



วิทยานิพนธ์

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าแพงโกล่าโดยรังสีแกมมา
ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

INDUCED MUTATION IN PANGOLA GRASS
(*DIGITARIA ERIANTHA* CV. 258A) BY
GAMMA IRRADIATION THROUGH TISSUE CULTURE

นางสาวศิรณา อุทุมพฤษ์พร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)
ปริญญา

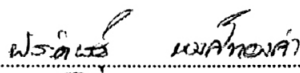
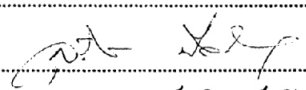
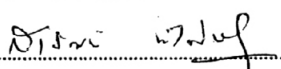
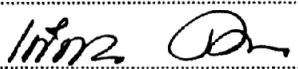
..... พันธุศาสตร์ พันธุศาสตร์
..... สาขา ภาควิชา

เรื่อง การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าแพงโกล่าโดยรังสีแกมมา ร่วมกับการ
เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

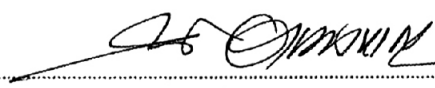
Induced Mutation in Pangola Grass (*Digitaria eriantha* cv. 258A) by Gamma
Irradiation Through Tissue Culture

นามผู้วิจัย นางสาวศิรณา อุทุมพุกภัยพร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ 
(..... ศาสตราจารย์ประคิษฐ์ พงศ์ทองคำ, วท.ม.)
กรรมการ 
(..... รองศาสตราจารย์สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, Dr.Agr.)
กรรมการ 
(..... ศาสตราจารย์สาธิต ทัดศรี, Ph.D.)
หัวหน้าภาควิชา 
(..... ผู้ช่วยศาสตราจารย์เลิศลักษณ์ เงินศิริ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

..... 
(..... รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 16 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2551

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าแพงโกล่าโดยรังสีแกมมาพร้อมกับ
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Induced Mutation in Pangola Grass (*Digitaria eriantha* cv. 258A) by
Gamma Irradiation Through Tissue Culture

โดย

นางสาวศิรณา อุทุมพุกษ์พร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

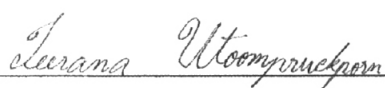
พ.ศ. 2551

ตีรณา อุทุมพฤษพร 2551: การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหนูแอ่งโกล่าโดยรังสี
แกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)
สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ ประชานกรรมการที่ปรึกษา: ศาสตราจารย์
ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, วท.ม. 90 หน้า

อาหารสูตรที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้ข้อของหนูแอ่งโกล่าเกิดยกดหลายยกด คือ
อาหารสูตร MS ที่เติม BAP 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยกดเฉลี่ย คือ 13.05
ยกดต่อข้อ หลังจากนำยกดของหนูแอ่งโกล่าไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณ 0, 20,
40, 60, 80 และ 100 เกรย์ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100, 94.21, 89.56, 85.71, 76.47 และ
39.34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นสามารถหาค่าปริมาณรังสีที่ทำให้เกิดการตาย 50 เปอร์เซ็นต์
(LD₅₀) ได้เท่ากับ 80.9 เกรย์ นำต้นหนูที่รอดชีวิตจากการฉายรังสีไปเลี้ยงบนอาหารชักนำราก
เพื่อให้ได้ต้นที่แข็งแรง มีรากมาก พบว่า อาหารสูตรที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้ต้นหนูแอ่ง
โกล่าเกิดรากได้มากที่สุดคือ อาหารสูตร MS ที่ใส่ถ่านปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร จากนั้นเมื่อนำ
ต้นหนูที่คัดเลือกแล้วมาสักคัตเอ็นเอเพื่อทำการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคเอเอฟแอล
พี โดยใช้ไพรเมอร์ 11 คู่ คือ E-AAC/M-CAA, E-AAC/M-CAT, E-AAC/M-CAC, E-AAC/M-
CTC, E-ACA/M-CTA, E-ACA/M-CTT, E-ACC/M-CTG, E-AGC/M-CAC, E-AGG/M-CAG,
E-AGG/M-CTA และ E-AGG/M-CTT พบว่า ไพรเมอร์ทั้ง 11 คู่สามารถจำแนกตัวอย่างได้ 18
ตัวอย่างจากทั้งหมด 20 ตัวอย่าง โดยพันธุ์กลายบางพันธุ์สามารถจำแนกได้ด้วยไพรเมอร์เพียงคู่
เดียว แต่พันธุ์กลายบางพันธุ์ต้องใช้ไพรเมอร์มากกว่า 1 คู่เพื่อใช้ในการจำแนกความแตกต่าง

Teerana Utoompruckporn 2008: Induced Mutation in Pangola Grass (*Digitaria eriantha* cv. 258A) by Gamma Irradiation Through Tissue Culture. Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Professor Pradit Pongtongkam, M.Sc. 90 pages.

The suitable medium for multiple shoot induction of Pangola grass (*Digitaria eriantha*) was Murashige and Skoog medium (MS) containing 8 mg/l BAP which gave the average shoot numbers of 13.05 shoots per node. Then shoots were irradiated with gamma rays at 0, 20, 40, 60, 80 and 100 Gy and the survival percentage were at 100, 94.21, 89.56, 85.71, 76.47 and 39.34 percent respectively, giving the percent lethal dose (LD_{50}) of 80.9 Gy. These survival plants were cultured for root formation on 3 formulae of synthetic media: MS, MS supplemented with 1 g/l activated charcoal and MS supplemented with 0.5 mg/l 2,4-D for root induction. The results showed that MS supplemented with 1 g/l activated charcoal was the best appropriate medium for root induction. DNA was extracted from the selected prospective mutant plants for analysis DNA fingerprint by AFLP technique using 11 combinations of primer: E-AAC/M-CAA, E-AAC/M-CAT, E-AAC/M-CAC, E-AAC/M-CTC, E-ACA/M-CTA, E-ACA/M-CTT, E-ACC/M-CTG, E-AGC/M-CAC, E-AGG/M-CAG, E-AGG/M-CTA and E-AGG/M-CTT. Eighteen out of twenty DNA samples could be identified by these 11 primer pairs. However, some mutant plants could be classified by only one combination of primer but some must use more than one combination.



Student's signature



Thesis Advisor's signature

15 / May / 2008

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงในความกรุณาของ ศาสตราจารย์ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้แนะนำและให้คำปรึกษาหัวข้อวิทยานิพนธ์ วิธีการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนประเมินการทดลอง รวมถึงตรวจและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร์ ปิยะโชคนาคกุล กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก และศาสตราจารย์ ดร.สายัณห์ ทัดศรี กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง ที่ให้คำปรึกษาแนะนำในการศึกษาวิจัย ตลอดจนตรวจทานแก้ไข และเรียบเรียงวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุริยา ดันดีวิวัฒน์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ข้อเสนอแนะและช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณจันทกานต์ อรณันท์, คุณสุพรรณฎิภา เสี่ยงสาย, คุณอาภากร สกุลสถาพร, คุณมานิตย์ มีสกุล และ คุณธีรพร จิรธรรมคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจอย่างดีในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชอาหารสัตว์ชัยนาท ที่ให้ความอนุเคราะห์และช่วยเหลือสำหรับงานวิจัยในแปลงทดลองจนประสบความสำเร็จ

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณลุง กมล อุทุมพฤกษ์พร ที่ให้การสนับสนุนในทุกๆด้าน และกราบขอบพระคุณ คุณยาย คุณป้า คุณพ่อ และทุกคนในครอบครัวที่ให้กำลังใจอย่างดีเสมอมา

ศิรณา อุทุมพฤกษ์พร

มีนาคม 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	21
ผลและวิจารณ์	24
สรุปผลการทดลอง	63
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	65
ภาคผนวก	75

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนยอดทั้งหมด และจำนวนยอดเฉลี่ยต่อข้อ จากการนำข้อของหญ้าแพง โกล่ามาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ในระดับความเข้มข้นที่ ต่างๆกัน	24
2	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นหญ้าแพงโกล่าหลังจากได้รับการฉายรังสี แกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เกรย์ แล้ว เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอดหลายยอด เป็นเวลา 4 สัปดาห์	27
3	รายละเอียดของตัวอย่างหญ้าแพงโกล่าทั้งหมด 20 ตัวอย่าง	32
4	ค่าเฉลี่ยจำนวนต้น และน้ำหนักสดภายในกรอบสี่เหลี่ยมขนาด 25x25 เซนติเมตร ความสูงของลำต้น ขนาดของใบของต้นหญ้าแพงโกล่าที่พัฒนาจากข้อที่ผ่าน การฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ หลังจากนำออกปลูกที่ศูนย์วิจัยและพัฒนา พืชอาหารสัตว์ชัยนาท เป็นเวลา 30 วัน	38
5	ค่าเฉลี่ยของความสูง จำนวนต้น และน้ำหนักสดภายในกรอบสี่เหลี่ยมขนาด 25x25 เซนติเมตร ขนาดของใบของหญ้าแพงโกล่าที่เจริญจากยอดที่ไม่ผ่านและผ่าน การฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ ที่ปลูกในสภาพธรรมชาติเป็นเวลา 30 วัน	43
6	รายละเอียดตัวอย่างหญ้าแพงโกล่า 11 ตัวอย่างที่คัดเลือกเพื่อนำไปทำการ ทดสอบต่อ	44
7	ค่าเฉลี่ยของความสูง จำนวนต้น และน้ำหนักสดภายในกรอบสี่เหลี่ยมขนาด 25x25 เซนติเมตร ขนาดของใบของหญ้าแพงโกล่าที่คัดเลือกไว้ 10 ตัวอย่าง ที่ปลูก ในสภาพธรรมชาติเป็น เวลา 30 วัน	45
8	คู่มือไพรเมอร์ต่างๆที่ใช้ในการตรวจสอบ AFLP	46
9	แสดงการจำแนกตัวอย่างของคู่มือไพรเมอร์ทั้งหมด 11 คู่มือ	60

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ BAP ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน ที่มีผลต่อการให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อข้อ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์	76
2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสูง จำนวนต้นและน้ำหนักสดในกรอบส้อม ขนาด 25x25 เซนติเมตร ขนาดของใบของต้นหญ้าแพงโกล่าที่เจริญจากยอดที่ไม่ผ่านและผ่านการฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่างๆ ในสภาพธรรมชาติเป็นเวลา 30 วัน	76
3 การวิเคราะห์ผลของรังสีแกมมาที่มีต่อความแปรปรวนของความสูง จำนวนต้นและน้ำหนักสดภายในกรอบส้อมขนาด 25x25 เซนติเมตร ขนาดของใบของต้นหญ้าแพงโกล่าที่เจริญจากยอดที่ไม่ผ่านและผ่านการฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่างๆในสภาพธรรมชาติ เป็นเวลา 30 วัน	77
4 วิเคราะห์ความแปรปรวนของความสูง จำนวนต้นและน้ำหนักสดในกรอบส้อมขนาด 25x25 เซนติเมตร ขนาดของใบของต้นหญ้าแพงโกล่าที่คัดเลือกไว้ 10 ตัวอย่าง ในสภาพธรรมชาติ เป็นเวลา 30 วัน	78
5 ปริมาตรสารสำหรับการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด	82
6 สารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter	83
7 สารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้น preselective amplification	84
8 สารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้น selective amplification	86
9 ปริมาณสารที่ใช้สำหรับเตรียมเจลเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ สำหรับขนาดกระจุก 15x17 เซนติเมตร ปริมาตรรวม 30 มิลลิลิตร	87

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แสดงลักษณะต้นหญ้าแพงโกล่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม BAP (A) และที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (B) 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (C) 6 มิลลิกรัมต่อลิตร (D) 8 มิลลิกรัมต่อลิตร (E) 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (F) เป็นเวลา 4 สัปดาห์	26
2 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของยอดที่ได้รับการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ	28
3 แสดงลักษณะรากของหญ้าแพงโกล่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (A) MS ที่ใส่ถ่าน (B) และ MS ที่เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (C) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	29
4 แสดงลักษณะของต้นหญ้าแพงโกล่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (A) MS ที่ใส่ถ่าน (B) และ MS ที่เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (C) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	29
5 ภาพหญ้าแพงโกล่าที่ปลูกที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชอาหารสัตว์ชัยนาท	31
6 ลักษณะต้นหญ้าแพงโกล่าที่ผ่านการฉายรังสีแล้วมีลักษณะที่แตกต่างจากหญ้าแพงโกล่าปลูกตัวอย่างชัดเจน A. control B. ตัวอย่างที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในปริมาณ 80 เกรย์ (ตัวอย่างที่ 15-D703/01)	33
7 ลักษณะต้นหญ้าแพงโกล่าที่ผ่านการฉายรังสีแล้วมีลักษณะที่แตกต่างจากหญ้าแพงโกล่าปลูกตัวอย่างชัดเจน A. control B. ตัวอย่างที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในปริมาณ 100 เกรย์ (ตัวอย่างที่ 19-E701/02)	33
8 ลักษณะต้นหญ้าแพงโกล่าที่ผ่านการฉายรังสีแล้วมีลักษณะที่แตกต่างจากหญ้าแพงโกล่าปลูกตัวอย่างชัดเจน A. control B. ตัวอย่างที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในปริมาณ 100 เกรย์ (ตัวอย่างที่ 20-E702/04)	34
9 เปรียบเทียบลักษณะใบและไหลของหญ้าแพงโกล่าตัวอย่างที่ 1 กับตัวอย่างที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในปริมาณ 80 เกรย์ (ตัวอย่างที่ 15-D703/01) A. ลักษณะใบ B. ลักษณะไหล	35

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
10 เปรียบเทียบลักษณะใบและไหลของหญ้าแพงโกล่าตัวอย่างที่ 1 กับตัวอย่างที่ผ่าน การฉายรังสีแกมมาในปริมาณ 100 เกรย์ (ตัวอย่างที่ 19-E701/02) A. ลักษณะใบ B. ลักษณะไหล	36
11 เปรียบเทียบลักษณะใบและไหลของหญ้าแพงโกล่าตัวอย่างที่ 1 กับตัวอย่างที่ผ่าน การฉายรังสีแกมมาในปริมาณ 100 เกรย์ (ตัวอย่างที่ 20-E702/04) A. ลักษณะใบ B. ลักษณะไหล	37
12 แสดงลักษณะการวัดความสูงของต้นหญ้าแพงโกล่า	41
13 แสดงลักษณะการวัดความกว้าง (A) ความยาวใบ (B)	41
14 แสดงลักษณะการใช้กรอบสี่เหลี่ยม (quadrat) ขนาด 25x25 เซนติเมตร	42
15 ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของหญ้าที่ได้จากคู่ไพรมอร์ E-AAC กับ M-CAA	47
16 ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของหญ้าที่ได้จากคู่ไพรมอร์ E-AAC กับ M-CAT	48
17 ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของหญ้าที่ได้จากคู่ไพรมอร์ E-AAC กับ M-CAC	49
18 ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของหญ้าที่ได้จากคู่ไพรมอร์ E-AAC กับ M-CTC	50
19 ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของหญ้าที่ได้จากคู่ไพรมอร์ E-ACA กับ M-CTA	51
20 ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของหญ้าที่ได้จากคู่ไพรมอร์ E-ACA กับ M-CTT	52
21 ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของหญ้าที่ได้จากคู่ไพรมอร์ E-ACC กับ M-CTG	53
22 ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของหญ้าที่ได้จากคู่ไพรมอร์ E-AGC กับ M-CAC	54
23 ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของหญ้าที่ได้จากคู่ไพรมอร์ E-AGG กับ M-CAG	55
24 ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของหญ้าที่ได้จากคู่ไพรมอร์ E-AGG กับ M-CTA	56
25 ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของหญ้าที่ได้จากคู่ไพรมอร์ E-AGG กับ M-CTT	57

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
AFLP	amplified fragment length polymorphism
BAP	6-benzylaminopurine
PCR	polymerase chain reaction
RFLP	restriction fragment length polymorphism

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าแพงโกล่าโดยรังสีแกมมาร่วมกับ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Induced Mutation in Pangola Grass (*Digitaria eriantha* cv. 258A) by Gamma Irradiation Through Tissue Culture

คำนำ

พืชอาหารสัตว์ เป็นอาหารหลักที่สำคัญสำหรับสัตว์กระเพาะรวม (ruminant) เช่น โคเนื้อ โคนม และกระบือ จากข้อมูลในปี พ.ศ. 2545 กรมปศุสัตว์ได้สำรวจการปลูกพืชอาหารสัตว์ในประเทศไทยพบว่าพื้นที่ทั้งหมด 1,195,564 ไร่ ซึ่งมีปริมาณเพิ่มขึ้นมากกว่า 374,564 ไร่ เมื่อเทียบกับปริมาณพื้นที่การปลูกในปี พ.ศ. 2538 ที่มีพื้นที่รวม 821,000 ไร่ (จันทกานต์, 2544) เนื่องจากปัจจุบันประเทศไทยมีความต้องการผลผลิตจากโคเนื้อ และ โคนมเพิ่มขึ้น ดังนั้นการศึกษาพัฒนาปรับปรุงพันธุ์พืชอาหารสัตว์ที่ดีมีคุณภาพ และปริมาณการผลิตสูงจึงมีบทบาทสำคัญมากยิ่งขึ้น และหญ้าแพงโกล่าเป็นพืชอาหารสัตว์ชนิดหนึ่งที่น่าสนใจมากในปัจจุบัน เนื่องจากความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีในดินหลายชนิด ตั้งแต่ดินทรายจนถึงดินเหนียว ดินเลว หรือดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ รวมถึงในบริเวณพื้นที่ชื้นแฉะและน้ำท่วมขังก็สามารถเจริญเติบโตได้ดี นอกจากนี้หญ้าแพงโกล่ายังมีคุณสมบัติทนแล้งและทนต่อสภาพอากาศร้อนได้ดีมาก ซึ่งเหมาะสมกับสภาพภูมิอากาศในประเทศไทยเป็นอย่างยิ่ง

ในอดีตไม่ปรากฏหลักฐานว่ามีการปรับปรุงพันธุ์หญ้าแพงโกล่าในประเทศไทยมาก่อน จึงทำให้ข้อมูลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์หญ้าชนิดนี้มีไม่เพียงพอ เนื่องจากหญ้าแพงโกล่ามีจำนวนโครโมโซมเป็นทวีคูณซึ่งยากต่อการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการผสมพันธุ์แบบธรรมดา นอกจากนี้หญ้าแพงโกล่ายังจัดเป็นพืชวันยาว จะออกดอกเมื่อได้รับแสง 14 ชั่วโมงต่อวันโดยประมาณ ส่งผลให้หญ้าแพงโกล่าในประเทศไทยไม่สามารถออกดอกได้ตามต้องการ ดังนั้นการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้รังสีเพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์จึงเป็นวิธีที่น่าสนใจ และเหมาะสม เนื่องจากใช้ระยะเวลาสั้น และได้จำนวนต้นในปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว ในการทดลองครั้งนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าแพงโกล่าพันธุ์ 258A ที่นำเข้ามาโดยบริษัท ซี.พี. โดยชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยรังสีแกมมาเพื่อให้ได้หญ้าแพงโกล่าสาย

พันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะพึงประสงค์ เช่น มีขนาดใบใหญ่ขึ้นจากสายพันธุ์เดิม สามารถให้ผลผลิตต่อปีเพิ่มขึ้น เป็นต้น

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำข้อให้เกิดยอดหลายยอด (multiple shoot) เพื่อให้ได้ยอดจำนวนมาก
2. ศึกษาผลของรังสีแกมมา 6 ระดับ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เกรย์ (gray) เพื่อหาค่า LD50
3. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำยอดให้เกิดรากเพื่อนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติให้มีจำนวนต้นที่รอดตายได้มากขึ้น
4. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กล้วยที่มีลักษณะดีเด่นต่างๆ เช่น มีขนาดใบใหญ่ขึ้น สามารถให้ผลผลิตต่อปีสูงขึ้น เป็นต้น

การตรวจเอกสาร

1. หญ้าแพงโกล่า (*Digitaria eriantha*) ชื่อเดิม *D. decumbens*

หญ้าแพงโกล่าจัดอยู่ในวงศ์ Gramineae สกุล *Digitaria* ซึ่งหญ้าในสกุล *Digitaria* นี้มีประมาณ 80 ชนิด ขึ้นกระจายอยู่ทั่วประเทศ อาจจะมีอายุเพียงฤดูกาลเดียวในเขตอบอุ่น ลักษณะเด่นของหญ้านี้คือ มีช่อดอกแบบ panicle ที่มีกิ่งแขนงของช่อดอกแบบ spike-like raceme และมีกลุ่มของดอก (spikelet) เรียงตัวแบบหลวมหรือเกาะกันแน่น หญ้าในสกุล *Digitaria* ที่นิยมปลูกเพื่อใช้เลี้ยงสัตว์และนำมาทดสอบในประเทศไทยได้แก่ *Digitaria eriantha* มีอยู่ 2-3 สายพันธุ์ และที่ปลูกเป็นการค้าเพื่อทำหญ้าแห้งได้แก่ พันธุ์ 258A ซึ่งบริษัท ซี.พี. เป็นผู้นำเข้ามาจากไต้หวัน ปัจจุบันเรียกว่า พันธุ์ ซีพี-1 (สายพันธุ์, 2546)

1. ลักษณะทางสัณฐาน หญ้าแพงโกล่าจัดเป็นหญ้าประเภท stoloniferous มีลำต้นทอดนอนไปตามพื้นดิน มีรากเจริญออกมาจากข้อ และส่วนของหน่ออ่อนเจริญไปด้านบน ซึ่งอาจจะตั้งตรงหรือกึ่งตั้ง มีใบมากและเมื่อมีช่อดอกอาจจะสูงถึง 70-120 เซนติเมตร ลำต้นไม่มีขน มีข้อจำนวนมาก ช่อดอกแบบ digitate panicle ซึ่งมีการออกดอกเฉพาะบางสายพันธุ์เท่านั้น

2. แหล่งที่ปลูก มีเฉพาะในสถานีวิจัยของรัฐ ยกเว้นสายพันธุ์บางสายพันธุ์ที่บริษัท ซี.พี. ได้นำมาจากไต้หวัน และปลูกเพื่อทำหญ้าแห้ง โดยมีพื้นที่ปลูกประมาณ 2,000 ไร่

3. การปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม เหมาะกับบริเวณที่มีฝนตกเฉลี่ย 1,000 มิลลิเมตร ขึ้นได้ดีในดินหลายชนิดตั้งแต่ดินทรายจนถึงดินเหนียว ในบริเวณที่ชื้นแฉะและน้ำท่วมเป็นครั้งคราวก็สามารถเจริญเติบโตได้ แม้ว่าอาจจะไม่ดีเท่าใดนัก ขึ้นได้ในดินเลว หรือมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำตอบสนองต่อปุ๋ยในโตรเจนได้ดี อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 19-24 องศาเซลเซียส แต่ในประเทศไทยอุณหภูมิสูงระหว่าง 25-35 องศาเซลเซียสก็ขึ้นได้ดีมาก ทนแล้งได้ดีมาก และเจริญเติบโตได้ดีในช่วงฤดูร้อน ถ้ามีการให้น้ำเต็มที่ จัดเป็นพืชวันยาว ออกดอกเมื่อได้รับแสง 14 ชั่วโมง

4. ผลผลิตและคุณค่าทางอาหาร รายงานของบริษัท ซี.พี. ซึ่งปลูกที่กำแพงเพชรให้ผลผลิตระหว่าง 600-800 กิโลกรัมต่อไร่ จากการตัดทุกๆ 45-55 วัน มีระดับโปรตีน 8.5-11.2% โดยใช้ปุ๋ย

เรีย 45 กิโลกรัมต่อไร่ต่อการตัดหนึ่งครั้ง (สายันห์ และคณะ, 2539ก) จากการศึกษาของไพโรจน์ (2507) ในบริเวณแปลงทดลองของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ตลอดระยะเวลาหนึ่งปี พบว่าให้ผลผลิตน้ำหนักแห้งได้ 3,236 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี และในสภาพที่มีการใช้ปุ๋ยไนโตรเจน 70 กิโลกรัมต่อไร่ ให้ผลผลิตน้ำหนักแห้ง 4,060 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี เนื่องจากหญ้าแพงโกล่ามีลักษณะการเจริญเติบโตแบบเลื้อย ดังนั้นการปล่อยให้หญ้ามียู่มากกว่า 60 วัน จะทำให้เกิดใบตายเพิ่มขึ้น ทำให้คุณภาพของหญ้าลดต่ำลงได้ (สายันห์ และคณะ, 2539ก) นอกจากนี้ระดับความสูงของการตัดมีผลกระทบต่อผลผลิตของหญ้าแพงโกล่าอย่างเด่นชัด แต่มีผลต่อระดับโปรตีนเพียงเล็กน้อย ความสูงที่ควรตัดอยู่ที่ระดับ 5 เซนติเมตรเหนือพื้นดิน (สายันห์และคณะ, 2539ข)

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) มีความสำคัญอย่างยิ่งในการปรับปรุงพันธุ์ วิธีการสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการคัดเลือกสายพันธุ์บนอาหารทดสอบจัดเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถสร้างพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะตามต้องการได้ สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชวงศ์หญ้าในสภาพปลอดเชื้อ เริ่มมีการศึกษามาประมาณ 60 ปีแล้ว โดยประสบความสำเร็จเมื่อปี 1960 (รังสฤษฎ์, 2541)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ การนำเอาส่วนหนึ่งส่วนใดของพืชไม่ว่าจะเป็นอวัยวะ เนื้อเยื่อ เซลล์ หรือเซลล์ไร้ผนังมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์และควบคุมสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ แสง และความชื้น ชิ้นส่วนของพืชเหล่านี้มีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้หลายรูปแบบ เช่น สามารถพัฒนาเป็นแคลลัส (callus formation) แล้วพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ หรือชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงพัฒนาเป็นอวัยวะ (organogenesis) จากนั้นจึงพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ หรือมีการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอก่อน (embryogenesis) แล้วพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมื่อตัดแบ่งเป็นชิ้นๆแล้วทำการเปลี่ยนอาหาร เนื้อเยื่อดังกล่าวยังคงมีความสามารถในการเพิ่มปริมาณได้ อย่างไม่มีที่สิ้นสุด สุดท้ายจะได้ต้นที่มีลักษณะเหมือนกันทุกประการเป็นจำนวนมาก (อรดี, 2539) สำหรับความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการที่มีบทบาทควบคุมการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ

โดยปกติแล้วเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะต่างๆของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นได้ผ่านกระบวนการเปลี่ยนสภาพเป็นโครงสร้างที่สมบูรณ์ และ ทำหน้าที่เฉพาะอย่างตามที่ถูกกำหนดมาแล้ว การจะชักนำขึ้นส่วนเหล่านี้ให้มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานและมีพัฒนาการจนเกิดเป็นพืชต้นใหม่ได้จะต้องผ่านขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงสภาพเพื่อปรับเปลี่ยนสภาวะของเซลล์ 2 ขั้นตอนคือ

1. Dedifferentiation เพื่อเปลี่ยนสถานะของเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะต่างๆให้มาอยู่ในสภาพที่เป็นเซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนสภาพ แต่มีการเติบโตและเพิ่มจำนวนโดยการแบ่งเซลล์แบบ proliferative division ที่อาจอยู่ในรูปของกลุ่มเซลล์หรือแคลลัส(callus) หรืออยู่ในรูปของเซลล์เดี่ยวหรือเซลล์แขวนลอย ซึ่งจะเป็นเซลล์ที่ยังไม่ถูกกำหนดให้มีการเปลี่ยนสภาพ (undetermined cell)
2. Redifferentiation เพื่อเปลี่ยนสถานะของกลุ่มเซลล์หรือแคลลัสให้กลับมีการกำหนดการเปลี่ยนแปลงสภาพ (determined cell) เพื่อพร้อมเข้าสู่กระบวนการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ซึ่งอาจเกิดได้ 2 ทาง คือ 1. Embryogenesis หมายถึง การกำเนิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายที่เรียกว่า somatic embryo และ 2. Organogenesis หมายถึง การกำเนิดเป็นอวัยวะของส่วนต้น (shoot) หรือราก (root)

