ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร — **สาขา**

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา — **ภาควิชา**

เรื่อง การชักนำความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้กับว่านชักมดลูกโดยวิธีเพิ่มชุดโครโมโซมและก่อกลายพันธุ์

Induction of Genetic Variation in *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. by Polyploidy and Mutagenesis

นามผู้วิจัย นางสาวจุรีภรณ์ ศรีใหม่

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทร์เปรม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา .....

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครธนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การชักนำความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้กับว่านชักมดลูกโดยวิธีเพิ่มชุดโครโมโซม และก่อกลายพันธุ์

Induction of Genetic Variation in *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. by Polyploidy and Mutagenesis

โดย

นางสาวจุรีภรณ์ ศรีใหม่

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
พ.ศ.2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จุรีภรณ์ ศรีใหม่ 2554: การชักนำความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้กับว่านชักมดลูกโดยวิธีเพิ่มชุดโครโมโซมและก่อกลายพันธุ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทร์เปรม, Ph.D. 59 หน้า

เพื่อชักนำให้เกิดการความแปรปรวนทางพันธุกรรมกับว่านชักมดลูก ได้นำต้นว่านชักมดลูกที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ระดับความเข้มข้นของรังสี 0 1 2 3 4 5 6 7 และ 8 กิโลแรด พบว่า ปริมาณรังสีที่ระดับความเข้มข้น 5.13 กิโลแรด ทำให้ต้นว่านชักมดลูกตาย 50% หลังได้รับการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน 60 วัน จากนั้นนำต้นว่านชักมดลูกออกปลูกในกระถางพบว่า ที่ปริมาณรังสี 3 กิโลแรด ลำต้นของต้นว่านชักมดลูกเปลี่ยนเป็นสีแดงจำนวน 2 ต้น ในการทดลองให้สารโคลชิซินนั้นต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0 0.1% และ 0.2% นาน 24 ชั่วโมง หรือ 48 ชั่วโมง พบว่า มีจำนวนปากใบเฉลี่ยเท่ากับ 8.56 7.00 6.56 6.56 และ 6.56 ต่อหน่วยพื้นที่ตามลำดับ และต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับสารโคลชิซินมีขนาดของปากใบใหญ่ขึ้น จากนั้นเมื่อนำต้นว่านชักมดลูกเหล่านี้ไปตรวจ nuclear content โดยเครื่อง flow cytometer พบว่า มีทั้งต้นที่เป็นดิพพลอยด์ และต้นที่เป็น mixoploid คือต้นที่เป็นทั้งดิพพลอยด์และเตตราพลอยด์ในต้นเดียวกัน จากการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับการฉายรังสีด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 คู่ไพรเมอร์พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนทั้งหมด 122 แถบ ที่ระดับปริมาณรังสี 2 กิโลแรด ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลีมอร์ฟิซึมมากที่สุด คือ 29 แถบ ส่วนที่รังสี 6 กิโลแรด ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลีมอร์ฟิซึมน้อยที่สุด คือ 12 แถบ ส่วนต้นที่ได้รับสารโคลชิซินไม่พบแถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลีมอร์ฟิซึม แสดงว่าต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น ส่วนต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับสารโคลชิซินไม่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม เมื่อนำหัวจากต้นอายุ 1 ปีมาวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในว่านชักมดลูก ด้วยวิธี HPLC พบว่าหัวของต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับการฉายรังสีและโคลชิซิน มีปริมาณของสารสำคัญบางชนิดมากขึ้น ยกเว้นต้นที่ได้รับปริมาณรังสี 6 และ 7 กิโลแรด และต้นที่ได้รับสารโคลชิซิน 0.2 % นาน 24 ชั่วโมง ที่มีปริมาณของสารเฉลี่ยน้อยกว่าต้นควบคุม โดยต้นที่ได้รับปริมาณรังสี 3 krad มีปริมาณสารเฉลี่ยมากที่สุด

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Jureeporn Srimai 2011: Induction of Genetic Variation in *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. by Polypoidy and Mutagenesis. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field : Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Sontichai Chanprame, Ph.D. 59 pages.

Induction of genetic variation in *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. was carried out. *C. xanthorrhiza* Roxb. was cultured *in vitro* on solid MS medium supplemented with 5 mg/l BA. The cultures were subjected to acute irradiation with gamma rays at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 krad. It was found that $LD_{(50,60d)}$ was 5.13 krad. The irradiated plants were then transferred to pots. At 3 krad of irradiation, the color of leaf sheath of 2 plants turn to red color. In the experiment of colchicine treatment, the plants were treated with 0.1 or 0.2 % colchicine for 24 or 48 hr. It was found that the average number of stomata per unit area were 8.56, 7.00, 6.56, 6.56 and 6.56 for 0, 0.1 or 0.2 % colchicine for 24 hr and 0.1 or 0.2 % colchicine for 48 hr, respectively. The stomatal size of colchicine treated plants was also larger than the normal plant. Then, nuclear content was measured by flow cytometry technique, it revealed that some plants were diploid and some were mixoploid. To determine genetic variation induced by irradiation and colchicine treatment, AFLP technique with 10 primer pairs was applied. The total of 122 DNA bands were amplified. The most polymorphic of 29 DNA bands were received from 2 krad-plant. The least polymorphic of 12 DNA bands were received from 6 krad-plant. Whereas the plants treated with colchicine showed no polymorphism. It was indicated that colchicine treatment could not induce genetic variation in *C. xanthorrhiza*. To determine secondary metabolite from one-year-old rhizomes of irradiation and colchicine treated plants, HPLC technique was used. It was found that the amount of substance was increased except the 6 and 7 krad and 0.2 % colchicines for 24 hr treated plant which possessed lower amount of the substance than that of the control. The highest average amount of substance was obtained from 3 krad-plant.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สนธิชัย จันทร์เปรม ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูงยิ่ง ที่กรุณาให้ความรู้ ให้คำปรึกษาวิธีการดำเนินการวิจัย และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ของวิทยานิพนธ์ รวมทั้งช่วยเหลือในด้านอื่น ๆ เสมอมา ขอกราบขอบพระคุณกรรมการที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เสริมศิริ จันทร์เปรม ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณ ดร. บุบผา คงสมัย ประธานคณะกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ และดร. กุลนาถ อบสุวรรณ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ให้ความกรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนทุนบัณฑิตผู้ช่วยวิจัยและงบประมาณในการทำวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

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

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ชายทั้งสอง รวมทั้งทุกคนในครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจ ให้คำปรึกษา ให้การส่งเสริมในด้านการศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์แก่ข้าพเจ้าด้วยดีเสมอมา

จุรีภรณ์ ศรีใหม่

เมษายน 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	19
อุปกรณ์	19
วิธีการ	21
ผลและวิจารณ์	32
สรุปและข้อเสนอแนะ	47
สรุป	47
ข้อเสนอแนะ	49
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	50
ภาคผนวก	57
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	59

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คู่ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกที่ปลาย 3’ สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการทำพีซีอาร์ II	28
2	จำนวนต้นที่รอดชีวิตของต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับรังสีแบบเฉียบพลันในปริมาณรังสีต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 60 วัน หลังจากฉายรังสี	33
3	จำนวนปากใบเฉลี่ยของต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับสารโคลชิซิน 2 ระดับความเข้มข้น และ 2 ระยะเวลา	37
4	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี	41
5	ปริมาณสารสำคัญของหัวว่านชักมดลูกอายุ 1 ปี ที่ได้จากต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับการฉายรังสีและโคลชิซิน	45

ตารางผนวกที่

1	องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962)	58

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรังสี (กิโลแรด) กับเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอด ของต้นว่านชักมดลูกที่ระยะเวลา 60 วัน หลังได้รับการฉายรังสี แกมมาแบบเฉียบพลัน	33
2	ต้นว่านชักมดลูกหลังจากได้รับการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน ที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 3 4 5 6 7 และ 8 กิโลแรด เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ หลังได้รับรังสี	34
3	ต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน ที่ปริมาณ 0 1 2 3 4 5 6 และ 7 กิโลแรด หลังย้ายปลูกในสภาพกระถาง เป็นเวลา 10 สัปดาห์	36
4	nuclear content ของว่านชัดมดลูกที่ตรวจสอบโดยใช้เครื่อง flow cytometor ของต้นปกติ (ภาพ ก) และต้นที่ได้รับสารโคลชิซินที่ได้รับสารโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.1% นาน 48 ชั่วโมง (ภาพ ข)	39
5	Calibration curve ของ curcuminoids standard reference	42
6	Chromatogram ของ curcuminoids standard reference mAU = milli Absorbance Unit, min = นาที	42
7	Chromatogram ของตัวอย่างสารสกัดจากหัวของต้นว่านชักมดลูกต้นปกติ	43
8	Chromatogram ของตัวอย่างสารสกัดจากหัวของต้นว่านชักมดลูก ที่ได้รับสารโคลชิซิน 0.1 % นาน 48 ชั่วโมง	46
9	Chromatogram ของตัวอย่างสารสกัดจากหัวของต้นว่านชักมดลูก ที่ได้รับปริมาณรังสี 7 กิโลแรด	46

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AFLP	amplified fragment length polymorphism
BA	6-benzylaminopurine
DNA	deoxyribose nucleic acid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
krad	กิโลแรด
PCR	polymerase chain reaction

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การชักนำความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้กับว่านชักมดลูกโดยวิธีเพิ่มชุดโครโมโซมและก่อกลายพันธุ์

Induction of Genetic Variation in *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. by Polyploidy and Mutagenesis

คำนำ

เนื่องจากในปัจจุบันความต้องการใช้ยารักษาโรคมีมากขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มจำนวนประชากรอย่างมาก ทำให้การรักษาทางด้านอื่น ๆ มีบทบาทมากยิ่งขึ้น นอกเหนือจากการแพทย์แผนปัจจุบัน ได้แก่การแพทย์ทางเลือกอื่น ๆ เช่น การฝังเข็ม การกดจุด รวมถึงการแพทย์แผนไทยที่มีการใช้สมุนไพร และในปัจจุบันยังมีกลุ่มคนที่หันมาให้ความสำคัญกับการดูแลสุขภาพด้วยวิธีทางธรรมชาติมากขึ้น ทำให้สมุนไพรมีบทบาทเพิ่มขึ้นทั้งในและต่างประเทศ

ว่านชักมดลูกเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่อยู่ในสกุลเดียวกับขมิ้นชัน ส่วนของรากใช้แก้อาการท้องอืดท้องเฟ้อ หัวหรือเหง้าใช้รักษาและบำรุงอาการต่าง ๆ ในสตรี เช่น ช่วยให้มดลูกเข้าอู่ แก้ปวดมดลูก แก้ประจำเดือนมาไม่ปกติ (สมาคมโรงเรียนแพทย์แผนโบราณ สำนักวัดพระเชตุพนวิมลมังคลาราม, 2520; เลื่อน, 2523; สุนทรี, 2535; บุญค้ำ, 2544) แก้ริดสีดวงทวาร (เลื่อน, 2523; บุญค้ำ, 2544; อภิชาติ, 2550) เป็นต้น ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีการใช้ว่านชักมดลูกเป็นองค์ประกอบสำคัญในยาน้ำสตรีชนิดต่าง ๆ ที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย นอกจากนี้ว่านชักมดลูกยังมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน แต่มีฤทธิ์อ่อนกว่า ช่วยกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เยื่อบุช่องคลอด เยื่อบุมดลูก และช่วยเสริมสร้างความหนาแน่นของกระดูก (Piyachaturawat *et al*., 1995b, 1995c, 1998, 1999a; Suksamrarn *et al*, 2008) ต้านอนุมูลอิสระ (Niumsakul *et al*., 2007) ลดคอเลสเตอรอล กระตุ้นการหลั่งน้ำดี (Piyachaturawat *et al*., 1995a, 1999b; Suksamrarn *et al*., 1997) ลดการอักเสบ (Jantaratnotai *et al*, 2006; Sodsai *et al*, 2007) เป็นต้น ว่านชักมดลูกจึงเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพสูงและน่าสนใจอีกชนิดหนึ่ง และยังเป็นวัตถุดิบที่สำคัญส่วนหนึ่งในการผลิตยาทางการแพทย์แผนไทย และนิยมใช้อยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มคุณภาพและปริมาณสารที่มีฤทธิ์ทางยาให้มากขึ้นจึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อช่วยตอบสนองความต้องการที่มีมากขึ้นตลอดเวลา และเพื่อลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ลง การใช้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เทคโนโลยีชีวภาพร่วมกับการก่อกลายพันธุ์และการเพิ่มชุดโครโมโซมเป็นแนวทางหนึ่งที่มีโอกาสประสบความสำเร็จสูง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. ชักนำความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้แก่ว่านชักมดลูกโดยใช้สารโคลชิซินและการก่อกลายพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมา

2. ศึกษาผลของการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมโดยใช้สารโคลชิซินและการก่อกลายพันธุ์โดยใช้รังสีในว่านชักมดลูก ที่มีต่อปริมาณสารสำคัญในหัวว่านชักมดลูก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1.ว่านชักมดลูก

1.1 ลักษณะทางพฤษศาสตร์

ว่านชักมดลูก (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae สกุล *Curcuma* ชนิด *xanthorrhiza* Roxb. มีชื่อพื้นเมือง ได้แก่ ทรหด (กรุงเทพฯ) ว่านพระยาหัวศึก ว่านการบูรเลือด เป็นไม้ล้มลุก ประเภทปีเดียว (annual herb) หัวเป็นแง่งลักษณะกลมใหญ่ เนื้อในหัวสีขาว ต้นและใบเหมือนขมิ้นแต่ใหญ่กว่าหลายเท่า ก้านใบสีเขียว ยาว 30-40 เซนติเมตร ลักษณะด้านในเป็นร่อง ด้านนอกกลมนูน บริเวณของก้านใบแผ่ออกเป็นกาบโอบหุ้มกันเป็นลำสูง 40-50 เซนติเมตร ใบรูปรียาว ขนาดกว้าง 12-15 เซนติเมตร ยาว 40-60 เซนติเมตร ปลายใบแหลมเป็นติ่ง โคนใบสอบ เส้นกลางใบด้านบนเป็นร่อง สีเขียว แดง ใบสีเขียว ด้านล่างนูนสีเขียวเข้ม แผ่นใบด้านบนมีสีเขียวเข้มกว่าทางด้านล่าง (เสงี่ยม, 2519; สมาคมว่านแห่งประเทศไทย, 2525; บุญค้ำ, 2544) ว่านชักมดลูกสามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินทุกประเภท แต่จะเจริญเติบโตได้ดีในดินร่วนหรือดินร่วนปนทราย (ชมรมว่านมหาเศรษฐี, 2549; โชติอนันต์, 2550)

1.2 ประโยชน์และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ว่านชักมดลูกเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่ใช้หัวหรือเหง้ารักษาและบำรุงอาการต่าง ๆ ในสตรี อาจใช้ว่านชักมดลูกเพียงชนิดเดียว หรือใช้ร่วมกับสมุนไพรตัวอื่นในรูปตำหรับยาในการรักษา ว่านชักมดลูกมีสรรพคุณช่วยลดการอักเสบ อาการปวดมดลูก ปวดประจำเดือน ชักมดลูกเข้าอู่ และแก้มดลูกพิการ วิธีใช้ให้นำหัวว่านชักมดลูกมาฝานแล้วย่างไฟ จากนั้นนำไปดองเหล้ากิน (สมาคมโรงเรียนแพทย์แผนโบราณ สำนักวัดพระเชตุพนวิมลมังคลาราม, 2520; เลื่อน, 2523; สุนทรี, 2535; บุญค้ำ, 2544) หรือจะนำว่านมาตำเป็นผงกินกับน้ำร้อน หรือผสมกับน้ำผึ้งปั้นลูกกลอน หรือกินสด ช่วยรักษาโรคริดสีดวงทวารและโรคลำไส้ (เลื่อน, 2523; บุญค้ำ, 2544; อภิชาติ, 2550) นำหัวว่านมาโขลกกับเหล้าขาว กรองเอาแต่น้ำดื่มรักษาโรคไส้เลื่อน และกระบังลมเคลื่อนในผู้ชายได้ (สมาคมโรงเรียนแพทย์แผนโบราณ สำนักวัดพระเชตุพนวิมลมังคลาราม, 2520; บุญค้ำ, 2544) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของว่านชักมดลูก พบว่าในหัวของว่านชักมดลูกมีสารสำคัญหลายชนิด เช่น phloracetophenone glucoside ซึ่งมีฤทธิ์ช่วยลดคอเลสเตอรอล กระตุ้นการหลั่งน้ำดี (Piyachaturawat *et al*., 1995a, 1999b; Suksamrarn *et al*., 1997) สาร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

diarylheptanoids ซึ่งเป็น phytoestrogen ชนิดหนึ่งที่มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน แต่มีฤทธิ์อ่อนกว่า ช่วยกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เยื่อบุช่องคลอด เยื่อบุช่องมดลูก และช่วยเสริมสร้างความหนาแน่นของกระดูก (Piyachaturawat *et al*., 1995b, 1995c, 1998, 1999a; Suksamrarn, 2008) สาร 5-hydroxy-7-(4-hydroxyphenyl)-1-1-phenyl-(1*E*)-1-heptene และ 7-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-1-phenyl-(1*E*)-1-heptene ช่วยลดการอักเสบ (Jantaratnotai *et al*, 2006; Sodsai *et al*, 2007) สาร diarylheptanoids ที่แยกได้จากสารสกัดส่วนที่มีขั้วน้อยมีฤทธิ์ฆ่าไส้เดือนตัวกลม (nematodes) (Jurgens *et al*, 1994) สารในกลุ่ม curcuminoids ช่วยต้านอนุมูลอิสระ (สนั่นและฉัตรชัย, 2546; Niumsakul *et al*., 2007) เป็นต้น

