรวมทั้งจำนวน โพลีเมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นจึงแตกต่างกัน

การตรวจพบโพลีเมอร์ฟิซึมนั้นแสดงว่าต้นสับค้ำที่ได้รับการฉายรังสีมีความแปรปรวนทาง พันธุกรรมเกิดขึ้น อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงเบสอันเนื่องมาจากรังสีแกมมา ในตำแหน่งที่เป็น ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ ทำให้สามารถหรือไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ มีผลทำให้ขนาด ของชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้เปลี่ยนแปลงไป (สุรินทร์, 2545 ; Kokotovic *et al.*, 1999) การชักนำ ให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีเมื่อยีนหรือโมเลกุลของดีเอ็นเอได้รับรังสี จะเกิดการเปลี่ยนแปลง ทางเคมีรวมทั้งการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของโมเลกุลได้ (อรุณี, 2530)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

ก้านใบอ่อนมีความสามารถในการชักนำให้เกิดเป็น compact callus ได้ดีกว่าก้านดอกอ่อน โดยสูตรอาหารที่เหมาะสม คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่มี TDZ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิด compact callus ได้ 84.38% และแคลลัสที่สภาวะดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ยอดเฉลี่ย 6.62 ยอด

จากการให้รังสีแกมมาแบบเฉียบพลันกับแคลลัสสนูปดำในสภาพปลอดเชื้อ มีผลทำให้ต้นสนูปดำตายเมื่อได้รับปริมาณรังสีตั้งแต่ 10 เกรย์ ขึ้นไป หลังได้รับการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันเป็นระยะเวลา 60 วัน และปริมาณรังสี 30-40 เกรย์ ทำให้ต้นสนูปดำบางต้นมีลักษณะใบที่ผิดปกติและใบมีสีเหลือง และจากการให้รังสีแกมมาแบบเรื้อรังกับกิ่งปักชำสนูปดำ ที่ระดับ 0-150 เกรย์ ไม่ส่งผลให้เกิดการตาย แต่มีผลทำให้ลักษณะทางสัณฐานบางลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไป ได้แก่ ลักษณะใบต่าง ก้านแดง รูปร่างลักษณะของใบที่เปลี่ยนแปลง รวมถึงความยาวกิ่งที่เพิ่มขึ้นหรือสั้นลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยเฉพาะอย่างยิ่งลักษณะการออกดอกที่เร็วขึ้น โดยต้นสนูปดำที่ได้รับการฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรัง ที่ระดับ 20 เกรย์ เพียงครั้งเดียวมีการออกดอกเร็วที่สุดและเร็วกว่าชุดควบคุมต้นแรกที่ออกดอก 11 วัน

เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นสนูปดำที่ได้รับรังสีที่ปริมาณต่าง ๆ ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีโดยใช้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 35 คู่ไพรเมอร์ มีคู่ไพรเมอร์ 10 คู่ ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลิมอร์ฟิซึม แสดงว่าต้นสนูปดำที่ได้รับการฉายรังสีมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น

ข้อเสนอแนะ

การฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันกับเซลล์สับดูดำในระดับที่สูงกว่าหรือใกล้เคียงค่า LD_{50} มักส่งผลให้ยอดที่ได้มีลักษณะแคระแกร็น ไม่สามารถชักนำให้เป็นต้นได้ ดังนั้นถ้าต้องการได้ต้นสับดูดำที่ผ่านการฉายรังสีและสามารถนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้ ควรฉายรังสีให้กับเซลล์สับดูดำในปริมาณรังสีที่ต่ำกว่าค่า LD_{50}

การฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรังให้กับกิ่งปักชำสับดูดำ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานบางลักษณะ เช่น ความยาวกิ่งที่สั้นลง ลักษณะการออกดอกที่เร็วขึ้น ซึ่งลักษณะดังกล่าวมีประโยชน์ในแง่ของการปรับปรุงพันธุ์ อาจใช้ลักษณะเหล่านี้เป็นพ่อแม่พันธุ์เพื่อปรับปรุงให้ได้พันธุ์สับดูดำที่มีลักษณะที่ดีขึ้นต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กฤษณา โกวิทวณิช. 2546. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชอาหารสัตว์บางชนิด และตรวจสอบพันธุ์กลายที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยรังสีโดยเทคนิค AFLP. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กาญจนาрі พงษ์ณี, ฅฐกร ประดิษฐ์สรรพ และ วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย. 2550. การปรับปรุงพันธุ์ไม้สกุลอานูเบียส (*Anubias* spp.) โดยการฉายรังสีแกมมาพร้อมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. น. 67-68. ใน รายงานการประชุมวิชาการ ประจำปี 2550. กรมประมงและศูนย์พัฒนาการประมงแห่งเอเชียตะวันออกเฉียงใต้, กรุงเทพฯ.

คำณูญ กาญจนภูมิ. 2544. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สำนักพิมพ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 162 น.

เจริญ คำหล้า. 2549. ผลของรังสีแกมมาที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของบอนสี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

ชาญวิทย์ ม่วงมิตร. 2537. การชักนำให้เกิดพันธุ์อ้อยทนเค็มโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทวีศักดิ์ อุ่ณจิตติกุล. 2548. สบู่ดำพืชพลังงานสารพัดประโยชน์. สำนักพิมพ์ วชิระ, กรุงเทพฯ. 99 น.

ธิดากุล แสงอุดม. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อละหุ่งและการชักนำให้เกิดความแปรปรวนโดยใช้รังสีแกมมา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธัญญา จำเลิศ. 2532. ผลของรังสีแกมมาที่มีต่อเนื้อเยื่อรากที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นงลักษณ์ เทียนเสรี. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบีโกเนียเร็กซ์และผลของรังสีแกมมา.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นพดล จรัสสัมฤทธิ์. 2537. ฮอโมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช. กรุงเทพฯ.
128 น.

นพรัตน์ อินสร. 2552. การปรับปรุงพันธุ์บานชื่นเลี้ยงใบด่างโดยใช้รังสีแกมมา. วิทยานิพนธ์
ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นันทน์ภัส เทพสำราญ. 2549. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.). วิทยานิพนธ์
ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยศิลปากร.

_____, โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธิ และ อารีย์ ทองภักดี. 2549. การชักนำให้เกิด
แคลลัสและเกิดยอดจากชิ้นส่วนก้านใบของสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.). ใน การประชุม
วิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 6. 7-10 พฤศจิกายน ณ โรงแรมโลตัส ปางสวนแก้ว
เชียงใหม่.

บุษราภรณ์ งามปัญญา. 2548. เทคโนโลยีเซลล์และเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิคพื้นฐาน.
สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม. 111 น.

พีรเดช ทองอำไพ. 2537. ฮอโมนพืชและสารสังเคราะห์แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย.
สำนักพิมพ์ วิจัยการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 196 น.

ไพบุลย์ กวินเลิศวัฒนา. 2524. หลักการและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพืชสวน,
คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 109 น.

ระพีพันธ์ ภาสบุตร. 2525. การใช้น้ำมันสบู่ดำเดินเครื่องยนต์ดีเซล. สำนักพิมพ์ คุรุสภา,
กรุงเทพฯ. 34 น.

รังสัน หล้าพรหม. 2549. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่บางชนิดในประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีและไมโครแซทเทลไลท์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิษุตา รุ่งเรือง. 2537. ผลของโคลชิซินและรังสีแกมมาที่มีต่อการกลายพันธุ์ของหน้าวัวพันธุ์ **Double Spathe** ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิทยา พรหมมี และ สมปอง เตชะโต. 2541. การปรับปรุงพันธุ์มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) โดยใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิภา หงษ์ตระกูล. 2544. ผลงานวิจัยการประยุกต์ใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค AFLP, น.70-76. ใน สัมมนาเชิงปฏิบัติการการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP วันที่ 26-29 พฤศจิกายน 2544. กรมวิชาการเกษตร.

ศิริวรรณ บุรีคำ และ รุ่งทิพย์ กาวิตา. 2550. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสนับดำ (*Jatropha curcas* L.) ในสภาพปลอดเชื้อ. น. 130-135. ใน เรื่องเต็มการประชุมวิชาการสับดำแห่งชาติ ครั้งที่ 1. 29 พฤษภาคม 2550. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2544. สรีรวิทยาของพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 237 น.