การเพาะเลี้ยงแคลลัส

แคลลัส หมายถึงเซลล์ที่อยู่รวมกันและยังไม่มีการพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่างๆ ประกอบด้วยเซลล์พาราเมโซไคมา มีขนาดไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีแวคิวโอลจำนวนมาก ส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุแต่บางส่วนอาจมีสีเขียวของคลอโรพลาสต์ สีเหลืองของแคโรทีนอยด์และฟลาโวนอยด์ หรือมีสีม่วงจากแอนโทไซยานิน ปริมาณและชนิดของรงควัตถุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหารและปัจจัยสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง เช่น แสง ลักษณะของแคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันหนาแน่น (compact callus) สีเหลืองอ่อนหรือขาวจะพัฒนาเป็นเอ็มบริโอได้ เรียกว่า embryogenic callus ส่วนแคลลัสที่มีการเจริญเติบโตช้าในระยะแรก ในบางครั้งอาจพบว่ามีลักษณะอ่อนนุ่ม (non-embryogenic callus) เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วก่อนแล้วจึงพัฒนาไปเป็น embryogenic callus เรียกแคลลัสแบบนี้ว่า แคลลัส type II ส่วนแคลลัสที่เกาะกันอย่างหลวมๆเรียกว่า friable callus (Vasil, 1987)

การเจริญของแคลลัสจากส่วนต่างๆของพืชสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ระยะ คือ

1. การชักนำ (induction)
2. การแบ่งเซลล์ (cell division)
3. การเปลี่ยนแปลง (differentiation)

ในระยะแรกของการชักนำให้เกิดแคลลัสจะมีการกระตุ้นให้เกิดกิจกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ซึ่งจะเกิดขึ้นนานเท่าใดนั้นขึ้นอยู่กับสภาพทางสรีรวิทยาของเซลล์พืชและสภาพการเพาะเลี้ยง จากนั้นจะเป็นระยะของการแบ่งเซลล์ โดยเซลล์ของพืชจะเปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อเจริญและมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์พืชเกิดขึ้นต่อไป (Dodds and Roberts, 1995) ต้นไม้ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสต้องอาศัยปัจจัยร่วมกันกำหนดรูปแบบของการเกิดต้น เช่น ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับพืช สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงมี 2 แบบ คือ embryogenesis และ organogenesis

1. Embryogenesis เป็นกระบวนการที่เซลล์ร่างกายเปลี่ยนรูปไปเป็นโครงสร้างที่มีส่วนยอดและราก (bipolar structure) ซึ่งมีการเจริญเติบโตระยะต่างๆเหมือนเอ็มบริโอที่เกิดจากการรวมตัวของเซลล์สืบพันธุ์ เรียกว่า somatic embryo หรือ embryoid เนื่องจากเป็นโครงสร้างที่มีทั้งส่วน shoot primordia และ root primordia ที่เจริญมาจากจุดกำเนิดเดียวกัน การเกิด embryoid เกิดได้ 2 ลักษณะ คือ

- direct embryogenesis เกิด embryoid โดยตรงจากเซลล์หรือกลุ่มเซลล์โดยไม่ผ่านการเกิดแคลลัสมาก่อน

- indirect embryogenesis เกิด embryoid จากแคลลัสโดยชักนำส่วนที่ใช้เพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นแคลลัสที่พร้อมจะเจริญเป็น embryoid เรียกว่า embryogenic callus

2. Organogenesis เป็นกระบวนการเกิดอวัยวะจากกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะเหมือนเซลล์แคมเบียม คือ เซลล์ที่มีขนาดเล็กมีแวคิวโอลน้อย ไซโทพลาซึมเข้มข้น มีเม็ดแป้งขนาดใหญ่ มีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว เรียกว่า meristemoid จากจุดกำเนิดนี้จะมีการเจริญเป็นอวัยวะเพียงชนิดเดียว คือ ยอดหรือราก เรียก monopolar structure เกิดขึ้น 2 ลักษณะ คือ

- direct organogenesis อวัยวะเกิดโดยตรง จากเซลล์เนื้อเยื่อหรือตายอดหรือตาข้างที่นำมาเพาะเลี้ยงโดยไม่เกิดจากแคลลัสมาก่อน

- indirect organogenesis อวัยวะเกิดจากแคลลัสบนชิ้นเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง (สุมด, 2546)

ในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์หญ้าเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของพืชวงศ์หญ้าเพื่อให้ได้ลักษณะที่ต้องการทั้งทางด้านผลผลิตและคุณค่าทางอาหาร ซึ่งอาหารสังเคราะห์ที่นิยมใช้เลี้ยง ได้แก่ อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพวกไซโตไคนิน (cytokinin) ออกซิน (auxin) หรือสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นๆ จากรายงานการทดลองมีทั้งการชักนำให้เกิดยอดหลายยอด การชักนำให้เกิดแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์

การชักนำให้เกิดยอดหลายยอดในพืชวงศ์หญ้าที่ผ่านมา พบว่ามีการใช้ชิ้นส่วนของหญ้าที่แตกต่างกัน เช่น ใช้ส่วนปลายยอดของหญ้า *Lolium multiflorum* ชักนำให้เกิดหน่อใหม่โดยนำส่วนปลายยอดไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 1 มก.ต่อลิตร สามารถสร้างหน่อใหม่ในอัตราการขยาย 40 หน่อต่อเดือน (Dalton and Dale, 1981) และ Sairam *et al.*(2002) นำปลายยอดของหญ้า *Tripsacum dactyloides* (L.) ไปเลี้ยงบนอาหารที่มี 6-benzyladenine (BA) 5-10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอด 6-10 ยอดในเวลา 4-6 สัปดาห์ กมลพรรณ และคณะ (2535) ใช้ส่วนข้อของหญ้าแฝกหอม (*Vetiveria zizanioides* Nash) มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 6-benzylaminopurine (BAP) 10 ไมโครโมลต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดหน่อใหม่ 10 หน่อต่อต้นในเวลา 4 สัปดาห์

นอกจากส่วนข้อและปลายยอดแล้วยังมีผู้ที่ใช้เมล็ดในการชักนำให้เกิดยอดหลายยอด โดย ธนภักย์(2545) ใช้เมล็ดของหญ้าอะตราตัม (*Paspalum atratum*) เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ศิริญา (2545) เพาะเลี้ยงเมล็ดของหญ้ารูจี (*Brachiaria ruziziensis* Germain and Everard) บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BAP 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากเฉลี่ย 7.49 ยอด นอกจากนั้น วิภาศิริ(2546) ยังใช้เมล็ดของหญ้าชิกแนลนอน (*Brachiaria decumbens* Stapf) เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 6 มก.ต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุด 71.37 เปอร์เซ็นต์ และสุมล(2546) ทดลองโดยเพาะเลี้ยงเมล็ดของหญ้างินนิสีม่วง (*Panicum maximum* TD 58) บนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ไคเนติน 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และcasein hydrolysate 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยเท่ากับ 5.75 ยอด

นอกจากการชักนำให้เกิดยอดแล้วในพืชวงศ์หญ้ายังมีรายงานการชักนำให้ชิ้นส่วนของหญ้าเกิดเป็นแคลลัส โดยสามารถเพาะเลี้ยงจากชิ้นส่วนของหญ้าที่แตกต่างกันได้หลายส่วน เช่น ใช้ส่วนตาดอกของหญ้า Weeping Love (*Eragrostis curvula*) (Echenque *et al.*,1996) ใช้เมล็ดของ

หญ้า switchgrass (*Panicum virgatum*) (Denchev and Conger, 1994) หญ้า buffle (*Cenchrus ciliaris*) (Ross *et al.*, 1995) หญ้าซิกแนลนอน (*Brachiaria decumbens* Stapf) (วิภาสศิริ, 2546) และหญ้านีนีสีม่วง (*Panicum maximum* TD58) (สุมล, 2546) นอกจากนี้ยังมีผู้ใช้ส่วนใบมาชักนำให้เกิดแคลลัส เช่น ใช้ฐานใบของหญ้าบาเฮียร์ (*Paspalum notatum* Fluegge L.) (Shatters *et al.*, 1994) ใช้ใบอ่อนในหญ้านเปียร์ (*Pennisetum purpureum* Schum) (Wan and Vasil, 1996) หญ้า *Paspalum scrobiculatum* (Vikrant and Rashid, A., 2003) และหญ้านีนีสีม่วง (สุมล, 2546) และยังสามารถนำต้นอ่อนมาใช้ในการชักนำแคลลัส เช่น ใช้ต้นอ่อนของหญ้า switchgrass (*Panicum virgatum*) (Denchev and Conger, 1994) และใช้ต้นกล้าในหญ้า blue gamma (Aguado-Santacruz *et al.*, 2001) การใช้ยอดอ่อนของหญ้า *P. maximum* Jacq. cv. Likoni (Lajonchare *et al.*, 1993) และใช้ส่วน mesocotyl ของหญ้า *Bromus inermis* Leyss. (Vikrant and Rashid, 2003)

การนำช่อดอกมาใช้ในการเพาะเลี้ยงและชักนำให้เกิดแคลลัสได้แก่ ใช้ช่อดอกอ่อนของหญ้า *Echinochloa colonum* (L.) Link. (Tyagi *et al.*, 1985) หญ้านเปียร์ (*Pennisetum purpureum* Schum) (Bajaj, 1988) หญ้าเบอร์มิวดา [*Cynodon dactylon* (L.) Pres.] (Ahn *et al.*, 1988) หญ้า *Paspalum intermedium* และ *P. virgatum* (Bobo *et al.*, 1988) หญ้า dallisgrass (*Paspalum diltatum* Poir.) (Akashi and Adachi, 1992) ในหญ้า *Cenchrus ciliaris* cv.75 (Ross *et al.*, 1995) หญ้าแฝกหอม (*Vetiveria zizanioides* Nash) (มโนชัย, 2539) ลูกผสมของหญ้า bermudagrass cv. Tifgreen และ Mukesh (Chaudhury and Rongda, 2000) ลูกผสมของหญ้า bermudagrass cv. Tifton 85 (Jain *et al.*, 2005) เป็นต้น

3. การกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ หมายถึง การเปลี่ยนแปลงลักษณะพันธุกรรม และลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปนี้สามารถจะถ่ายทอดจากชั่วอายุหนึ่งไปยังอีกชั่วอายุหนึ่ง ซึ่งการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม ทั้งที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการเปลี่ยนแปลงทางจำนวนของโครโมโซมเรียกว่า การกลายพันธุ์ระดับโครโมโซม (chromosome mutation) แต่ถ้าเป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของยีนเรียกว่า การกลายพันธุ์ระดับยีน (gene mutation) (ประดิษฐ์, 2546)

การเกิดการกลายพันธุ์ แบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองในธรรมชาติ (spontaneous mutation) ซึ่งเป็นผลมาจาก รังสี สารเคมี อุณหภูมิ ที่มีอยู่ในธรรมชาติ กระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ และการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำ (induced mutation) เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดจากมนุษย์ใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ (mutagen) ชักนำให้เกิดขึ้น (ประดิษฐ์, 2546)

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืช (induced mutation) เป็นวิธีการที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้เร็วขึ้น และสามารถถ่ายทอดไปยังชั่วต่อไปได้ ปกติแล้วการกลายพันธุ์นั้นสามารถเกิดขึ้นเองได้ตามธรรมชาติแต่มีอัตราต่ำ จึงต้องมีการกระตุ้นเพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในอัตราที่สูงและในระยะเวลาที่รวดเร็วขึ้น ซึ่งก่อให้เกิดความแปรปรวนของลักษณะพันธุกรรมที่เป็นประโยชน์ในการคัดเลือกต่อไป การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้มีการใช้อย่างแพร่หลายในประเทศต่างๆทั่วโลก เช่น จีน อินเดีย คิวบา เนเธอร์แลนด์ และญี่ปุ่น เป็นต้น ทำให้ได้พันธุ์พืชใหม่ๆที่มีลักษณะดี เช่น ทนต่อโรคและแมลง ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ทนดินเค็ม ดินเปรี้ยวและทนแล้ง เป็นต้น ปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชมาก โดยเฉพาะการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในส่วนของเนื้อเยื่อนำมาเพาะเลี้ยงหรือในส่วนของแคลลัส ทำให้ได้ลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นจำนวนมาก ซึ่งช่วยให้มีโอกาสในการคัดเลือกลักษณะที่พึงประสงค์ได้มากขึ้น อีกทั้งช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย แรงงาน เวลาและพื้นที่ในการเพาะปลูกด้วย

สิ่งก่อกลายพันธุ์ที่นำมาใช้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี (chemical mutagen) เช่น ethylmethane sulphonate (EMS) diethyl sulphate (DES) เป็นต้น และสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ (physical mutagen) เช่น อุณหภูมิ และรังสีต่างๆ เป็นต้น

การใช้รังสีเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์

รังสี (radiation) หมายถึง พลังงานที่ออกมาในรูปของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic wave) หรือโฟตอน (photon) หรือออกมาในรูปของอนุภาคที่มีขนาดเล็ก (particulate radiation) ซึ่งสามารถแบ่งรังสีตามพลังงานที่มีอยู่ในตัวเองได้เป็น 2 พวก คือ รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) และรังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (non-ionizing radiation) (สิรินุช, 2541)

รังสีแกมมา (gamma) เป็นรังสีคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นสั้นมาก มีอำนาจในการทะลุทะลวงสูง เกิดจากการสลายตัว (decay) ของนิวเคลียสของสารกัมมันตรังสี (radioactive substance) เช่น Cobalt-60 (Co-60), Cesium-137 (Cs-137), Manganese-56 (Mn-56) เป็นต้น (สิรินุช, 2541)

รังสีแกมมา (gamma) ได้รับความนิยมน้อยมากในการใช้เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืช เนื่องจากสามารถฉายรังสีได้ 2 แบบ คือ การฉายรังสีแบบเฉียบพลัน (acute irradiation) เป็นการให้รังสีในปริมาณสูงและให้เสร็จสิ้นในระยะเวลาอันสั้น นิยมใช้ฉายรังสีกับเมล็ด ละอองเรณู และเนื้อเยื่อนำมาเพาะเลี้ยง โอกาสที่เซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ได้รับรังสีจะเกิดการกลายพันธุ์มีสูง และการฉายรังสีแบบเรื้อรัง (chronic irradiation) เป็นการฉายรังสีโดยใช้ระยะเวลานาน และใช้รังสีปริมาณต่ำ เช่น เป็นสัปดาห์หรือเป็นเดือน นิยมใช้ฉายรังสีกับพืชทั้งต้น หน่อ กิ่งตอนและกิ่งชำ เซลล์หรือเนื้อเยื่อจะมีโอกาสได้รับรังสีอย่างทั่วถึง นอกจากนี้เครื่องฉายรังสีแกมมายังมีหลายรูปแบบแบ่งตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน เช่น ไร่รังสีแกมมา เรือนรุกรังสี เครื่องฉายรังสีแกมมาแบบปิด และห้องรังสีแกมมา เป็นต้น (สิรินุช, 2540)

ปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการฉายรังสีทำได้ทั้งพืชที่ผ่านและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีรายงานการทดลองการฉายรังสีในเมล็ดโดย Shivashilanker *et al.* (1988) ใช้เมล็ดของหญ้ากรีนแพนิก (*Panicum maximum* var. *trichoglume*) ฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณต่างๆคือ 40, 50 และ 60 กิโลเรด ผลปรากฏว่าได้หญ้ากรีนแพนิกที่เกิดการกลายพันธุ์หลายลักษณะ เช่น ไม่มีการออกดอก เพิ่มผลผลิตน้ำหนัสด มีจำนวนกอและมีน้ำหนักรากต่อกอเพิ่มขึ้น และจากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของใบ พบว่าพืชที่ไม่ออกดอกมีโปรตีนสูงกว่าพืชที่ออกดอกถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น ต่อมา Hussin *et al.* (2002) ได้ศึกษากระบวนการ mutagenesis ของเมล็ดหญ้าชิกแนลนอน (*Brachiaria decumbens*) โดยนำเมล็ดไปฉายรังสีแกมมาที่ระดับ 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 และ 800 เกรย์ พบว่าหญ้ามีความไวต่อรังสีแกมมาต่ำ ดังนั้นปริมาณรังสีที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดกระบวนการ mutagenesis คือ 700-900 เกรย์

การฉายรังสีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถทำได้โดยนำพืชมาเพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นแคลลัสหรือยอดจำนวนมากหรือเซลล์แขวนลอย บางครั้งอาจนำพืชมาฉายรังสีก่อนนำมาเพาะเลี้ยง เมื่อทำการฉายรังสีแล้วจึงนำพืชมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารคัดเลือกที่ใส่สารช่วยในการคัดเลือกพืชที่ต้องการไว้ เช่น กรด กลีโค ค้าง เป็นต้น หลังจากนั้นนำพืชที่คัดเลือกได้จากอาหารคัดเลือกออกปลูก

ทดสอบและประเมินผลการทดสอบและคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ เช่น วราพร (2543) ทำการทดลองเพื่อทดสอบความสามารถในการทนเค็มของแคลส โดยนำแคลสของหญ้าแฝกที่ได้รับการฉายรังสีปริมาณ 0, 50, 100 และ 200 เกรย์ ไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 5 ไมโครโมลาร์ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4 % นาน 8 สัปดาห์พบว่าหญ้าแฝกที่ได้จากแหล่งพันธุ์กรรมกำแพงเพชร 1 ที่ได้รับรังสี 50 เกรย์สามารถทนเค็มได้สูงถึง 4 % นอกจากนี้ จันทกานต์ (2544) ยังสามารถคัดเลือkdต้นหญ้าเนเปียร์แคะทนเค็มจากแคลสที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 0-5 กิโลเรด แล้วย้ายมาเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับต่างๆตั้งแต่ 0-2% ได้ต้นหญ้าเนเปียร์แคะมีลักษณะทนเค็มที่ระดับ 0.5% 25 ต้น และต้นทนเค็มที่ระดับ 1% 6 ต้น นอกเหนือจากการนำแคลสไปฉายรังสีแล้วยังสามารถนำยอดของหญ้าที่เกิดจากการชักนำในการเพาะเลี้ยงไปฉายรังสีแกมมาได้ เช่น สุมล (2546) ทดลองโดยการชักนำเมล็ดของหญ้างินนิสีม่วงให้เกิดยอดหลายยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% kinetin 5 มก.ต่อลิตร และ casein hydrolysate 100 มก.ต่อลิตร จากนั้นนำยอดที่ได้ไปฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณ 0, 10, 20 และ 30 เกรย์ แล้วย้ายลงอาหารคัดเลือกที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% หลังจากนำหญ้างอกปลูกในสภาพธรรมชาติพบว่าต้นหญ้างินนิสีม่วงมีการรอดชีวิตเท่ากับ 26.92% และพบต้นหญ้างินนิสีม่วงที่คาดว่าจะเป็ต้นที่มีลักษณะทนเค็มที่ระดับความเข้มข้นเกลือ 2.0% จำนวน 4 โคลน

รังสีทำอันตรายต่อเซลล์ได้อย่างไร

รังสีทำให้อะตอมต่างๆภายในเซลล์เกิดการแตกตัวเป็นไอออน โดยเฉพาะเกิด chemical radicals ที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาและก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีขึ้นภายในเซลล์ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าว อาจทำให้เกิดความเสียหายต่อการทำหน้าที่ต่างๆของเซลล์ สามารถฆ่าเซลล์ได้ หรือขัดขวางการแบ่งเซลล์

เซลล์พืชที่เป็นเป้าหมายของรังสีและเกิดการเปลี่ยนแปลงของข้อมูลทางพันธุกรรมได้ คือ เซลล์เนื้อเยื่อเจริญ (meristematic cells) ที่อยู่ในส่วนต่างๆของพืช ภายในเซลล์จะมีชีวโมเลกุลที่สำคัญ คือ ดีเอ็นเอ ซึ่งผลจากการได้รับรังสีทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอเกิดการเปลี่ยนแปลงที่สามารถตรวจสอบได้ ได้แก่ เกิดการสลายตัวของพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ที่เชื่อมระหว่างคู่เบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ เกิดการตัดขาดพันธะที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลกับฟอสเฟต (phosphodiester bond) ทำให้เกิด single strand break และ double strand break เกิดการแตกหักที่พันธะโควาเลนต์

(covalent bond) อื่นๆของดีเอ็นเอ เกิดการเชื่อมกันระหว่างสายและภายในสายของดีเอ็นเอ (cross-linkage) เกิด dimer ระหว่าง pyrimidine base ภายในสายของดีเอ็นเอสายใดสายหนึ่ง และเกิดการเชื่อมกันระหว่างดีเอ็นเอและโปรตีน (DNA-protein crosslink) ซึ่งเป็นการเชื่อมต่อระหว่างเบสและกรดอะมิโนด้วย sulfide linkage (SH) (สิรินุช, 2541)

เมื่อเซลล์ได้รับรังสีแล้ว จะส่งผลกระทบต่อโครงสร้างและหน้าที่ของเซลล์ เช่น อาจมีผลต่อเยื่อหุ้มต่างๆภายในเซลล์ กระบวนการเมแทบอลิซึม กระบวนการสังเคราะห์ภายในเซลล์ ซึ่งส่งผลกระทบต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ด้วย การเปลี่ยนแปลงจะเกิดมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณรังสีที่ได้รับ อัตรารังสี และชนิดของเซลล์ เป็นต้น ในส่วนของการแบ่งเซลล์อาจเกิดปรากฏการณ์อย่างใดอย่างหนึ่ง หรือหลายอย่างพร้อมกันได้ดังนี้

1. เซลล์ตายทันทีในขณะที่ได้รับรังสี
2. เซลล์ที่ได้รับรังสีอาจมีการแบ่งเซลล์ได้ 2-3 ครั้ง หรือไม่มีการแบ่งเซลล์เลยแต่มีชีวิตอยู่ได้ระยะหนึ่งหลังจากได้รับรังสีแล้วตาย
3. เซลล์มีชีวิตอยู่ต่อไปได้แต่ไม่มีการแบ่งเซลล์ต่อไปได้อีก
4. เซลล์มีชีวิตอยู่และสามารถแบ่งเซลล์ต่อไปได้ แต่การแบ่งเซลล์ในระยะแรกๆหลังจากได้รับรังสีแล้วจะล่าช้าไปบ้าง (อรุณี, 2541)

4. เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

ในปัจจุบันสามารถแบ่งเครื่องหมายทางโมเลกุลได้ 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีนเป็นการตรวจสอบโมเลกุลของโปรตีนชนิดต่างๆ และระดับดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นการตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2545)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์ เป็นดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งบนโครโมโซม (nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ (mitochondrial DNA หรือ chloroplast DNA) ความแตกต่างที่เกิดขึ้นเนื่องจากความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอหรือเกิดโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2545) โดยทั่วไปเครื่องหมายดีเอ็นเอจะมีแบบแผนของการถ่ายทอดตามกฎเมนเดล และมีการพัฒนา

เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่างๆ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาทางพันธุศาสตร์ รวมถึงการนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น เครื่องหมาย Restriction Fragment Length Polymorphism หรือ RFLP marker, Random Amplified Polymorphic DNA หรือ RAPD marker (Williams *et al.*, 1990), Amplified Fragment Length Polymorphism หรือ AFLP marker (Vos *et al.*, 1995) และ Sequence Tag Site หรือ STS marker เป็นต้น

Karp and Edward, 1997 แบ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

1. Hybridization based marker ได้แก่ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) เป็นการไฮบริไดเซชันระหว่างตัวตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่ถูกตรึงอยู่บนแผ่นเมมเบรนโดยการทำให้ Southern blotting

2. Multilocus PCR based marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ (PCR : Polymerase Chain Reaction) ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่เป็น arbitrary หรือ semi-arbitrary โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ไม่จำเป็นต้องรู้ลำดับเบสภายในจีโนมก่อน แบ่งเป็นสองกลุ่มตามประเภทของไพรเมอร์ที่ใช้คือ

- 2.1 ไพรเมอร์ที่เป็น single arbitrary โดยไพรเมอร์ชนิดนี้สามารถเริ่มต้นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอได้แม้ว่าจะจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้ไม่สมบูรณ์ marker ในกลุ่มนี้ได้แก่ RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), MAAP (Multiple Arbitrary Amplicon Profiling), AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR)

- 2.2 ไพรเมอร์ที่เป็น semi-arbitrary เป็นไพรเมอร์ที่ได้จากตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะหรือลำดับเบสที่กระจายทั่วไปในจีโนม เช่น ไมโครแซทเทลไลต์ และทรานส์โพซอน เครื่องหมายดีเอ็นเอในกลุ่มนี้ได้แก่ AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) และ MP-PCR (Microsatellite-Primed PCR)

3. Singlelocus PCR based marker เป็นเครื่องหมายที่ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียว ได้แก่ Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ microsatellite marker

เครื่องหมายดีเอ็นเอ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวาง เช่น การศึกษาแผนที่ของยีน ในระยะ 20 ปีที่ผ่านมาแผนที่ทางพันธุศาสตร์ (genetic map) จะประกอบด้วยเครื่องหมาย (marker) ที่เป็นเครื่องหมายทางสัณฐาน (morphological marker) และไอโซไซม์ (isozyme) ซึ่งแผนที่เหล่านี้จะมีจำนวนเพียง 2-3 ตำแหน่งต่อโครโมโซมเท่านั้น แต่ในปัจจุบันด้วยความก้าวหน้า

ทางด้านเทคโนโลยีของเครื่องหมายดีเอ็นเอ และชนิดของเครื่องหมายที่มีมากมาย ทำให้แผนที่ทางพันธุศาสตร์ทุกวันนี้มีจำนวนเครื่องหมายหลายร้อยตำแหน่ง นอกจากนี้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ยังช่วยในการคัดเลือกที่เรียกว่า marker assisted selection โดยอาศัยข้อมูลของยีนที่ให้ลักษณะที่สนใจ ซึ่งเชื่อมโยงกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ นอกจากประโยชน์ในการทำแผนที่ยีนและใช้ในการคัดเลือกแล้วเครื่องหมายดีเอ็นเอยังเป็นตัวบ่งชี้ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต ทั้งในระดับสปีชีส์ และในระดับประชากร โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอให้ข้อมูลที่ช่วยในการระบุลักษณะเฉพาะของแต่ละสปีชีส์ การจัดกลุ่มตามลำดับของความคล้ายคลึงกัน เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยบอกความแตกต่างและความคล้ายคลึงกันได้ว่าความหลากหลายที่ปรากฏมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการอย่างไร ตลอดจนบอกถึงการกระจายของประชากร ความหลากหลายทางพันธุกรรม gene flow และการอพยพระหว่างประชากร ส่วนการศึกษาภายในประชากร เครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถบอกที่มาของความหลากหลายทางพันธุกรรมที่กระจายภายในประชากร (Karp and Edward, 1997)

5. การตรวจสอบพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี

เทคนิค Amplified fragment length polymorphism (AFLP) เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (Restriction fragment length polymorphism) ร่วมกับเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR (polymerase chain reaction) โดย Zabeau และ Vos นักวิจัยประเทศเนเธอร์แลนด์ ในปี ค.ศ. 1993 ซึ่งเทคนิคเอเอฟแอลพีนี้ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส (*EcoRI*) ร่วมกับเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส (*MseI*) ทำให้ได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เหมาะสมแล้วเชื่อมต่อกับ adapter เพื่อเป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR 2 ครั้ง โดยครั้งแรกใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสเพียง 1-2 เบส และครั้งที่ 2 ใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสต่อจากไพรเมอร์แรกอีก 1-2 เบส เพื่อให้การคัดเลือกเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพและถูกต้องยิ่งขึ้น การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ทำให้มีข้อดีหลายประการคือ ชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้มีขนาดพอเหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณได้ดีในการทำ PCR และยังสามารถปรับจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณได้โดยปรับจำนวนเบสเพื่อคัดเลือกที่ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดร่วมกันซึ่งการใช้ไพรเมอร์คู่ผสมทั้ง 2 ชนิดจำนวนน้อยก็สามารถทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้จำนวนมาก เช่นมีไพรเมอร์ชนิดละ 5 แบบ จากการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกสามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ถึง 25 แบบ เป็นต้น นอกจากนี้การใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดทำให้สามารถเลือกติดตามที่ไพรเมอร์ชนิดใดชนิดหนึ่งและเมื่อนำไปแยกขนาดโดย denaturing polyacrylamide gel จะตรวจพบแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว ทำให้วิเคราะห์ผลง่าย ดังนั้นเทคนิคเอเอฟแอลพี จึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการ

ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ มีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม (random fingerprint) ซึ่งใช้กับดีเอ็นเอใดๆก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องรู้ลำดับเบสของดีเอ็นเอนั้น นอกจากนี้ยังไม่ขึ้นกับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม สามารถทำได้รวดเร็วและทำซ้ำได้ผลคงเดิม (reproducible) มีคู่ผสมของไพรเมอร์หลายแบบทำให้เกิดลายพิมพ์ที่แตกต่างกันจำนวนมาก และในการทำปฏิกิริยาครั้งหนึ่งสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกันคือ multiplex ratio สูง มีโพลีเมอร์พีซีเอ็มสูง (Nicola and Valeria, 2002) ซึ่งสามารถปรับให้เกิดลายพิมพ์ที่เหมาะสมโดยปรับจำนวนเบสคัดเลือที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ที่ใช้ AFLP marker มีทั้งแบบที่แสดงลักษณะข่ม (dominance) และแบบที่แสดงลักษณะข่มร่วมกัน (codominance) โดยทั่วไปจะพบ AFLP marker แบบที่เป็นลักษณะข่มมากกว่าคือ ไม่สามารถใช้แยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอแบบโฮโมไซกัสที่ทั้งสองแอลลีลให้แถบดีเอ็นเอและเฮเทอโรไซกัสที่หนึ่งแอลลีลให้แถบดีเอ็นเอและอีกหนึ่งแอลลีลไม่ให้แถบดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้วิเคราะห์ผลยากกว่า marker แบบที่เป็น codominance และบางครั้งอาจมีดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันที่มาจากจีนดีเอ็นเอคนละตำแหน่งซ้อนกันอยู่ในแถบดีเอ็นเอแต่ละแถบเนื่องจากการทำปฏิกิริยาครั้งหนึ่งๆ เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก ซึ่งทำให้การวิเคราะห์ผลผิดพลาดได้ และยังพบว่าเทคนิคเอเอฟแอลพีไม่เหมาะสำหรับใช้เปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่างกันมากๆ เพราะจะมีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (common band) จำนวนน้อย ทำให้การหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการผิดพลาดได้ ขณะเดียวกันเทคนิคเอเอฟแอลพีก็ไม่เหมาะสำหรับสิ่งมีชีวิตที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกันมาก เพราะจะพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวนน้อย ซึ่งจะเห็นได้ว่าเทคนิคเอเอฟแอลพีมีทั้งข้อดีและข้อด้อยเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเออื่นๆ (วิภา, 2544)

5.1 หลักการทำเอเอฟแอลพี

ขั้นแรก คือ การนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดที่มีจำนวนเบสของตำแหน่งจดจำต่างกัน เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ได้มีหลายชนิด เช่น *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *BglII*, *XbaI* (6-cutter) และ *Sse 8387I* (8-cutter) ร่วมกับ *MseI* หรือ *TaqI* ซึ่งเป็น 4-cutter เอนไซม์ *MseI* มีตำแหน่งจดจำเป็น 5'-TTAA-3' และ *TaqI* มีตำแหน่งจดจำเป็น 5'-TCGA-3' ปัจจุบันนิยมใช้เอนไซม์ *MseI* มากกว่า เพราะตัดดีเอ็นเอได้ขนาดพอเหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR และการแยกโดยใช้ denaturing polyacrylamide gel ส่วนเอนไซม์ที่ใช้เป็นคู่กันมักใช้เอนไซม์ *EcoRI* เนื่องจากมีราคาถูกและการตัดดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพดีพบการตัดไม่สมบูรณ์ได้น้อย แต่ก็ยังมีงานวิจัยอื่นๆ ที่ใช้เอนไซม์ *PstI* คู่กับ *MseI* ในการศึกษาความหลากหลายของข้าวโพด (Lubberstedt *et al.*, 2000) หรือ Van *et al.* (2001) ใช้เอนไซม์ *Tru9I* ซึ่งเป็น isochizomer กับ

เอนไซม์ *MseI* คู่กับเอนไซม์ *PstI* ในการศึกษาตัวในสกุล *Vicia* ส่วนการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเพียงชนิดเดียวจะทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ปลายทั้ง 2 ด้านมีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำ (inverted repeat) เมื่อถูกทำให้เสียสภาพเป็นสายเดี่ยวจะสามารถกลับมาจับกันเองเกิดโครงสร้างแบบ stem-loop ทำให้ไพรมอร์ไม่สามารถเข้ามาจับได้ หรืออาจทำให้ตรวจพบชิ้นดีเอ็นเอได้จำนวนน้อย เฉพาะชิ้นที่มีขนาดเล็กเท่านั้น เพราะชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเพิ่มปริมาณได้ดีกว่าจึงไม่ค่อยนิยม

เมื่อได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอพอเหมาะแล้วจึงเชื่อมต่อกับ adapter เพื่อเป็นตำแหน่งที่จับของไพรมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่ง adapter จะออกแบบให้มีปลายที่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับปลายเหนียวของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ แต่เบสคู่ที่อยู่ในตำแหน่งถัดมาเป็นเบสคนละชนิดกับเบสที่บริเวณจดจำของเอนไซม์ ดังนั้นเมื่อ adapter เข้าไปเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอแล้ว เอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นจะไม่สามารถตัดได้อีก

ขั้นที่สอง คือ การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วน โดยใช้ไพรมอร์ที่จำเพาะมีลำดับเบสทางปลาย 5' เหมือนกับลำดับเบสของ adapter ต่อด้วยลำดับเบสบริเวณจดจำหรือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ และเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3' อีกส่วนหนึ่งเพื่อให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางชิ้น ส่วนของไพรมอร์ที่เหมือนกับ adapter และบริเวณจดจำของเอนไซม์เรียกว่า common part ส่วนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' เรียกว่า selective part จำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณลง โดยชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณได้ต้องมีลำดับเบสที่อยู่ต่อกับตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์สอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไป ถ้าเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกรวมขึ้นจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณจะลดลงประมาณ 4 เท่าต่อทุกๆเบสที่เพิ่มขึ้นซึ่งการใช้ไพรมอร์ที่เพิ่มเบสที่ปลาย 3' มากกว่า 2 เบส จะทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ 2 ครั้ง ครั้งแรกเรียกว่า preselective amplification และการทำ PCR ครั้งที่ 2 เรียกว่า selective amplification (สุรินทร์, 2545; Vos *et al.*, 1995) ดังนั้นในการศึกษาจีโนมขนาดเล็ก หรือโคลนที่อยู่ในพลาสมิด คอสมิด หรือ Bacterial artificial chromosome (BAC) ไม่จำเป็นต้องเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก เนื่องจากจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีจำนวนน้อยอยู่แล้ว และสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดเล็กไม่ใหญ่มาก เช่น แบคทีเรียหรือเชื้อราจะเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก 1-2 เบส จึงทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณเพียงครั้งเดียว ส่วนพวกที่มีจีโนมขนาดใหญ่จะเพิ่มเบสมากกว่า 2 เบสที่ไพรมอร์ทั้งสองชนิดจึงทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ 2 ครั้ง ดังตัวอย่างแสดงในตารางผนวก ไพรมอร์ที่เพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกที่ปลาย 3' จะเรียกว่าเป็นไพรมอร์ +1, +2, +3, +4 ตามลำดับ เช่น ไพรมอร์ทางปลาย *EcoRI* adapter จะเรียกว่า *EcoRI*+1, *EcoRI*+2, *EcoRI*+3 เป็นต้น

ขั้นสุดท้าย คือ การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยทำอิเล็กโทรโฟริซิสใน denaturing polyacrylamide gel แอปติเอ็นเอที่เหมาะสมที่แยกได้อยู่ในช่วง 50-100 แอป การตรวจสอบแอปติเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยการย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท หรืออาจตรวจสอบโดยการทำออโตเรดิโอกราฟหรือตรวจสอบผลด้วยการไฮบริดเซชันกับโพรบที่ติดฉลากด้วยสารปลดรังสี (nonradioactive label) หรือตรวจสอบการเรืองแสงโดยใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (automatic sequencer)

5.2 การประยุกต์ใช้เทคนิคเอฟแอลพี

เนื่องจากเทคนิคเอฟแอลพีทำให้เกิดโพลีเมอร์พีซีเอ็มได้จำนวนมาก จึงใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่จะนำไปสู่ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ใช้ในการศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตเพื่อบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่าง การจดทะเบียนพันธุ์ การตรวจสอบความเป็นลูกผสม การติดตามยีนและการทำแผนที่จีโนม

5.2.1 การติดตามยีนและการทำแผนที่จีโนม

การติดตามยีนสามารถทำได้หลายวิธีซึ่งเอฟแอลพีก็เป็นวิธีหนึ่งที่สะดวกและรวดเร็วในการค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ชิดกับยีน ซึ่งมักใช้ร่วมกับวิธีการ Bulk Segregant Analysis (BSA) ยีนที่ทำการศึกษายีนส่วนใหญ่เป็นยีนที่ควบคุมลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ยีนต้านทานโรค stem rot (*Sclerotium oryzae*) ในข้าว (Ni *et al.*, 2001) ยีนต้านทานแมลง brown plant hopper (BPH) (Murai *et al.*, 2001) ยีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง (สุพรรณภูมิ, 2549) นอกจากการติดตามยีนยังสามารถนำไปใช้ในการทำแผนที่จีโนม (Genetic linkage map และ QTL mapping) ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์และการคัดเลือกพันธุ์ที่ดี ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น สามารถคัดเลือกพันธุ์ทนเค็มในสภาพดินทั่วไป โดยอาศัยเครื่องหมายที่อยู่ชิดกับยีนควบคุมลักษณะทนเค็ม หรือทนต่อดินที่มีอลูมิเนียมสูง เช่น การศึกษาของ Miftahudin *et al.* (2002) ศึกษา ยีนที่ทนต่ออลูมิเนียม *Alt3* ในข้าวไรย์โดยใช้เทคนิคเอฟแอลพี

ในปี 1996 Cervera *et al.* ได้วิเคราะห์หาเครื่องหมายเอฟแอลพีที่มีตำแหน่งใกล้กับยีนต้านทานโรคราสนิม (*Mer*) พบว่ามีเครื่องหมายเอฟแอลพี 3 เครื่องหมายที่มีตำแหน่งใกล้กับยีน *Mer* ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้ และในปีเดียวกัน

Cnop *et al.* ทำ Chromosome landing โดยใช้เครื่องหมายเอฟแอลพีในการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *trn1* (tonado1) ใน *Arabidopsis* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 5 พบว่ามีเครื่องหมายเอฟแอลพี 17 เครื่องหมายที่อยู่ใกล้กับยีน *trn1* ต่อมา Schierholt *et al.* (2000) ใช้เทคนิคเอฟแอลพีในการติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการมีปริมาณกรดโอเลอิก (HO) สูงกว่าปกติใน winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) ที่กลายพันธุ์ พบว่ามีเครื่องหมายเอฟแอลพี 3 เครื่องหมายที่อยู่ใกล้กับยีน *fad2* ที่กลายพันธุ์คือ E32M61-141, E38M62-358 และ E35M62-256

5.2.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic variation and/or Genetic diversity)

เทคนิคเอฟแอลพีสามารถบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่เป็นชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ได้ เช่น ศึกษาใน daylily (*Hemerocallis* spp.) (Tomkins *et al.*, 2001) ถั่ว azuki (Xu and Baughan, 2002) ถั่ว cowpea พันธุ์พื้นเมือง (*Vigna unguiculata* ssp. *unguiculata*) (Nicola and Valeria, 2002) ข้าวสาลี *Triticum turgidum* L. ssp. *durum* (Soleimani *et al.*, 2002) *Lolium temulentum* (Senda *et al.*, 2004) รวมถึงสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในสกุลเดียวกันแต่ต่างชนิดกัน เช่น การศึกษาความสัมพันธ์ของ *Lolium* sp. จากโปรตุเกส (Cresswell *et al.*, 2001) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Bromus catharticus* Vahl. (Debora I *et al.*, 2001) ความสัมพันธ์ของพืชในสกุล *Berberis* ที่พบใน Patagonia และ Argentina (Bottini *et al.*, 2002) มะละกอที่พบในฮาวายและออสเตรเลีย ถั่วสกุล *Mucuna* spp., อ้อย (*Saccharum* spp.) หญ้า Tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) และ Bermudagrass (*Cynodon* spp.) (Kim *et al.*, 2002; Capo-chichi *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2002; Rouf *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 1999) และสามารถบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในวงศ์เดียวกันได้ เช่น Aggarwal *et al.* (1999) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชต่างชนิดในสกุล *Oryza* รวมทั้ง ข้าวโพด อ้อย และถั่วเหลือง โดยใช้เทคนิคเอฟแอลพีทำให้สามารถอธิบายวิวัฒนาการของพืชในสกุลนี้ได้ว่ามีบรรพบุรุษร่วมกันหรือมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน แต่ถูกแยกออกจากกันในช่วงแรกของกระบวนการวิวัฒนาการ เกิดเป็นพืชหลายชนิดที่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเทคนิคเอฟแอลพีสามารถที่จะจำแนกลักษณะที่เกิดจากการกลายพันธุ์ได้ (Liscum and Briggs, 1995) เช่น การตรวจสอบการกลายพันธุ์ somaclonal variant ในกล้วย *Musa* spp., *Arabidopsis thaliana*, *Taxus canadensis* Marsh. (Engelborghs *et al.*, 1998; Corradini *et al.*, 2002; Polanco *et al.*, 2001) เป็นต้น

ในปี 1999 Mulu *et al.* ได้ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของ *Eragrostis* 2 สปีชีส์ คือ *Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter กับ *Eragrostis pilosa* โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี พบว่า มีจำนวน แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 897 แถบ แถบที่เป็น โพลิมอร์ฟิซึมทั้งหมด 395 แถบจากจำนวนคู่ไพรเมอร์ 11 คู่ ผลการทำ cluster analysis พบว่า *E. pilosa* มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *E. tef* ต่อมา กฤษณาและคณะ (2544) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชอาหารสัตว์ 3 ชนิดคือ หญ้าเนเปียร์ (*Pennisetum purpureum*), หญ้ากินนีสีม่วง (*Panicum maximum* TD58) และหญ้ารูชี (*Brachiaria ruziziensis*) โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี พบว่าผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของหญ้าเนเปียร์สอดคล้องกับลักษณะภายนอก คือ หญ้าที่มีลักษณะลำต้นเดี่ยวและชนิดที่มีลำต้นสูงจัดอยู่คนละกลุ่ม ส่วนในหญ้ากินนีสีม่วงพบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้เหมือนกันเกือบทั้งหมด ทั้งตัวอย่างที่อยู่ในจังหวัดเดียวกัน และอยู่คนละจังหวัด ซึ่งตรงข้ามกับหญ้ารูชีที่พบว่ามีความแปรปรวนของประชากรสูงมาก แม้แต่ตัวอย่างที่นำมาจากจังหวัดเดียวกัน จากนั้นในปี 2002 Yasas *et al.* ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง bromegrass 2 สปีชีส์ คือ smooth bromegrass (*Bromus inermis* Leyss.) กับ meadow bromegrass (*Bromus riparius* Rehmann) รวมทั้งลูกผสมของทั้ง 2 สปีชีส์นี้ โดยใช้เทคนิคอาร์เอฟดีกับเอเอฟแอลพี ในการทดลองครั้งนี้ ผลปรากฏว่ามีความแปรปรวนสูงในลูกผสม และระหว่าง smooth กับ meadow bromegrass แต่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมต่ำระหว่าง smooth กับ hybrid bromegrass ผลจากการศึกษาครั้งนี้ สามารถนำเทคนิคอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพีไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ bromegrass ได้ในอนาคต แต่ถ้าต้องการให้ได้จำนวนโพลิมอร์ฟิซึมสูงควรเลือกใช้เทคนิคเอเอฟแอลพีดีกว่า

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างพืช

ต้นหญ้าแพงโกล่า พันธุ์ 258A ได้รับจาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชอาหารสัตว์ชัยนาท

การเตรียมชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อ

1. เลือกลำต้นของหญ้าแพงโกล่าที่ไม่แก่จนเกินไป โดยบริเวณที่ตัดควรอยู่สูงจากพื้นดินประมาณ 3-4 ข้อ หรือดูจากข้อของหญ้าที่มีต้นอ่อนงอกออกมาเพียงเล็กน้อย ในการทดลองนี้ส่วนที่นำมาใช้จะเป็นบริเวณของยอดอ่อน ข้อ และ หน่อ
2. ล้างทำความสะอาดผิวภายนอกด้วยน้ำสบู่และน้ำให้สะอาด จากนั้นนำลำต้นมาตัดใบแก่ออกและตัดเป็นชิ้นเล็กๆ โดยการตัดให้บริเวณข้อของหญ้าอยู่ตรงกลางของชิ้นส่วนและตัดให้มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร
3. นำชิ้นส่วนของหญ้าไปแช่ในสารละลายไฮเตอร์ เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารจับใบ (tween 20) 2-3 หยด เขย่าเป็นครั้งคราว เป็นเวลา 10 นาที นำมาแช่ต่อในสารละลายไฮเตอร์ เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารจับใบ 2-3 หยด เขย่าเป็นครั้งคราว เป็นเวลา 5 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆละ ประมาณ 1 นาที

การทดลองแบ่งออกเป็น 4 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำข้อของหญ้าแพงโกล่าให้เกิดยอดหลายยอด

1. นำชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตกแต่งโดยลอกกาบใบและเยื่อชั้นนอกสุดออก ตัดบริเวณหัวท้ายที่ชำออกให้เหลือบริเวณข้อที่อยู่ตรงกลางของชิ้นส่วนหญ้า ให้มีความยาวประมาณ 0.3 เซนติเมตร
2. นำชิ้นส่วนแต่ละชิ้นไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต 6-benzylaminopurine (BAP) ในปริมาณ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยอาหารทุกสูตรปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.8 นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความ

คัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที โดยเพาะเลี้ยง 4 ชั้นต่อขวด การวางชิ้นส่วนของหญ้าให้วางในแนวตั้งให้ปลายสัมผัสกับอาหาร กดลงเบาๆ ให้ชิ้นส่วนจมในอาหารเล็กน้อย นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง มีด 8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของรังสีแกมมาปริมาณต่างๆต่อการเจริญเติบโตของยอดที่ผ่านการฉายรังสี เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดยอดหลายยอด เพื่อหาค่าปริมาณรังสีที่ทำให้เกิดการตายที่ 50 เปอร์เซนต์

1. เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหญ้าแพงโกล่าบนอาหารสูตรเหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดหลายยอดจากการทดลองที่ 1 เมื่ออายุครบ 6 สัปดาห์ ให้นำยอดหลายยอด ที่ได้ไปฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่างๆ 6 ระดับ คือ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เกรย์(gray)

2. นำยอดที่ฉายรังสีแล้ว ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม ในสภาพที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส บันทึกจำนวนยอดที่รอดชีวิตในอาหารแต่ละขวด และหาเปอร์เซ็นต์การตาย 50 เปอร์เซนต์(LD50)

3. นำยอดไปฉายรังสีไม่เกินค่า LD50 แล้วไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม แล้วนำยอดที่รอดตายไปชักนำให้เกิดราก เมื่อได้ต้นที่สมบูรณ์ นำออกปลูกในสภาพธรรมชาติเพื่อคัดเลือกลักษณะพึงประสงค์

การทดลองที่ 3 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำยอดของหญ้าแพงโกล่าให้เกิดรากเพื่อนำยอดหลายยอดที่ได้จากการฉายรังสีออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

นำยอดที่รอดตายจากการฉายรังสีแล้วไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่ใส่และใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ MS ที่ใส่ถ่าน 1 กรัมต่อลิตร

การทดลองที่ 4 ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าแพงโกล่าที่ผ่านการฉายรังสี

คัดเลือกลักษณะหญ้าแพงโกล่าที่มีลักษณะที่พึงประสงค์มาสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ spectrophotometer และการวัดการเรืองแสงของดีเอ็นเอ

ร่วมกับเอชดีเอ็มโบลูมส์ เมื่อได้ชิ้นเนื้อที่มีคุณภาพดีแล้ว นำมาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอฟแอลพี (ภาคผนวก)

สถานที่และเวลาทำการวิจัย

1. สถานที่

1.1 หน่วยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2 ศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3 ศูนย์ปลูกพืชทดลอง ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.4 ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชอาหารสัตว์ชัยนาท

2. ระยะเวลาในการทำการวิจัย

เริ่มทำการทดลองเดือนมกราคม 2548 สิ้นสุดการทดลองเดือนมกราคม 2551

ผลและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำข้อของหญ้าแพงโกล่าให้เกิดยอดหลายยอด

จากการนำข้อของหญ้าแพงโกล่ามาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ในระดับความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาพที่รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าข้อของหญ้าแพงโกล่าตอบสนองต่อ BAP โดยแสดงให้เห็นความแตกต่างจากจำนวนยอดที่เกิดขึ้นในจำนวนที่ต่าง ๆ กัน โดยอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ในระดับความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดหลายยอดได้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อข้อเท่ากับ 2.375, 7.725, 8.8, 13.05 และ 13.10 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนยอดทั้งหมด และจำนวนยอดเฉลี่ยต่อข้อ จากการนำข้อของหญ้าแพงโกล่ามาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์

อาหารสูตรที่	จำนวนข้อเริ่มต้น	จำนวนยอดทั้งหมด	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อข้อ
1	40	41	1.025 ^c
2	40	95	2.375 ^c
3	40	309	7.725 ^b
4	40	352	8.80 ^b
5	40	522	13.05 ^a
6	40	524	13.10 ^a

หมายเหตุ ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan Multiple Test

อาหารสูตรที่ 1 อาหารสูตร MS

2 อาหารสูตร MS + BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

3 อาหารสูตร MS + BAP 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

4 อาหารสูตร MS + BAP 6 มิลลิกรัมต่อลิตร

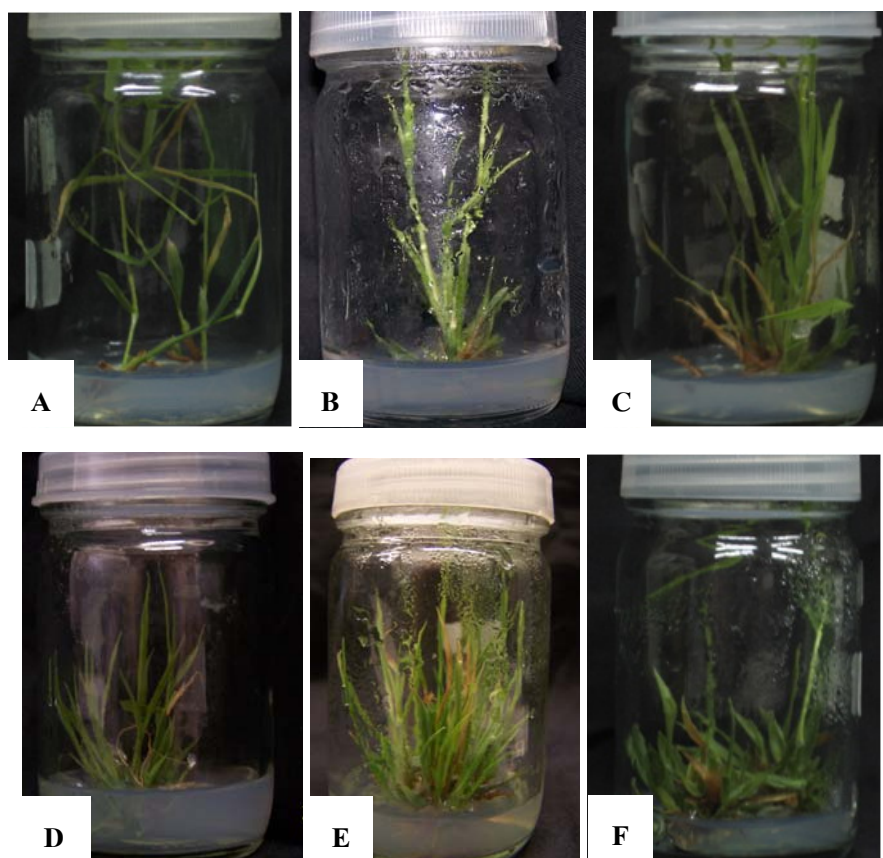
5 อาหารสูตร MS + BAP 8 มิลลิกรัมต่อลิตร

6 อาหารสูตร MS + BAP 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า อาหารสูตรต่างๆจะให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อข้อแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 1) โดยอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (อาหารสูตรที่ 5 และ 6) ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อข้อไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างจากอาหารสูตรที่ไม่เติม BAP (อาหารสูตรที่ 1) และที่เติม BAP 2, 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร (อาหารสูตรที่ 2, 3 และ 4) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับอาหารสูตรที่ 3 และ 4 ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อข้อไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างจากอาหารสูตรที่ 1 และ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 1) อาหารสูตรชักนำให้เกิดยอดหลายยอดที่ให้ผลดี คือ อาหารสูตร MS ที่เติม BAP 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจำนวนยอดที่ได้เฉลี่ยต่อข้อเท่ากับ 13.05 และ 13.10 ยอดต่อข้อ แต่จากการทดลอง พบว่า อาหารสูตรที่ 5 ซึ่งเป็นอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 8 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดให้มีลักษณะสมบูรณ์ มีการเจริญเติบโตดี ไม่แคระแกร็น (ภาพที่ 1E) ในขณะที่อาหารสูตรที่ 6 ที่เติม BAP 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ยอดที่เกิดขึ้นมามีลักษณะแคระแกร็น ต้นเตี้ย การเจริญเติบโตไม่ค่อยดี (ภาพที่ 1F) ในการทดลองครั้งนี้จึงเลือกใช้อาหารสูตร MS ที่เติม BAP 8 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากผลการทดลองพบว่าจำนวนยอดเฉลี่ยต่อข้อจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ BAP เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ในระดับความเข้มข้นที่ต่าง ๆ กัน (อาหารสูตรที่ 2-6) กับอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม BAP (อาหารสูตรที่ 1) ปรากฏว่าอาหารสูตรที่ 1 เกิดยอดเฉลี่ย 1 ยอดต่อข้อเท่านั้น ในขณะที่อาหารสูตรที่ 2-6 ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อข้อเท่ากับ 2.375, 7.725, 8.8, 13.05 และ 13.10 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Hisajima *et al.* (1987) ที่ได้เพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BAP, kinetin และ 2-iP เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า BAP เท่านั้นที่สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้ ต่อมา กมลพรรณ และคณะ(2535) สามารถชักนำส่วนข้อของเผือกหอม *Ventiveria zizaniodes* Linn. ให้เกิดยอดหลายยอดได้โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 10 ไมโคร