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ปัจจุบันนิยมใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในการปรับปรุงพันธุ์พืช เนื่องจากช่วยลดระยะเวลาในการปฏิบัติงาน และช่วยแก้ไขเรื่องความไม่สามารถรวมตัวของลักษณะพันธุกรรม (incompatible) ในขบวนการถ่ายละอองเกสร หรือการปฏิสนธิ จากการผสมข้ามระหว่างชนิดได้ โดยการใช้เทคนิคการผสมพันธุ์ในหลอดทดลอง (*in vitro* fertilization) และการกู้ชีพคัพภะ (embryo rescue)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ การเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช ไม่ว่าจะเป็นอวัยวะ เนื้อเยื่อ เซลล์ หรือเซลล์ที่ไม่มีผนัง (protoplast) มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วย แร่ธาตุ น้ำตาล วิตามินและสารควบคุมการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และอยู่ในสภาวะควบคุมสิ่งแวดล้อม ส่วนของพืชเหล่านี้มีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้หลายรูปแบบ คือ เป็นต้นโดยตรง หรือเกิดเป็นกลุ่มของเซลล์ เรียกว่า แคลลัส (callus) หรือ เกิดเป็นคัพภะ เรียกว่า โซมาติกเอมบริโอ (somatic embryo) และเมื่อตัดเป็นชิ้น ๆ แล้วเปลี่ยนอาหารก็สามารถเพิ่มปริมาณได้ไม่มีที่สิ้นสุด ผลสุดท้ายก็จะได้ต้นจำนวนมาก ที่มีลักษณะเหมือนกันทุกประการ (อรดี, 2539)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะประสบความสำเร็จมากน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างที่มีบทบาทควบคุมการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืช (ไพบูลย์, 2524) สรุปได้ ดังนี้

1. ปัจจัยภายในพืช (endogenous factors)

1.1 ลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) คือ การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อไปเป็นยอดหรือรากนั้นขึ้นอยู่กับชนิดพืช พืชบางชนิดอาจเกิดเป็นยอดหรือรากได้ง่าย ในขณะที่พืชอีกชนิดหนึ่งเกิดได้ยาก แม้จะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของพันธุกรรม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (phytohormone) ในชิ้นส่วนพืช ฮอร์โมนบางชนิดอาจจะช่วยส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช และฮอร์โมนบางชนิดก็สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้เช่นกัน

2. ปัจจัยภายนอก

2.1 แสง (light) แสงไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการปรุงอาหารของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง แต่แสงช่วยให้เนื้อเยื่อมีการพัฒนาไปเป็นส่วนต่าง ๆ ของพืชได้ ซึ่งการให้แสงควรพิจารณา ถึงคุณภาพของแสง ความเข้มของแสง และระยะเวลาในการให้แสง

2.2 อุณหภูมิ (temperature) โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อจะประมาณ 25 องศาเซลเซียส

2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators) การเกิดเป็นต้นรากหรือแคลลัสของพืชแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับความสมดุลของปริมาณออกซินและไซโตไคนินในอาหาร

3. ปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่ ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง สภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและส่วนประกอบของพืช

ได้มีการศึกษาวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) โดย สิรินทร์ (2532) ได้ทดลองเพิ่มปริมาณต้นขิงในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้หน่อจากเหง้าของขิง พบว่า อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิเพาะเลี้ยง 25 ± 2 องศาเซลเซียส สามารถเพิ่มปริมาณขิงได้มากที่สุด 5.6 ต้น ภายในเวลา 3 สัปดาห์ และเมื่อใช้อาหารเหลวสูตร ปุ๋ยบีคอม (20-20-20 ปริมาณ 3-5 กรัมต่อลิตร) ทำให้ขิงมีอัตราการเจริญเติบโตได้ใกล้เคียงกัน แต่เกิดจำนวนใบน้อยกว่าอาหารสูตร MS โดยการเพาะเลี้ยงขิงบนอาหารเหลวไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องเขย่า

Malamug *et al*. (1991) ชักนำให้เกิดแคลลัสโดยใช้หน่อขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) พันธุ์ Kintoki ขนาด 1.0-1.5 เซนติเมตร ในอาหารสูตรที่มีธาตุอาหารหลักของ MS และธาตุอาหารรองของ Ring และ Nitsh ร่วมกับน้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร และวุ้น 8 กรัมต่อลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของ 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) และความเข้มข้นของ BA แตกต่างกัน พบว่าสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากปลายยอดได้มากที่สุดคือสูตรที่เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่มีลักษณะนุ่มจะถูกแบ่งแยกออกไป และเพิ่มปริมาณแคลลัสในอาหารสูตรเดิม ยอดจะพัฒนาขึ้นจากแคลลัสได้ดีบนอาหารสูตรที่เติม BA 1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถเพิ่มจำนวนยอดได้สูงที่สุดในอาหารที่ใช้ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่พบว่าอัตราการเกิดของต้นใหม่ลดลงในครั้งที่ 3 ของการเปลี่ยนอาหาร การสร้างรากจะไม่ขึ้นอยู่กับชนิดอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง

จุฑารัตน์ (2535) ศึกษาผลของ BA และน้ำตาลซูโครสในอาหารสูตร MS ที่มีผลต่อการเกิดยอดของขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) โดยใช้ตาจากเหง้า พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 45 กรัมต่อลิตร ทำให้ขมิ้นชัน accession no. 06068801 มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 2.2 ยอดต่อต้น และมีการเจริญเติบโตดีที่สุด และอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ทำให้ขมิ้นชัน accession no. 15038802 มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 2.9 ยอดต่อต้น และมีการเจริญเติบโตดีที่สุด หลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 2 เดือน

ช่อแก้ว (2548) ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์ของขมิ้นชันและว่านนางคำในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำส่วนของลำต้นของขมิ้นชันและว่านนางคำในสภาพปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige และ Skoog (1962) ที่เติม kinetin หรือ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ kinetin หรือ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ในขมิ้นชันที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA 6 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความสูงต้นโดยเฉลี่ยมากที่สุด คือ 3.3, 3.0, 3.2, 3.15 เซนติเมตรตามลำดับ และปริมาณรากเฉลี่ยมากที่สุดคือ 8, 7.4, 6, 7.6 รากต่อต้นตามลำดับ ปริมาณหน่อเฉลี่ย 0.25, 2.2, 1, 0.8 หน่อ ส่วนว่านนางคำที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความสูงต้นโดยเฉลี่ยมากที่สุด คือ 3.25, 3.1, 3, 3.1 เซนติเมตรตามลำดับ และปริมาณรากเฉลี่ยมากที่สุดคือ 7.6, 7.2, 9, 7.5 รากต่อต้นตามลำดับ ปริมาณหน่อเฉลี่ย 1, 1.2, 0.8, 0.4 หน่อ ตามลำดับ

3. การกลายพันธุ์ของพืช

การกลายพันธุ์ คือ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมภายในเซลล์ การกลายพันธุ์อาจเกี่ยวข้องกับการสูญหายไปของส่วนของยีน หรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในยีน เรียกว่า การกลายพันธุ์ของยีน (gene mutation) ส่วนการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนส่วนของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โครโมโซม การสูญหายไปหรือการเพิ่มเข้ามาของส่วนของโครโมโซมที่ครอบคลุมมากกว่าหนึ่งยีน เรียกว่า การกลายพันธุ์ของโครโมโซม (chromosome mutation) (สิรนุช, 2540)

3.1 การกลายพันธุ์ของยีน

เป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของยีนที่เกี่ยวข้องกับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide base) เพียงไม่กี่โมเลกุล ในยีนหนึ่ง ๆ สามารถทำให้ข่าวสารทางพันธุกรรมของยีนนั้นต่างไปจากเดิม การกลายพันธุ์ของยีนแบ่งตามการเกิดได้ 2 ชนิด คือ

3.1.1 การกลายพันธุ์แบบเฟรมชิพต์ (frameshift mutation)

การเพิ่มหรือขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์จากโมเลกุลดีเอ็นเอเพียง 1 โมเลกุล ทำให้กรอบการอ่านของรหัสที่ละ 3 โมเลกุล เปลี่ยนไปจากเดิม เป็นผลให้โปรตีนที่สร้างจากยีนดังกล่าวผิดไปจากเดิม ทำให้ไม่สามารถทำงานได้เหมือนเดิม หรือทำงานไม่ได้เลย

3.1.2 เบสซับสติติวชัน (base substitution)

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากการแทนที่คู่เบส มีการเข้าแทนที่คู่ของเบสด้วยเบสอื่นในกลุ่มเดียวกัน เรียกว่า ทรานซิชัน (transition) ส่วนการเปลี่ยนแปลงแบบสลับคู่ของเบสที่ต่างกลุ่มกัน เรียกว่า ทรานสเวอร์ชัน (transversion) การกลายพันธุ์ของยีนแบบเบสซับสติติวชัน มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า การกลายพันธุ์เฉพาะจุด (point mutation)

3.2 การกลายพันธุ์ของโครโมโซม คือ การเปลี่ยนแปลงจำนวนหรือโครงสร้างของโครโมโซม

3.2.1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม (changes in the structure of chromosome)

ได้แก่ การขาดหายไปของส่วนของโครโมโซม (deletion หรือ deficiency) ทำให้ยีนจำนวนหนึ่งขาดหายไปด้วย หรือการที่มียีนหรือส่วนของโครโมโซมเพิ่มเข้ามามากกว่าปกติ (duplication) หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงกลับทิศทางของส่วนของโครโมโซม (inversion) หรือเกิดการย้ายสลับที่ระหว่างส่วนของโครโมโซมที่ต่างคู่กัน (translocation) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ มีผลมากน้อยต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของยีน และจำนวนยีนที่เกี่ยวข้อง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2.2 การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม (changes in the number of chromosomes)

เกิดจากความผิดปกติในกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) โดยที่โครโมโซมที่เป็นคู่กันคู่ใดคู่หนึ่งไม่แยกจากกัน เรียกว่า นอนดิสจังชัน (nondisjunction) หรืออาจเกิดจากการยับยั้งการเคลื่อนที่ของโครโมโซมไปยังขั้วของเซลล์ในระยะแอนาเฟส (anaphase) ทำให้เซลล์สืบพันธุ์บางเซลล์มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น และบางเซลล์มีจำนวนโครโมโซมน้อยกว่าปกติ เมื่อมีการผสมพันธุ์ระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ปกติหรือผิดปกติด้วยกันก็ตาม ทำให้ได้ต้นลูกที่เกิดใหม่มีความผิดปกติในจำนวนโครโมโซม (สิรนุช, 2540)

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชเป็นวิธีการที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและได้พืชพันธุ์ใหม่เร็วขึ้น และสามารถถ่ายทอดไปยังชั่วต่อไปได้ ปกติแล้วการกลายพันธุ์สามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติได้แต่มีอัตราต่ำ จึงมีการกระตุ้นเพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในอัตราสูงและในระยะเวลาที่รวดเร็วขึ้น ซึ่งทำได้โดยการใช้รังสีหรือสารเคมี (ไพบูลย์, 2524) พันธุ์กลายที่ได้จากการเหนี่ยวนำที่เกิดขึ้นในพืชนั้นสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ 2 ทาง คือ

1. การใช้ประโยชน์โดยตรง (direct use) พันธุ์กลายที่มีลักษณะดี สามารถนำมาขยายพันธุ์ส่งเสริมได้ทันที เหมาะสมกับพืชที่มีการปรับปรุงพันธุ์ยังไม่ได้ระดับสูงสุด ในการใช้รังสีหรือสารเคมีเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์สามารถเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมได้ง่าย ทำให้ได้ จีโนไทด์ใหม่ ๆ ออกมาและนำไปใช้เป็นพันธุ์ใหม่ได้โดยตรง ในระยะเวลาค่อนข้างสั้น

2. การใช้ประโยชน์ทางอ้อม (indirect use) พันธุ์กลายที่มีลักษณะที่สนใจ แต่ยังไม่ดีพอที่จะนำมาขยายเป็นพันธุ์โดยตรง เนื่องจากยังมีลักษณะอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการอยู่ด้วย อาจนำพันธุ์กลายนี้ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมพันธุ์ (cross breeding) เพื่อถ่ายทอดลักษณะที่ต้องการเข้าไปยังพืชที่จะปรับปรุง เนื่องจากขาดลักษณะที่ดีบางอย่าง

ความผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์เมื่อได้รับการก่อกลายพันธุ์แล้วจะส่งผลกระทบต่อโครงสร้างและหน้าที่ของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงจะเกิดขึ้นมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณของการก่อกลายพันธุ์ที่ได้รับและชนิดของเซลล์ เป็นต้น

3.3 การเหนี่ยวนำให้พืชกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีก่อกลายพันธุ์

สารก่อกลายพันธุ์ (mutagens) คือ สารเคมีที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตได้ ซึ่งสารโคลชิซินใช้ในการเพิ่มจำนวนโครโมโซม การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการชักนำให้เพิ่มจำนวนโครโมโซม เป็นวิธีการที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่ต้องการเพียง 1-2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลักษณะกับพืชที่เป็นพืชปลูกเดิม สารเคมีหลายชนิดที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเมื่อเซลล์ได้รับสารเหล่านั้นมากกว่า 1 ชีพจักร (cell cycle) แล้วจำนวนโครโมโซมอาจเพิ่มขึ้นได้โดยไม่เกิดการแบ่งเซลล์ (Griesbach, 1987) สารเคมีที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางคือ โคลชิซิน (colchicine) ซึ่งพบในดองดึง (*Gloriosa superba*) และโคลชิคัม (*Colchicum autumnale*) จัดอยู่ในวงศ์ Lilliaceae ซึ่ง Popovic and Gasic (1993) รายงานว่าโคลชิคัมเป็นพืชป่าในแถบทะเลเมดิเตอเรเนี่ยน มีสารอัลคาลอยด์ 28 ชนิด พบในส่วนของหัวและเมล็ด สารอัลคาลอยด์ส่วนใหญ่คือสารโคลชิซินซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อน โคลชิซินบริสุทธิ์ซึ่งมีสูตรโครงสร้างทางเคมี $C_{22}H_{25}NO_6$ จะมีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มไม่มีสี สามารถละลายได้ง่ายในแอลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม และน้ำเย็น มีประโยชน์ทางการแพทย์ใช้ในการรักษาโรคเก๊าท์

สารโคลชิซิน มีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้างสายสปินเดิล (spindle fiber) ในระยะที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีส เรียกว่า C-mitotic agent โดยสารโคลชิซินจะไปรวมกับองค์ประกอบที่เป็นโปรตีนของไมโครทิวบูล (microtubule) ภายในเซลล์ ทำให้ไมโครทิวบูลไม่สามารถต่อกันเป็นสายสปินเดิลที่จะช่วยดึงโครโมโซมให้แยกออกจากกันในระยะเมตาเฟส (metaphase) ได้ โครโมโซมจึงไม่เคลื่อนที่เข้าสู่ขั้วเซลล์ ทำให้มีจำนวนเพิ่มขึ้นอีกเท่าตัว (สิรนุช, 2536; อมรา, 2536)

มีรายงานการวิจัย การใช้โคลชิซินในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของพืช เพื่อให้มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นได้ เช่น

Chen and Coeden-kallemeyn (1979) ศึกษาการชักนำแคลลัสของ Daylily ให้เพิ่มจำนวนโครโมโซมด้วยโคลชิซิน เพื่อให้ได้ต้นเตตราพลอยด์โดยเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมืด อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พบว่าเกิดต้นเตตราพลอยด์ที่สมบูรณ์ได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้โคลชิซินความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีความเหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

ปิยะดา และ อรดี (2532) ศึกษาผลของโคลชิซินต่อขิงที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อโดยแช่ต้นขิงในสายละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0-1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1-4 วัน พบว่า การเพิ่มระดับความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซิน ทำให้การเจริญเติบโต และอัตราการรอดชีวิตลดลง และทำให้เกิดลักษณะผิดปกติ เช่นลำต้นอ้วน ใบหนาและกว้าง บางต้นมีลักษณะใบด่างเป็นริ้ว และการแช่ต้นขิงในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 วัน และ 0.50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 วัน สามารถชักนำให้ต้น VM_2 เป็นเตตราพลอยด์ 50.0 และ 33.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนต้น VM_3 ที่แยกจากต้น VM_2 ที่เป็นเตตราพลอยด์ พบว่า เป็นต้นเตตราพลอยด์ 60 เปอร์เซ็นต์ และเป็นต้นดิพลอยด์ 40 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาสันต์ (2540) ชักนำต้นอ่อนกล้วยไข่ให้กลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้สารโคลชิซินเข้มข้น 0 0.5 0.75 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2.5 5.0 และ 7.5 ชั่วโมง พบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้น และระยะเวลาที่ได้รับสารนานขึ้น ทำให้อัตราการรอดชีวิตลดลง การใช้โคลชิซิน 0.5-0.75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7.5 ชั่วโมง ทำให้สามารถคัดเลือกต้นเตตราพลอยด์ (2n=4x=44) ได้ พบว่ามีลักษณะผิดปกติแบบ chimera ใบหนาและมุมการกางของใบกว้าง ปากใบมีขนาดใหญ่ แต่จำนวนปากใบต่อพื้นที่น้อยลง

วีรยุทธ (2548) ทดลองสร้างไพลที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นโดยใช้สารโคลชิซิน และหาระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการแช่หน่อไพลในสารดังกล่าว โดยการแช่หน่อไพลในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในสภาพปลอดเชื้อ นาน 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า ระยะเวลาที่ใช้แช่สารนานขึ้นมีผลทำให้ลักษณะใบสีเขียวเข้มกว่าปกติ ความหนาใบเพิ่มขึ้น ปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้น จำนวนปากใบต่อพื้นที่น้อยลง และจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นจากดิพลอยด์ เป็นเตตราพลอยด์ และการแช่หน่อไพลในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 72 ชั่วโมง เกิดเป็นต้นโพลีพลอยด์สูงสุด