สมบัติ ชินะวงศ์. 2548. แปลงปลูกสวนป่าสนับดำ. ว. เกษตรกรรมธรรมชาติ. 8 : 32-35.

สมพร ประเสริฐส่งสกุล. 2549. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์พืช. สำนักพิมพ์โพธิ์เพชร, กรุงเทพฯ. 127 น.

สินุช ลามศรีจันทร์. 2527. เอกสารคำสอนวิชาพันธุศาสตร์รังสี. คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 262 หน้า

_____. 2536. การกลายพันธุ์ของพืช. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 197 น.

_____. 2540. การกลายพันธุ์ของพืช. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 205 น.

_____, อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์ และ สุมินทร์ สมุทคุปดี. 2534. ผลของรังสีแกมมาต่อการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงของถั่วเขียว. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.). 25: 139-145.

สุขสันต์ สุทธิผลไพบูลย์ และ ระพีพันธุ์ ภาสบุตร. 2544. สบู่ดำ: พืชมหัศจรรย์ สกัดทดแทนน้ำมันดีเซล. ว. เพื่อนชาวทุ่ง. 45-48.

สุมน นิลรัตน์นิสากร. 2546. ผลของรังสีแกมมา ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีต่อการเจริญเติบโตของหญ้าน้ำจืด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 116 น.

อรดี สหวัชรินทร์. 2539. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สำนักพิมพ์ อักษรสยามการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 50 น.

อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์. 2530. รังสีชีววิทยา. เอกสารประกอบคำสอนวิชารังสี 421. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 250 น.

_____. 2550. การกลายพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 279 น.

อัญชลี ชินสุข. 2546. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมและรังสีแกมมาที่มีผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยบัวสีส้ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

แอนนา สายมณีรัตน์, พิทยาภรณ์ สุภรพัฒน์ และ สุปราณี งามประสิทธิ์. 2546. โครงการการรวบรวมพันธุ์สับดูดำเพื่อใช้เป็นเชื้อพันธุ์กรรม. สถาบันอินทรีจันทร์สถิตย์เพื่อการค้นคว้าและพัฒนาพืชศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Afshari R.T, R. Angoshtari and S. Kalantari. 2011. Effects of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. **POJ.** 4(2): 60-67.

Aldrich, K.J and C.A Cullis. 1993. RAPD analysis in flax: optimization of yield and reproducibility using KlenTaq1 DNA polymerase, chelex 100 and gel purification of genomic DNA. **Plant Mol. Biol. Rep.** 11: 128-141.

Datta, S.K. 2009. A report on 36 years of practical work on crop improvement through induced mutagenesis, pp 253-256. In Q.Y. Shu (ed.), **Induced Plant Mutations in the Genomics Era**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Dhakshanamoorthy, D., R. Selvaraj and A. Chidambaram. 2010. Physical and chemical mutagenesis in *Jatropha curcas* L. to induce variability in seed germination, growth and yield traits. **Rom. J. Biol. - Plant Biol.** 55: 113-125.

Dwimahyani I. and Ishak. 2004. Induced mutation on *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) for improvement of agronomic characters variability. **Atom. Indonesia J.** 30: 53-60

Heller, J. 1996. Physic nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben. **IPGRI.** 66 p.