โมลต่อลิตร จากนั้นในปี 2539 มโนชัย ได้เพาะเลี้ยงหน่อของหญ้าแฝก (*Vetiveria zizanioides* Linn.) บนอาหาร 4 สูตร คือ สูตร MS, MoMS, $1/2$ MS และ N_6 โดยในแต่ละสูตรเติม BAP ในระดับความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 50 ไมโครโมลต่อลิตร พบว่าในอาหารทุกสูตรที่เติม BAP ในระดับความเข้มข้น 50 ไมโครโมลต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดหลายยอดได้ดีกว่าอาหารทุกสูตรที่เติม BAP ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่า นอกจากนี้ วิชาสิริ (2546) ได้ทำการทดลองโดยใช้เมล็ดของหญ้าชันก้านบนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ในระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำให้เกิดยอดหลายยอด พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดคือ อาหารสูตร MS ที่เติม BAP 6 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดหลายเฉลี่ย 3.82 ยอดต่อเมล็ด ทั้งนี้เนื่องมาจาก BAP เป็นสารสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์ของ 6-amino-purine ซึ่งทำหน้าที่เป็นไซโตไคนินที่มีผลโดยตรงต่อการชักนำเนื้อเยื่อให้เกิดยอดโดยจะไปกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์และเกิดตา (Krishnamoorthy, 1981) และมีประสิทธิภาพสูงในการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอด (Vijaya and Satyanarayana, 1991)



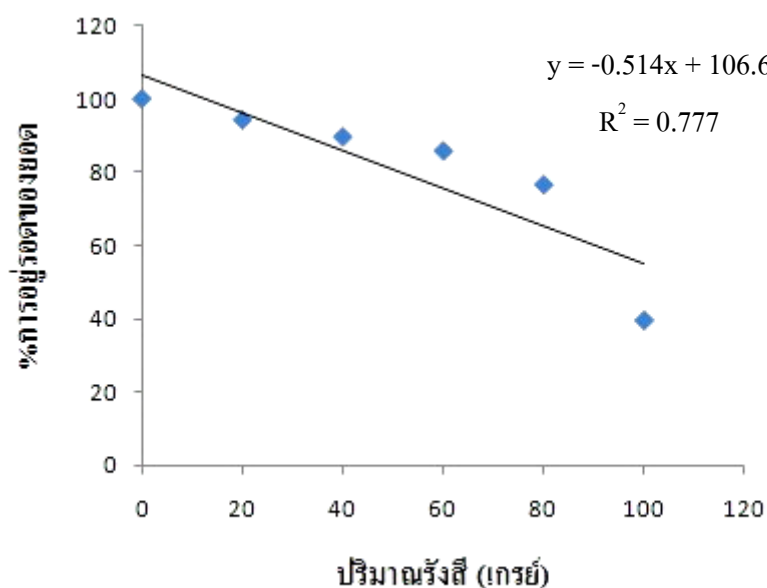
ภาพที่ 1 แสดงลักษณะต้นหญ้าแฝกโกล่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม BAP (A) และที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (B) 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (C) 6 มิลลิกรัมต่อลิตร (D) 8 มิลลิกรัมต่อลิตร (E) 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (F) เป็นเวลา 6 สัปดาห์

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการเจริญเติบโตของยอด เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดยอดหลายยอด เพื่อหาค่าปริมาณรังสีที่ทำให้เกิดการตายที่ 50 เปอร์เซนต์ (LD₅₀)

จากการนำยอดหลายยอดที่ได้ไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณต่างๆ 6 ระดับ คือ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เกรย์ แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า เมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น อัตราการรอดชีวิตของหน่อย่างงโคล่าลดลง โดยที่ปริมาณรังสี 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เกรย์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100, 94.21, 89.56, 85.71, 76.47 และ 39.34 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ทำให้สามารถหาค่าปริมาณรังสีที่ทำให้เกิดการตายที่ 50 เปอร์เซนต์ (LD₅₀) โดย Regression Analysis ซึ่งมีค่า linear regression คือ $y = -0.514x + 106.6$, $R = 0.777$ ดังนั้น ปริมาณรังสีที่ทำให้เกิดการตายที่ 50 เปอร์เซนต์ คือ ที่ปริมาณรังสี 80.9 เกรย์ (ภาพที่ 2) ส่วนค่า LD₅₀ ของพืชตระกูลหญ้าชนิดอื่นๆ ที่ทำการศึกษามีความแตกต่างกัน เช่น ค่า LD₅₀ ของหญ้าอะตราบัมเท่ากับ 42.35 เกรย์ (ชนภักษ์, 2545) หญ้ารูซี่เท่ากับ 67.87 เกรย์ (ศิริภู, 2545) หญ้าชิกแนลอนเท่ากับ 43.47 เกรย์ (วิภาศิริ, 2546) ส่วนหญ้านินีสีม่วงเท่ากับ 28.60 เกรย์ (สุมล, 2546) จะเห็นได้ว่าค่า LD₅₀ ของหญ้าแต่ละชนิดมีค่าแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับการตอบสนองต่อรังสีของหญ้าที่แตกต่างกัน โดยค่า LD₅₀ ของหญ้าแพงโกล่ามีค่ามากกว่า LD₅₀ ของหญ้าที่ได้ยกตัวอย่างไป แสดงให้เห็นว่าหญ้าแพงโกล่าอาจมีการตอบสนองต่อรังสีที่ช้ากว่าหรือทนต่อรังสีได้มากกว่าหญ้าทั้ง 4 ชนิด ซึ่งข้อมูลของค่า LD₅₀ นี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อนำมาคาดคะเนปริมาณรังสีที่เหมาะสมในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

ตารางที่ 2 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของต้นหญ้าย่างงโคล่าหลังจากได้รับการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เกรย์ แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำยอดหลายยอด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

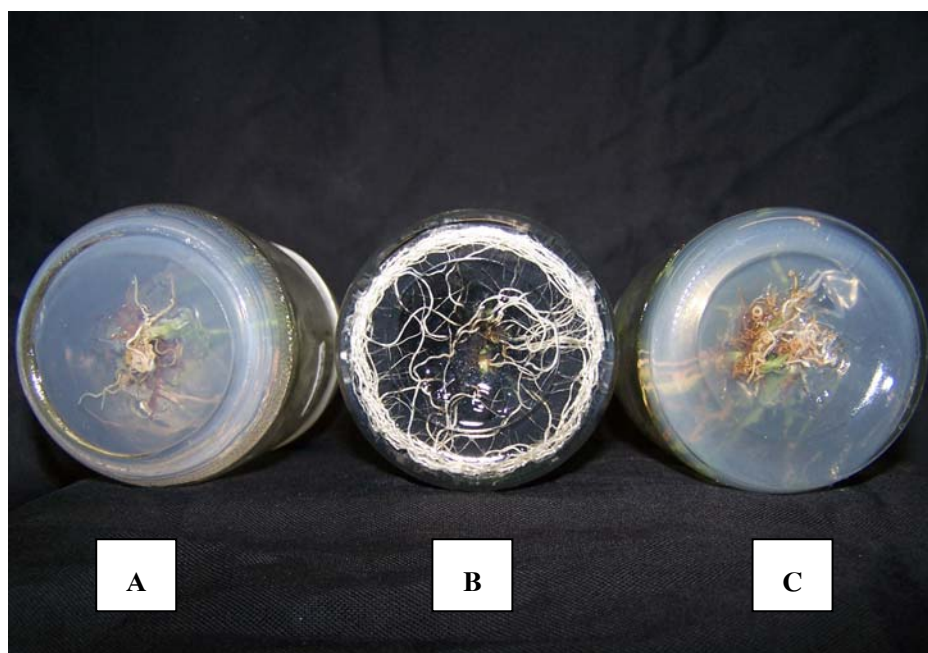
ปริมาณรังสี (เกรย์)	จำนวนต้นเริ่มต้น	จำนวนต้นที่รอดชีวิต	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต
0	100	100.00	100.00
20	100	94.21	94.21
40	100	89.56	89.56
60	100	85.71	85.71
80	100	76.47	76.47
100	100	39.34	39.34



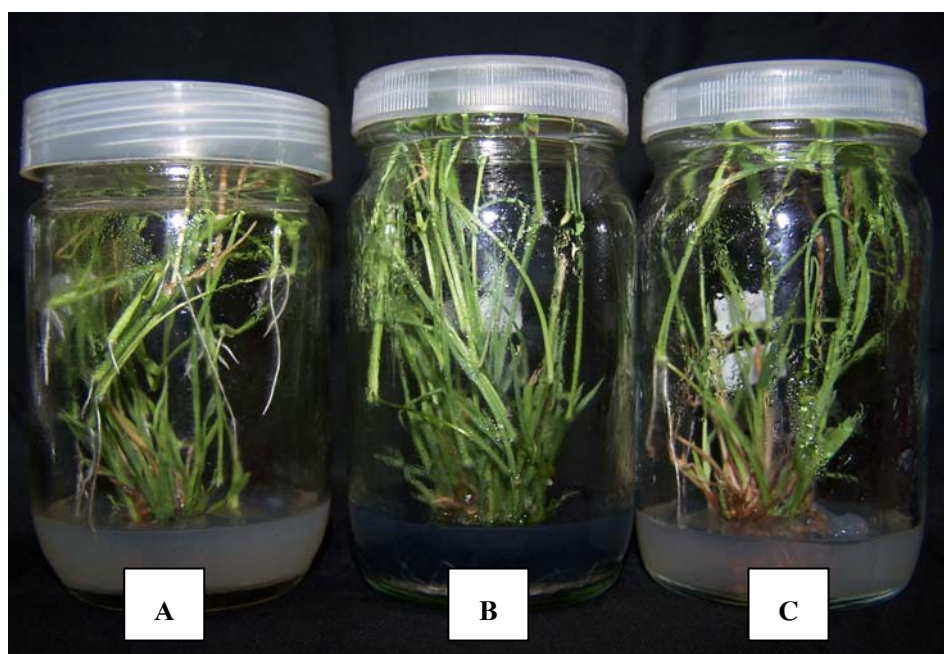
ภาพที่ 2 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของยอดที่ได้รับการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ

การทดลองที่ 3 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำยอดของหญ้าแพงโกล่าให้เกิดรากเพื่อนำยอดหลายยอดที่ได้จากการฉายรังสีออกปลูก

จากการทดลองที่ 2 จะได้ยอดของหญ้าแพงโกล่าที่ไม่มีรากหรือมีรากน้อย ทำให้ยากต่อการนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ ดังนั้นจึงนำยอดหลายยอดที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS, MS ที่เติมถ่านปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร และ MS ที่เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลปรากฏว่าต้นของหญ้าแพงโกล่าที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่ใส่ถ่านทุกต้นมีรากจำนวนมาก และรากที่ได้มีลักษณะสีขาว แข็งแรง (ภาพที่ 3B) แต่ต้นของหญ้าแพงโกล่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ MS ที่เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรมีรากน้อย และรากที่ได้มีสีเหลืองเป็นส่วนใหญ่ (ภาพที่ 3A และ 3C)



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะรากของหญ้าแพงโกล่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (A) MS ที่ใส่ถ่าน (B) และ MS ที่เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (C) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 4 แสดงลักษณะของต้นหญ้าแพงโกล่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (A) MS ที่ใส่ถ่าน (B) และ MS เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (C) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

จากภาพ 3B จะเห็นได้ชัดว่าหญาแพงโกล่าที่เลี้ยงในอาหาร MS เดิมถ่านมีปริมาณรากมากกว่า และรากที่ได้มีสีขาว ส่วนในภาพที่ 4 ลักษณะต้นของหญาแพงโกล่าที่เลี้ยงในอาหาร MS (ภาพที่ 4A) และ MS ที่เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4C) ที่บริเวณโคนต้นเริ่มมีใบสีเหลืองเกิดขึ้นมากกว่าต้นหญาแพงโกล่าที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมถ่าน อาจเนื่องมาจาก activated charcoal (AC) มีผลช่วยในการดูดซับสารพิษพวก phenolic compounds ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญาแพงโกล่า ทำให้ต้นหญาแพงโกล่ามีอัตราการเจริญเติบโตดี และรากที่ได้แข็งแรง มีสีขาว และมีปริมาณมาก ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Gunnar *et al* (1978) ที่ศึกษาผลของ AC ในการเพาะเลี้ยง *Daucus carota*, *Haplopappus gracilis* และ *Allium cepa* var. *proliferum* โดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม และไม่เติม AC ในอาหาร ปรากฏว่าในอาหารที่เติม AC ไม่เกิดสารพวก phenolic compound ต่างกับอาหารที่ไม่เติม AC ที่เกิดสารพวก phenylacetic acid (*Daucus*), 2,6-OH-benzoic acid (*Allium*) และ benzoic acid (*Haplopappus*) ในปริมาณสูง ต่อมา Phongyuth (1995) ได้ศึกษาการยับยั้งการเกิดสารพวก phenolic compound ในการเพาะเลี้ยงปอสาญี่ปุ่น (*Broussonetia kazinoki*) โดยใช้ AC ใส่ลงในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ผลปรากฏว่า สามารถใช้ในการยับยั้งการเกิดพืชที่มีสีน้ำตาลได้ (explants browning) นอกจากนั้นในปี 2002 Van Staden ยังศึกษาผลของ AC ที่มีต่อการเกิดรากใน *Daucus carota* และในปีเดียวกัน Gallardo-Williams *et al.* ยังศึกษาการดูดซับสารพิษของ AC ใน cattails (*Typha domingensis*) จากงานทดลองที่กล่าวมาผลของ AC ที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือ ช่วยในการดูดซับสารพิษ และมีผลต่อการเจริญเติบโตทั้งของรากและลำต้น ทำให้ต้นพืชที่เลี้ยงในอาหารที่เติม AC มีรากที่แข็งแรงและปริมาณรากที่ได้มีมาก และพืชที่ได้ไม่เกิดสีน้ำตาล

จากการทดลองนี้พบว่าเมื่อใส่ AC ลงในอาหารที่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต BAP 8 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้หญาแพงโกล่าไม่แตกกอดังที่รายงานไว้ใน การทดลองที่ 1 ซึ่งให้ผลตรงกับ Gallardo-Williams *et al.* (2007) ที่ศึกษาในยาสูบโดยใส่ AC ลงในอาหารที่เติมสารเร่งการเจริญเติบโตประเภทออกซิน และไซโตไคนินเพื่อเร่งให้เกิดแคลลัส และการเกิดยอด ผลที่ได้ปรากฏว่า AC ยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัส และการพัฒนาเป็นยอดของยาสูบ

หลังจากได้ต้นหญ้าแพงโกล่าที่ผ่านการฉายรังสีและผ่านการชักนำให้เกิดรากจนได้เป็นต้นที่แข็งแรงและเจริญเติบโตเต็มที่แล้วในสภาพธรรมชาติ จึงนำออกปลูกที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชอาหารสัตว์ชัยนาท (ภาพที่ 5) เป็นเวลา 45 วัน หลังจากนั้นจึงทำการคัดเลือกโคลนที่ต้องการเพื่อนำมาศึกษาสายพันธุ์ดีเอ็นเอ โดยคัดเลือกจากลักษณะภายนอก (morphology) และยังคำนึงถึงการนำพืชอาหารสัตว์มาใช้ประโยชน์ คือ การตัดสด และการนำมาทำหญ้าแห้ง ดังนั้นการคัดเลือกตัวอย่างจึงคัดเลือกทั้งตัวอย่างที่มีลักษณะเด่นกว่า control และ ตัวอย่างที่มีลักษณะด้อยกว่า control ไว้ เพราะคาดว่าตัวอย่างที่มีลักษณะด้อยกว่า control สามารถนำมาทำหญ้าแห้งได้ดี เนื่องจากอาจมีลักษณะต้นที่เล็กกว่า ทำให้แห้งง่ายกว่าต้นที่มีลำต้นหนา หรืออาจมีลักษณะใบที่เล็กกว่าแต่ระยะห่างระหว่างข้อปล้องน้อยกว่า จึงทำให้สัดส่วนของใบมีมากกว่า โดยลักษณะที่คัดเลือก คือ ขนาดใบ, ลักษณะต้นตั้งตรง, การแตกกอ และปริมาณของไหล ได้ทั้งหมด 19 โคลน คือ A308/01, A308/06, A309/03, B114/01, B204/01, B501/03, B511/03, B606/03, B609/03, C110/03, C402/01, D111/02, D115/04, D703/01, E107/02, E107/03, E108/01, E701/02 และ E702/04 (ตัวอย่างที่ 2-20 ตามลำดับ) (ตารางที่ 3) และตัวอย่างที่ 1 คือ control หรือหญ้าแพงโกล่าปกติ



ภาพที่ 5 ภาพหญ้าแพงโกล่าที่ปลูกที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชอาหารสัตว์ชัยนาท

ตารางที่ 3 รายละเอียดตัวอย่างหญ้าแพงโกล่าทั้งหมด 20 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่		ตัวอย่างที่	
1	Control	11	C110/03
2	A308/01	12	C402/01
3	A308/06	13	D111/02
4	A309/03	14	D115/04
5	B114/01	15	D703/01
6	B204/01	16	E107/02
7	B501/03	17	E107/03
8	B511/03	18	E108/01
9	B606/03	19	E701/02
10	B609/03	20	E702/04

หมายเหตุ control หญ้าแพงโกล่าที่ไม่ผ่านการฉายรังสี

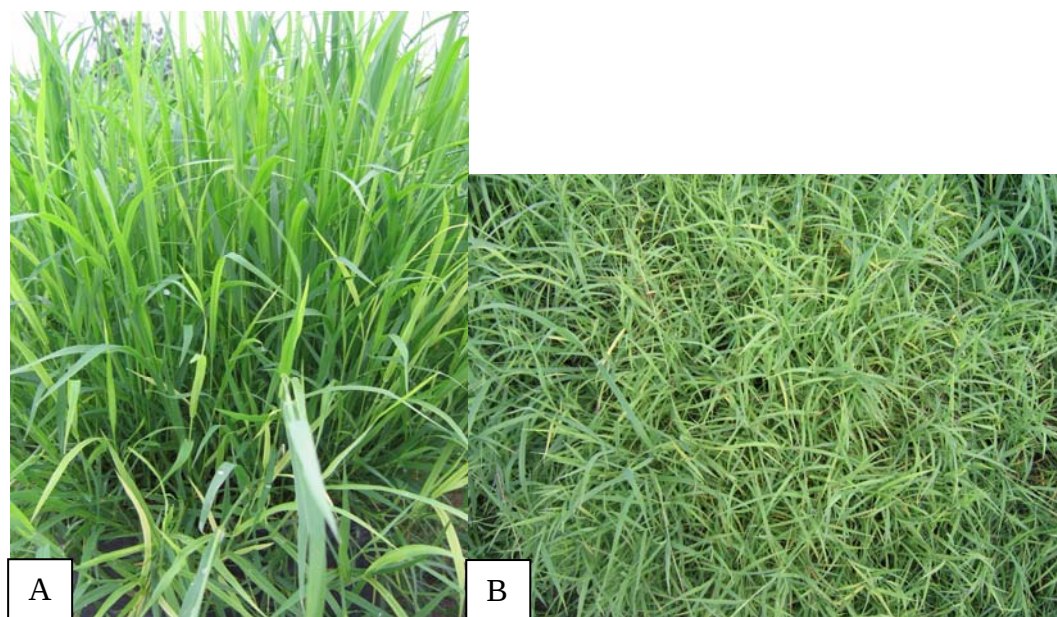
A, B, C, D, E ปริมาณรังสีแกมมา 20, 40, 60, 80 และ 100 เกรย์

-x--/-- ต้นที่

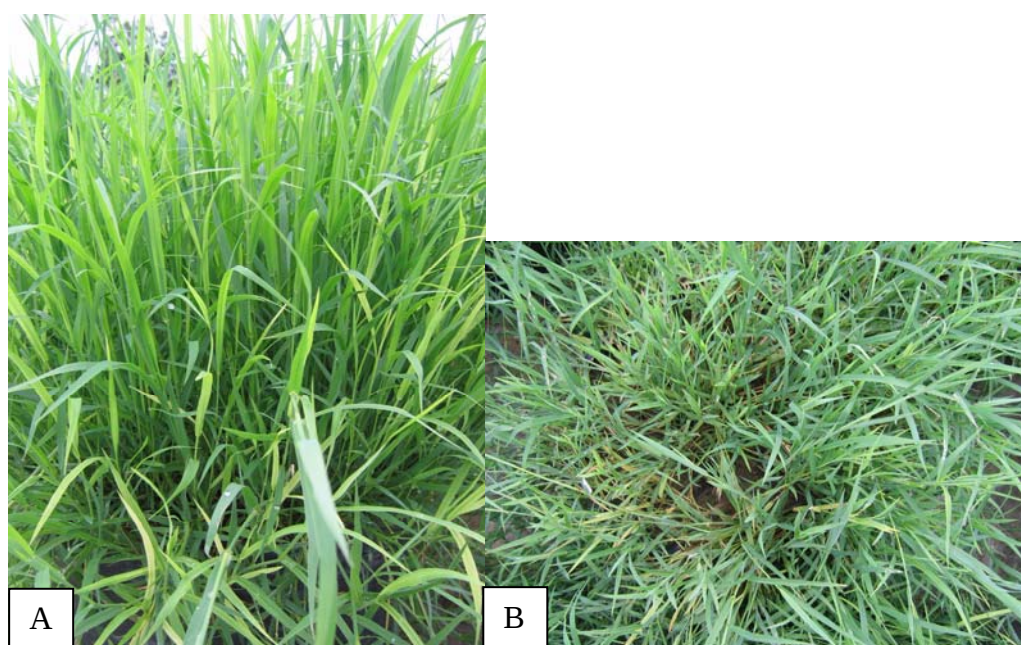
--xx/-- หน่อที่

---/xx โคลนที่

จากภาพที่ 6-8 แสดงให้เห็นความแตกต่างของตัวอย่างหญ้าที่ผ่านการฉายรังสีกับตัวอย่างหญ้าปกติ (control) และภาพที่ 9-11 เป็นภาพที่แสดงให้เห็นความแตกต่างของใบและไหล ของตัวอย่างที่คัดเลือกมาบางตัวอย่างเท่านั้น



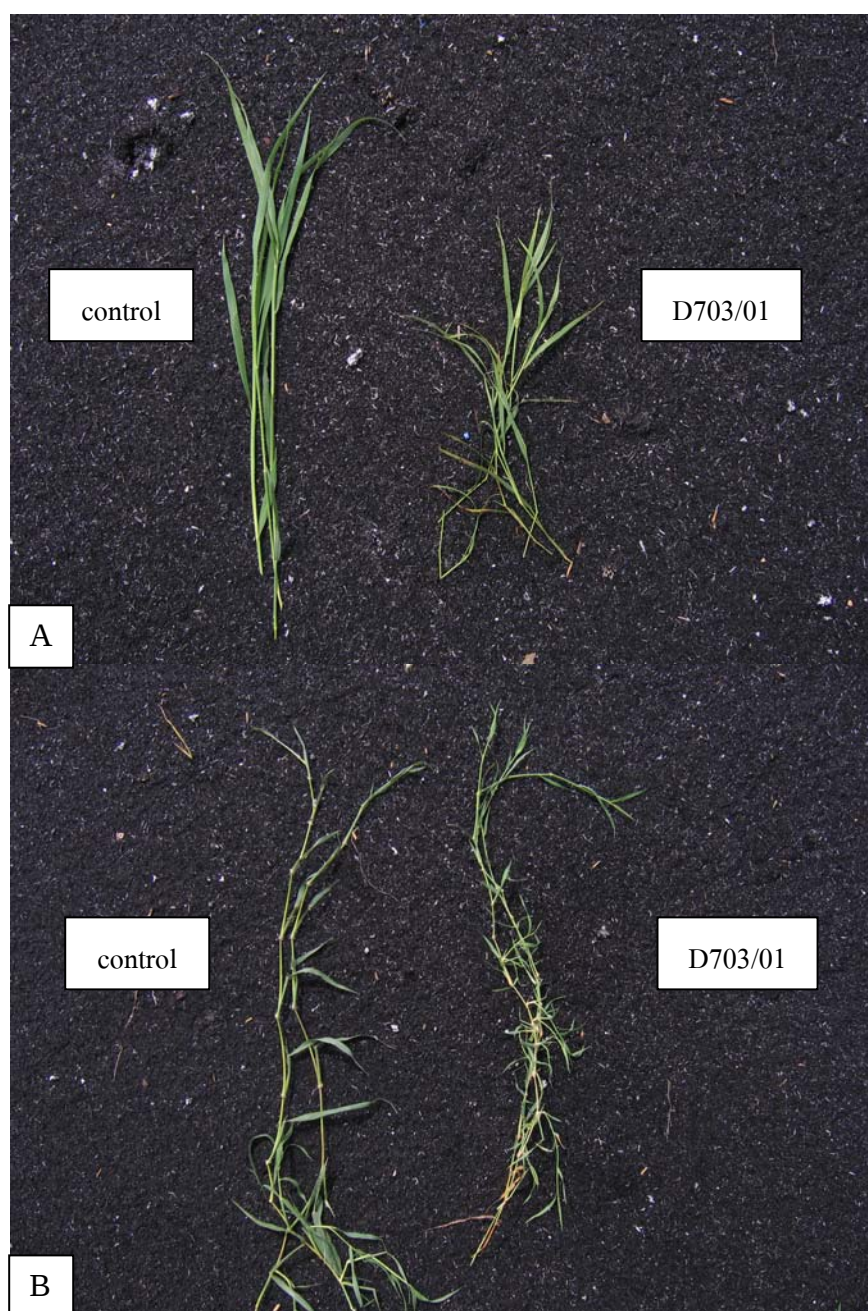
ภาพที่ 6 ลักษณะต้นหญ้าแพงโกล่าที่ผ่านการฉายรังสีแล้วมีลักษณะที่แตกต่างจากหญ้าแพงโกล่า ปกติอย่างชัดเจน A. control B. ตัวอย่างที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในปริมาณ 80 เกรย์ (ตัวอย่างที่ 15-D703/01)