กรภพ (2549) ศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมในกระแจะจันทร์โดยใช้สารโคลชิซิน โดยแช่หน่อกระแจะจันทร์ในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีสารละลายโคลชิซิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 48 และ 72 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตรในสภาพปลอดเชื้อ จากนั้นย้ายลงปลูกในกระถาง พบว่า ต้นกระแจะจันทร์ที่เป็นโพลีพลอยด์มีลักษณะแคระแกร็น ใบด่างหรือมีสีเขียวเข้มกว่าปกติ จำนวนปากใบต่อพื้นที่น้อยลงแต่ปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้น และมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นจากดิพพลอยด์ เป็นเตตราพลอยด์ ระยะเวลาที่ 72 ชั่วโมง ชักนำให้เกิดต้นโพลีพลอยด์สูงสุด คือ 12.5 เปอร์เซ็นต์

สุพัตรา (2550) ศึกษาการใช้สารโคลชิซินในว่านชักมดลูก พบว่า สารโคลชิซินทำให้ลักษณะของว่านชักมดลูกเปลี่ยนไป ใบมีขนาดเล็กลง สีเขียวเข้ม ใบหนาขึ้น จำนวนปากใบต่อพื้นที่น้อยลง และความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่เหมาะสมที่สุดต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมในว่านชักมดลูกในสภาพปลอดเชื้อ คือ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง จะสามารชักนำให้ว่านชักมดลูกเกิดเป็นโพลีพลอยด์ได้มากที่สุด

3.4 การเหนี่ยวนำให้พืชกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสี

คุณสมบัติที่รังสีสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นที่ทราบกันมานานแล้ว ตั้งแต่ปี ค.ศ.1900 โดยเริ่มศึกษาผลของรังสีที่มีต่อพืช จนกระทั่งปี ค.ศ. 1920 การศึกษาส่วนใหญ่จะ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เน้นผลของรังสีที่มีต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางสรีรวิทยา (Smith, 1958) จนกระทั่งปี ค.ศ. 1925 Muller ได้นำรังสีเอ็กซ์ (X-ray) มาทดลองกับแมลงหวี่ พบว่ารังสีเอ็กซ์สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในอัตราที่สูงกว่าการเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หลังจากนั้นได้มีผู้นำรังสีเอ็กซ์และรังสีอื่น ๆ เข้ามาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชกันอย่างแพร่หลาย และปัจจุบันนักปรับปรุงพันธุ์ให้ความสนใจการปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยวิธีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation breeding) โดยวิธีการฉายรังสีเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ (Smith, 1958)

รังสีที่นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ รังสีเอกซ์ และรังสีแกมมา รังสีทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติทางรังสีเหมือนกัน คือ เป็นรังสีคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า และถูกจัดไว้ในกลุ่มของ ionizing radiation แต่ต่างกันที่ต้นกำเนิดของรังสีเท่านั้น รังสีแกมมามีกำเนิดจากนิวเคลียสของอะตอมในขณะที่รังสีเอกซ์มีกำเนิดจากนอกนิวเคลียสของอะตอม (สิรนุช, 2540) นอกจากนี้การฉายรังสีให้กับชิ้นส่วนของพืช จะไม่พบรังสีที่เป็นอันตรายตกค้างอยู่ในพืช ทำให้ปลอดภัยต่อผู้ที่นำพืชไปปลูกและปฏิบัติดูแลรักษา อย่างไรก็ตามรังสีแกมมาเป็นรังสีที่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้เพื่อการกลายพันธุ์ในพืชมากกว่ารังสีเอกซ์ เนื่องจากรังสีแกมมามีความยาวคลื่นต่ำกว่าจึงมีอำนาจในการทะลุทะลวงผ่านวัตถุได้สูงกว่ารังสีเอกซ์ (Wood, 1983)

รังสีแกมมาเป็นรังสีประเภทแม่เหล็กไฟฟ้า ทำให้เกิด ionization ได้ รังสีแกมมาเกิดจากการสลายตัวของนิวเคลียสของราดิโอนิวไคลด์ ในปฏิกิริยาการสลายตัว นิวเคลียสของราดิโอนิวไคลด์ ซึ่งมีสภาพไม่เสถียร (unstable) พยายามปรับตัวให้เข้าสู่สภาพเสถียร (stable) โดยการปลดปล่อยพลังงานส่วนเกินออกมาในรูปรังสีแอลฟา หรือรังสีบีตา และติดตามด้วยการสลายตัวให้รังสีแกมมา ราดิโอนิวไคลด์ที่นิยมใช้เพื่อให้รังสีแกมมา คือ โคบอลท์-60 (cobalt-60) และซีเซียม-137 (cesium-137) (สิรนุช, 2540)

การฉายรังสีให้กับพืชหรือชิ้นส่วนของพืชสามารถทำได้ 2 วิธี (อรุณี, 2539) คือ

1. การฉายรังสีแบบเฉียบพลัน (acute irradiation) เป็นการให้รังสีปริมาณสูง ๆ และสิ้นสุดในระยะเวลาอันสั้น เพื่อไม่ให้พืชหรือชิ้นส่วนของพืชมีโอกาสซ่อมแซมความเสียหายในช่วงที่ได้รับรังสี การให้รังสีแบบนี้จะให้เฉพาะส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชก็ได้ ทำให้อัตราการกลายพันธุ์โดยทั่วไปค่อนข้างสูง ขนาดของส่วนที่กลาย (mutated sector) ใหญ่ ง่ายต่อการคัดเอาลักษณะนั้น ๆ ออกมาได้ ตัวอย่างเช่น การฉายรังสีเมล็ดข้าวในปริมาณรังสี 20 กิโลแรด ในเครื่องฉายรังสีแกมมาที่ให้ปริมาณรังสี 1 กิโลแรดต่อนาที ก็จะฉายเสร็จสิ้นโดยใช้ระยะเวลาเพียง 20 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การฉายรังสีแบบโครนิก (chronic irradiation) เป็นการผ่อนระยะเวลาที่ได้รับรังสีให้นานออกไป โดยให้ได้รับรังสีต่อหน่วยเวลาต่ำ เพื่อให้ทุกระยะของการเจริญเติบโต หรือการแบ่งเซลล์ได้รับรังสี การได้รับรังสีแบบนี้จะเสียหายน้อยกว่าการได้รับรังสีแบบเฉียบพลันในกรณีที่ได้รับรังสีเป็นปริมาณที่เท่ากัน และส่วนกลายที่ได้จะมีขนาดเล็ก จึงเป็นการยากที่จะค้นหา และแยกส่วนที่กลายออกมา ตัวอย่างเช่น การฉายรังสีเนื้อเยื่อขิงแดงในปริมาณรังสี 11 กิโลแรด ใช้เวลาฉายรังสีประมาณ 3 สัปดาห์

รังสีแกมมาจะทำให้เกิดการกลายโดยรังสีจะถ่ายเทพลังงานให้กับเซลล์พืชเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีขึ้นกับองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารพันธุกรรมหรือที่เรียกกันว่ายีน ซึ่งเป็นตัวกำหนดลักษณะต่าง ๆ ของพืช ควบคุมกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์พืช เมื่อสารพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงเนื่องจากได้รับพลังงานจากรังสีแกมมา ก็จะทำให้หน้าที่ที่สารพันธุกรรมนั้นทำอยู่หรือควบคุมอยู่เปลี่ยนแปลงไปด้วย เมื่อเซลล์นั้นแบ่งตัวพัฒนาเป็นต้นพืชก็จะได้ลักษณะที่ต่างไปจากเดิมเรียกว่าเกิดการกลาย พืชที่มีการกลายเกิดขึ้นเรียกว่าพันธุ์กลาย ซึ่งสามารถขยายเป็นพืชพันธุ์ใหม่ได้ เมื่อมีการกลายเกิดขึ้นเราจะทราบได้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงที่ปรากฏให้เห็น หรือที่เรียกกันว่าเปลี่ยนแปลงทางฟีโนไทป์ของพืช ลักษณะที่ปรากฏอาจเห็นได้ด้วยตาเปล่า เช่นการเปลี่ยนแปลงของสีดอก สีใบ รูปทรงดอก รูปทรงใบ ความสูงของต้น มีอายุการออกดอกติดผลเร็วขึ้นหรือช้าลง สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมบางอย่างได้ เป็นต้น (อรุณี, 2541)

ผลที่เกิดขึ้นกับเซลล์ภายหลังได้รับรังสี

ความผิดปกติที่เกิดขึ้นภายในเซลล์เมื่อได้รับรังสีแล้ว จะส่งผลกระทบต่อโครงสร้างและหน้าที่ของเซลล์ เช่น อาจมีผลต่อเยื่อหุ้มต่าง ๆ ภายในเซลล์ กระบวนการเมแทบอลิซึม กระบวนการสังเคราะห์ภายในเซลล์ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการแบ่งเซลล์ด้วย การเปลี่ยนแปลงจะเกิดขึ้นมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณรังสีที่ได้รับ อัตรารังสี ชนิดของเซลล์ เป็นต้น (อรุณี, 2541) ผลของรังสีในระดับเซลล์ แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ ผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์ และผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ (สิรนุช, 2527)

1. ผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์

การที่เซลล์ได้รับรังสีปริมาณน้อย ๆ จะทำให้เกิดความล่าช้าในการแบ่งตัวของเซลล์ รังสีไปทำให้มีการลดจำนวนเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวลง เรียกว่า ไมโตติก ดีเลย์ (mitotic delay) ซึ่งจะเป็นอยู่ในช่วงหนึ่งภายหลังเซลล์ได้รับรังสี หลังจากนั้นเซลล์จะเริ่มกิจกรรมมีการแบ่งตัวใหม่เพิ่มจำนวนเซลล์โดยการแบ่งตัวแบบไมโตซิสขึ้น เรียกว่า ไมโตติก โอเวอร์ชูต (mitotic overshoot)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความล่าช้าในการแบ่งตัวของเซลล์ มีสาเหตุหลายประการ เช่น สารเคมีที่เกี่ยวข้องในการแบ่งเซลล์ถูกกระทบกระเทือนโดยรังสี กระบวนการสร้างโปรตีนอาจหยุดชะงัก ไม่มีการสร้างโปรตีนขึ้นมาใช้ในการแบ่งเซลล์ กระบวนการเข้ามารวมกลุ่มกันของโครโมโซม (chromosome assembly) ล่าช้าลง หรือเพิ่มความเหนียว (stickiness) ให้กับโครโมโซม ทำให้โครโมโซมมีความยากลำบากในการแยกจากกันเพื่อไปสู่เซลล์ที่เกิดใหม่ (daughter cells) อย่างไรก็ตามความล่าช้าของเซลล์ในการเข้าสู่ไมโตซิส ขึ้นอยู่กับปริมาณรังสีที่เซลล์ได้รับ และระยะของเซลล์ (stage of cell cycle) ในขณะได้รับรังสีบางระยะจะไวต่อรังสีมากกว่าระยะอื่น ๆ

รังสีในปริมาณสูง ทำให้เซลล์หยุดชะงักการแบ่งตัวอย่างถาวร และไม่มีการฟื้นคืนกลับมาทำหน้าที่ได้อย่างเดิม ในที่สุดเซลล์จะตาย เซลล์อื่นที่ไม่ตายอาจแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเข้ามาแทนที่เซลล์ที่ตายได้ ในบางกรณีพบว่า เซลล์ที่ผ่านการฉายรังสีสามารถแบ่งตัวตามปกติได้หลายครั้ง หลังจากนั้นเซลล์จึงจะตาย

2. ผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์

การที่รังสีทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์น่าจะเป็นผลอันเนื่องจากการที่รังสีทำอันตรายต่อเยื่อหุ้มต่าง ๆ ภายในเซลล์ และเอนไซม์ ตัวอย่างเช่น รังสีทำอันตรายกับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหายใจ อันเป็นผลเนื่องมาจากรังสีทำอันตรายต่อเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย ซึ่งเอนไซม์เกาะติดอยู่ ทำให้เอนไซม์ได้รับความกระทบกระเทือนด้วย การควบคุมการเข้าออกของสารผ่านเซลล์โดยวิธีแอกทีพทรานสปอร์ต เป็นไปอย่างยากลำบาก เช่น เมื่อเซลล์รากพืชได้รับรังสี เซลล์รากพืชจะดูดซึมไอออนได้น้อยลง

รังสีทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซมได้ง่าย ลักษณะที่เปลี่ยนแปลงเกิดจากการที่โครโมโซมถูกทำให้แตกหักเนื่องจากรังสี แล้วมีการเชื่อมต่อกัน หรืออาจทำให้ชิ้นส่วนขาดหายไป (deletion) ก็ได้ การขาดหายไปของโครโมโซมทำให้ยีนจำนวนหนึ่งขาดหายไปด้วย สำหรับการเชื่อมต่อกัน ถ้าเชื่อมต่อกันเหมือนเดิมก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นกับสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ แต่การเชื่อมอย่างผิดปกติเช่น มีชิ้นส่วนโครโมโซมเพิ่มขึ้นมา (duplication) การเชื่อมแบบกลับทิศทาง (inversion) หรือเกิดการเชื่อมต่อสลับคู่ระหว่างโครโมโซมต่างคู่กัน (translocation) จะเป็นผลให้สิ่งมีชีวิตนั้น ๆ เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ การเปลี่ยนแปลงนี้จะมีผลมากน้อยต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของยีน และจำนวนยีนที่เกี่ยวข้อง

การใช้รังสีกับพืชที่กำลังเจริญเติบโตอยู่นั้นจะทำให้เกิดผลได้หลายอย่าง คือ เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา (morphological abnormalities) หรือเกิดการกลายพันธุ์ ทำให้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กระบวนการ เมแทบอลิซึมผิดปกติหรือเปลี่ยนแปลงไป ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช หรือเกิดการตาย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของรังสีที่ได้รับ ชนิดของรังสี ชนิดของพืช และอายุของพืช เป็นต้น

การให้รังสีกับพืชไม่ว่าจะเป็นแบบโครนิกหรือแบบเฉียบพลันกับส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชหรือกับพืชที่กำลังเจริญเติบโต จะทำให้เกิดความผิดปกติอย่างใดอย่างหนึ่งหรือหลายอย่างพร้อมกันได้ ความผิดปกติดังกล่าวอาจเป็นไปได้ทั้งผลดีหรือผลเสีย ซึ่งอาจเป็นประโยชน์หรือไม่เป็นประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์ก็ได้ ความผิดปกติดังกล่าวพอแบ่งออกได้ดังนี้ (อรุณี, 2530)

1. ผลของรังสีที่มีต่อสัณฐานวิทยาของพืช (morphological effects of radiation)

ความผิดปกติที่เกิดกับรูปร่างลักษณะของพืชที่ได้รับรังสีอาจเกิดขึ้นกับราก ลำต้น ใบ ดอก ผล เช่น รังสีไปยับยั้งการแบ่งเซลล์ในบริเวณยอด และยับยั้งการยืดตัวของเซลล์บริเวณปล้อง ทำให้ต้นแคระแกรน

2. ผลของรังสีที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงสี (color change)

พืชที่ได้รับรังสีเอกซ์หรือรังสีแกมมามักเกิดการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับสี โดยเฉพาะอย่างยิ่งสีใบ เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า mosaic ส่วนใหญ่เกิดขึ้นเนื่องจากการกระจายตัวของคลอโรฟิลล์ไม่สม่ำเสมอ นอกจากนี้อาจพบว่าใบเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีอื่น ๆ เช่น สีเหลือง หรือ สีขาว เป็นต้น การฉายรังสีกับพืชตระกูลถั่วหรือพวกธัญพืช มักพบลักษณะการกลายของคลอโรฟิลล์ได้หลายชนิด นอกจากสีของใบเปลี่ยนแล้ว สีของต้นและสีของดอกก็เกิดการเปลี่ยนแปลงได้เช่นเดียวกัน การทดลองในต้นคาร์เนชั่นพบความผิดปกติในสีของดอกมากมายหลายชนิด

3. ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช (growth inhibition)

รังสีไปยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชเป็นผลจากเนื้อเยื่อเจริญถูกทำลายโดยตรง

4. เร่งการเจริญเติบโต (growth stimulation)

มีรายงานว่ารังสีปริมาณต่ำ ๆ สามารถไปเร่งการเจริญเติบโตของพืชได้ ปริมาณรังสีที่ไปเร่งการเจริญเติบโตได้คือ ปริมาณรังสีที่ต่ำกว่า 5000 เรินต์เกน การแสดงออกถึงการเร่งการเจริญเติบโตอาจแสดงออกมาในลักษณะต่าง ๆ เช่น ต้นพืชสูงขึ้น มีรากยาว งอกเร็ว ออกดอกเร็ว ผลผลิตสูง หรืออายุเก็บเกี่ยวสั้นลง เป็นต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาณรังสีที่เหมาะสม

พืชแต่ละชนิดมีความไวต่อรังสีแตกต่างกัน ลักษณะความไวต่อรังสี หรือความทนทานต่อรังสีขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ นอกเหนือจากวิธีการฉายรังสี ยังขึ้นอยู่กับปริมาณรังสีที่ใช้ ส่วนของพืชที่ใช้ฉายรังสี และความชื้นของส่วนของพืชนั้น การหาปริมาณรังสีที่เหมาะสมของแต่พืชเป็นสิ่งสำคัญและจำเป็น สามารถหาปริมาณรังสีที่เหมาะสมได้โดยทำการทดลองหาค่า LD_{50} (50% lethality) หรือ GR_{50} (50% growth reduction) หาเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของต้นกล้าที่อายุ 30 วัน หรือเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของต้นกล้าที่อายุ 15 วัน เปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของพืชที่ไม่ฉายรังสี ปริมาณรังสีที่เหมาะสมที่แนะนำใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ คือ ปริมาณรังสีที่ทำให้เกิดการตายของต้นพืชอยู่ในช่วง 30-50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{30}-LD_{50}) หรือค่าความเจริญเติบโตอยู่ในช่วง GR_{50} (อรุณี, 2539)