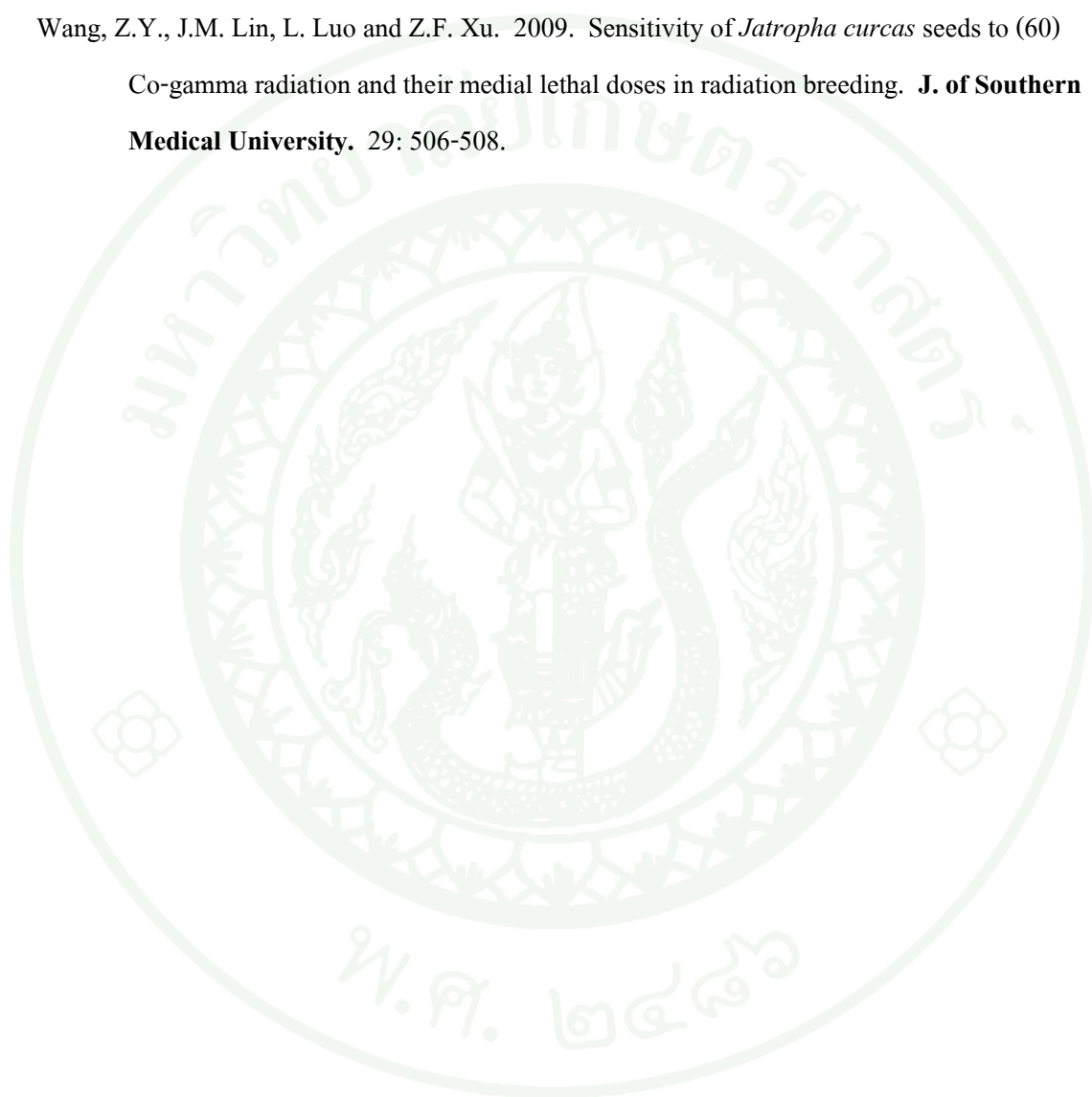
Kokotovic, B., N.F. Friis, J.S. Jensen and P. Ahrens. 1999. Amplified fragment length polymorphism fingerprint of *Mycoplasma* species. **J. Clin. Microbiol.** 37 : 3300-3307.