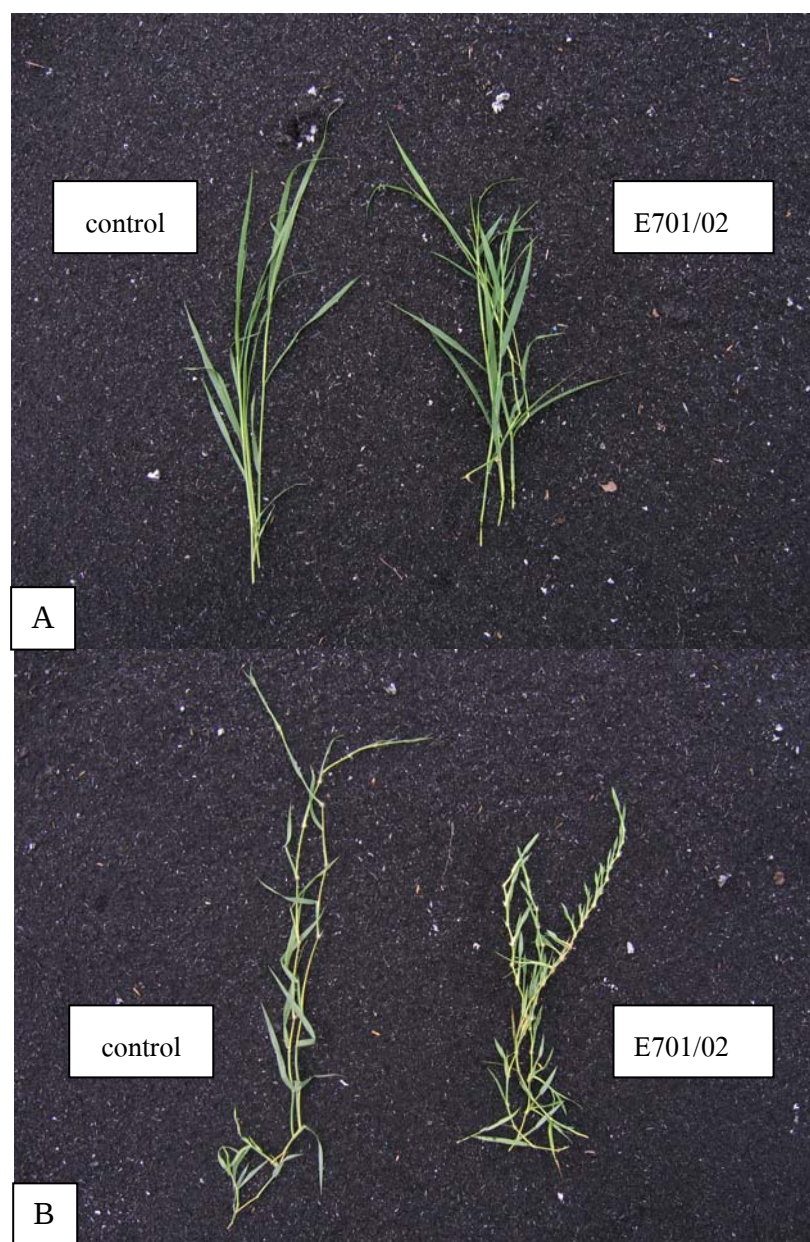
ภาพที่ 7 ลักษณะต้นหญ้าแพงโกล่าที่ผ่านการฉายรังสีแล้วมีลักษณะที่แตกต่างจากหญ้าแพงโกล่า ปกติอย่างชัดเจน A. control B. ตัวอย่างที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในปริมาณ 100 เกรย์ (ตัวอย่างที่ 19-E701/02)



ภาพที่ 8 ลักษณะต้นหญ้าแพงโกล่าที่ผ่านการฉายรังสีแล้วมีลักษณะที่แตกต่างจากหญ้าแพงโกล่า
ปกติอย่างชัดเจน A. control B. ตัวอย่างที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในปริมาณ 100 เกรย์
(ตัวอย่างที่ 20-E702/04)



ภาพที่ 9 เปรียบเทียบลักษณะใบและไหลของหญ้าแพงโกล่าตัวอย่างที่ 1 กับตัวอย่างที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในปริมาณ 80 เกรย์ (ตัวอย่างที่ 15-D703/01) A. ลักษณะใบ B. ลักษณะไหล



ภาพที่ 10 เปรียบเทียบลักษณะใบและไหลของหญ้าแพงโกล่าตัวอย่างที่ 1 กับตัวอย่างที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในปริมาณ 100 เกรย์ (ตัวอย่างที่ 19-E701/02) A. ลักษณะใบ B. ลักษณะไหล



ภาพที่ 11 เปรียบเทียบลักษณะใบและไหลของหญ้าแพงโกล่าตัวอย่างที่ 1 กับตัวอย่างที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในปริมาณ 100 เกรย์ (ตัวอย่างที่ 20-E702/04) A. ลักษณะใบ B. ลักษณะไหล

หลังจากการคัดเลือกด้วยลักษณะทางภายนอกแล้ว จึงทำการตัดหญ้าทุกตัวอย่างเพื่อให้หญ้าเจริญเติบโตใหม่ หลังจากนั้นประมาณ 30 วัน จึงทำการเก็บข้อมูลโดยการวัดความสูง (ภาพที่ 12) วัดขนาดความกว้าง ความยาวของใบ (ภาพที่ 13) การนับจำนวนต้นและน้ำหนักสดภายในกรอบสี่เหลี่ยม (quadrat) ขนาด 25x25 เซนติเมตร (ภาพที่ 14) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยจำนวนต้น และน้ำหนักสดภายในกรอบสี่เหลี่ยมขนาด 25x25 เซนติเมตร ความสูงของลำต้น ขนาดของใบของต้นหญ้าแพงโกล่าที่พัฒนาจากข้อที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ หลังจากนำออกปลูกที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชอาหารสัตว์ชัยนาท เป็นเวลา 30 วัน

ตัวอย่าง	ความสูง(cm)	น้ำหนัก (kg)	จำนวนต้น	ขนาดของใบ (cm)	
				กว้าง	ยาว
<u>control*</u>	61.10	0.41	394.75	0.54	20.4
A102/05*	62.08	0.51	418.50	0.54	21.82
<u>A308/01</u>	62.18	0.48	370.25	0.59	15.04
<u>A308/06</u>	65.98	0.43	336.75	0.56	14.95
<u>A309/03</u>	73.30	0.25	147.00	0.56	15.81
A405/01	58.43	0.48	418.25	0.59	18.11
A410/07	61.28	0.40	270.00	0.56	18.23
A504/05	64.23	0.41	347.75	0.55	18.57
B103/04	60.90	0.34	271.50	0.58	18.94
<u>B106/05</u>	58.80	0.39	371.25	0.62	16.68
B110/06	60.10	0.40	334.67	0.56	17.26
<u>B111/01</u>	61.98	0.34	313.50	0.57	18.47
<u>B114/01*</u>	67.05	0.58 ^a	458.75	0.63	15.83
<u>B204/01</u>	62.43	0.43	345.75	0.53	17.72
B207/01	61.53	0.43	380.50	0.53	18.43
B401/01	61.38	0.48	392.25	0.56	17.03

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ความสูง(cm)	น้ำหนัก (kg)	จำนวนต้น	ขนาดของใบ (cm)	
				กว้าง	ยาว
B401/03	62.23	0.46	370.50	0.56	18.39
B501/02	62.27	0.38	417.67	0.57	19.1
<u>B501/03*</u>	65.50	0.71 ^a	335.25	0.62	18.39
B509/01	65.25	0.35	351.50	0.58	17.88
<u>B511/03</u>	66.63	0.50	279.25	0.56	12.96
<u>B606/03</u>	64.00	0.38	324.67	0.53	17.1
B609/01	62.53	0.40	213.33	0.57	14.49
<u>B609/03</u>	64.23	0.43	316.75	0.59	17.37
B702/03	59.05	0.46	413.75	0.59	17.05
C107/01*	62.90	0.51	345.00	0.58	20.93
C109/04	63.43	0.35	361.00	0.57	17.17
C110/02	60.83	0.45	296.50	0.53	16.33
<u>C110/03</u>	63.43	0.38	315.25	0.58	18.43
C110/06	60.95	0.43	341.25	0.54	20.55
<u>C402/01</u>	64.80	0.48	370.25	0.60	16.28
C708/08*	69.07	0.63 ^a	515.67	0.61	13.41
D106/02	63.43	0.30	310.25	0.56	14.83
D110/02	59.23	0.38	416.67	0.46	14.66
<u>D111/02*</u>	62.00	0.62 ^a	226.33	0.61	14.54
D113/04	64.08	0.31	377.50	0.57	17.24
D115/03*	66.37	0.58 ^a	457.33	0.53	19.16
<u>D115/04</u>	56.90	0.43	249.00	0.32	10.74
D406/03	61.58	0.45	341.75	0.52	16.96
<u>D703/01*</u>	40.75	0.55 ^a	1409.00	0.32	7.53

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ความสูง (cm)	น้ำหนักสด (kg)	จำนวนต้น	ขนาดของใบ (cm)	
				กว้าง	ยาว
D704/03	61.67	0.32	236.33	0.51	16.64
D704/06*	69.97	0.62 ^a	453.00	0.58	17.73
<u>E107/02*</u>	60.38	0.44	442.50	0.54	15.64
<u>E107/03</u>	63.78	0.30	315.75	0.53	14.82
<u>E108/01</u>	63.45	0.43	287.50	0.58	17.32
E108/02	64.40	0.39	423.25	0.48	18.49
E503/02	60.50	0.38	342.50	0.47	18.45
<u>E701/02</u>	53.77	0.35	164.33	0.51	9.33
E702/02	63.00	0.43	285.00	0.52	22.23
<u>E702/04</u>	58.10	0.27	397.33	0.51	15.33

หมายเหตุ control หญ้าแพงโกล่าที่ไม่ผ่านการฉายรังสี

A, B, C, D, E ปริมาณรังสีแกมมา 20, 40, 60, 80 และ 100 เกรย์

-x--/-- ต้นที่

--xx/-- หน่อที่

----/xx โคลนที่

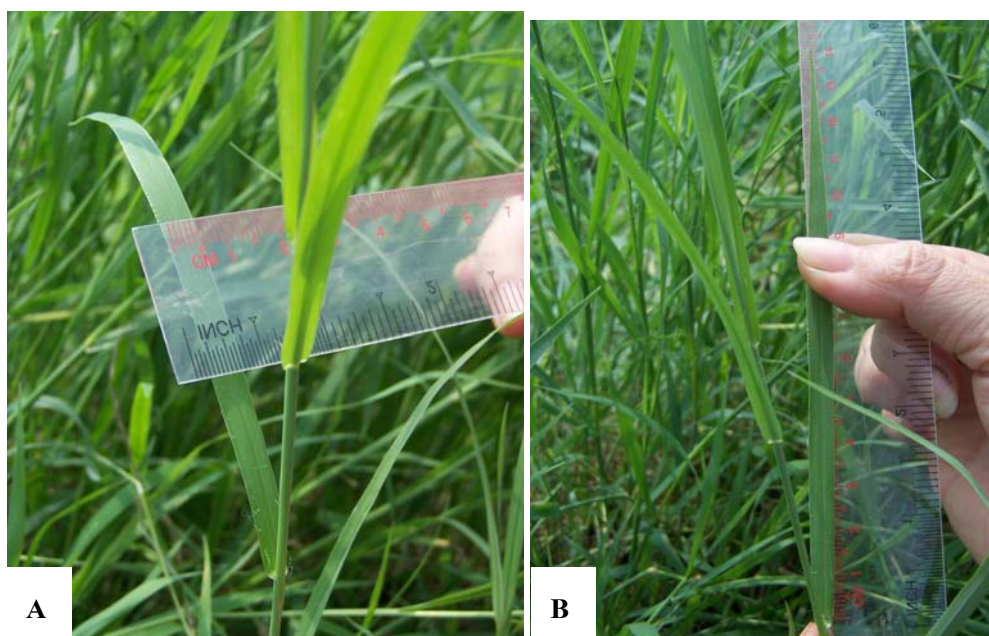
ตัวอย่างที่ขีดเส้นใต้ คือ ตัวอย่างที่คัดเลือกเพื่อนำมาศึกษาสายพันธุ์ดีเอ็นเอ

* = ตัวอย่างที่คัดเลือกไว้ 10 ตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ตัวอักษรในคอลัมน์น้ำหนักสด คือ ตัวอย่างที่มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดสูงสุด



ภาพที่ 12 แสดงลักษณะการวัดความสูงต้นหญ้าแพงโกล่า



ภาพที่ 13 แสดงลักษณะการวัดความกว้างใบ (A) ความยาวใบ (B)



ภาพที่ 14 แสดงลักษณะการใช้กรอบสี่เหลี่ยม (quadrat) ขนาด 25x25 เซนติเมตร

จากตารางที่ 4 เมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 2) พบว่า ตัวอย่างทั้ง 50 ตัวอย่าง รวมทั้ง control มีค่าเฉลี่ยความสูงของดิน จำนวนดิน และ น้ำหนักสดภายในกรอบสี่เหลี่ยมขนาด 25x25 เซนติเมตร และขนาดของใบ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และจากการวิเคราะห์ทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 3) พบว่า ปริมาณรังสีแกมมาต่างกัน มีผลต่อขนาดของใบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่ความสูง จำนวนดินและน้ำหนักสดภายในกรอบสี่เหลี่ยมไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยของความสูง จำนวนต้น และน้ำหนักสดภายในกรอบส้มขนาด 25x25 เซนติเมตร ขนาดของใบของหญ้าแพงโกล่าที่เจริญจากยอดที่ไม่ผ่านและผ่านการฉายรังสีแกมมา ปริมาณต่างๆ ที่ปลูกในสภาพธรรมชาติเป็นเวลา 30 วัน

ปริมาณรังสี (เกรย์)	ความสูงของลำต้น (เซนติเมตร)	จำนวนต้น	น้ำหนักสด (กิโลกรัม)	ความกว้างใบ (เซนติเมตร)	ความยาวใบ (เซนติเมตร)	จำนวนต้น ที่บันทึกผล
0	61.10 ^a	339 ^a	0.41 ^a	0.56 ^{a, b}	20.40 ^a	4
20	63.57 ^a	337 ^a	0.43 ^a	0.58 ^a	17.57 ^b	27
40	62.74 ^a	348 ^a	0.44 ^a	0.58 ^a	17.22 ^b	64
60	63.43 ^a	358 ^a	0.46 ^a	0.58 ^a	17.76 ^b	26
80	61.44 ^a	408 ^a	0.44 ^a	0.51 ^c	15.36 ^b	32
100	61.18 ^a	339 ^a	0.37 ^a	0.53 ^{b, c}	16.17 ^b	26

หมายเหตุ ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan Multiple Test

จากตารางที่ 4 และตารางผนวกที่ 2 ต้องการคัดเลือกตัวอย่างจำนวน 10 ตัวอย่างเพื่อนำไปทดสอบต่อทางด้านโภชนะ โดย 10 ตัวอย่างที่คัดเลือกได้ (ตารางที่ 6) คือ A102/05, B114/01, B501/03, C107/01, C708/08, D111/02, D115/03, D703/01, D704/06 และ E107/02 โดย 6 ตัวอย่างแรกคัดเลือกจากน้ำหนักสดที่ได้ภายในกรอบส้ม เรียงลำดับจากมากไปน้อย คือ B501/03, C708/08, D111/02, D704/06, D115/03 และ B114/01 มีค่าเท่ากับ 0.71, 0.63, 0.62, 0.62, 0.58 และ 0.58 กิโลกรัม ส่วนตัวอย่าง A102/05 และ C107/01 มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดเท่ากับ 0.51 กิโลกรัม ซึ่งมีค่ารองลงมาจาก 6 ตัวอย่างแรก อีก 2 ตัวอย่างที่เหลือคือ D703/01 และ E107/02 มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดเท่ากับ 0.55 และ 0.44 กิโลกรัม แต่เนื่องจากลักษณะภายนอก (morphology) มีลักษณะต้นเล็ก มีระยะห่างระหว่างข้อน้อย ทำให้มีจำนวนใบเฉลี่ยต่อข้อมาก ถึงแม้ลักษณะภายนอกจะมีลักษณะที่ดีกว่า control แต่คาดว่าทั้ง 2 ตัวอย่างนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการทำหญ้าแห้งได้ดีกว่า control หรือตัวอย่างที่ไม่ผ่านการฉายรังสีแกมมา

ตารางที่ 6 รายละเอียดตัวอย่างหญ้าแพงโกล่า 11 ตัวอย่างที่คัดเลือกเพื่อนำไปทำการทดสอบต่อ

ตัวอย่างที่		ตัวอย่างที่	
1	Control	7	D111/02
2	A102/05	8	D115/03
3	B114/01	9	D703/01
4	B501/03	10	D704/06
5	C107/01	11	E107/02
6	C708/08		

หมายเหตุ control หญ้าแพงโกล่าที่ไม่ผ่านการฉายรังสี

A, B, C, D, E ปริมาณรังสีแกมมา 20, 40, 60, 80 และ 100 เกรย์

-x--/-- ต้นที่

--xx/-- หน่อที่

----/xx โคลนที่

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าการคัดเลือกตัวอย่างทั้ง 10 ตัวอย่างคัดเลือกจากค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดภายในกรอบสุ่ม ดังนั้นเมื่อนำข้อมูลต่างๆของตัวอย่างจากตารางที่ 6 ไปทำการวิเคราะห์ทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 4) พบว่า ตัวอย่างทั้ง 11 ตัวอย่างมีค่าเฉลี่ยความสูงของลำต้น จำนวนต้นภายในกรอบสุ่มขนาด 25x25 เซนติเมตร ขนาดของใบของต้นหญ้าแพงโกล่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ขณะที่ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของตัวอย่างทั้งหมดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และสามารถแยกค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของ control ออกจากกลุ่มได้อย่างชัดเจน (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยของความสูง จำนวนต้น และน้ำหนักสดภายในกรอบส้มขนาด 25x25 เซนติเมตร ขนาดของใบของหญ้าแพงโกล่าที่คัดเลือกไว้ 10 ตัวอย่าง ที่ปลูกในสภาพธรรมชาติเป็นเวลา 30 วัน

ปริมาณรังสี (เกรย์)	ความสูงของต้น (เซนติเมตร)	จำนวนต้น	น้ำหนักสด (กิโลกรัม)	ความกว้างใบ (เซนติเมตร)	ความยาวใบ (เซนติเมตร)
control	61.10 ^c	395 ^{b, c}	0.41	0.56 ^{b, c}	20.40 ^{a, b}
A102/05	62.08 ^{b, c}	419 ^{b, c}	0.51	0.56 ^{b, c}	21.82 ^a
B114/01	67.05 ^{a, b, c}	459 ^{b, c}	0.58	0.65 ^a	15.83 ^{b, c, d}
B501/03	65.50 ^{a, b, c}	335 ^{c, d}	0.71	0.62 ^{a, b}	18.40 ^{a, b, c}
C107/01	62.90 ^{a, b, c}	345 ^{c, d}	0.51	0.60 ^{a, b, c}	20.93 ^a
C708/08	69.07 ^{a, b}	516 ^b	0.63	0.61 ^{a, b, c}	13.41 ^d
D111/02	62.00 ^{b, c}	226 ^d	0.62	0.61 ^{a, b, c}	14.54 ^{c, d}
D115/03	66.37 ^{a, b, c}	457 ^{b, c}	0.58	0.53 ^c	19.16 ^{a, b, c, d}
D703/01	40.75 ^d	1,409 ^a	0.55	0.32 ^d	7.54 ^e
D704/06	69.97 ^a	453 ^{b, c}	0.62	0.58 ^{a, b, c}	17.73 ^{a, b, c, d}
E107/02	60.38 ^c	443 ^{b, c}	0.44	0.55 ^{b, c}	15.64 ^{c, d}

หมายเหตุ ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)
เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan Multiple Test

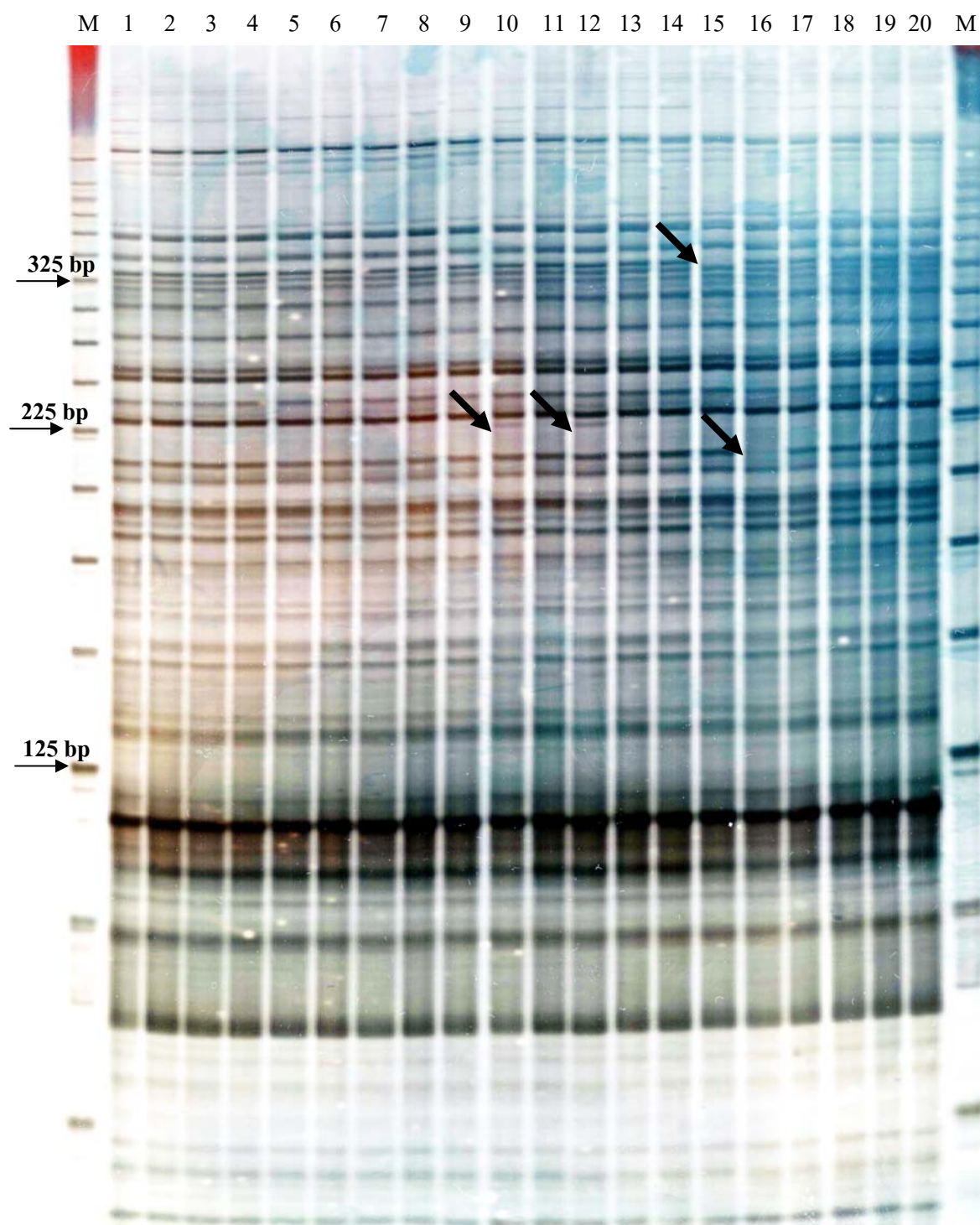
การทดลองที่ 4 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าแพงโกล่าที่ผ่านการฉายรังสี

เมื่อนำดีเอ็นเอจากหญ้าแพงโกล่าที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 3 มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างหญ้าแพงโกล่าปกติ กับหญ้าแพงโกล่าที่รอดจากการฉายรังสีแบบเฉียบพลัน พบว่าจากไพรเมอร์ที่ทดลองใช้จำนวน 64 คู่ มีไพรเมอร์ 11 คู่ ได้แก่ E-AAC กับ M-CAA, E-AAC กับ M-CAT, E-AAC กับ M-CAC, E-AAC กับ M-CTC, E-ACA กับ M-CTA, E-ACA กับ M-CTT, E-ACC กับ M-CTG, E-AGC กับ M-CAC, E-AGG กับ M-CAG, E-AGG กับ M-CTA และ E-AGG กับ M-CTT (ตารางที่ 8) ที่สามารถแสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างต้นปกติกับต้นพันธุ์กลาย โดยตัวอย่างที่ 1 คือ

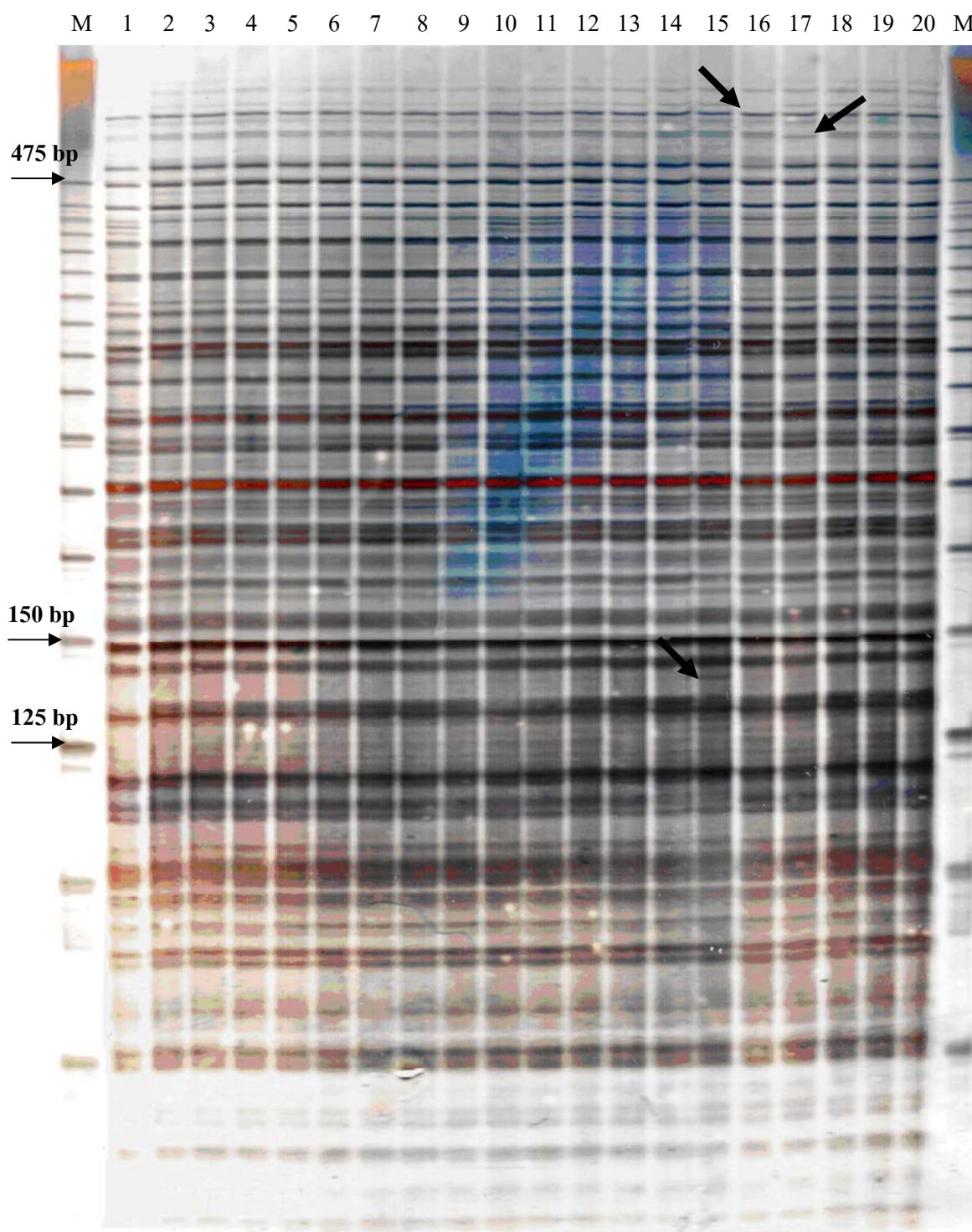
หญ้าแพงโกล่าปกติ และตัวอย่างที่ 2-20 คือหญ้าแพงโกล่าที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน ซึ่งคัดเลือกมาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชอาหารสัตว์ชัยนาท (ภาพที่ 15-25)