มีรายงานการวิจัยการใช้รังสีในการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น Nagatomi *et al.* (1996) ศึกษาการชักนำกล้วยในกลุ่ม genome AAA สายพันธุ์ Sanjakushu ให้เกิดการกลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 5-480 เกรย์พบว่ามีการกลายพันธุ์ ร้อยละ 34.5 และการกลายพันธุ์จะเกิดหลังจากได้รับปริมาณรังสีแล้ว 4 เดือน ลักษณะที่เปลี่ยนแปลงคือ ใบยาวกว่าปกติ

Lamseejan *et al* (2000) นำเบญจมาศชนิด Spray พันธุ์ Taihei ดอกสีม่วงมาศึกษาผลของรังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS+BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำยอด (multiple shoot) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาฉายรังสีที่ปริมาณ 0 10 30 50 70 90 และ 110 เกรย์ จากนั้นตัดแยกและเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยง จากรุ่น M_1V_1 ถึง M_1V_4 พบว่า ยอดที่ได้รับรังสี 50 เกรย์ จะตายภายใน 25-30 วัน หาค่า LD_{50} ได้ที่ 14 เกรย์ และมีเพียงยอดที่ไม่ได้รับรังสี และได้รับรังสี 10 เกรย์เท่านั้นที่สามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะสีดอกของเบญจมาศมีความผันแปรมาก และได้สีใหม่ คือ สีเหลืองอ่อน

ปรียานันท์ (2540) ศึกษาการปรับปรุงพันธุ์กล้วยน้ำว้าโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้รังสีแกมมา พบว่าปริมาณรังสีแกมมา 30 และ 40 เกรย์ จะทำให้การเจริญเติบโตของต้นกล้วยน้ำว้า เช่น ความสูง จำนวนใบ จำนวนราก และ จำนวนหน่อลดลง ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากรังสีแกมมาไปทำให้การทำงานและการแบ่งเซลล์บริเวณจุดเจริญผิดปกติ รังสีปริมาณ 20 และ 30 เกรย์ทำให้ได้ใบด่าง ลำต้นอวบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สิรนุชและอรุณี (2544) นำหน่อหรือเหง้าพุทธรักษาพันธุ์ต่าง ๆ มาฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน ปริมาณรังสีที่ใช้อยู่ระหว่าง 15-30 เกรย์ และฉายรังสีแกมมาแบบโครนิกให้กับพุทธรักษาที่ปลูกในกระถางใช้ปริมาณรังสี 250 เกรย์ ผลการศึกษาพบว่าได้พันธุ์กลาย จำนวน 22 พันธุ์และได้ขึ้นทะเบียนพันธุ์ไว้กับมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งพันธุ์ที่กลายทั้ง 22 พันธุ์ได้รับความสนใจจากเกษตรกรเป็นอย่างมาก โดยเกษตรกรได้นำไปขยายพันธุ์เพื่อจำหน่ายสร้างรายได้ต่อไป

รุ่งนภา (2548) ทดลองชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในกล้วยไม้หวายตัดดอกพันธุ์เอียสกุล ด้วยการฉายรังสีแกมมา โดยการนำโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน โดยทำการฉาย 3 ครั้ง ครั้งที่ 1 ใช้ปริมาณรังสีที่ 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 กิโลแรด ครั้งที่ 2 ใช้ปริมาณรังสีที่ 2 4 6 8 10 12 และ 14 กิโลแรด และครั้งที่ 3 ใช้ปริมาณรังสีที่ 1 2 3 4 5 และ 6 กิโลแรด ผลการทดลองพบว่า ปริมาณรังสีที่ทำให้โปรโตคอร์มตายเป็นจำนวน 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) คือปริมาณรังสีที่ 2-3 กิโลแรด และที่ปริมาณรังสีน้อย ๆ ได้แก่ 0.5-1.0 กิโลแรด พบว่า ต้นกล้วยไม้มีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าต้นปกติที่ไม่ได้รังสี ส่วนโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่ได้รับปริมาณรังสีที่เพิ่มสูงขึ้นมีการเจริญเติบโตที่ลดลง และเมื่อนำออกปลูกในสภาพโรงเรือนและตรวจสอบต้นกล้วยไม้อายุ 12 เดือนได้พบลักษณะ ลำต้นอ้วนป้อม มีสีค่อนข้างแดง ใบมีลายเป็นริ้วสีแดง โดยลักษณะเหล่านี้ปรากฏชัดในกล้วยไม้ที่ได้รับปริมาณรังสีสูง ๆ ตั้งแต่ 3 กิโลแรด ขึ้นไป

4. การตรวจสอบสายพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี

เทคนิค ampliflied fragment length polymorphism (AFLP) เป็นเทคนิคของเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบหนึ่ง พื้นฐานของเอเอฟแอลพี คือ การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนั้นจึงรวมเอาความน่าเชื่อถือของเทคนิค อาร์เอฟแอลพี (restriction fragment length polymorphism) และประสิทธิภาพของเทคนิคพีซีอาร์เข้าด้วยกัน (สุรินทร์, 2545)

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยพีซีอาร์ (polymerase chain reaction ; PCR) คิดค้นโดย Zabeau และ Vos นักวิจัยประเทศเนเธอร์แลนด์ในปี ค.ศ.1993 ซึ่งเทคนิคเอเอฟแอลพีนี้ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส (*Eco*RI) ร่วมกับเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส (*Mse*I) ทำให้ได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอพอเหมาะแล้วเชื่อมต่อกับ adapter เพื่อเป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยพีซีอาร์ 2 ครั้ง โดยครั้งแรกใช้ไพรเมอร์ที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพิ่มเบสเพียง 1-2 เบส และครั้งที่สองใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสต่อจากไพรเมอร์แรกอีก 1-2 เบส เพื่อใช้ในการคัดเลือกเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพและถูกต้องมากยิ่งขึ้น ดังนั้นเทคนิคเอเอฟแอลพีจึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ มีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม (random fingerprint) ซึ่งใช้กับดีเอ็นเอใด ๆ ก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องรู้ลำดับเบสของดีเอ็นเอนั้น นอกจากนี้ ยังไม่ขึ้นกับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม สามารถทำได้รวดเร็วและทำซ้ำได้ผลคงเดิม (reproducible) มีคู่ผสมของไพรเมอร์หลายแบบทำให้เกิดลายพิมพ์ที่แตกต่างกันจำนวนมาก และในการทำปฏิกิริยาครั้งหนึ่งสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน คือ multiplex ratio สูง มีโพลีมอร์ฟิซึมสูง (Nicola and Valeria, 2002) ในบางกรณีพบว่าเทคนิคเอเอฟแอลพีไม่เหมาะสำหรับใช้เปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่างกันมาก ๆ เพราะจะมีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (common band) จำนวนน้อยทำให้การหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการผิดพลาดได้ ขณะเดียวกันเทคนิคเอเอฟแอลพีก็ไม่เหมาะสำหรับสิ่งมีชีวิตที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกันมากเพราะจะพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวนน้อย (วิภา, 2544)

เทคนิคเอเอฟแอลพีสามารถบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่เป็นชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กันได้ เช่น ศึกษาในถั่วพุ่ม (cowpea) พันธุ์พื้นเมือง (*Vigna unguiculata unguiculata*) (Nicola and Valeria, 2002) รวมถึงสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในสกุลเดียวกันแต่ต่างชนิดกัน เช่น ในการศึกษาความสัมพันธ์ของพืชในสกุล *Berberis* ที่พบใน Patagonia และ Argentina มะละกอที่พบในฮาวายและออสเตรเลีย และสามารถบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในวงศ์เดียวกันได้ เช่น Aggarwal *et al.* (1999) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชต่างชนิดในสกุล *Oryza* รวมทั้ง ข้าวโพดอ้อย และถั่วเหลือง โดยสามารถอธิบายวิวัฒนาการของพืชในสกุลนี้ว่ามีบรรพบุรุษร่วมกันหรือมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเทคนิคเอเฟแอลพีสามารถที่จะจำแนกลักษณะที่เกิดจากการกลายพันธุ์ได้ เช่น ตรวจสอบการกลายพันธุ์ และ somaclonal variation ในกล้วย (Liscum and Briggs, 1995)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ต้นว่านชักมดลูกที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ
2. วัสดุและอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและให้สารก่อกลายพันธุ์
   - 2.1 เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น ขวดแก้วขนาด 4 ออนซ์ บีกเกอร์ กระบอกตวง
   - 2.2 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
   - 2.3 ตู้อบ (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 (Pretri dish) และตะเกียงแอลกอฮอล์
   - 2.9 ชั้นวางขวดเนื้อเยื่อพืช และเครื่องเขย่า
   - 2.10 เครื่องฉายรังสี
3. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์เอเอฟแอลพี
   - 3.1 โกร่งบดตัวอย่าง
   - 3.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centifuge) และเครื่อง vortex
   - 3.3 เครื่อง Thermal Cycler สำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์
   - 3.4 เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoreis)
   - 3.5 อุปกรณ์เตรียมเจล (gel caster)
   - 3.6 เครื่องถ่ายรูปเจล (gel document)
   - 3.7 เครื่อง denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์สารด้วย HPLC

4.1 ชุดสกัดสาร

4.2 เครื่อง HPLC รุ่น HP 1100 ของบริษัท Agillent Technologies

4.3 ตู้ดูดควัน (fume hood)

5. สารเคมี

5.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) (ตารางภาคผนวกที่ 1)

5.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต 6-benzylaminopurine (BA)

5.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับก่อกลายพันธุ์ คือ สารโคลชิซิน (colchicine)

5.4 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากพืช เช่น CTAB (cetytrimethyl ammoniumbromide), PVP (polyvinylpyrrolidone), α-mercaptoethanol, liquid nitrogen, EDTA, Tris HCl, chloroform, isoamyl alcohol, isopropanol และ 70% ethanol เป็นต้น

5.5 สารเคมีที่ใช้ในการทำ AFLP

5.5.1 สารเคมีในปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการต่อด้วย adapter เช่น เอนไซม์ *Eco*RI, *Mse*I, T4 ligase, *Eco*RI adapter, *Mse*I adapter และ ATP เป็นต้น

5.5.2 สารเคมีในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ เช่น *Eco*RI primer, *Mse*I primer, $MgCl_2$, dNTP และ *Taq* polymerase เป็นต้น

5.5.3 สารเคมีในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดย agarose gel เช่น agarose gel electrophoresis, loading dye และ 1x TBE เป็นต้น

5.5.4 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

5.5.5 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร curcuminoid ด้วยวิธี HPLC เช่น methanol, acetic acid, acetonitrile, hexane และน้ำ 18 โอห์ม เป็นต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. ไพรเมอร์สำหรับการทำเอเอฟแอลพีดังตารางที่ 1

7. อุปกรณ์สำหรับปลูกพืชในสภาพธรรมชาติ ได้แก่ กระบะปลูก กระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว ทรายผสมขุยมะพร้าว ในสัดส่วน 1 : 1 สำหรับปลูกในถาดหลุม และ ดิน : แกลบเผา : แกลบ : ปุ๋ยคอก ในสัดส่วน 1 : 1 : 1 : 1 สำหรับลงปลูกในกระถางขนาด 8 นิ้ว

วิธีการ

1. การเพิ่มจำนวนว่านชักมดลูกในสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นว่านชักมดลูกในสภาพปลอดเชื้อ ตัดแยกเป็นเหง้าเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS โดยใช้วิตามินของอาหารสูตร B5 ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเป็น 5.6-5.8 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 1 เดือน

2. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

2.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสี

ศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีต่อว่านชักมดลูกที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS โดยใช้วิตามินของอาหารสูตร B5 ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 1 เดือน โดยนำต้นว่านชักมดลูกมาฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน ในปริมาณต่าง ๆ คือ 0 1 2 3 4 5 6 7 และ 8 กิโลแรด แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS โดยใช้วิตามินของอาหารสูตร B5 ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเป็น 5.6-5.8 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 1 เดือน หาค่าอัตราการตายที่ 50% (LD_{50}) จากนั้นฉายรังสีที่ระดับ น้อยกว่าค่า LD_{50}, LD_{50} และมากกว่าค่า LD_{50}

บันทึกอัตราการรอดชีวิต จำนวนยอด ความสูง อัตราการรอดชีวิตหลังย้ายปลูก จำนวนต้นที่มีลักษณะผิดปกติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารโคลชิซิน

ศึกษาผลของสารโคลชิซินที่มีต่อว่านชักมดลูก โดยตัดต้นว่านชักมดลูกออกเป็นเหง้า ความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร แช่ในสารละลายโคลชิซินที่กรองเชื้อแล้ว ความเข้มข้น 0 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที เมื่อครบเวลาแล้วล้างท่อนพันธุ์ด้วยน้ำสะอาดที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS โดยใช้วิตามินของอาหารสูตร B5 ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเป็น 5.6-5.8 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 1 เดือน วางแผนการทดลองแบบ 3x2 Factorial Experiment in CRD มี 20 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 3 ระดับ คือ 0 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาในการแช่สาร 2 ระดับ คือ 24 และ 48 ชั่วโมง

บันทึกอัตราการรอดชีวิต จำนวนยอด ความสูง อัตราการรอดชีวิตหลังย้ายปลูก จำนวนต้นที่มีลักษณะผิดปกติ จำนวนปากใบและ nuclear content

3.3 การย้ายปลูกในสภาพกระถาง

นำต้นว่านชักมดลูกที่ได้การฉายรังสีและสารโคลชิซิน ที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ มาปรับสภาพที่ อุณภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน แล้วย้ายต้นที่สมบูรณ์ออกปลูกในถาดหลุม โดยใช้ทรายผสมขุยมะพร้าวในสัดส่วน 1 : 1 เป็นวัสดุปลูก รดน้ำและคลุมด้วยถุงพลาสติกเพื่อรักษาความชื้นเป็นเวลา 7 วันจากนั้นเปิดปากถุงเล็กน้อยเพื่อเพิ่มการถ่ายเทอากาศ เป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงย้ายต้นว่านชักมดลูกไปปลูกในกระถางขนาด 8 นิ้ว โดยใช้ ดิน : แกลบเผา : แกลบ : ปุ๋ยคอก ในสัดส่วน 1 : 1 : 1 : 1 เป็นวัสดุปลูก

3. ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นว่านชักมดลูกโดยวิธีเอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)

3.1 สกัดดีเอ็นเอจากใบของต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับการฉายรังสีและสารโคลชิซิน ที่ออกปลูกในกระถางโดยใช้วิธี CTAB ซึ่งดัดแปลงมาจาก Aldrich and Cullis (1993)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.1.1 นำชิ้นส่วนใบว่านชักมดลูกประมาณ 0.1 กรัมมาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว แล้วถ่ายใส่หลอดเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 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 chroloform : 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 chroloform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10-15 นาที

3.1.5 ดูดสารละลายใสใส่หลอดใหม่ เติม 3M sodium acetate (NaOAc pH 5.2) ปริมาตร 0.1 เท่าของส่วนใส และเติม isopropanol ซึ่งผ่านการแช่เย็น ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายใส ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่า บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 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 การตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ทำโดยนำดีเอ็นเอตัวอย่างที่เตรียมไว้มาทำอิเล็คโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจล แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ซึ่งโมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์จะเข้าไปแทรกในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และเมื่อนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจะเกิดการเรืองแสง โดยที่ความเข้มของแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นจะสามารถบอกปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างโดยประมาณได้ ซึ่งปริมาณที่ตรวจสอบได้เป็นระดับนาโนกรัม นอกจากนี้ยังสามารถบอกคุณภาพดีเอ็นเอได้ด้วยว่ามีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอหรือไม่ ถ้าหากมีอาร์เอ็นเอปนอยู่จะเห็นเป็นแถบเคลื่อนที่ไปเร็วกว่าดีเอ็นเอ โดยมีขั้นตอนการตรวจสอบดังนี้

3.2.1 เตรียมอะกาโรสเจล เข้มข้น 1% ในบัฟเฟอร์ 1x TBE จากนั้นหลอมอะกาโรสเจลจนละลายหมด ตั้งไว้ให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เทลงในถาดที่เตรียมไว้ให้เจลมีความหนา ประมาณ 5 มิลลิเมตร และรอให้เจลแข็งที่อุณหภูมิห้อง

3.2.2 สารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye (bromophenol blue 0.25%, glycerol 30%) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงไปในแผ่นเจล พร้อมกับหยอดดีเอ็นเอมาตรฐานที่บอกความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เช่น 50 100 และ 200 นาโนกรัม

3.2.3 ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็คโทรโฟริซีส ปรับกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลานาน 30 นาที

3.3.4 นำแผ่นเจลมาย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลานาน 10 นาที จากนั้นล้างเอธิเดียมโบรไมด์โดยการแช่แผ่นเจลในน้ำสะอาด เป็นเวลานาน 10 นาที

3.3.5. นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ด้วยเครื่อง Gel document ถ่ายรูปบันทึกผล และประมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.3 การวิเคราะห์เอเอฟแอลพี

นำดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบมาทำปฏิกิริยาตามขั้นตอน ดังนี้