- Lamseejan, S., P. Jompuk and S. Deeseepan. 2003. Improvement of chrysanthemum variety “Taihei” through *in vitro* induced mutation with chronic and acute gamma rays. **J. Nuclear Soc. Thai.** 6(2): 1-13.
- Liscum, E. and W.R. Briggs. 1995. Mutations in the NPH1 locus of arabidopsis disrupt the perception of phototropic stimuli. **Plant cell.** 7: 473-485.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15: 473-497.
- Qi-Bao, S., L-F. Li, Y. Li, G-J. W. and X-J. Ge. 2008. SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant *Jatropha curcas* in China. **Crop Sci.** 48: 1865–1871.
- Qin, W., L. Wei-Da, L. Yi, P. Shu-Lin, X. Ying, T. Ling and C. Fang. 2004. Plant regeneration from epicotyl explant of *Jatropha curcas*. **J. Physiol Mol Biol Plants.** 30: 475-478.
- Rajore, S. and Batra, A. 2005. Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas* L. **J. Plant Biochem. Biotech.** 14: 73-75.
- _____, Sardana, J. and Batra, A. 2002. *In vitro* cloning of *Jatropha curcas* L. **J. Plant Biol.** 29: 195-198.
- Reinhard, K.H. 2005. Fighting desertification by integrated utilisation of the *Jatropha* plant an integrated approach to supply energy and create income for rural development. **Unpublished project report.** Project *Jatropha*, Germany.
- Sardana, J. and Batra, A. 2000. An expeditious method for regeneration of somatic embryos in *Jatropha curcas* L., **Phytomorphology.** 50: 239-242.

- Shah, T.M., J.I. Mirza, M.A. Haq and B.M. Atta. 2008. Induced genetic variability in chick pea (*Cicer arietinum* L.). II. Comparative mutagenic effectiveness and efficiency of physical and chemical mutagens. **Pak. J. Bot.** 40(2): 605-613.
- Songsri, P., B. Suriharn, J. Sanitchon, S. Srisawangwong and T. Kesmla. 2011. Effects of gamma radiation on germination and growth characteristics of physic nut (*Jatropha curcas* L.). **J. Biol. Sci.** 11: 268-274.
- Sudheer, P., D. V. N., S. Singh, S.G. Mastan, J. Patel and M.P. Reddy. 2008. Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. using RAPD, AFLP and SSR markers. **Mol Biol Rep.** 36: 1357–1364.
- Sujatha, M. and M. Dhingra. 1993. Rapid plant regeneration from various explants of *Jatropha integerrima*. **PCTOC.** 35: 293-296.
- _____ and N. Mukta. 1996. Morphogenesis and plant regeneration from cultures of *Jatropha curcas*. **PCTOC.** 44: 135-141.
- _____, H.P.S. Makkar and K. Becker. 2005. Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. **J. Plant Growth Regul.** 47: 83–90.
- _____ and T.P. Reddy. 2000. Morphogenic responses of *Jatropha integerrima* explants to cytokinins. **Biologia, Bratislava.** 55: 99-104.
- Tatikonda, L., S.P. Wani, S. Kannan, N. Beerelli, T.K. Sreedevi, D.A. Hoisington, P. Devi and R.K. Varshney. 2009. AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L., a biofuel plant. **Plant Sci.** 176: 505–513

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, Theo van de Lee, M. Hornes, A. Friters, J. Pot, J. Paleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acid Res.** 23: 4407–4414.

Wang, Z.Y., J.M. Lin, L. Luo and Z.F. Xu. 2009. Sensitivity of *Jatropha curcas* seeds to (60) Co-gamma radiation and their medial lethal doses in radiation breeding. **J. of Southern Medical University.** 29: 506-508.





ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962)

ธาตุอาหาร	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
Macronutrients	
NH_4NO_3	1,650.000
KNO_3	1,900.000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.000
KH_2PO_4	170.000
Micronutrients	
H_3BO_3	6.200
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22.300
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10.930
KI	0.830
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Fe-EDTA solution	
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	37.250
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.850
Organic compounds	
Glycine	2.000
Nicotinic acid	0.500
Pyridoxine.HCl	0.500
Thiamine.HCl	0.100
Myo-inositol	100.000
Other	
Sucrose	30,000.000
pH 5.6-5.8	

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวอัญชิสา ปานแก้ว
วัน เดือน ปี ที่เกิด	6 ตุลาคม 2526
สถานที่เกิด	จ.ยะลา
ประวัติการศึกษา	จบการศึกษาระดับปริญญาตรี ปีการศึกษา 2549 สาขาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนบัณฑิตผู้ช่วยวิจัย โครงการพัฒนาพันธุ์สับดำ ซึ่งสนับสนุนทุนวิจัยโดย บริษัท โปรเทคโนโลยี นวัตกรรม (ประเทศไทย) จำกัด