ตารางที่ 8 คู่ไพรเมอร์ต่างๆที่ใช้ในการตรวจสอบเอเอฟแอลพี

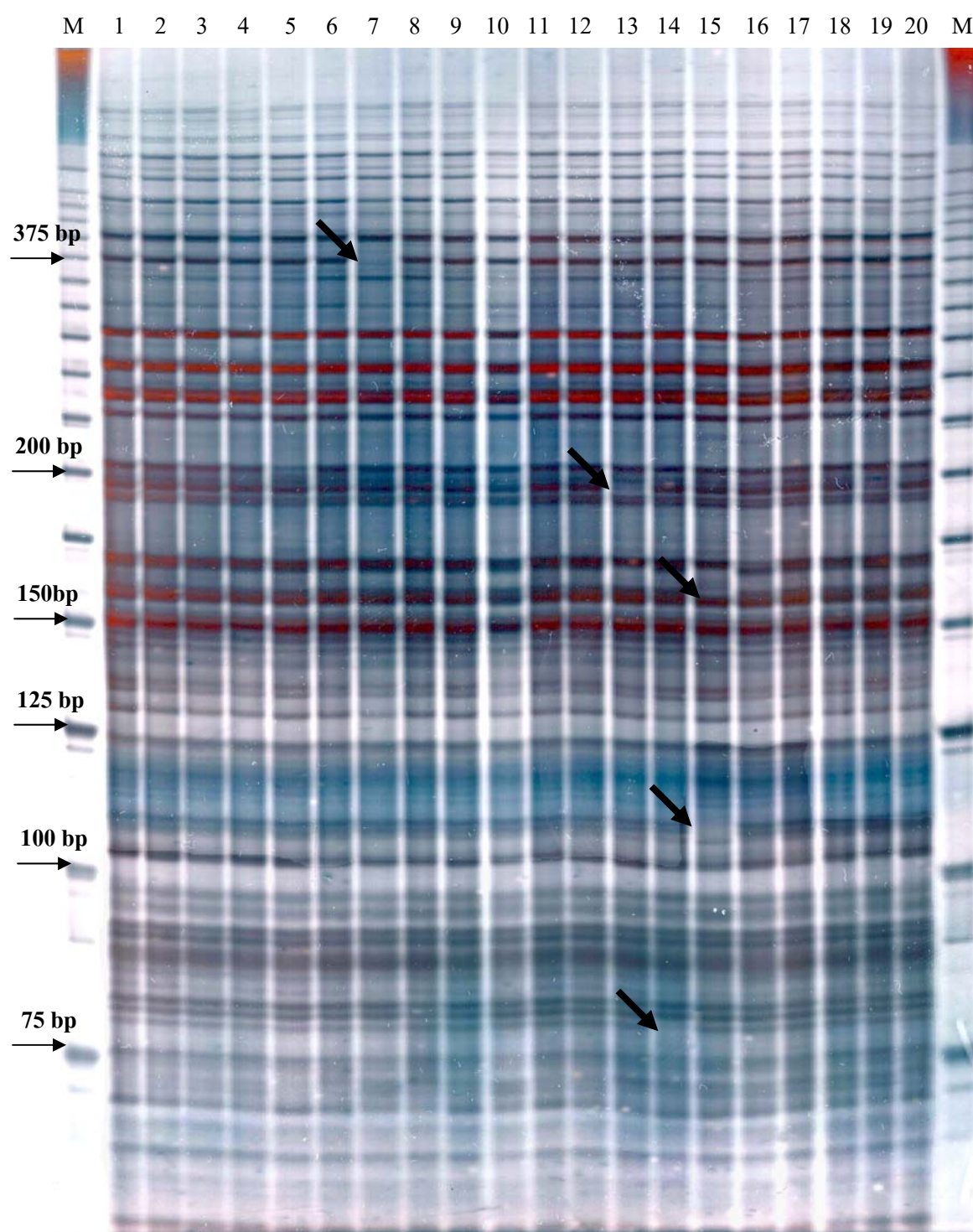
primer	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
	AAC	AAG	ACA	ACT	ACC	ACG	AGC	AGG
M1 CAA	*							
M2 CAT	*							
M3 CAC	*						*	
M4 CAG								*
M5 CTA			*					*
M6 CTT			*					*
M7 CTC	*							
M8 CTG					*			



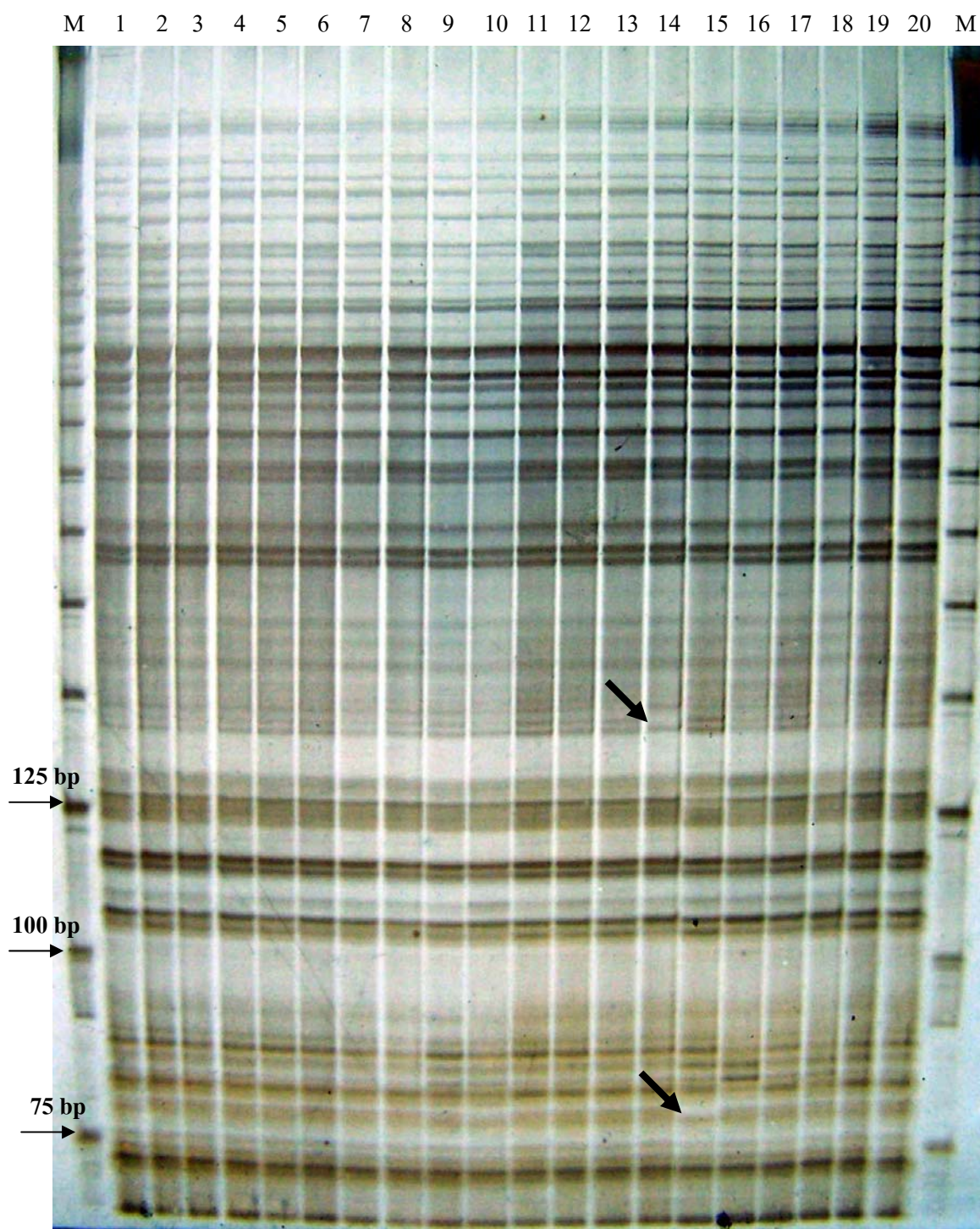
ภาพที่ 15 ลายพิมพ์แอฟแอลพีของหญ้าที่ได้จากตู้ไพรเมอร์ E-AAC กับ M-CAA
 ตัวอย่างที่ 1 เป็นดีเอ็นเอจากหญ้าแพงโกล่าปกติ
 ตัวอย่างที่ 2-20 เป็นดีเอ็นเอจากหญ้าแพงโกล่าที่ฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่างๆกัน
 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 base pair ladder



ภาพที่ 16 ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของหนูที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-AAC กับ M-CAT
 ตัวอย่างที่ 1 เป็นดีเอ็นเอจากหนูแพงโกล่าปกติ
 ตัวอย่างที่ 2-20 เป็นดีเอ็นเอจากหนูแพงโกล่าที่ฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่างๆกัน
 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 base pair ladder



ภาพที่ 17 ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของหนูที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-AAC กับ M-CAC
 ตัวอย่างที่ 1 เป็นดีเอ็นเอจากหนูแพงโกล่าปกติ
 ตัวอย่างที่ 2-20 เป็นดีเอ็นเอจากหนูแพงโกล่าที่ฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่างๆกัน
 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 base pair ladder

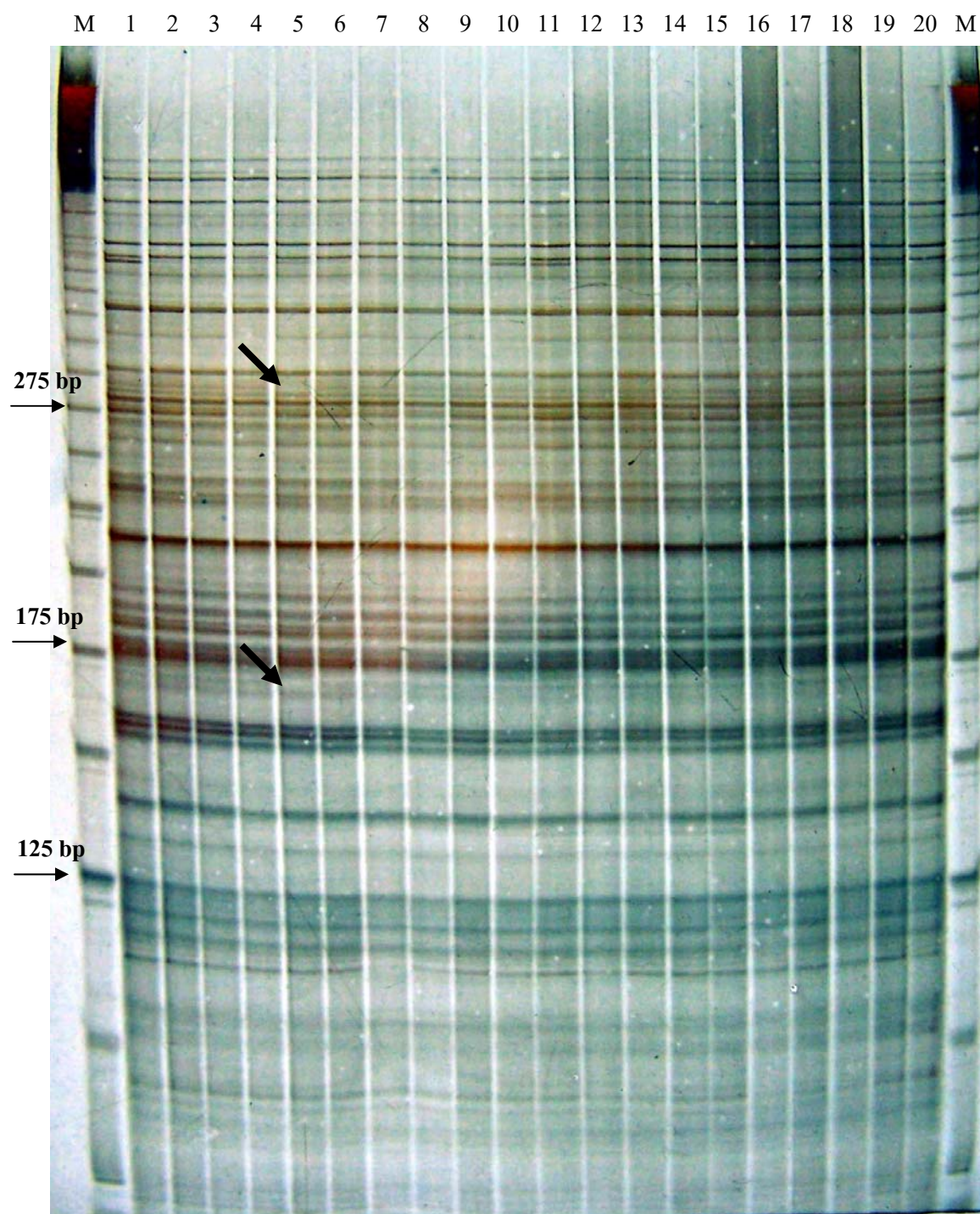


ภาพที่ 18 ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของหญ้าที่ได้จากตู้ไพรเมอร์ E-AAC กับ M-CTC

ตัวอย่างที่ 1 เป็นดีเอ็นเอจากหญ้าแพงโกล่าปกติ

ตัวอย่างที่ 2-20 เป็นดีเอ็นเอจากหญ้าแพงโกล่าที่ฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่างๆกัน

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 base pair ladder

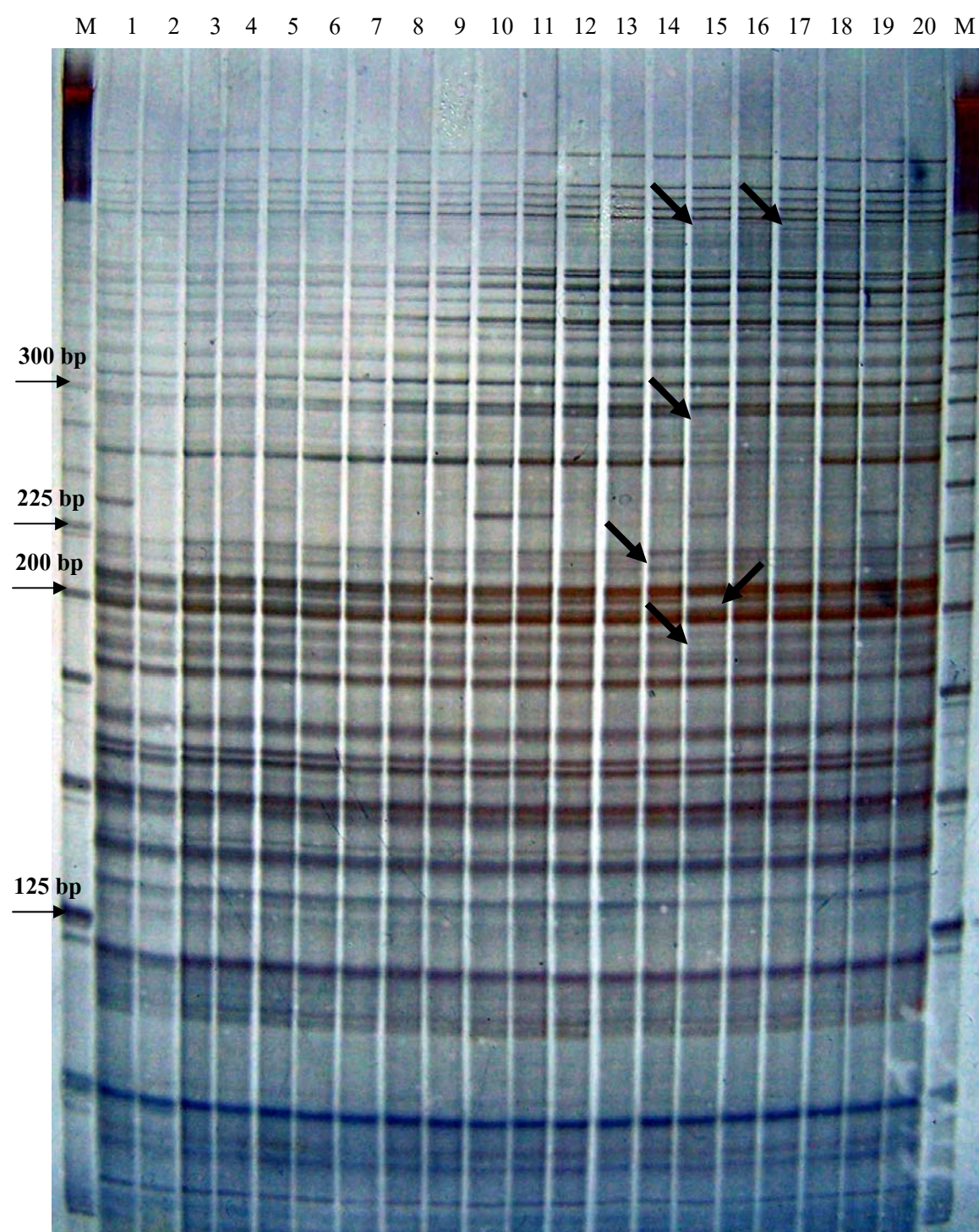


ภาพที่ 19 ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของหญ้าที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-ACA กับ M-CTA

ตัวอย่างที่ 1 เป็นดีเอ็นเอจากหญ้าแพงโกล่าปกติ

ตัวอย่างที่ 2-20 เป็นดีเอ็นเอจากหญ้าแพงโกล่าที่ฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่างๆกัน

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 base pair ladder

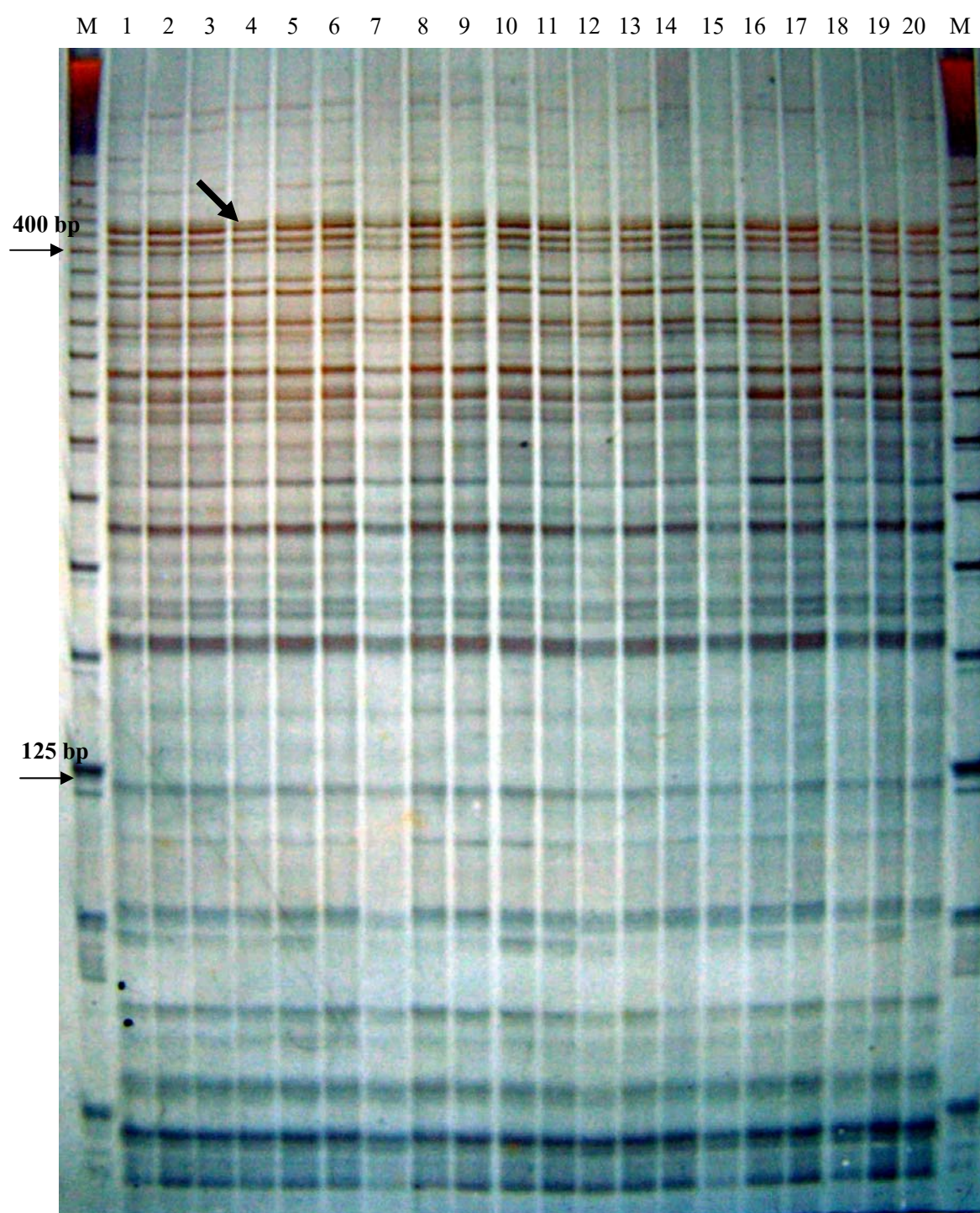


ภาพที่ 20 ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของหนูที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-ACA กับ M-CTT

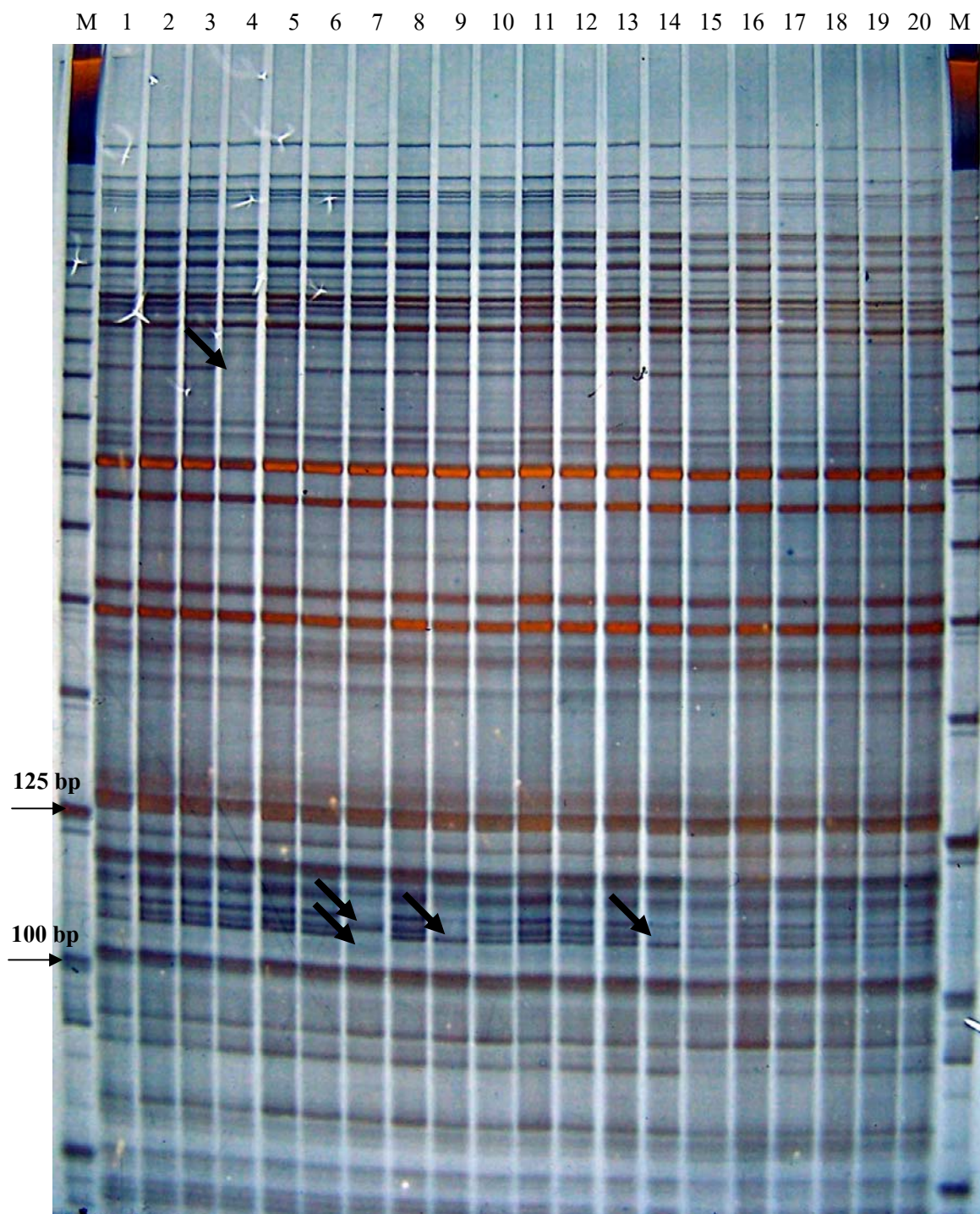
ตัวอย่างที่ 1 เป็นดีเอ็นเอจากหนูแพงโกล่าปกติ

ตัวอย่างที่ 2-20 เป็นดีเอ็นเอจากหนูแพงโกล่าที่ฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่างๆกัน

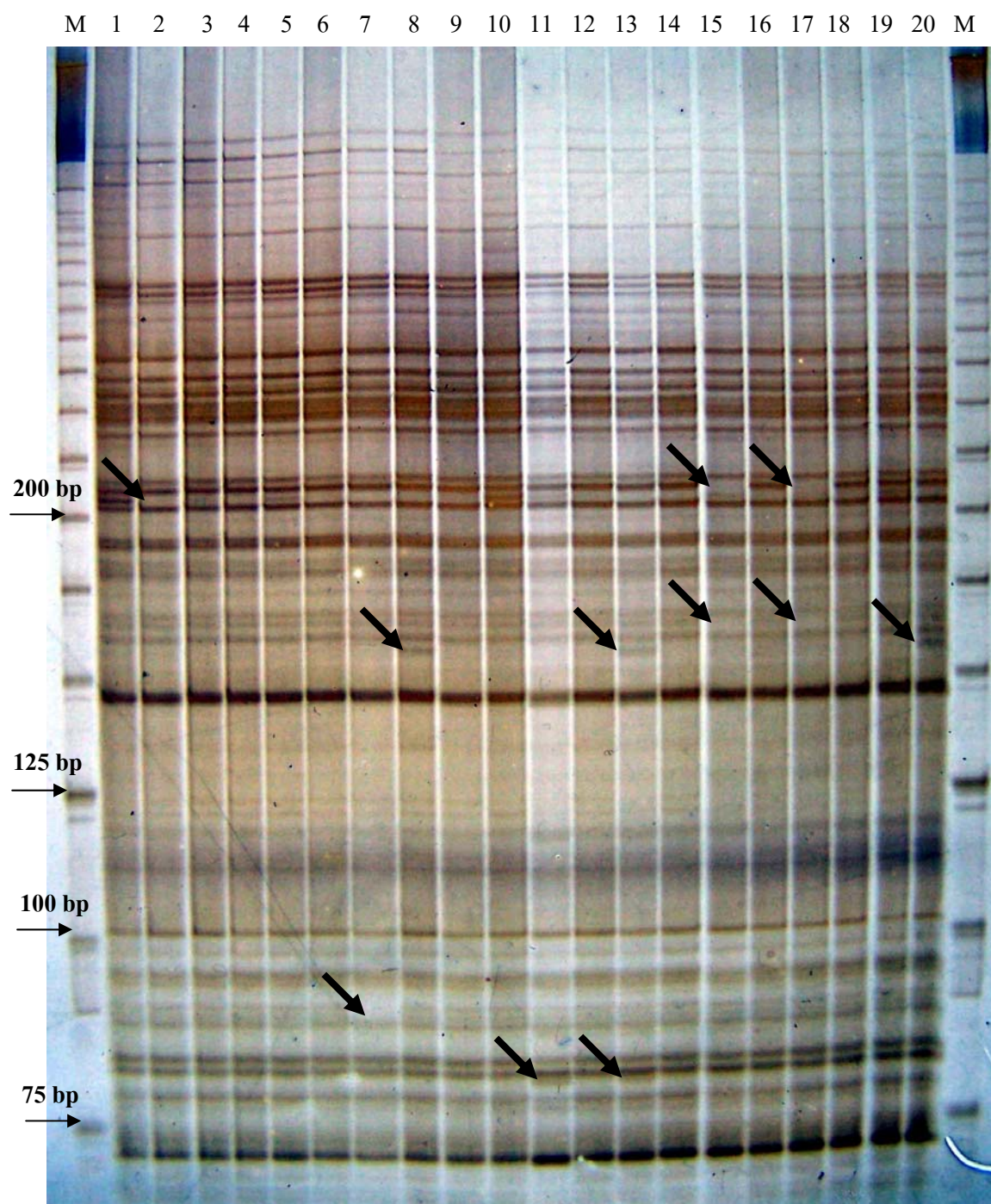
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 base pair ladder