3.3.1 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและต่อกับ adapter

นำดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการตรวจสอบ ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด พร้อมกัน คือ *Eco*RI ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีความถี่ในการตัดต่ำ มีตำแหน่งจดจำ 6 เบส และเอนไซม์ *Mse*I ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีความถี่ในการตัดสูง มีตำแหน่งจดจำ 4 เบส จากนั้นนำ *Eco*RI adapter และ *Mse*I adapter ซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอสายคู่เส้นสั้น ๆ มีความจำเพาะกับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปลายของดีเอ็นเอสายคู่ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Mse*I โดย adapter จะเข้ามาต่อกับปลายทั้งสองด้านของชิ้นดีเอ็นเอ เพื่อใช้เป็นตำแหน่งจับของไพรเมอร์ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและต่อกับ adapter ทำโดยนำดีเอ็นเอต้นแบบ 200 นาโนกรัม มาตัดส่วนปลายด้วยเอนไซม์ *Eco*RI 1 ไมโครลิตร (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร, บริษัท Fermentas) และเอนไซม์ *Mse*I 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 *Eco*RI adapter (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร และ *Mse*I adapter (50 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 30 ไมโครลิตร ด้วยน้ำ deionized นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

ตำแหน่งจดจำและจุดตัดของเอนไซม์ *Eco*RI และเอนไซม์ *Mse*I เป็นดังนี้ คือ

เอนไซม์ *Eco*RI 5’-G AATTC-3’
3’-CTTAA G-3’

เอนไซม์ *Mse*I 5’-T TAA-3’
3’-AAT T-3’

ลำดับเบสของ *Eco*RI adapter และ *Mse*I adapter เป็นดังนี้ คือ

*Eco*RI adapter 5’-CTCGTAGACTGCGTACC-3’
3’-CATCTGACGCATGGTTAA-5’

*Mse*I 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 *Eco*RI และ ไพรเมอร์ *Mse*I ที่เพิ่มเบสคัดเลือกที่ปลาย 3’ จำนวน1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เบส เพื่อเพิ่มความจำเพาะในการคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอ ชนิดละ 0.5 ไมโครลิตร (5 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร) พร้อมกับ 10x บับเฟอร์ (10 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM KCl) 1 ไมโครลิตร 1.5 mM $MgCl_2$ 0.6 ไมโครลิตร dNTP 2 ไมโครลิตร (1 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร) และเอนไซม์ *Taq* polymerase 0.2 ไมโครลิตร (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปรับปริมาตรสุทธิเป็น 10 ไมโครลิตร ด้วยน้ำ deionize แล้วนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง Thermal Cycler โดยกำหนดโปแกรมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 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) และเบสคัดเลือกที่ต่อด้านปลาย 3’ (extension base) ซึ่งแต่ละไพรเมอร์มีองค์ประกอบ คือ

	core base	enzyme base	extension base
*Eco*RI primer	5’-GACTGCGTACC	AATTC	NNN-3’
*Mse*I primer	5’-GATGAGTCCTGAG	TAA	NNN-3’

ผลที่ได้จากการทำ preselective amplification คือ การเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่มีปลายด้านหนึ่งถูกตัดด้วย *Eco*RI และปลายอีกด้านหนึ่งถูกตัดด้วย *Mse*I ซึ่งในขั้นตอนนี้จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการคัดเลือก โดยดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นตอนนี้จะใช้เป็นต้นแบบในการทำ selective amplification

3.3.3 การทำพีซีอาร์ II หรือ selective amplification

นำผลผลิตที่ได้จากการทำพีซีอาร์ I มาเจือจางลง 30 เท่า ด้วยน้ำ deionize เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา โดยใช้ดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วปริมาตร 2 ไมโครลิตร เป็นดีเอ็นเอต้นแบบทำปฏิกิริยากับ *Eco*RI ไพรเมอร์ และ *Mse*I ไพรเมอร์ ที่เพิ่มเบสคัดเลือกที่ปลาย 3’ จำนวน 3 เบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(ตารางที่ 1) เพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอ ชนิดละ 0.5 ไมโครลิตร (5 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร) พร้อมกับ 10x บับเฟอร์ (10 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM KCl)1 ไมโครลิตร 1.5 mM $MgCl_2$ 0.6 ไมโครลิตร dNTP 2 ไมโครลิตร (1 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร) และเอนไซม์ *Taq* polymerase 0.2 ไมโครลิตร (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปรับปริมาตรสุทธิเป็น 20 ไมโครลิตร ด้วยน้ำ deionize แล้วนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง Thermal Cycler โดยกำหนดโปรแกรมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 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 องศาเซลเซียสต่อรอบหลังจากเสร็จรอบแรก)
	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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 คู่ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกที่ปลาย 3' สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในการทำพีซีอาร์ II

คู่ที่	*Eco*RI primer	*Mse*I primer
1	E-CGT	M-CTG
2	E-CTG	M-CAG
3	E-TAC	M-TAC
4	E-TCG	M-TGA
5	E-TAC	M-TGA
6	E-GCA	M-GTA
7	E-GCA	M-GTC
8	E-GCC	M-GTA
9	E-GCA	M-GTC
10	E-GTC	M-GCC

หมายเหตุ E คือ *Eco*RI primer

M คือ *Mse*I primer

3.3.4 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยอิเล็คโทรโฟรีซิส

3.3.4.1 นำดีเอ็นเอตัวอย่างที่ได้จากการทำพีซีอาร์ II มาใส่สี 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 ตรวจสอบผลโดยการทำอิเล็คโทรโฟรีซิสบน 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 ย้อมเจลด้วยวิธี silver staining โดยนำแผ่นกระจกเจลมาแช่ย่าในสารละลายอะซิติก เข้มข้น 10% เป็นเวลา 20 นาที และล้างด้วยน้ำ deionize 2 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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 เขย่าอย่างสม่ำเสมอนาน ประมาณ 5-10 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบของดีเอ็นเอปรากฏขึ้นมาอย่างชัดเจน

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

3.3.5 การอ่านผลจากการทำเอเอฟแอลพี

เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันของทุกตัวอย่าง แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏให้สัญลักษณ์ “1” และแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏให้สัญลักษณ์ “0” แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบหาความเหมือนและความแตกต่างทางพันธุกรรม

4. ศึกษาปริมาณสาร Curcuminoid ในหัวของว่านชักมดลูกที่ได้รับการฉายรังสีและ โคลชิซิน

4.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

4.1.1 เตรียมหัวว่านชักมดลูกที่ได้รับการฉายรังสีและโคลชิซินที่มีอายุ 1 ปี หั่นเป็นชิ้นบาง ๆ อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

4.1.2 บดตัวอย่างด้วยเครื่องบด และชั่งตัวอย่างตัวอย่างละ 0.058 กรัม ใส่ใน Thimble extraction

4.1.3 นำตัวอย่างที่เตรียมใน Thimble extraction มาสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (hexane) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดไขมันออก เป็นเวลา 60 นาที และสกัดต่อด้วยตัวทำละลายเมธานอล (methanol) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 90 นาที ด้วยชุดสกัดสาร

4.1.4 นำสารละลายที่สกัดได้ มาทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยแห้ง (evaporator)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.1.5 นำสารที่ได้ละลายด้วยเมธานอลชนิดสำหรับเครื่อง HPLC (HPLC grade) ใส่ในขวดปรับให้มีปริมาตร 25 มิลลิลิตร กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรองขนาดอนุภาคเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมครอน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

4.1.6 นำสารสกัดที่ได้จากการกรองปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์ด้วยเครื่อง HPLC และคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน

4.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

4.2.1 นำสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมิน 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 มิลลิกรัม ละลายด้วย เมธานอล HPLC grade ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นสารละลายมาตรฐาน (Stock solution)

4.2.2 ดูดสารละลายมาตรฐานใน Stock solution ปริมาตร 200 400 600 และ 800 ไมโครลิตร ใส่ในขวดเก็บสาร (Vial) ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 ไมโครลิตร โดยดูดสารละลายเมธานอล HPLC grade ปริมาตร 800 600 400 และ 200 ไมโครลิตร ใส่ในขวดเก็บสาร จะได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

4.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ด้วยเครื่อง HPLC นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์ เทียบกับกราฟมาตรฐานโดยมีสภาวะที่สำคัญดังนี้

- อัตราการไหลของสาร (Flow rate) 1.0 มิลลิลิตร/นาที

- สารตัวพาสารละลายให้เคลื่อนที่ (Mobile phase) ประกอบด้วย 1% Acetic acid : Acetonitrile อัตรา 45 : 55

- คอลัมน์ที่ใช้คือ Zorbax SB-C18 Column (4.6x150 nm)

- ตัวตรวจสอบที่ใช้คือ UV-Vis Detector ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร

- ฉีดสารละลายปริมาตร 20 ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืชและถ่ายยีน และห้องปฏิบัติการชีววิทยาโมเลกุล ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

5. ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง

เดือน พฤษภาคม 2550 ถึง เดือน พฤศจิกายน 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. ผลจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสี

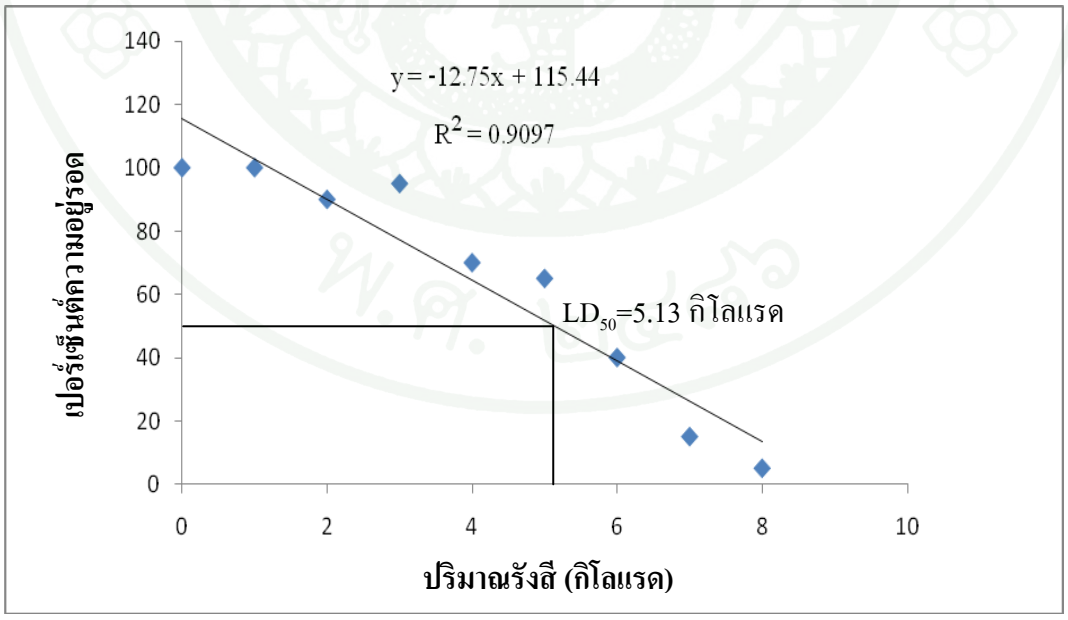
หลังจากนำต้นว่านชักมดลูกมาฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน ในปริมาณต่าง ๆ คือ 0 1 2 3 4 5 6 7 และ 8 กิโลแรด และนำกลับมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS โดยใช้วิตามินของอาหารสูตร B5 ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มมากขึ้นการเจริญเติบโตของต้นว่านชักมดลูกจะลดน้อยลง โดยต้นที่ได้รับปริมาณรังสีสูงกว่า 2 กิโลแรด การแตกหน่อ การยืดตัวของลำต้น การแตกใบ จะลดน้อยลงเมื่อปริมาณรังสีสูงขึ้น ลักษณะของต้นว่านชักมดลูกเมื่อผ่านไป 7 วันที่ปริมาณรังสี 7-8 กิโลแรด ใบของต้นว่านชักมดลูกจะมีสีเหลือง และเมื่อผ่านไป 14 วันต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับปริมาณรังสีตั้งแต่ 5-8 กิโลแรด จะเริ่มตาย และเมื่อผ่านไป 60 วัน ปริมาณรังสีมากกว่า 1 กิโลแรด จะทำให้ต้นว่านชักมดลูกตายโดยปริมาณรังสีที่ 8 กิโลแรด ทำให้ต้นว่านชักมดลูกตายมากที่สุด ดังตารางที่ 2 สาเหตุที่ต้นว่านชักมดลูกตายเมื่อได้รับรังสีโดยเฉพาะรังสีในปริมาณสูงนั้น เนื่องจากรังสีปริมาณสูงทำให้เซลล์หยุดชะงักการแบ่งตัวอย่างถาวร และไม่มีการฟื้นคืนกลับมาทำหน้าที่ได้อย่างเดิม ในที่สุดเซลล์จะตาย เซลล์อื่นที่ไม่ตายอาจแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเข้ามาแทนที่เซลล์ที่ตายได้ ในบางกรณีพบว่า เซลล์ที่ผ่านการฉายรังสีสามารถแบ่งตัวตามปกติได้หลายครั้ง หลังจากนั้นเซลล์จึงจะตาย (สิรนุช, 2527)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 จำนวนต้นที่รอดชีวิตของต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในปริมาณรังสีต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 60 วัน หลังจากฉายรังสี

ปริมาณรังสี (กิโลแรด)	จำนวนต้นที่ใช้ในการทดลอง	จำนวนต้นที่รอดชีวิตทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอด
0	20	20	100
1	20	20	100
2	20	18	90
3	20	19	95
4	20	14	70
5	20	13	65
6	20	8	40
7	20	3	15
8	20	1	5

จากนั้นนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟหาค่า LD_{50} ได้ดังกราฟ

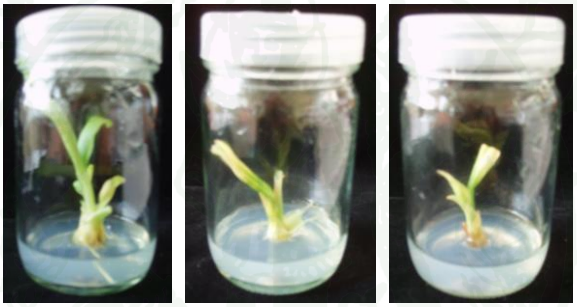


ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรังสี (กิโลแรด) กับเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของต้นว่านชักมดลูกที่ระยะเวลา 60 วัน หลังได้รับการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การหาค่า $LD_{50(60)}$ สามารถหาได้จากสมการถดถอย เพื่อทำนายค่า $LD_{50(60)}$ ดังแสดงในภาพที่ 1 และวิธีลากเส้นตรงตัดกราฟ ค่า $LD_{50(60)}$ ที่ได้คือ 5.13 กิโลแรด

Control 1 krad 2 krad 3 krad 4 krad 5 krad



6 krad 7 krad 8 krad

ภาพที่ 2 ต้นว่านชักมดลูกหลังจากได้รับการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ระดับความเข้มข้น 0 1 2 3 4 5 6 7 และ 8 กิโลแรด เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ หลังได้รับรังสี

เมื่อฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสี 0 1 2 3 4 5 6 7 และ 8 กิโลแรด และนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ต้นว่านชักมดลูกมีการเจริญเติบโตแตกต่างกันไปตามระดับรังสี โดยที่ปริมาณรังสี 0 1 2 3 4 และ 5 กิโลแรด ต้นว่านชักมดลูกสูงประมาณ 7-9 เซนติเมตร มีหน่อ 3-5 ต้น มีใบ 5-6 ใบ มีรากยาวเห็นชัดเจน ส่วนต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับปริมาณรังสี 6 และ 7 กิโลแรด ต้นว่านชักมดลูกสูงประมาณ 6-8 เซนติเมตร มีหน่อ 2-3 ต้น มีใบ 3-5 ใบ มีรากยาวเห็นชัดเจนแต่จะมีจำนวนน้อยกว่าต้นที่ได้รับปริมาณรังสีที่ระดับ 0 1 2 3 4 และ 5 กิโลแรด ส่วนต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับปริมาณรังสีที่ 8 กิโลแรด เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ต้นว่านชักมดลูกจะตายในที่สุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อเพาะเลี้ยงต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับปริมาณรังสีที่ระดับ 0 1 2 3 4 5 6 และ 7 กิโลแรด บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ครบ 6 สัปดาห์ จึงตัดแยกให้เป็นต้นเดี่ยว ๆ แล้วย้ายต้นว่านชักมดลูกลงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ต้นว่านชักมดลูกมีการตอบสนองดังนี้ ต้นว่านชักมดลูกสูงขึ้นเป็น 8-9 เซนติเมตร การแตกหน่อจะลดลงโดยที่ปริมาณรังสี 0-4 กิโลแรด จะยังมีการแตกหน่อของต้นว่านชักมดลูกอยู่บ้าง 1-2 ต้น ส่วนที่ปริมาณรังสี 5-7 กิโลแรด มีการแตกหน่อบ้างเล็กน้อย ในบางต้นก็ไม่มีการแตกหน่อเลย มีใบ 3-5 ใบ มีรากยาวเห็นชัดเจน ผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับงานทดลองของ Lamseejan *et al*. (2003) ที่ฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันกับปทุมมาในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (0-30 เกรย์) พบว่าเมื่อปริมาณรังสีสูงขึ้นอัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตลดลง ผลของรังสีจะทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืช ผิดปกติจะเกิดกับรูปร่างลักษณะของพืชที่ได้รับรังสีอาจเกิดขึ้นกับราก ลำต้น ใบ ดอก ผล เช่น รังสีไปยับยั้งการแบ่งเซลล์ในบริเวณยอด และยับยั้งการยืดตัวของเซลล์บริเวณปล้อง ทำให้ต้นแคระแกรน และรังสียังไปยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชเป็นผลจากเนื้อเยื่อเจริญถูกทำลายโดยตรง (อรุณี, 2530)

เมื่อเพาะเลี้ยงต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับปริมาณรังสี 0 1 2 3 4 5 6 และ 7 กิโลแรด บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรครบ 6 สัปดาห์แล้ว จากนั้นนำต้นว่านชักมดลูกออกปลูกในสภาพกระถาง โดยนำต้นว่านชักมดลูกที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อมาปรับสภาพที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน แล้วย้ายต้นว่านชักมดลูกออกปลูกในถาดหลุม โดยใช้ ดิน : แกลบ : แกลบเผา : ปุ๋ยคอก ในสัดส่วน 1 : 1 : 1 : 1 เป็นวัสดุปลูก รดน้ำและคลุมด้วยถุงพลาสติกเพื่อรักษาความชื้น เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นเปิดปากถุงเล็กน้อยเพื่อเพิ่มการถ่ายเทอากาศ เป็นเวลา 7 วันและจากนั้นย้ายต้นว่านชักมดลูกไปปลูกในกระถาง 8 นิ้ว โดยใช้วัสดุปลูกเหมือนเดิม พบว่าลักษะทางสัณฐานวิทยาของต้นว่านชักมดลูกจะคล้ายคลึงกัน แต่ในต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับปริมาณรังสี 3 Krad ลำต้นเทียมเหนือดินของต้นว่านชักมดลูกเปลี่ยนเป็นสีแดง ดังภาพที่ 3 เช่นเดียวกับการทดลองของธนวัฒน์ และเตือนใจ (2549) ที่ฉายรังสีแกมมาปริมาณ 60 เกรย์ให้กล็อกซิเนีย แล้วทำให้สีของลำต้นเปลี่ยนเป็นสีแดง รังสีมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสี (color change) พืชที่ได้รับรังสีเอกซ์หรือรังสีแกมมามักเกิดการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับสี โดยเฉพาะอย่างยิ่งสีใบ เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า mosaic ส่วนใหญ่เกิดขึ้นเนื่องจากการกระจายตัวของคลอโรฟิลล์ไม่สม่ำเสมอ นอกจากนี้อาจพบว่าใบเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีอื่น ๆ เช่น สีเหลือง หรือ สีขาว เป็นต้น การฉายรังสีกับพืชตระกูลถั่วหรือพวกธัญพืช มักพบลักษณะการกลายของคลอโรฟิลล์ได้หลายชนิด นอกจากสีของใบเปลี่ยนแล้ว สีของต้นและสีของดอกก็เกิดการเปลี่ยนแปลงได้เช่นเดียวกัน การทดลองในต้นคาร์เนชั่นพบความผิดปกติในสีของดอกมากมายหลายชนิด (อรุณี, 2530)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Control 1 krad 2 krad 3 krad 4 krad

5 krad 6 krad 7 krad

ภาพที่ 3 ต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณ 0 ถึง 7 กิโลแรด หลังย้ายปลูกในสภาพกระถางเป็นเวลา 10 สัปดาห์

2. ผลจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารโคลชิซิน

เมื่อให้สารโคลชิซินความเข้มข้น 0.1 และ 0.2% นาน 24 และ 48 ชั่วโมง แก่ว่านชักมดลูก และนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ต้นว่านชักมดลูกมีความสูงประมาณ 8-9 เซนติเมตร มีการแตกหน่อ 4-5 ต้น มีใบ 4-6 ใบ มีรากยาวเห็นชัดเจน

เมื่อเพาะเลี้ยงต้นว่านชักมดลูกบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ครบ 6 สัปดาห์ แล้วจึงตัดแยกให้เป็นต้นเดี่ยว ๆ แล้วย้ายต้นว่านชักมดลูกลงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ต้นว่านชักมดลูกมีการตอบสนองโดยต้นว่านชักมดลูกสูงขึ้น 9-10 เซนติเมตร การแตกหน่อลดลง มีใบ 3-5 ใบ มีรากยาวเห็นชัดเจน

จากนั้นนำต้นว่านชักมดลูกออกปลูกในสภาพกระถาง โดยนำต้นว่านชักมดลูกที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อมาปรับสภาพที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน แล้วย้ายต้นว่านชักมดลูกออกปลูกในถาดหลุม โดยใช้ ดิน : แกลบ : แกลบเผา : ปุ๋ยคอก ในสัดส่วน 1 : 1 : 1 : 1 เป็นวัสดุปลูก รดน้ำและคลุมด้วยถุงพลาสติกเพื่อรักษาความชื้น เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นเปิดปากถุงเล็กน้อยเพื่อเพิ่มการถ่ายเทอากาศ เป็นเวลา 7 วันและจากนั้นย้ายต้นว่านชักมดลูกไปปลูกในกระถาง 8 นิ้ว โดยใช้วัสดุ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปลูกเหมือนเดิม เมื่อต้นว่านชักมดลูกที่ย้ายออกปลูกจากทรีทเมนต์ต่าง ๆ ในกระถางตั้งตัวได้ดีจึงตรวจนับปากใบโดยใช้ยาทาเล็บทาที่ผิวใบด้านใต้ท้องใบ ลอกออกแล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อนับจำนวนปากใบโดยตรวจสอบบริเวณกลางใบเหมือนกันหมดทุกใบ จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของจำนวนปากใบ พบว่า ความเข้มข้นของโคลชิซินมีผลทำให้จำนวนปากใบเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยโคลชิซิน 0.1 และ 0.2 % มีผลทำให้จำนวนปากใบลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่โคลชิซินทั้งสองความเข้มข้นไม่ทำให้จำนวนปากใบแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนระยะเวลาที่ว่านชักมดลูกได้รับสารโคลชิซิน และปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับระยะเวลาไม่ทำให้จำนวนปากใบมีความแตกต่างทางสถิติ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 จำนวนปากใบเฉลี่ยของต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับสารโคลชิซิน 3 ระดับความเข้มข้น และ 2 ระยะเวลา

ความเข้มข้น (%)	เวลา (ชั่วโมง)		ค่าเฉลี่ย (ความเข้มข้น)
	24	48	
0	8.6	9.1	8.8 a [1/]
0.1	7	6.6	6.8 b
0.2	6.6	6.9	6.8 b
ค่าเฉลี่ยเวลา	7.4	7.5	
CV (%)	20.9		

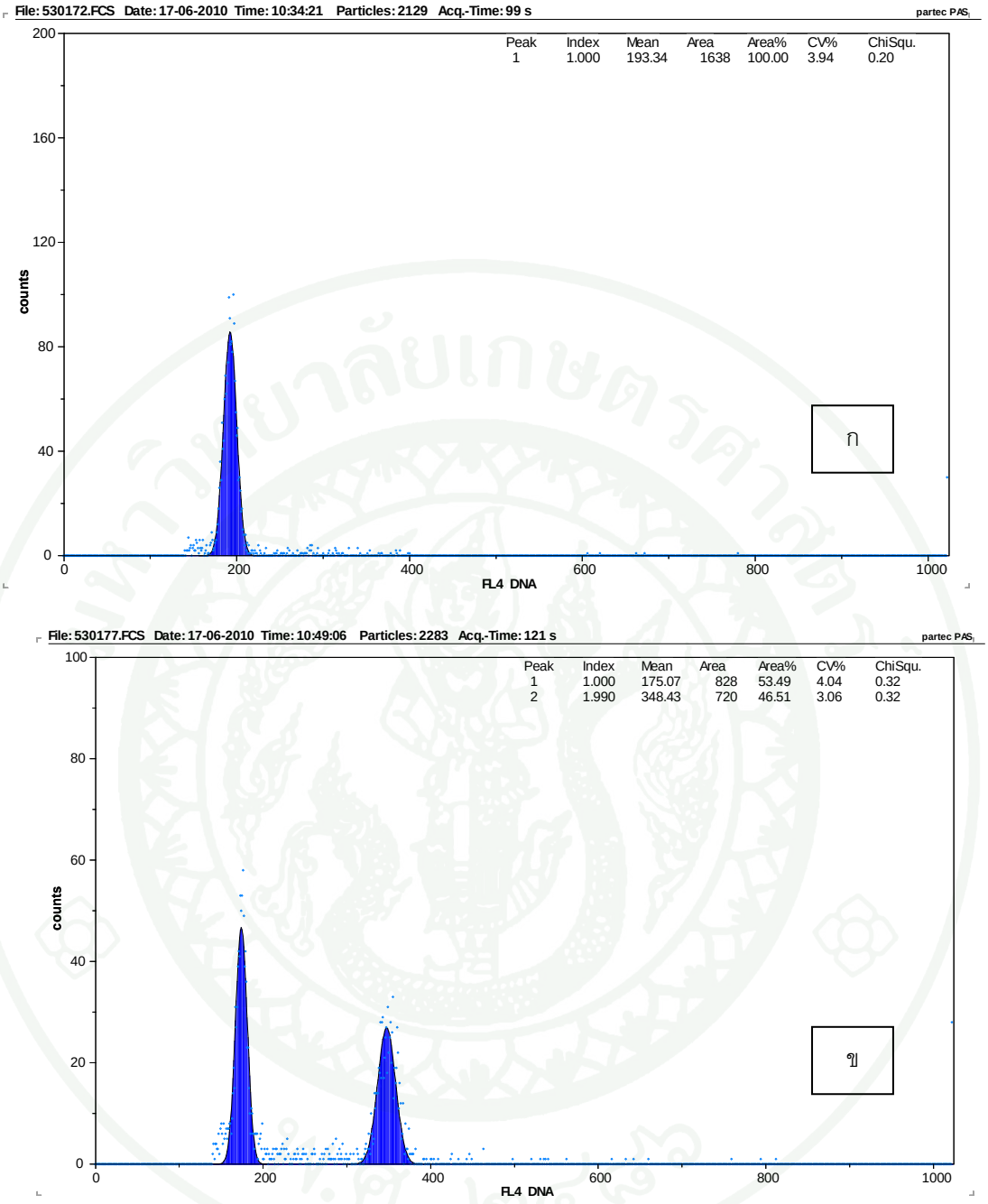
[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD

และเมื่อนำต้นว่านชักมดลูกเหล่านี้ไปตรวจหาปริมาณ nuclear content โดยเครื่อง flow cytometer พบว่า มีทั้งต้นที่เป็นดิพพลอยด์ และต้นที่เป็น mixoploid คือต้นที่เป็นทั้งดิพพลอยด์และเตตราพลอยด์ในต้นเดียวกันโดยต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับสารโคลชิซิน 0.1 % นาน 48 ชั่วโมงบางต้นที่เป็น mixoploid (ภาพที่ 4) การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม จะมีผลสำเร็จต่อเมื่อเซลล์อยู่ในขั้นตอนของการแบ่งเซลล์ ประกอบกับการให้สารเคมีที่เหมาะสม เช่น ชนิดและความเข้มข้นของสาร การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้สารเคมีเป็นวิธีที่สะดวกในการเพิ่มจำนวนชุดของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โครโมโซม และให้ผลสำเร็จสูงเนื่องจากเซลล์มีการแบ่งตัวตลอดเวลา โดยเฉพาะเมื่อมีการผ่าหรือตัดให้เป็นแผล (ชยานิจ และคณะ, 2551) ดังนั้นการเกิด mixoploid ในต้นว่านชักมดลูกอาจเกิดจากการให้สารโคลชิซินในหน่อของต้นว่านชักมดลูกซึ่งประกอบด้วยเซลล์เป็นจำนวนมาก ซึ่งแต่ละเซลล์อยู่ในระยะการแบ่งเซลล์ที่แตกต่างกัน และต้นที่ได้พัฒนามาจากเซลล์มากกว่า 1 เซลล์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 4 nuclear content ของว่านชัดมดลูกที่ตรวจสอบโดยใช้เครื่อง flow cytometor ของว่านชักมดลูกปกติ (ภาพ ก) และต้นที่ได้รับสารโคลชิซินที่ได้รับสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.1% นาน 48 ชั่วโมง (ภาพ ข)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ผลการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับการฉายรังสีและโคลชิซิน

เพื่อตรวจสอบความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับรังสีและสารโคลชิซิน จึงตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 คู่ไพรเมอร์ พบว่า ในต้นที่ได้รับรังสีเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนทั้งหมด 122 แถบ ที่ระดับปริมาณรังสี 2 Krad ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลีมอร์ฟิซึมมากที่สุด คือ 29 แถบ ส่วนที่รังสี 6 Krad ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลีมอร์ฟิซึมน้อยที่สุด คือ 12 แถบ (ตารางที่ 4) การเกิดโพลีมอร์ฟิซึมน้อย เมื่อปริมาณรังสีสูงขึ้น อาจเนื่องมาจากต้นว่านชักมดลูกที่อยู่รอดจากการได้รับรังสีมักเป็นต้นที่ได้รับปริมาณรังสีในปริมาณน้อยซึ่งอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมน้อย ส่วนต้นที่ได้รับปริมาณรังสีมาก ๆ มักตายไป ซึ่งต้นเหล่านี้อาจมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมมากกว่าก็ได้ ดังนั้นต้นที่รอดเมื่อได้รับปริมาณรังสีสูง ๆ จึงเป็นต้นที่ค่อนข้างปกติ จึงเกิดโพลีมอร์ฟิซึมน้อย ประกอบกับจำนวนต้นรอดชีวิตลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณรังสี ส่วนต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับสารโคลชิซินเมื่อนำมาตรวจสอบโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี พบว่า ไม่เกิดโพลีมอร์ฟิซึม เพราะสารโคลชิซินมีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้างสายสปินเดิล (spindle fiber) ในระยะที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีสทำให้ไม่มีการดึงโครโมโซมให้แยกออกจากกันในระยะเมตาเฟส (metaphase) โครโมโซมจึงไม่เคลื่อนที่เข้าสู่ขั้วเซลล์ ทำให้มีจำนวนเพิ่มขึ้นอีกเท่าตัว (สิรนุช, 2536; อมรา, 2536) แต่สารโคลชิซินไม่มีผลในการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส ทำให้เมื่อตรวจสอบความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมจึงไม่เกิดโพลีมอร์ฟิซึม แสดงว่าต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับการฉายรังสีมีความแปรปรวนทางพันธุกรรม เกิดการเปลี่ยนแปลงเบสอันเนื่องมาจากรังสีแกมมา ในตำแหน่งที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ ทำให้สามารถหรือไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ มีผลทำให้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้เปลี่ยนแปลงไป (สุรินทร์, 2545 ; Kokotovic *et al.,* 1999) การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดย ใช้รังสีเมื่อยีนหรือโมเลกุลของดีเอ็นเอ ได้รับรังสีประเภท ionizing radiation ได้แก่ รังสี X รังสี gamma รังสี alpha รังสี beta รังสี proton และ รังสี neutron จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ซึ่งเป็นผลให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ เมื่อยีนหรือโมเลกุลของ ดีเอ็นเอ ได้รับรังสีประเภท nonionizing radiation ได้แก่รังสี ultraviolet ดีเอ็นเอจะดูดซับพลังงานจากรังสี ultraviolet ไว้ ทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอเปลี่ยนไปอยู่ในสภาวะที่สามารถเกิดปฏิกิริยาทางเคมีได้สูง จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของโมเลกุลได้ ซึ่งการเกิดการกลายพันธุ์อาจเกิดการกลายพันธุ์ของยีน ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่เกี่ยวข้องกับนิวคลีโอไทด์เพียงไม่กี่โมเลกุลในยีนหนึ่ง ๆ และการกลายพันธ์ของโครโมโซม คือ การเปลี่ยนแปลงจำนวนหรือโครงสร้างของโครโมโซม (อรุณี, 2530) เช่นเดียวกับการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม ในต้นเจตมูลเพลิงแดงที่เกิดจากแคลลัส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และเซลล์แขวนลอยที่ได้รับสาร ethylmethanesulphonate เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 8 คู่ ที่สามารถตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นได้ โดยตรวจสอบการเกิดโพลีมอร์ฟิซึม (สายใจ, 2551)

ตารางที่ 4 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี

คู่ไพรเมอร์	แถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลีมอร์ฟิซึมที่ปริมาณรังสีระดับต่าง ๆ						
		1 Krad	2 Krad	3 Krad	4 Krad	5 Krad	6 Krad	7 Krad
CGT/CTG	16	3	1	1	2	4	1	1
CTG/CAG	22	1	4	3	3	1	2	1
TAC/TAC	6	1	5	1	3	2	1	1
TCG/TGA	12	2	3	3	2	1	2	2
TAC/TGA	10	1	4	2	1	1	1	1
GCA/GTA	9	1	2	4	3	0	1	1
GCA/GTC	5	2	2	2	3	2	1	1
GCC/GTA	18	0	3	2	3	0	1	1
GCA/GTC	11	2	2	4	4	4	1	2
GTC/GCC	13	2	3	0	2	5	1	2
รวม	122	15	29	22	26	20	12	13

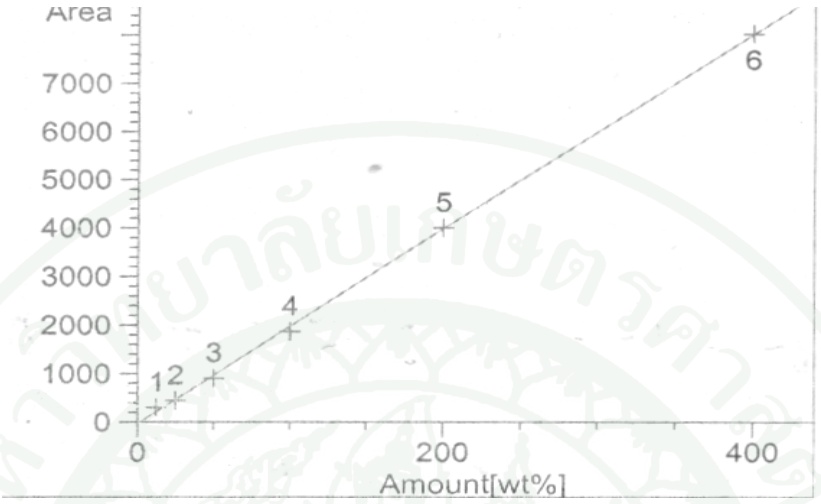
4. ผลการศึกษาปริมาณสาร curcuminoids ในหัวของว่านชักมดลูกที่ได้รับการฉายรังสีและโคลชิซินโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Calibration curve ของ curcuminoids standard reference