ภาพที่ 21 ลายพิมพ์แอฟแอลพีของหญ้าที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-ACC กับ M-CTG
 ตัวอย่างที่ 1 เป็นดีเอ็นเอจากหญ้าแพงโกล่าปกติ
 ตัวอย่างที่ 2-20 เป็นดีเอ็นเอจากหญ้าแพงโกล่าที่ฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่าง ๆ กัน
 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 base pair ladder



ภาพที่ 22 ลายพิมพ์เอฟแอลพีของหนูที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-AGC กับ M-CAC
 ตัวอย่างที่ 1 เป็นดีเอ็นเอจากหนูแพงโกล่าปกติ
 ตัวอย่างที่ 2-20 เป็นดีเอ็นเอจากหนูแพงโกล่าที่ฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่างๆกัน
 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 base pair ladder

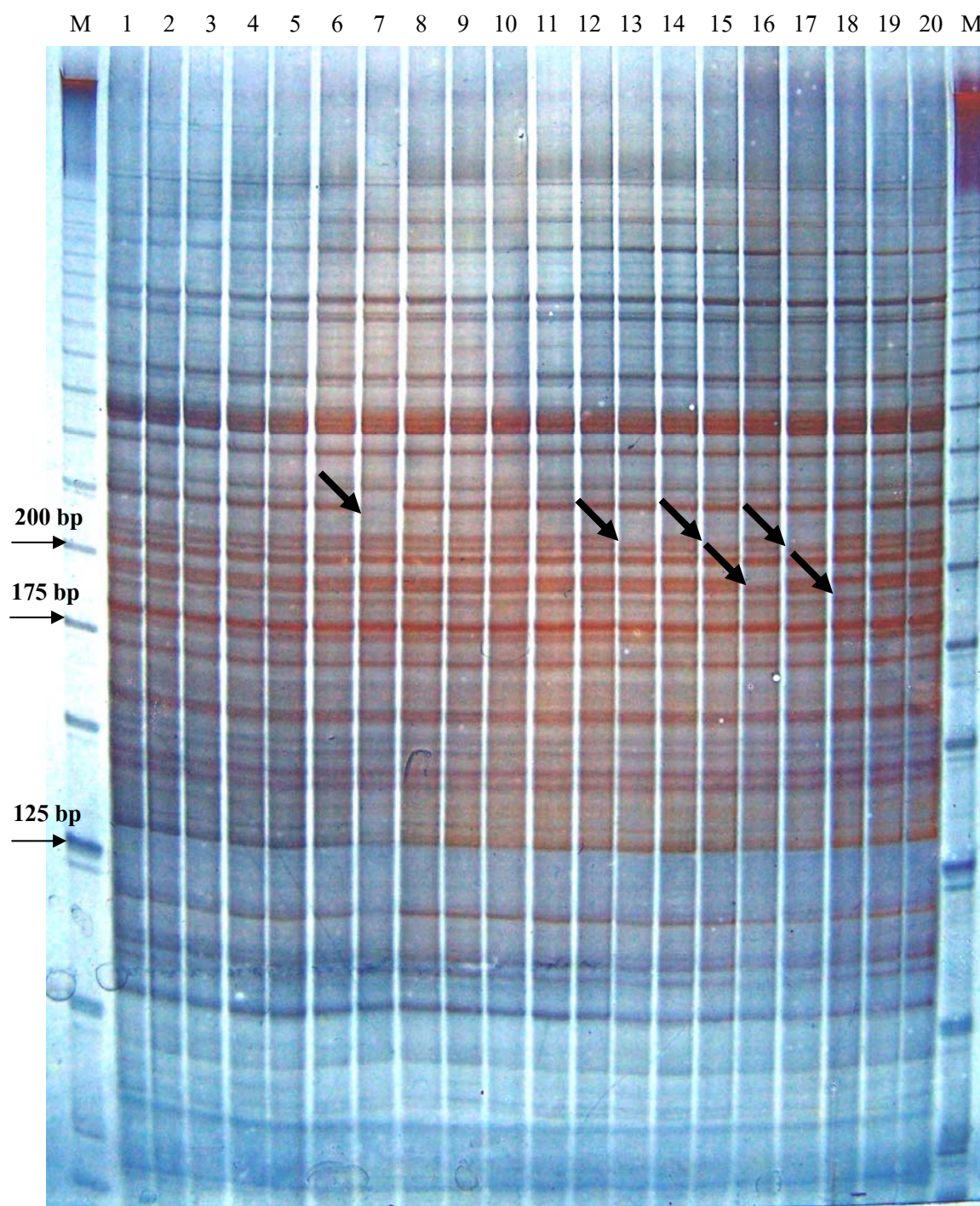


ภาพที่ 23 ลายพิมพ์แอฟแอลพีของหนูที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-AGG กับ M-CAG

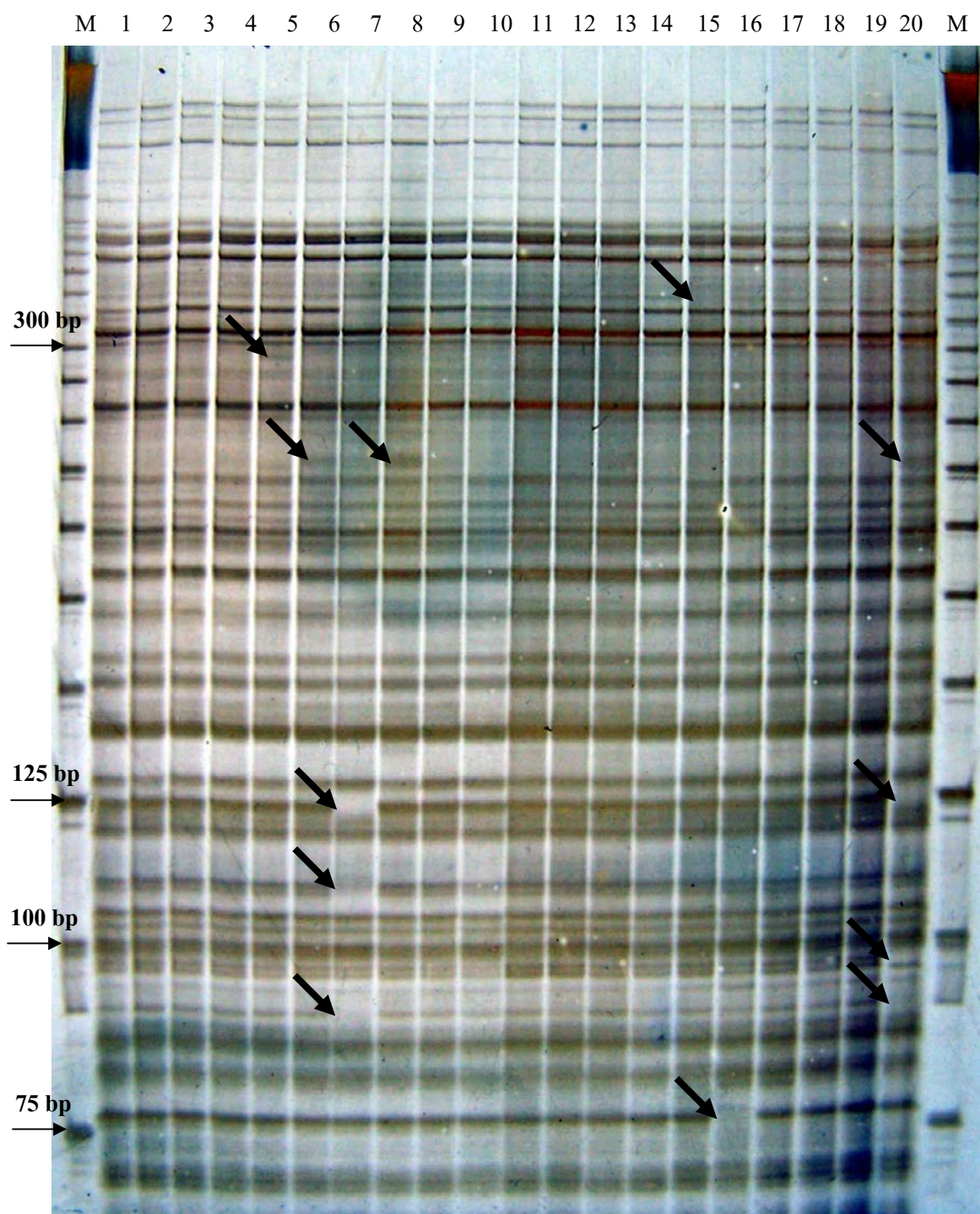
ตัวอย่างที่ 1 เป็นดีเอ็นเอจากหนูแพงโกล่าปกติ

ตัวอย่างที่ 2-20 เป็นดีเอ็นเอจากหนูแพงโกล่าที่ฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่างๆกัน

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 base pair ladder



ภาพที่ 24 ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของหนูที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-AGG กับ M-CTA
 ตัวอย่างที่ 1 เป็นดีเอ็นเอจากหนูแพงโกล่าปกติ
 ตัวอย่างที่ 2-20 เป็นดีเอ็นเอจากหนูแพงโกล่าที่ฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่างกัน
 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 base pair ladder



ภาพที่ 25 ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของหนูที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-AGG กับ M-CTT

ตัวอย่างที่ 1 เป็นดีเอ็นเอจากหนูแพงโกล่าปกติ

ตัวอย่างที่ 2-20 เป็นดีเอ็นเอจากหนูแพงโกล่าที่ฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่างๆกัน

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 base pair ladder

จากภาพที่ 15-25 เป็นภาพถ่ายพิมพ์ดีเอ็นเอของคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 11 คู่ที่ใช้ในการหาความแตกต่างระหว่างหญ้าแพงโกล่าปกติ (ตัวอย่างที่ 1) กับหญ้าแพงโกล่าที่รอดชีวิตจากการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน (ตัวอย่างที่ 2-20)

คู่ไพรเมอร์ E-AAC กับ M-CAA (ภาพที่ 15) สามารถจำแนกได้ 4 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 10 และ 12 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 225 คู่เบส เพิ่มขึ้นมา ส่วนตัวอย่างที่ 15 และ 16 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 330 คู่เบส และ 210 คู่เบสหายไปตามลำดับ

คู่ไพรเมอร์ E-AAC กับ M-CAT (ภาพที่ 16) สามารถจำแนกได้ 3 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 15 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 140 คู่เบส เพิ่มขึ้นมา ส่วนตัวอย่างที่ 16 กับ 17 แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่า 475 คู่เบส ขาดหายไปทั้ง 2 ตัวอย่าง

คู่ไพรเมอร์ E-AAC กับ M-CAC (ภาพที่ 17) สามารถจำแนกได้ 3 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 7, 13 และ 14 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 375 คู่เบส, 195 คู่เบส และ 80 คู่เบส ขาดหายไป ตามลำดับ ส่วนในตัวอย่างที่ 15 มีตำแหน่งที่ขาดหายไปทั้งหมด 3 ขนาดคือ ขนาด 110 คู่เบส, 112 คู่เบส และ 160 คู่เบส

คู่ไพรเมอร์ E-AAC กับ M-CTC (ภาพที่ 18) สามารถจำแนกได้ 2 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 14 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 140 คู่เบส ขาดหายไป และแถบดีเอ็นเอขนาด 80 คู่เบส ของตัวอย่างที่ 15 ขาดหายไป

คู่ไพรเมอร์ E-ACA กับ M-CTA (ภาพที่ 19) จำแนกตัวอย่างที่ 5 ได้เพียงตัวอย่างเดียวโดยมีแถบดีเอ็นเอที่ขาดหายไป 2 แถบคือ แถบดีเอ็นเอขนาด 170 คู่เบส และ 290 คู่เบส

คู่ไพรเมอร์ E-ACA กับ M-CTT (ภาพที่ 20) สามารถจำแนกได้ 3 ตัวอย่างคือ ตัวอย่างที่ 14, 15 และ 17 โดย ตัวอย่างที่ 14 พบว่ามีแถบดีเอ็นเอขนาด 220 คู่เบส ขาดหายไป ในขณะที่ตัวอย่างที่ 15 มีแถบขนาด 185 คู่เบสเพิ่มขึ้นมา และมีแถบดีเอ็นเอขาดหายไป 3 ตำแหน่ง คือ 205 คู่เบส, 290 คู่เบส และ 480 คู่เบส ซึ่งตำแหน่งที่ 480 คู่เบส ของตัวอย่างที่ 15 ที่ขาดหายไปเป็นตำแหน่งเดียวกันกับในตัวอย่างที่ 17

คู่ไพรเมอร์ E-ACC กับ M-CTG (ภาพที่ 21) สามารถจำแนกได้เพียงตำแหน่งเดียวของ ตัวอย่างที่ 4 คือ แลบดีเอ็นเอขนาด 410 คู่เบส ขาดหายไป

คู่ไพรเมอร์ E-AGC กับ M-CAC (ภาพที่ 22) สามารถจำแนกได้ 3 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 7, 9 และ 14 โดย ในตัวอย่างที่ 7 มีตำแหน่งของแลบดีเอ็นเอที่ขาดหายไป 2 ขนาด คือ 110 คู่เบส กับ 115 คู่เบส ในส่วนของตัวอย่างที่ 9 และ 14 มีขนาดของแลบดีเอ็นเอที่ขาดหายไปเหมือนกันคือ 112 คู่เบส

คู่ไพรเมอร์ E-AGG กับ M-CAG (ภาพที่ 23) ไพรเมอร์คู่นี้เป็นคู่ที่จำแนกตัวอย่างได้มากที่สุดจากทั้งหมด 11 คู่ โดยสามารถจำแนกตัวอย่างได้ทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ซึ่งมีทั้งแลบดีเอ็นเอที่ขาดหายไปและแลบดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นมา โดยตัวอย่างที่ 2 พบว่ามีแลบดีเอ็นเอที่ขาดหายไปในตำแหน่งที่ 210 คู่เบส ในขณะที่ตัวอย่างที่ 7 และ 8 มีแลบดีเอ็นเอตำแหน่งที่ 90 คู่เบส และ 160 คู่เบส ขาดหายไปตามลำดับ ส่วนในตัวอย่างที่ 11 และ 13 มีตำแหน่งที่ 80 คู่เบส เพิ่มขึ้นเหมือนกัน แต่ในตัวอย่างที่ 13 มีเพิ่มขึ้นมาอีก 1 ตำแหน่งคือ แลบดีเอ็นเอขนาด 160 คู่เบส นอกจากนี้ยังพบอีกว่าในตัวอย่างที่ 15 และ 17 มีแลบดีเอ็นเอขนาด 165 และ 215 คู่เบส ขาดหายไปเหมือนกัน และสุดท้าย ตัวอย่างที่ 20 พบว่ามีตำแหน่งของแลบดีเอ็นเอขนาด 160 คู่เบส เพิ่มขึ้นมา

คู่ไพรเมอร์ E-AGG กับ M-CTA (ภาพที่ 24) สามารถจำแนกได้ 6 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 7, 13, 15, 16, 17 และ 18 โดยตัวอย่างที่ 7 พบว่าแลบดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ 225 คู่เบส ขาดหายไป ตัวอย่างที่ 13, 15 และ 17 พบว่าแลบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันที่มีขนาด 215 คู่เบส ขาดหายไป ตัวอย่างที่ 16 พบว่าแลบดีเอ็นเอขนาด 200 คู่เบส ขาดหายไป และตัวอย่างที่ 18 พบการขาดหายไปของแลบดีเอ็นเอขนาด 195 คู่เบส

คู่ไพรเมอร์ E-AGG กับ M-CTT (ภาพที่ 25) สามารถจำแนกตัวอย่างได้ 7 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 5, 6, 7, 8, 15, 16 และ 20 โดยตัวอย่างที่ 5 พบว่ามีแลบดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ 290 คู่เบส เพิ่มขึ้นมา ตัวอย่างที่ 6, 8 และ 20 พบว่ามีแลบดีเอ็นเอขนาด 230 คู่เบส เพิ่มขึ้นเหมือนกันทั้ง 3 ตัวอย่าง ในส่วนของตัวอย่างที่ 20 ยังพบการขาดหายไปของแลบดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ 90 คู่เบส และ 125 คู่เบส เหมือนกันกับในตัวอย่างที่ 7 โดยในตัวอย่างที่ 7 ยังพบการขาดหายไปของแลบดีเอ็นเอขนาด 110 คู่เบส นอกจากนี้ในตัวอย่างที่ 20 ยังพบว่าเกิดการขาดหายไปของแลบดีเอ็นเอ

ขนาด 96 คู่เบส และยังพบการขาดหายไปของแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ 340 คู่เบส ของตัวอย่างที่ 15 และ 80 คู่เบส กับ 195 คู่เบส ของตัวอย่างที่ 16 โดยสรุปผลรวมทั้งหมดได้ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงการจำแนกตัวอย่างของคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 11 คู่

คู่ไพรเมอร์	ตัวอย่างที่แยกได้	แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น(bp)	แถบดีเอ็นเอที่หายไป(bp)
E-AAC/M-CAA	10,12	225	
	15		330
	16		210
E-AAC/M-CAT	15	140	
	16		ขนาดใหญ่กว่า 475
	17		ขนาดใหญ่กว่า 475
E-AAC/M-CAC	7		375
	13		195
	14		80
	15		110, 112, 160
E-AAC/M-CTC	14		140
	15		80
E-ACA/M-CTA	5		170, 290
E-ACA/M-CTT	14		220
	15	185	205, 290, 480
	17		480
E-ACC/M-CTG	4		410
E-AGC/M-CAC	7		110, 115
	9		112
	14		112
E-AGG/M-CAG	2		210
	7		90
	8	160	
	11	80	

ตารางที่ 6 (ต่อ)

คู่ไพรเมอร์	ตัวอย่างที่แยกได้	แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น(bp)	แถบดีเอ็นเอที่หายไป(bp)
	13	80, 160	
	15		165, 215
	17		165, 215
	20	160	
E-AGG/M-CTA	7		225
	13		215
	15		215
	16		200
	17		215
	18		195
E-AGG/M-CTT	5	290	
	6	230	
	7		90, 110, 125
	8	230	
	15		340
	16		80, 195
	20	230	90, 96, 125

จากตารางที่ 9 พบว่า คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 11 คู่ คือ E-AGG กับ M-CAG, E-AGG กับ M-CTT, E-AGG กับ M-CTA, E-AAC กับ M-CAC, E-AAC กับ M-CAA, E-ACA กับ M-CTT, E-AGC กับ M-CAC, E-AAC กับ M-CAT, E-AAC กับ M-CTC, E-ACA กับ M-CTA และ E-ACC กับ M-CTG เรียงลำดับจากคู่ไพรเมอร์ที่จำแนกตัวอย่างได้ตั้งแต่มากที่สุดจนถึงจำแนกตัวอย่างได้น้อยที่สุด โดยคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 11 คู่นี้สามารถจำแนกความแตกต่างของหนูแพงโกล่าได้ 18 ตัวอย่างจากจำนวน 20 ตัวอย่าง โดยมี 2 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 3 และ 19 ที่ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างได้ โดยพันธุ์กลายบางตัวอย่างสามารถจำแนกได้ด้วยไพรเมอร์เพียงคู่เดียว แต่บางตัวอย่างต้องใช้ไพรเมอร์หลายคู่ร่วมด้วยจึงสามารถจำแนกได้

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 9) แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างของหญ้าแพงโกล่าที่นำมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีมีความแตกต่างกันน้อยมาก แสดงว่าเกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าแพงโกล่าที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาจริง แต่อัตราการเกิดอาจจะน้อย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่ 2 ที่พบว่าเปอร์เซ็นต์การตาย (LD_{50}) ของหญ้าแพงโกล่ามีค่าสูง หมายความว่า หญ้าแพงโกล่าสามารถทนต่อรังสีได้สูง จึงทำให้อัตราการกลายพันธุ์ต่ำ แต่ถ้าใช้รังสีแกมมาในปริมาณสูงอาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์มาก แต่อัตราการรอดชีวิตของหญ้าจะลดต่ำลง และจากผลการทดลองดังกล่าวยังพบว่ามีตัวอย่าง 2 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 3 และ 19 ที่ยังไม่สามารถจำแนกได้ด้วยไพรเมอร์ทั้ง 11 คู่ อาจเกิดจากการที่ตัวอย่างดังกล่าวเกิดการกลายพันธุ์น้อยมาก จึงยังไม่สามารถตรวจพบได้ อาจต้องใช้จำนวนคู่ไพรเมอร์เพิ่มมากขึ้น

ผลการทดลองนี้แตกต่างจากของ Cruz *et al.* (1991) ที่ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าเนเปียร์ยักษ์ร่วมกับการฉายรังสีแกมมา เมื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอและวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสพบว่าหญ้าแต่ละต้นมีจำนวนและแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน แสดงว่ามีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น ต่อมา กฤษณา (2546) รายงานว่าการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างหญ้าเนเปียร์ปกติ กับหญ้าเนเปียร์ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา พบว่าตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความแตกต่างกันมาก และแตกต่างจากตัวอย่างที่ไม่ผ่านการฉายรังสีอย่างชัดเจน แสดงว่าเกิดการกลายพันธุ์ของพืชตัวอย่างเป็นอย่างมาก

สรุปผลการทดลอง

1. อาหารสูตรที่เหมาะสมในการชักนำข้อของหนูแพงโกล่าให้เกิดยอดหลายยอดคือ อาหารสูตร MS ที่เติม BAP 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อข้อเท่ากับ 13.05 ซึ่งมีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อข้อใกล้เคียงกับอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และยอดที่ได้จากอาหารสูตรนี้มีลักษณะดี
2. ปริมาณรังสีที่ทำให้เกิดการตายที่ 50 เปอร์เซนต์ (LD_{50}) ได้เท่ากับ 80.9 เกรย์ โดยวิเคราะห์จากการหาค่า Regression Analysis ซึ่งมีค่า linear regression คือ $y = -0.514x + 106.6$, $R = 0.777$
3. อาหารสูตรที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้ต้นหนูแพงโกล่าเกิดรากได้มากที่สุด คือ อาหารสูตร MS ที่เติมถ่านปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร
4. จากการนำหนูแพงโกล่าออกปลูกที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชอาหารสัตว์ชัยนาท เป็นเวลา 45 วัน สามารถคัดเลือกหนูแพงโกล่าที่คาดว่าจะเกิดการกลายพันธุ์และมีลักษณะที่ต้องการได้ทั้งหมด 19 โคลน โดยในจำนวนที่คัดเลือกมา มีทั้งหมด 6 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 2, 3, 6, 10, 11 และ 12 ที่มีลักษณะภายนอกดีกว่า control ทุกลักษณะ คือ มีขนาดใบใหญ่กว่า มีปริมาณไหลและมีการแตกกอดีกว่า ลักษณะลำต้นตั้งตรงมากกว่า control ส่วนตัวอย่างที่มีลักษณะเพียง 1-2 ลักษณะดีกว่า control เช่น ตัวอย่างที่ 15, 19 หรือไม่มีลักษณะที่ดีกว่า control เลย ตัวอย่างที่ 14 ที่คัดเลือกไว้ เพราะคาดว่าลักษณะที่กลายที่แตกต่างจาก control สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการทำหนูแพงโกล่าได้ดีกว่าหนูแพงโกล่าปกติ
5. จากการนำดีเอ็นเอของหนูแพงโกล่าปกติ และหนูแพงโกล่าที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา มาตรวจสอบโดยเทคนิคเอฟแอลพีปรากฏว่า สามารถจำแนกตัวอย่างได้ 18 ตัวอย่างจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 20 ตัวอย่าง จากคูไพรเมอร์ 11 คู่ โดยแต่ละคู่พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันจำนวนมาก โดยคูไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกตัวอย่างได้มากที่สุด คือ คู่ E-AGG กับ M-CAG ที่สามารถจำแนกตัวอย่างได้ทั้งหมด 8 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 2, 7, 8, 11, 13, 15, 17 และ 20 โดยพบทั้งแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นมา และแถบดีเอ็นเอที่ขาดหายไป ส่วนคูไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของ

ตัวอย่างน้อยที่สุดคือ คู่ E-ACC กับ M-CTG ให้ความแตกต่างเพียงตำแหน่งเดียวคือ แถบดีเอ็นเอ
ขนาด 410 คู่เบส ของตัวอย่างที่ 4 ที่ขาดหายไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กมลพรรณ นามวงศ์พรหม, มาลี ณ นคร, วงจันทร์ วงศ์แก้ว และ วีระชัย ณ นคร. 2535. การขยายท่อนพันธุ์แฟกหอมในหลอดทดลอง, น. 725-729. ใน รายงานการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 30. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- กฤษณา โกวิทวณิช. 2546. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชอาหารสัตว์บางชนิด และตรวจสอบพันธุ์กลายที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยรังสีโดยเทคนิค AFLP. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จันทกานต์ อรณนันท. 2544. การชักนำการกลายพันธุ์ในหญ้าเนเปียร์แคระโดยรังสีแกมมา ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศิริฎา มานะวิบูลย์. 2545. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าหูกช้างโดยรังสีแกมมา ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชนภัทช์ อินชอด. 2545. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าอะตราตัมโดยรังสีแกมมา ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- มโนชัย จงรักวิทย์. 2539. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าแฝก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- รังสฤษฎ์ กาวิต๊ะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่นา, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ลิลลี่ กาวิต๊ะ. 2546. การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานและพัฒนาการของพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

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

วิภาสรี ทิวสมบุญ. 2546. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าชิกแนลนอนโดยรังสีแกมมา ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สายนธ์ ทัดศรี, นิพนธ์ ภาชนะวรรณ, นิรันดร์ บำรุง และหยาง เจิ้งไ่. (2539 ก). อิทธิพลของปุ๋ย ไนโตรเจนและการตัดต่อผลผลิตและคุณภาพของหญ้าแพงโกล่า. **ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.)** 32 : 21-32

สายนธ์ ทัดศรี, นิพนธ์ ภาชนะวรรณ, นิรันดร์ บำรุง และหยาง เจิ้งไ่. (2539ข). ผลกระทบของความถี่และความสูงของการตัดต่อผลผลิตและคุณภาพของหญ้าแพงโกล่า. **ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.)** 32 : 265-267

สายนธ์ ทัดศรี. 2546. **พืชอาหารสัตว์เขตร้อน**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุพรรณนิภา เสี่ยงสาย. 2549. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ105 ให้ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งโดยวิธีผสมกลับและการเพาะเลี้ยงอับเรณูร่วมกับการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

สุมล นิลรัตน์นิศากร. 2546. ผลของรังสีแกมมา ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีต่อการเจริญเติบโตของหญ้ากินนีสีม่วง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอฟแอลพี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

- อรดี สหวัชรินทร์. 2539. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Agrawal, G.R., R.N. Pandey and V.P.A. Agrawal. 1992. Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris*. **Biotech. Biodiv. Lett.** 2: 19-24.
- Aggarwal, R.K., D.S. Brar, S. Nandi, N. Huang and G.S. Khush. 1999. Phylogenetic relationship among *Oryza* species revealed by AFLP markers. **Theor. Appl. Genet.** 98: 1320-1328.
- Aguado-Santacruz, G.A., J.L. Cabrera-Ponce, V. Olade-Portugal, M.R. Sanchez-Gonzalez, J. Marquez-Guzman and L. Herrera-Estrella. 2001. Tissue culture and plant regeneration of blue gramma grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. ex Steud. **In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant.** 37: 182-189.
- Ahn, B. J., J.W. King and F. H. Huang. 1988. Common bermudagrass. [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] pp. 458-469. In Y. P. S. Bajaj (ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Vol. 6 : Crops II. Springer Verlag, Berlin.
- Akashi, R. and T. Adachi. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured immature inflorescence of apomictic dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Poir.). **Plant Sci.** 82: 213-218.
- Bajaj, Y.P.S. 1988. Elephant grass, napier grass (*Pennisetum purpureum* Schum.), pp. 470-481 In Y.P.S. Bajaj (ed). **Biotechnology in Agriculture and Forestry** Vol. 6: Crops II. Springer Verlag, Berlin.
- Bottini, M.C.J., A. De Bustos, N. Jouve and L. Poggio. 2002. AFLP characterization of natural populations of *Berberis* (Berberidaceae) in Patagonia, Argentina. **Plant Syst. Evol.** 231: 133-142.