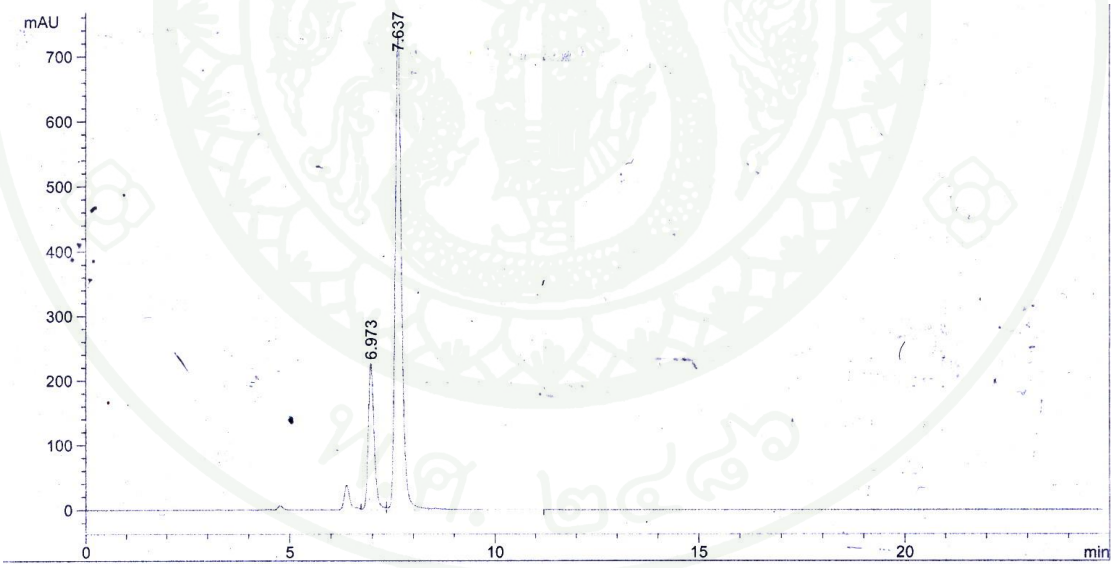
การทำ calibration curve (ภาพที่ 5) เพื่อแปรผลของพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ HPLC มาเป็นปริมาณสาร curcuminoids ตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร โดยการใช้สาร curcuminoids มาตรฐาน ความเข้มข้น 400 200 100 50 25 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าพื้นที่ใต้กราฟ ซึ่งใช้เป็น calibration curve ของ curcuminoids standard reference โดยมีสมการ linear regression คือ y = 20.10742x-43.97836 (r = 0.99975) โดย y คือ ค่าพื้นที่ใต้กราฟ (ตารางหน่วย) และ x คือ ค่าความเข้มข้นของสาร curcuminoids (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่ค่าเฉลี่ย retention time ของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

curcuminoids standard reference ประมาณ 8 นาที (ภาพที่ 6) ดังนั้นเมื่อทราบพื้นที่ใต้กราฟ และเวลาของสารที่ได้จากการวิเคราะห์ HPLC ก็สามารถทราบถึงปริมาณสาร curcuminoids ได้

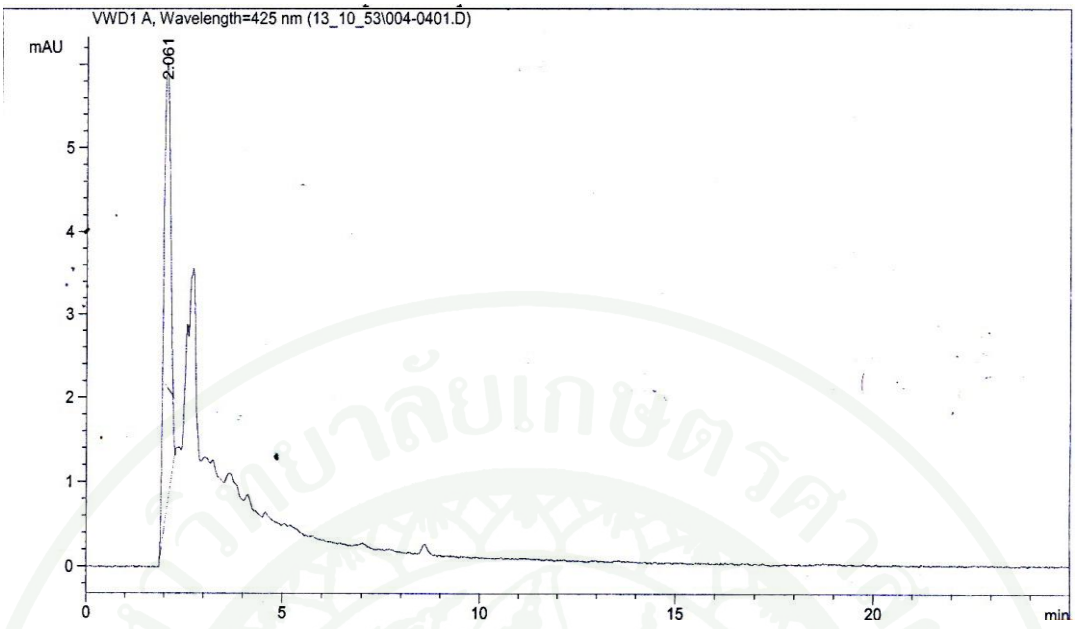


ภาพที่ 5 Calibration curve ของ curcuminoids standard reference



ภาพที่ 6 Chromatogram ของ curcuminoids standard reference mAU = milli Absorbance Unit, min = นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 7 Chromatogram ของตัวอย่างสารสกัดจากหัวของต้นว่านชักมดลูกต้นปกติ

Chromatogram จะทำให้ทราบแน่ชัดว่าตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์มีสาร curcuminoids หรือไม่ โดยการเปรียบเทียบผลวิเคราะห์และค่า retention time ของ curcuminoids standard reference กับสารตัวอย่าง

สารประกอบทางเคมีในว่านชักมดลูกพบสารประกอบในกลุ่มต่าง ๆ ต่อไปนี้ (สนั่นและฉัตรชัย, 2546)

กลุ่ม curcuminoids เช่น curcumin, desmethoxycurcumin, bisdesmethoxycurcumin, hexahydrocurcumin, octahydrocurcumin เป็นต้น

กลุ่ม diarylheptanoids เช่น trans-1,7-diphenylhepten-5-ol, trans, trans-1,7-diphenylheptadien-5-ol, trans, trans-1,7-diphenylheptadien-5-one, trans-1,7-diphenyl-1,3-heptadien-4-one, 5-hydroxy-7-(4-hydroxyphenyl)-1-phenyl-(1E)-1-heptene เป็นต้น

กลุ่ม sesquiterpenes เช่น xanthorrhizol, germacrone, curzerenone, alpha-curcumene, arturmerone, beta-atlantone เป็นต้น

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร curcuminoids โดยการสกัดสาร curcuminoids ในหัวของต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับการฉายรังสีและโคลชิซิน ที่ออกปลูกในสภาพกระถางเป็นระยะเวลา 1 ปี ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า ไม่พบสาร curcuminoids ในสารสกัดที่สกัดจากหัวของว่านชักมดลูกเมื่อฉีด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เทียบสารตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐาน curcuminoids อาจเนื่องมาจากหัวอายุ 1 ปียังไม่มีการสะสมสาร curcuminoids แต่พบสารบางชนิดในหัวของว่านชักมดลูกที่มีปริมาณมาก ซึ่งคาดว่าสารอาจเป็นสารในกลุ่ม sesquiterpenes เพราะสารในกลุ่มนี้ประกอบด้วยสาร xanthorrhizol ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอ็นไซม์ cyclooxygenase (COX-2) ที่แรง โดยมีค่า IC50 = 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นการยับยั้งการสร้าง prostaglandin E2 (PGE2) (สนั่นและฉัตรชัย, 2546) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดกระบวนการอักเสบต่างๆ เช่นการปวดอักเสบของมดลูกขณะมีประจำเดือน (Nakatani *et al*., 2002) โดยพบว่า เมื่อต้นว่านชักมดลูกได้รับการฉายรังสีหรือสารโคลชิซิน ปริมาณของสารชนิดนี้จะมีมากขึ้น ยกเว้นต้นที่ได้รับปริมาณรังสี 6 และ 7 กิโลแรด และต้นที่ได้รับสารโคลชิซิน 0.2 % นาน 24 ชั่วโมง ที่มีปริมาณของสารเฉลี่ยน้อยกว่าต้นควบคุม ดังตารางที่ 5 จากตารางแสดงให้เห็นว่าต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับปริมาณรังสี 3 krad มีปริมาณสารเฉลี่ยมากที่สุด จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของปริมาณสารสำคัญ พบว่า ปริมาณสารสำคัญไม่มีความแตกต่างทางสถิติ มีรายงานว่ารังสีปริมาณต่ำ ๆ สามารถไปเร่งการเจริญเติบโตของพืชได้ ปริมาณรังสีที่ไปเร่งการเจริญเติบโตได้คือ ปริมาณรังสีที่ต่ำกว่า 5000 เรินต์เกน การแสดงออกถึงการเร่งการเจริญเติบโตอาจแสดงออกมาในลักษณะต่าง ๆ เช่น ต้นพืชสูงขึ้น มีรากยาว งอกเร็ว ออกดอกเร็ว ผลผลิตสูง หรืออายุเก็บเกี่ยวสั้นลง เป็นต้น (อรุณี, 2530) ซึ่งสอดคล้องกับ การก่อกลายพันธุ์ในแก้วมังกรโดยใช้รังสีแกมมาทำให้ปริมาณ carotenoids, vitamin C และ total phenol เพิ่มมากขึ้น (อรพิน และคณะ, 2550)

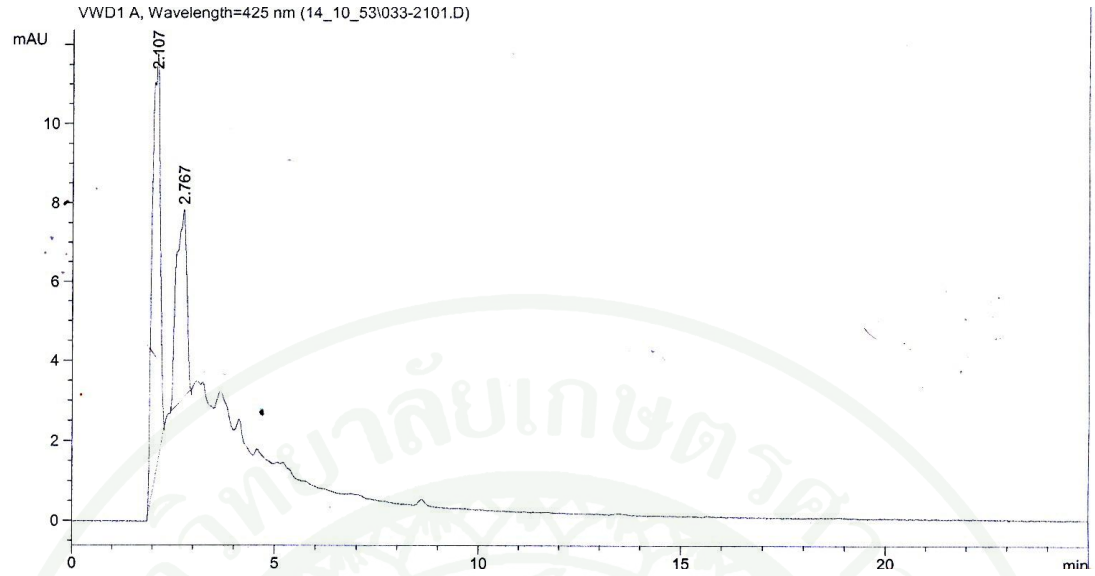
รัชนี (2553) ให้สารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.10% ขึ้นไปกับกล้วยไม้เอื้องเงิน โดยให้สารนาน 4 วัน พบว่า ขนาดและความยาวของปากใบเพิ่มขึ้น และสามารถชักนำให้เกิดต้นเตตราพลอยด์ได้ โดยยืนยันการทดสอบระดับพลอยดีด้วยเครื่อง flow cytometer ซึ่งส่งผลให้เอื้องเงินมีดอกขนาดใหญ่ กลีบดอกมีความกว้างยาวและหนามากกว่าต้นดิพลอยด์ และในฟ้าทะลายโจร พบว่าเมื่อแช่ส่วนยอดของฟ้าทะลายโจรในสารโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.2% เป็นเวลา 16 ชั่วโมงทำให้ปริมาณสาร andrographolide ในใบและลำต้นเพิ่มขึ้น (วราภรณ์, 2543) ซึ่งจากการทดลองแช่หน่อต้นว่านชักมดลูกในสารละลายโคลชิซิน แล้วทำให้จำนวนปากใบของต้นว่านชักมดลูกมีขนาดใหญ่ขึ้น มีต้นที่เป็นลักษณะเป็น mixoploid คือ ต้นที่เป็นทั้งดิพลอยด์และเตตราพลอยด์ในต้นเดียวกัน จึงคาดว่าปริมาณสารในต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับสารโคลชิซินจะเพิ่มมากขึ้นด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

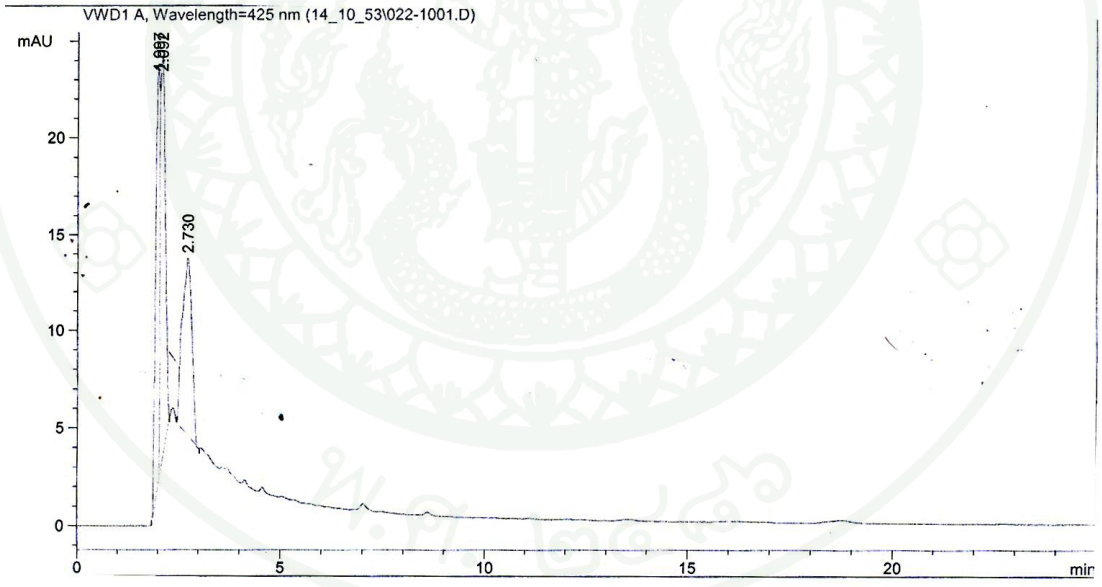
ตารางที่ 5 ปริมาณสารสำคัญของหัวว่านชักมดลูกอายุ 1 ปี ที่ได้จากต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับการฉายรังสีและโคลชิซิน

Treatment	ปริมาณสาร			ปริมาณสารเฉลี่ย
	ต้นที่ 1	ต้นที่ 2	ต้นที่ 3	
control	4.9	0.96	1.48	2.45
1 Krad	1.2	6	2.1	3.1
2 Krad	1.04	4.8	3.5	3.11
3 Krad	4.02	37	3.8	14.94
4 Krad	9.3	3.5	1.95	4.92
5 Krad	3.4	5.6	1.36	3.45
6 Krad	2.1	1.37	3.4	2.29
7 Krad	2.35	1.35	1.8	1.83
Pr(>F=0.4602)				**ns**
control	4.9	0.96	1.48	2.45
0.1/24 ชั่วโมง	4.5	3.1	3.5	3.7
0.2/24 ชั่วโมง	2.1	2.8	2.3	2.4
0.1/48 ชั่วโมง	2.2	3.4	2.2	2.6
0.2/48 ชั่วโมง	1.48	4.8	1.9	2.73
Pr(>F=0.1956)				**ns**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 8 Chromatogram ของตัวอย่างสารสกัดจากหัวของต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับสารโคลชิซิน 0.1 % นาน 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 9 Chromatogram ของตัวอย่างสารสกัดจากหัวของต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับปริมาณรังสี 7 Krad

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. จากการให้รังสีแกมมาแบบเฉียบพลันกับต้นว่านชักมดลูกในสภาพปลอดเชื้อ มีผลทำให้ต้นว่านชักมดลูกตายเมื่อได้รับปริมาณรังสีตั้งแต่ 2 กิโลแรด และจากสมการถดถอย สามารถทำนายได้ว่าปริมาณรังสี 5.13 กิโลแรด ทำให้ต้นว่านชักมดลูกตาย 50% หลังได้รับการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน เป็นระยะเวลา 60 วัน และปริมาณรังสี 3 กิโลแรด ทำให้ต้นว่านชักมดลูกบางต้นมีสีของลำต้นเทียมเปลี่ยนเป็นสีแดง

2. จากการให้สารโคลชิซินแก่ว่านชักมดลูกที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.2% นาน 24 และ 48 ชั่วโมง มีผลทำให้ต้นว่านชักมดลูกมีจำนวนปากใบเฉลี่ยลดน้อยลง ที่ระดับความเข้มข้น 0.1% นาน 48 ชั่วโมง และ 0.2% นาน 24 ชั่วโมงให้จำนวนปากใบต่ำสุด คือ 6.6 หน่วยต่อพื้นที่ เมื่อนำต้นว่านชักมดลูกเหล่านี้ไปตรวจ nuclear content โดยเครื่อง flow cytometer พบว่า มีทั้งต้นที่เป็นดิพพลอยด์ และต้นที่เป็น mixoploid คือต้นที่เป็นทั้งดิพพลอยด์และเตตราพลอยด์ในต้นเดียวกัน โดยที่ระดับความเข้มข้น 0.1 % นาน 48 ชั่วโมงพบว่าบางต้นมีลักษณะที่เป็น mixoploid

3. เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับรังสีที่ปริมาณต่าง ๆ ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีโดยใช้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 คู่ไพรเมอร์ พบว่าทุกคู่ไพรเมอร์ทำให้เกิดโพลีมอร์ฟิซึมได้ในขณะที่ต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับสารโคลชิซินทั้ง 2 ความเข้มข้นและ 2 ระยะเวลาไม่เกิดโพลีมอร์ฟิซึม แสดงว่าต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับการฉายรังสีมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น ส่วนต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับสารโคลชิซิน แม้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของนิวคลีโอไทด์ แต่ก็ยังสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการคัดเลือก และปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้รับสายพันธุ์ที่สามารถสะสมสารสำคัญได้สูงต่อไป

4. จากการวิเคราะห์ปริมาณสารด้วยวิธี HPLC พบว่าหัวของต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับการฉายรังสีและโคลชิซิน มีปริมาณของสารบางชนิดมีมากขึ้น เมื่อต้นว่านชักมดลูกได้รับการฉายรังสีหรือสารโคลชิซิน ปริมาณของสารชนิดนี้จะมีมากขึ้น ยกเว้นต้นที่ได้รับปริมาณรังสี 6 และ 7 กิโล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แรด และต้นที่ได้รับสารโคลชิซิน 0.2 % นาน 24 ชั่วโมง ที่มีปริมาณของสารเฉลี่ยน้อยกว่าต้นควบคุม โดยต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับปริมาณรังสี 3 krad มีปริมาณสารเฉลี่ยมากที่สุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

การเพิ่มชุดโครโมโซมให้กับว่านชักมดลูกโดยใช้สารโคลชิซิน พบลักษณะเป็น mixoploid ซึ่งเกิดจากการให้สารโคลชิซินในหน่อของต้นว่านชักมดลูกที่ประกอบด้วยเซลล์เป็นจำนวนมาก ซึ่งแต่ละเซลล์อยู่ในระยะการแบ่งเซลล์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นการทำให้ไม่เกิดลักษณะ mixoploid ทำได้โดยการให้สารโคลชิซินกับเนื้อเยื่อที่มีระยะการแบ่งเซลล์ในระยะเดียวกัน หรือไม่ก็แยกเนื้อเยื่อเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ส่วนต้นที่มีลักษณะเป็น mixoploid สามารถทำให้เป็นต้น tetraploid ได้ด้วยการนำเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเป็น mixoploid มาทำการตัดแยกและนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์ เพื่อให้เนื้อเยื่อส่วนที่เป็น tetraploid เจริญเติบโตเป็นต้นที่มีลักษณะเป็น tetraploid เพียงอย่างเดียว ไม่เป็นลักษณะ mixoploid

ถึงแม้ว่าการศึกษาในครั้งนี้จะไม่สามารถวิเคราะห์สารได้ว่าเป็นสารชนิดใด แต่อย่างไรก็ตาม ก็สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารในว่านชักมดลูกต่อไป ซึ่งอาจทำได้โดยการฉีดเทียบกับสารละลายมาตรฐานอื่นที่คาดว่าเป็นสารชนิดนั้น หรือทำการหาโครงสร้างของสารนั้น ๆ ดูว่าเป็นสารชนิดใด โดยใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโตรสโคปี เรียกโดยย่อว่า เอ็นเอ็มอาร์ (NMR) เพื่อดูว่าสารชนิดนั้นประกอบด้วยสูตรโครงสร้างชนิดใด และตรงกับสารชนิดใด เพื่อทราบชนิดของสารที่ไม่ทราบชนิดต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรภพ ศักดิ์พนา. 2549. **การเพิ่มชุดโครโมโซมในกระแจะจันทร์โดยใช้สารโคลชิซิน.** ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จุฑารัตน์ โชติวงศ์พิพัฒน์. 2535. **ผลของ 6-Benzyladenine และน้ำตาลซูโครสที่มีผลต่อการเกิดยอดของปทุมมาและขมิ้นชันในสภาพปลอดเชื้อ**. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ชมรมว่านมหาเศรษฐี. 2549. **ตำนานว่านไทย.** สำนักพิมพ์กู๊ดมอร์นิ่ง, กรุงเทพฯ.

ชยานิจ ดิษฐบรรจง, กษิดิศ ดิษฐบรรจง, เบญจมาศ แก้วรัตน์ และสุธาชีพ ศุภเกษร. 2551. การเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมในดาหลาโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, น.154-190. *ใน* **รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2549-50**. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร.

ช่อแก้ว จำปาเงิน. 2548. **ชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์ของขมิ้นชันและว่านนางคำในสภาพปลอดเชื้อ.** ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

โชติอนันต์ อินทุใสตระกูล. 2550. **ว่านสมุนไพร เพื่อสุขภาพ เสริมมงคลชีวิต.** สำนักพิมพ์อนิเมทกรุ๊ป, กรุงเทพฯ.

ธนวัฒน์ แก่นศักดิ์ศิริ และเตือนใจ โก้สกุล. 2549. ผลของรังสีแกมมาต่อกล็อกซิเนีย (*Sinningia speciosa*). **ว. วิทย์.** 5(1) : 13-23.

บุญค้ำ ไชยพรหมวงศา. 2544. **คู่มือเชียนว่าน.** สำนักพิมพ์แองแตร์นาติองนาล แปรสส์, กรุงเทพฯ. 34 น.

ปิยะดา ตันติสวัสดิ์ และ อรดี สหวัชรินทร์. 2532. การปรับปรุงพันธุ์ขิงโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับสารโคลชิซิน. น. 102. *ใน* **การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 27**. 30 มกราคม-1 กุมภาพันธ์ 2532. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรียานันท์ แสนโภชน์. 2540. การปรับปรุงพันธุ์กล้วยน้ำว้าโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้รังสีแกมมา. น. 80-81. *ใน* **การสัมมนาและนิทรรศการกล้วยครบวงจร** วันที่ 15-17 มกราคม 2541. อักษรสยามการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. 2524. **หลักการและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** ภาควิชาพืชสวน, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 109 น.

ภาสันต์ ศารทูลทัต. 2540. **การชักนำให้กล้วยไข่กลายพันธุ์ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย colchicine และ oryzalin**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

รัชนี เพ็ชร์ช้าง. 2553. ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการให้โคลชิซินต่อการเจริญและจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้เอื้องเงิน. **ว. วิทย. เทคโน มมส.** 29(4):413-419.

รุ่งนภา แก้วทองราช. 2548. **การชักนำกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ 'เอียสกุล' ให้กลายพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.** ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เลื่อน กัณหะกาญจนะ. 2523. **ตำราคุณลักษณะว่าน และวิธีปลูกว่าน.** พิมพ์ครั้งที่ 5 สำนักพิมพ์แพร่พิทยา, กรุงเทพฯ.

วราภรณ์ โรจนศิริวงศ์. 2543. การใช้สารเคมีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณ andrographolide ในฟ้าทะลายโจร. *ใน* **รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2543.** คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต.

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

วีรยุทธ ชะวาเขียว. 2548. **การเพิ่มชุดโครโมโซมในไพลโดยใช้สารโคลชิซิน.** ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สมาคมโรงเรียนแพทย์แผนโบราณ สำนักวัดพระเชตุพนวิมลมังคลาราม. 2520. **ประมวลสรรพคุณยาไทย (ภาคสาม) ว่าด้วยพฤกษชาติวัตถุธาตุและสัตว์วัตถุนานาชนิด.** ไพศิลป์การพิมพ์, กรุงเทพฯ.

สมาคมว่านแห่งประเทศไทย. 2525. **คู่มือว่าน.** ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้, คณะวนศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 109 น.

สนั่น ศุภธีรสกุล และฉัตรชัย วัฒนาภิรมย์สกุล. 2546. **ว่านชักมดลูก.** แหล่งที่มา. http://pcog.pharmacy.psu.ac.th/thi/Article/Article2546.asp, 3 ตุลาคม 2553.

สายใจ ชูรัตนา. 2551. **การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2527. **พันธุศาสตร์รังสี.** ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2536. **การกลายพันธุ์ของพืช.** ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 197 น.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2540. **การกลายพันธุ์ของพืช**. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 205 น.

สิรนุช ลามศรีจันทร์ และ อรุณี วงศ์ปิยะสถิต. 2544. **พุทธรักษากับศาสตราจารย์ ดร.ธีระ สูตะบุตร 60 ปีผู้ที่สร้างสรรค์ให้กับสังคม**. น. 110-117. *ใน* หนังสือที่ระลึกครบรอบ 60 ปี ศ.ดร.ธีระ สูตะบุตร. หจก.เอพลัสทรี มีเดีย. กรุงเทพฯ.

สิรินทร์ ไทยธวัช. 2532. **ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณขิงในหลอดทดลอง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุนทรี สิงหบุตรา. 2535. **สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด.** โอ.เอส.พริ้นติ้งเฮ้าส์, กรุงเทพฯ.

เสงี่ยม พงษ์บุญรอด. 2519. **ไม้เทศเมืองไทย : สรรพคุณของยาเทศและยาไทย.** สำนักงานวิทยาศาสตร์ แผนกสมุนไพรแห่งกองเภสัชกรรม, กรมวิทยาศาสตร์, กรุงเทพฯ. 488 น.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุพัตรา สีเทา. 2550. **การเพิ่มชุดโครโมโซมในว่านชักมดลูกโดยใช้สารโคลชิซิน.** ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี**. ภาควิชาพันธุศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 11 น.

อภิชาติ ศรีสะอาด. 2550. **คู่มือ 'ว่านมงคล'**. สำนักพิมพ์นาคา อินเตอร์มีเดีย จำกัด, กรุงเทพฯ.

อมรา คัมภิรานนท์. 2536. **พันธุศาสตร์ของเซลล์.** ภาควิชาพันธุศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 322 น.

อรดี สหวัชรินทร์. 2539. **หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. ภาควิชาพืชสวน, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 72 น.

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

อรุณี วงศ์ปิยะสถิต. 2539. **การใช้รังสีในการปรับปรุงพันธุ์พืช.** ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อรุณี วงศ์ปิยะสถิต. 2541. หลักการและวิธีการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีในพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด. น. 97-111. *ใน* **เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคการกลายพันธุ์.** ศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อรพิน เกิดชูชื่น, ทรงศิลป์ พจน์ชนะชัย, ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์, อภิรดี อุทัยรัตนกิจ, ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์, วณิช ลิ่มโอภาสมณี, สุชาดา เสกสรรวิริยะ, ประพนธ์ ปราณโสภณ และฐิติมา คงรัตน์อาภรณ์. 2550. อิทธิพลของรังสีแกมมาต่อปริมาณ carotenoids, vitamin C และ total phenol ในผลแก้วมังกร. **ว. วิทย์. เกษตร** 38 (พิเศษ) : 247-250.

Aggarwal, R.K., D.S. Brar, S. Nandi, N. Huang and G.S. Khush. 1999. Phylogenetic relationship among *Oryza* spicies revealed by AFLP markers. **Theor. Appl. Genet**. 98: 1320-1328.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

Chen, C.H. and V.C. Coeden-Kallemeyn. 1979. *In vitro* induction of tetraploid plant from colchicine-treated diploid daylily callus. **Euphytica** 28: 705-709.

Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Exp. Cell Res**. 50: 151-158.

Griesbach, R.J. 1987. Selected topics on induced chromosome changes in tissue culture cells. **Hort. Sci.** 22: 1204-1206.

Jantaratnotai, N., P. Utaisincharoen, P. Piyachaturawat, S. Chongthammakun and Y. Sanvarinda. 2006. Inhibitory effect of *Curcuma comosa* on production and cytokine expression in LPS-activated microglia. **Life Sci**. 78: 571-577.

Jurgens, T.M., E.G. FraZier, J.M. Schaeffer, T.E. Jones, D.L. Zink, R.P. Borris, W. Nanakoro, H.T. Beck and M.J. Balick. 1994. Novel nematocidal agents from *Curcuma comosa*. **J. Nature Prod**. 57: 230-235.

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

Lamseejan, S., P. Jompuk, A. Wongpiyasatid, S. Deeseepan and P. Kwanthamachart. 2000. Gamma-rays induced morphological changes in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). **Kasetsart J. (Nat Sci.)**. 34: 417-422.

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.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Malamug, J.J.F., H. Inden and T. Asahira. 1991. Plantlet regeneration and propagation from Ginger callus. **Scientia Hort.** 48: 89-97.

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

Nagatomi, S., K. Degi and H. Ikemiya. 1996. Development of a radiation breeding method using *in vitro* culture and in banana. **Technical News Insti. Radiat. Breed.** 55: 2.

Nakatani, K., N. Nakahata, T. Arakawa, H. Yasuda and Y. Ohizumi 2002. Inhibition of cyclooxgenase and prostaglandia E_2 synthesis by mangostin, a xanthone derivative in mangosteen, in C6 rat glioma cells. **Biochem. Pharmacol**. 63: 73–79.

Nicola, T. and N. Valeria. 2002. Efficiency of three PCR-based markers in assessing genetic variation among cowpea (*Vigna unguiculata* subsp. *unguiculata*) landraces. **Genome** 45: 268-275.

Niumsakul, S., A. Hirunsaree, S. Wattanapitayakul, N. Junsuwanitch and K. Prapanupan. 2007. An antioxidative and cytotoxic substance extracted from *Curcuma comosa* Roxb. **J. Thai Trad.** 5: 24-29.

Piyachaturawat, P., N. Teeratagolpisal, C. Toskulkao and A. Suksamrarn. 1995a. Hypolipidemic effect of *Curcuma comosa* in mice. **Artery** 22: 233-241.

_____, S. Ercharuporn and A. Suksamrarn. 1995b. An estrogenic activity of *Curcuma comosa* extract in rats. **Asia Pacific J. Pharmacol**. 10: 121-126.

_____,_____ and _____. 1995c. An uterotropic effect of *Curcuma comosa* extract in rats. **Int. J. Pharmacog**. 33: 334-338.

Piyachaturawat, P., A. Timinkul, A. Chuncharunee and A. Suksamrarn. 1998. Growth suppressing effect of *Curcuma comosa* extract on male reproductive organs in immature rats. **Pharmaceutical Biol**. 36: 44-49.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

_____,_____ ,_____ and _____. 1999a. Effect of *Curcuma comosa* extract on male fertility in rats. **Pharmaceutical Biolo**. 37: 22-27.

_____, J. Charoenpiboonsin, C. Toskulkao and A. Suksamrarn. 1999b. Reduction of plasma cholesterol by *Curcuma comosa* extract in hypercholesterolaemic hamsters. **J. Ethnopharmacol.** 66 : 199-204.

Popovic, M. and O. Gasic. 1993. Alkaloids from wild growing plant. **Hemijshi Pregled**. 34: 50-53.

Smith, H.H. 1958. Radiation in the production of useful mutation. **Bot. Rev**. 24: 1-24.

Sodsai, A., P. Piyachaturawat, S. Sophasan, A. Suksamrarn and M. Vongsakul. 2007. Suppression by *Curcuma comosa* Roxb. of pro-inflammatory cytokine secretion in phorbol-12-myristate-13-acetate stimulated human mononuclear cells. **Int. Immunopharmacol**. 7: 524-531.

Suksamrarn, A., S. Eiamong, P. Piyachaturawat and L. T. Byrne. 1997. A phloracetophenone glucoside with choleretic activity from *Curcuma comosa*. **J. Phytochem.** 45: 103-105.

_____, M. Ponglikitmongkol, K. Wongkrajang, A. Chindaduang, S. Kittidanairak, A. Jankam, B. Yingyongnarongkul, N. Kittipanumat, R. Chokchaisiri, P. Khetkam and P. Piyachaturawat. 2008. Diarylheptanoid, new phytoestrogens from the rhizomes of *Curcuma comosa* : isolation, chemical modification and estrogenic activity evaluation. **Bioorg. Med**. **Chem**. 16: 6891-6902.

Wood, D.R. 1983. **Crop Breeding**. The American Society of Agronomy, Inc., and the Crop Science Society of American, Inc., Wisconsin, USA. 294 p.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962)

ธาตุอาหาร	ปริมาตร (มิลลิกรัมต่อลิตร)
Macronutriens	
NH_4NO_3	1,650.000
KNO_3	1,900.000
$CaCl_2.2H_2O$	440.000
$MgSO_4.7H_2O$	370.000
KH_2PO_4	170.000
Micronutriens	
H_3BO_3	6.200
$MnSO_4.H_2O$	22.300
$ZnSO_4.7H_2O$	10.930
KI	0.830
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.250
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Fe-EDTA solution	
Na_2-EDTA	37.250
$FeSO_4.7H_2O$	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	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวจุรีภรณ์ ศรีใหม่
วัน เดือน ปี ที่เกิด	20 ตุลาคม 2526
สถานที่เกิด	จ.นครศรีธรรมราช
ประวัติการศึกษา	จบการศึกษาระดับปริญญาตรี ปีการศึกษา 2548 สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป (เคมี-ชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนบัณฑิตผู้ช่วยวิจัย ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์