- Bovo, O. A., L.A. Mroginski and C. Quarin. 1988. *Paspalum* spp. pp. 495-503. In Y.P.S. Bajaj (ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Vol.6 : Crops II. Springer Verlag, Berlin.
- Capo-chichi, L.J.A., D.B. Weaver and C.M. Morton. 2001. AFLP assessment of genetic variability among velvet bean (*Mucuna* sp.) accessions. **Theor. Appl. Genet.** 103: 1180-1188.
- Cervera, M.T., J. Gusmao, M. Steenackers, J. Peleman, B. Storme, A. Van der Broeck, M. Van Montagu and W. Boerjan. 1996. Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora laricipopulina* in *Populus*. **Theor. Appl. Genet.** 93: 733-737.
- Chaudhury, A. and Qu. Rongda. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type Bermuda grass : effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 60 : 113-120.
- Cnop, G., B. Den Boer, A. Gerats, M. Van Montagu and M. Van Lijsebettens. 1996. Chromosome landing at the *Arabidopsis* *TORNADO1* locus using an AFLP-based strategy. **Mol. Gen. Genet.** 253: 32-41.
- Corradini, P., C. Edelin, A. Bruneau and A. Bouchard. 2002. Architectural and genotypic variation in the clonal shrub *Taxus Canadensis* as determined from random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism. **Canadian J. Bot.** 80:205-219.
- Cruze, R., R.S. Herrera, E. Padron, R.O. Martinez, M. Monzote, R. Tuero and M. Garcia. 1991. Effect of gamma radiation in *Pennisetum purpureum* cv. King grass, *Cynodon nlemfuensis* cv. Jamaican and *Leucaena leucocephala* cv. Peru. **Cuban J. Agr. Sci.** 25: 301-306.

- Dalton, S. J. and P. J. Dale. 1981. Induce tillering of *Lolium mutiflorum in vitro*. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 1: 57-64.
- Debora I, P., C.G. Robredo, R.D. Rios and P. Rimieri. 2001. Genetic variability measures among *Bromus catharticus* Vahl. Populations and cultivars with RAPD and AFLP marker. **Euphytica** 121: 229-236.
- Denchev, P.D. and B.V. Conger. 1994. Plant regeneration from callus cultures of swithgrass. **Crop Sci.** 34: 1623-1627.
- Dodds, J.H. and L.W. Roberts. 1995. **Experiments in Plant Tissue Culture**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Echenque, V., P. Polci and L. Mrogiski. 1996. Plant regeneration in weeping lovergrass (*Eragrostis curvala*) through inflorescence culture. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 46: 123-130.
- Engelborghs, I., S. Campenhout and R. Swennen. 1998. The potential of AFLP to detect genetic differences and somaclonal variants in *Musa* spp. **Infomusa** 7(2): 3-6.
- Gallardo-Williams, M.T., C.L. Geiger, J.A. Pidala and D.F. Martin. 2002. Esssential fatty acids and phenolic acids from extracts and leachates of southern cattail (*Typha domingensis* P.). **Phytochemistry** 59: 305-308.
- Grant , D. nand R. Shoemaker. 1997. Molecular hybridization, pp. 15-26. *In* G. Caetano-Anolles and P.M. Gresshaf (eds.). **DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews**. Wiley-Liss Inc., New York.

- Gunnar F., M. Pedersen, L-E. Landstrom and T. Eriksson. 1978. The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. **Physiol. Plant.** 43:104-106.
- Hisajima, S., P. Chopngpraditium and Y. Arai. 1987. Microplant propagation of rice plant *in vitro*. **Japan J. Trop. Agr.** 31(2): 12-15.
- Karp, A. and K.T. Edwards. 1997. DNA marker: a global overview, pp. 1-13. *In* G. Caetano-Anolles and P.M. Gresshoff(eds.). **DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews.** Wiley-Liss Inc., New York.
- Kim, M.S., P.H. Moore, F. Zee, M.M.M. Fitch, D.L. Steiger, R.M. Manshardt, R.E. Paull, R.A. Drew, T. Sekioka and R. Ming. 2002. Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP marker. **Genome** 45: 503-512.
- Krishnamoorthy, H.N. 1981. **Plant Growth Substance.** Tata McGraw-Hill Publishing Co., Ltd., New Delhi.
- Lajonchere, G., A.R. Mesa, M. Prieto and O. Toral. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from apical meristems of *Panicum maximum* Jacq. Cv. Likoni. **Pas. For.** 16: 3201-3206.
- Lima, M.L.A., A.A.F. Garcia, K.M. Oliveira, S. Matsuoka, H. Arizono, C.L. de Souza Jr. and A.P. de Souza. 2002. Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum spp.*). **Theor. Appl. Genet.** 104: 30-38.
- Liscum E and WR Briggs. 1995. Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. **Plant cell** 7: 473-485.

- Miftahudin, G.J. Scoles and J.P. Gustafson. 2002. AFLP markers tightly linked to the aluminum-tolerance gene *Alt3* in rye (*Secale cereale* L.). **Theor. Appl. Genet.** 104: 626-631.
- Mukesh, J., Kudithipudi C., M. Gallo-Meagher and P. Mislevy. 2005. Embryogenic callus induction and regeneration in a pentaploid hybrid bermudagrass cv. Tifton 85. **Crop Sci.** 45 : 1069-1072.
- Mulu ,A., H. Tefera, K. Assefa and H.T. Nguyen. 1999. Genetic characterization of two *Eragrostis* species using AFLP and morphological traits. **Hereditas** 130: 33-40.
- Murai, H., Z. Hashimoto, P.N. Sharma, T. Shimizu, K. Murata, S. Takumi, N. Mori, S. Kawasaki and C. Nakamura. 2001. Construction of a high-resolution linkage map of a rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) resistance gene *bph2*. **Theor. Appl. Genet.** 103: 526-532.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised mediums for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15 : 473-497.
- Ni, J., P.M. Colowit, J.J. Oster, K. Xu and D.J. Machill. 2001. Molecular markers linked to stem root resistance in rice. **Theor. Appl. Genet.** 102: 511-516.
- 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.
- Nualbunruan, P. 1995. Inhibition of phenolic compound in culture of *Broussonetia kazinoki* Sieb, pp. 182-185. *In* **Proceeding of the 12th Rajamangala Institute of Technology Seminar 12. ed.** Rajamangala Inst. of Technology. North-Eastern Campus, Nakhon Ratchasima.

- Polanco, C. and M.L. Ruiz. 2001. AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. **Plant Sci.** 162: 817-824.
- Redway, F.A. and V. Vasil. 1990. Identification of callus types for long-term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theor. Appl. Genet.** 79: 609-617.
- Ross, A.H., J.M. Manners and R.G. Birch. 1995. Embryogenic callus production, plant regeneration and transient gene expression following particle bombardment in the pasture grass, *Cenchrus ciliaris*(Gramineae). **Aust. J. Bot.** 49 :193-199.
- Rouf Mian, M.A., A.A. Hopkins and J.C. Zwonitzer. 2002. Determination of genetic diversity in tall fescue with AFLP markers. **Crop Sci.** 42: 944-950.
- Sairam, R.V., C. Wilber, J. Franklin, B. Smith, J. Bazil, R. Hassel, D. Whaling, K. Frutiger, C.A. Blakey, R. Vierling and S.L. Goldman. 2002. High-frequency callus induction and plant regeneration in *Tripsacum dactyloides* (L.). **In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant.** 38: 435-440.
- Schierholt, A., H.C. Becker and W. Eeke. 2000. Mapping a high oleic acid mutation in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) **Theor. Appl. Genet.** 101: 897-901.
- Senda T., M. Saito, T. Ohsako and T. Tominaga. 2004. Analysis of *Lolium temulentum* geographical differentiation by microsatellite and AFLP markers. **Eur. Weed Res. Society** 45: 18-26.
- Shatters, R.G., Jr., R.A. Wheeler and S.H. West. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of ‘Tifton 9’ Bahiagrass. **Crop Sci.** 34 :1378-1384.

- Soleimani, V.D., B.R. Baum and D.A. Johnson. 2002. AFLP and pedigree-based genetic diversity estimates in modern cultivars of durum wheat [*Triticum turgidum* L. subsp. *durum* (Desf.) Husn.]. **Theor. Appl. Genet.** 104: 350-357.
- Tomkins, J.P., T.C. Wood, L.S. Barnes and A. Westman. 2001. Evaluation of genetic variation in the daylily (*Heemerocallis* spp.) using AFLP markers. **Theor. Appl. Genet.** 102: 489-496.
- Tyagi, A.K., S. Bharal, A. Rashid and N. Maheshawari. 1985. Plant regeneration from tissue culture initiated from immature inflorescences of a grass, *Echinochloa colonum* (L.) Link. **Plant Cell Rep.** 4 :115-117.
- Van de Wouw, M., N. Maxted, K. Chabane and B.V. Ford-Lloyd. 2001. Molecular taxonomy of *Vicia* ser. *Vicia* based on amplified fragment length polymorphism. **Plant Syst. Evol.** 229: 91-105.
- Van Staden, J. 2002. The effect of activated charcoal and auxins on root formation by hypocotyl segments of *Daucus carota*. **South Afr. J. Bot.** 68: 349-356.
- Vasil, I.K. 1987. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops. **J. Plant Physiol.** 128 : 193-218.
- Vijaya, N. and G. Satyanarayana. 1990. Effect of culture media and growth regulators on *in vitro* propagation of rose. pp. 209-214. **In Proceedings of the International Seminar on New Frontiers in Horticulture, Horticulture-new Technologies and Applications. organized by Indo-American Hybrid Seeds, Bangalore, India**
- Vikrant and Rashid, A. 2003. Somatic embryogenesis from mesocotyl and leaf-base segments of *Paspalum scrobiculatum* L., a minor millet. **In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant.** 39: 485-489.

Vos, P., R. Hogers., M. Bleeker, M. Reifans, T. van de Lee, M. Homes, A. Frijters, J. Pot, J.

Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucl. Acids Res.** 23: 4407-4414.

Wan, C.H. and I.K. Vasil. 1996 Regeneration of plants from embryogenic callus, cell suspensions, protoplasts, and cryopreserved cell suspension cultures of napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schum). **J.Plant Physiol.** 148 : 718-726.

Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acids Res.** 18: 6531-6535.

Yasas S.N.F. and B.E. Coulman. 2002. Evaluating genetic variation and relationships among two brome grass species and their hybrid using RAPD and AFLP markers. **Euphytica** 125: 281-291.

Zhang, L.H., P. Ozias-Akins, G.Kochert, S. Kresovich, R. Dean and W. Hanna. 1999. Differentiation of bermudagrass (*Cynodon* spp.) genotypes by AFLP analysis. **Theor. Appl. Genet.** 98: 895-902.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ BAP ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน ที่มีผลต่อการให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อข้อ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

SV.	SS	DF	MS	F	Sig.
Between Groups	5276.071	5	1055.214	72.406*	.000
Within Groups	3410.225	234	14.574		
Total	8686.296	239			

หมายเหตุ * = มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสูง จำนวนต้นและน้ำหนักสดในกรอบสี่เหลี่ยมขนาด 25x25 เซนติเมตร ขนาดของใบของต้นหญ้าแพงโกล่าที่เจริญจากยอดที่ไม่ผ่านและผ่านการฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่างๆ ในสภาพธรรมชาติ เป็นเวลา 30 วัน

ลักษณะที่วิเคราะห์	SV.	SS	DF	MS	F	Sig.
ความสูง	Between Groups	2690.376	49	54.906	3.275*	.000
	Within Groups	2162.565	129	16.764		
	Total	4852.941	178			
จำนวนต้น	Between Groups	3134052.787	49	63960.261	8.103*	.000
	Within Groups	1018284.833	129	7893.681		
	Total	4152337.620	178			
น้ำหนักสด	Between Groups	1.557	49	.032	2.879*	.000
	Within Groups	1.424	129	.011		
	Total	2.980	178			
ความกว้างใบ	Between Groups	.517	49	.011	5.119*	.000
	Within Groups	.266	129	.002		
	Total	.783	178			
ความยาวใบ	Between Groups	1152.245	49	23.515	5.732*	.000
	Within Groups	529.200	129	4.102		
	Total	1681.445	178			

หมายเหตุ * = มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ผลของรังสีแกมมาที่มีต่อความแปรปรวนของความสูง จำนวนต้นและ
น้ำหนักสดภายในกรอบสี่เหลี่ยมขนาด 25x25 เซนติเมตร ขนาดของใบของต้นหญ้า
แพงโกล่าที่เจริญจากยอดที่ไม่ผ่านและผ่านการฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่างๆ
ในสภาพธรรมชาติ เป็นเวลา 30 วัน

ลักษณะที่วิเคราะห์	SV.	SS	DF	MS	F	Sig.
ความสูง	Between Groups	145.983	5	29.197	1.073 ^{ns}	.377
	Within Groups	4706.958	173	27.208		
	Total	4852.941	178			
จำนวนต้น	Between Groups	113105.834	5	22621.167	.969 ^{ns}	.438
	Within Groups	4039231.786	173	23348.161		
	Total	4152337.620	178			
น้ำหนักสด	Between Groups	.124	5	.025	1.507 ^{ns}	.190
	Within Groups	2.856	173	.017		
	Total	2.980	178			
ความกว้างใบ	Between Groups	.153	5	.031	8.392*	.000
	Within Groups	.630	173	.004		
	Total	.783	178			
ความยาวใบ	Between Groups	175.768	5	35.154	4.039*	.002
	Within Groups	1505.676	173	8.703		
	Total	1681.445	178			

หมายเหตุ * = มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางผนวกที่ 4 วิเคราะห์ความแปรปรวนของความสูง จำนวนต้นและน้ำหนักรากในกรอบสี่เหลี่ยม
ขนาด 25x25 เซนติเมตร ขนาดของใบของต้นหญ้าแพรงโกล่าที่คัดเลือกไว้ 10
ตัวอย่าง ในสภาพธรรมชาติ เป็นเวลา 30 วัน

ลักษณะที่วิเคราะห์	SV.	SS	DF	MS	F	Sig.
ความสูง	Between Groups	1418.365	10	141.837	8.289*	.000
	Within Groups	462.030	27	17.112		
	Total	1880.395	37			
จำนวนต้น	Between Groups	2114349.961	10	211434.996	25.956*	.000
	Within Groups	219940.250	27	8145.935		
	Total	2334290.211	37			
น้ำหนักราก	Between Groups	.295	10	.030	1.289 ^{ns}	.285
	Within Groups	.619	27	.023		
	Total	.914	37			
ความกว้างใบ	Between Groups	.186	10	.019	8.773*	.000
	Within Groups	.057	27	.002		
	Total	.243	37			
ความยาวใบ	Between Groups	466.462	10	46.646	6.718*	.000
	Within Groups	187.467	27	6.943		
	Total	653.929	37			

หมายเหตุ * = มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

1. การเตรียมดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างหญ้าแพงโกล่าที่คัดเลือกแล้วจากการทดลองที่ 1-3 มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีที่ประยุกต์จาก Agrawal และคณะ (1992) ดังนี้

1.1 นำตัวอย่างประมาณ 2 กรัมตัดก้านใบออก แล้วตัดเป็นชิ้นเล็กๆ บนไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด ควรรีบบดในไนโตรเจนเหลวอย่างต่อเนื่อง เพราะเอนไซม์ของพืชจะทำลายดีเอ็นเอ

1.2 นำตัวอย่างที่บดแล้วใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวซ์ขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มี 2x CTAB buffer 6 มิลลิลิตร [2% hexadecyltrimethyl ammonium bromide, 1.4 M NaCl, 10 mM Na₂EDTA, 100 mM Tris HCl, pH 8.0] และ 2-mercaptoethanol 20 ไมโครลิตร (CTAB buffer ชนิดนี้มีความหนืด จึงต้องนำไปอุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสก่อนเพื่อสะดวกในการดูดวัดปริมาณ)

1.3 นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที กลับหลอดไปมาทุกๆ 10 นาที

1.4 นำมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

1.5 เติมหอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) 7 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยกลับหลอดไปมาเบาๆ

1.6 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกชั้นน้ำและหอโรฟอร์มออกจากกัน

1.7 ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายที่อยู่ส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม linear polyacrylamide 140 ไมโครลิตรและเติมน้ำไอโซโพรพานอล 2 ใน 3 เท่าของปริมาตรสารละลายทั้งหมดที่มีอยู่

1.8 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1.9 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.10 ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายออกให้หมดแล้วล้างตะกอนด้วย Wash buffer 500 มิลลิลิตร [10 mM sodium acetate, 70% ethanol]

1.11 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

1.12 เทสารละลายออก ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 10 นาที

1.13 ละลายตะกอนใน RNase buffer 500 ไมโครลิตร [10mM Tris-HCl pH 8.0, 15 mM NaCl] เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ถ่ายสารละลายใส่ในหลอดเซนตริฟิวซ์ขนาดเล็ก 1.5 มิลลิลิตร

1.14 ใส่ RNase A 10 ไมโครลิตร (10 mg/ml) บ่มไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

1.15 สกัดด้วยฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1) 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปกลับมา 4 ครั้งเบาๆแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1.16 ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายชั้นบนมาสกัดซ้ำด้วยคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) 450 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

1.17 ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายชั้นบนมาใส่หลอดใหม่ แล้วเติม linear polyacrylamide 70 ไมโครลิตร และเติมโซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาณ 1 ใน 10 เท่าของปริมาตรสารละลายที่ดูดมา และเติมเอธานอลปริมาณ 2 เท่าของสารละลายที่ดูดมา

1.18 นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที เพื่อให้การตกตะกอนเร็วยิ่งขึ้น

1.19 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนด้วยเอธานอล 70% นำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน แล้วเทสารละลายทิ้ง ตั้งไว้ให้แห้ง

1.20 นำตะกอนไปละลายใน TE buffer [10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA] เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ต่อไป

2. การวิเคราะห์สารละลายดีเอ็นเอ

2.1 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ spectrophotometer

วิธีนี้ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอและวัดปริมาณดีเอ็นเอ เมื่อได้สารละลายดีเอ็นเอแล้วนำไปวัดค่า optical density (OD) ซึ่งเป็นค่าการดูดแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร หรือ OD₂₆₀ เพื่อหาความเข้มข้นของ DNA ได้ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (}\mu\text{g/ml)} = \text{OD}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{dilution factor}$$

การวัดค่าการดูดแสงของดีเอ็นเอจะวัดที่ความยาวช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร (OD₂₈₀) ด้วยเพื่อใช้ในการคำนวณอัตราส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ถ้าค่า OD₂₆₀/OD₂₈₀ อยู่ระหว่าง 1.7-1.8 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นเกลียวคู่บริสุทธิ์ แต่ถ้าอัตราส่วนสูงกว่า 1.8 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอเจือปน

2.2 การแยกขนาดดีเอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยวิธีการวัดการเรืองแสงของดีเอ็นเอร่วมกับเอธิเดียมโบรไมด์เปรียบเทียบความเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

3. ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอฟแอลพี

3.1 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter

3.1.1 นำสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาตรของสารในการทำปฏิกิริยาตามตารางผนวกที่ 5

ตารางผนวกที่ 5 ปริมาตรสารสำหรับการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด

สารที่ใช้	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. สารละลายดีเอ็นเอ (100 ng/μl)	2.50
2. 5X Reaction buffer	5.00
3. <i>Eco</i> RI (10U/μl)	0.25
4. <i>Mse</i> I (5U/μl)	0.50
5. น้ำกลั่น	16.75
ปริมาตรรวม	25

3.1.2 นำมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง [1X reaction buffer ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM magnesium acetate และ 50 mM potassium acetate]

3.1.3 นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.1.2 มาเติมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter ตามตารางผนวกที่ 6

ตารางผนวกที่ 6 สารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter

สารที่ใช้	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. สารละลายดีเอ็นเอ	25.0
2. <i>Eco</i> RI adapter (5 pmole/ μ l)	1.0
3. <i>Mse</i> I adapter (25 pmole/ μ l)	2.0
4. 5X T4 ligase buffer	10.0
5. T4 DNA ligase (1 U/ μ l)	1.0
6. น้ำกลั่น	11.0
ปริมาตรรวม	50

3.1.4 นำมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ลำดับเบสของ adapter แต่ละชนิดมีดังนี้

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

*Mse*I adapter 5' -GACGATGAGTCCTGAG - 3'
3' -TACTCAGGACTCAT- 5'

3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ ในขั้น preselective amplification

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในขั้นตอนนี้จะใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 ตัวที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์เพื่อลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้และให้มีความเฉพาะในขั้นหนึ่งก่อนไพรเมอร์ที่ใช้ มีดังนี้

*Eco*RI primer +1 (E-A) 5' -GACTGCGTACCAATTCA - 3'
*Mse*I primer +1 (M-C) 5' -GATGAGTCCTGAGTAAC- 3'

เตรียมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตามตารางผนวกที่ 7 ในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ 7 สารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้น preselective amplification

สารที่ใช้	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. สารละลายดีเอ็นเอ	2.00
2. primer E-A (5 pmole/ μ l)	1.00
3. primer M-C (5 pmole/ μ l)	1.00
4. dNTP mix (2mM)	2.50
5. 10X PCR buffer	2.50
6. $MgCl_2$ (50mM)	0.75
7. <i>Taq</i> polymerase (5 U/ μ l)	0.10
8. น้ำกลั่น	15.15
ปริมาตรรวม	25.00

เมื่อเตรียมสารละลายสำหรับทำพีซีอาร์เรียบร้อยแล้ว ผสมให้เข้ากันนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา ดังนี้

Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	} จำนวน 30 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที	

แบ่งสารละลายดีเอ็นเอมาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจสอบผลโดยย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์จะพบรอยขาว (smear) ในช่วงขนาดไม่เกิน 1 กิโลเบส นำตัวอย่างที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แบ่งบางส่วนมาทำให้เจือจาง 20 เท่าด้วยสารละลาย TE สำหรับเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณขั้นต่อไป ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ ในขั้น selective amplification

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในขั้นตอนนี้จะใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 ตัวที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์เพื่อให้เกิดการคัดเลือกการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วน คู่ผสมของไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด มีชนิดละ 8 แบบ ดังนี้

ชนิด *EcoRI* ไพร์เมอร์ 8 แบบ

5' -GACTGCGTACCAATTCAAC - 3' (E-AAC)

5' -GACTGCGTACCAATTCAAG - 3' (E-AAG)

5' -GACTGCGTACCAATTCACA - 3' (E-ACA)

5' -GACTGCGTACCAATTCACT - 3' (E-ACT)

5' -GACTGCGTACCAATTCACC - 3' (E-ACC)

5' -GACTGCGTACCAATTCACG - 3' (E-ACG)

5' -GACTGCGTACCAATTCAGC - 3' (E-AGC)

5' -GACTGCGTACCAATTCAGG - 3' (E-AGG)

ชนิด *MseI* ไพร์เมอร์ 8 แบบ

5' -GATGAGTCCTGAGTAACAA - 3' (M-CAA)

5' -GATGAGTCCTGAGTAACAC - 3' (M-CAC)

5' -GATGAGTCCTGAGTAACAG - 3' (M-CAG)

5' -GATGAGTCCTGAGTAACAT - 3' (M-CAT)

5' -GATGAGTCCTGAGTAACTA - 3' (M-CTA)

5' -GATGAGTCCTGAGTAACTC - 3' (M-CTC)

5' -GATGAGTCCTGAGTAACTG - 3' (M-CTG)

5' -GATGAGTCCTGAGTAACTT - 3' (M-CTT)

เตรียมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตามตารางผนวกที่ 8 ในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ 8 สารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้น selective amplification

สารที่ใช้	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. สารละลายดีเอ็นเอ จากข้อ 3.2	5.00
2. primer E-ANN (5 pmole/ μ l)	1.00
3. primer M-CNN (5 pmole/ μ l)	1.00
4. dNTP mix (2mM)	2.00
5. 10X PCR buffer	2.00
6. $MgCl_2$ (50mM)	0.60
7. <i>Taq</i> polymerase (5 U/ μ l)	0.10
8. น้ำกลั่น	8.30
ปริมาตรรวม	20.00

เมื่อเตรียมสารละลายสำหรับทำพีซีอาร์เรียบร้อยแล้ว ผสมให้เข้ากันนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ เพื่อทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยโปรแกรม touch down ซึ่งใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา ดังนี้

Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	} จำนวน 1 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที	

โดยจะลดอุณหภูมิในขั้น annealing (65 องศาเซลเซียส) ลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียส จำนวน 12 รอบ และทำปฏิกิริยาต่อ ดังนี้

Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	} จำนวน 23 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที	

3.4 การวิเคราะห์สารละลายดีเอ็นเอโดย denaturing polyacrylamide gel

3.4.1 การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

3.4.1.1 เตรียมกระจกสำหรับเทเจลโพลีอะคริลาไมด์ โดยนำกระจกมาล้างให้สะอาด ปล่อยให้กระจกแห้ง แล้วเช็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ให้สะอาดทั้ง 2 แผ่น

3.4.1.2 เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 1 ไมโครลิตร, glacial acetic 2.5 ไมโครลิตร และเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร) เพื่อให้เจลเกาะติดกระจก

3.4.1.3 กระจกแผ่นหน้าที่มีลักษณะเป็นหุกระต่ายเช็ดด้วย repel silane ให้ทั่ว ปล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที

3.4.1.4 นำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกอบเข้าชุด โดยวาง spacer ไว้ทั้งสองข้าง เพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง โดยหันด้านที่ทา bind silane และ repel silane เข้าหากัน ใช้คลิปหนีบยึดให้คงที่ และใช้เทปกาวติดกระจก 3 ด้านเพื่อไม่ให้เจลรั่วซึมออกมา

3.4.2 การเตรียม polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 9 ปริมาณสารที่ใช้สำหรับเตรียมเจลเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกระจกขนาด 15x17 เซนติเมตร ปริมาตรรวม 30 มิลลิลิตร

สารที่ใช้	ปริมาตร
30% acrylamide (19:1)	3.0 มิลลิลิตร
5x TBE	3.0 มิลลิลิตร
ยูเรีย	6.75 กรัม
น้ำกลั่น	3.75 มิลลิลิตร
10% APS	150 ไมโครลิตร
TEMED	7.5 ไมโครลิตร

TBE = 89 mM Tris-borate, 2.5 mM EDTA

APS = ammonium persulfate

TEMED = N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine

3.4.2.1 ผสม acrylamide, บัฟเฟอร์ TBE, น้ำ และยูเรีย ในบีกเกอร์ที่ปิดด้วยแผ่นใสห่ออาหารเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นของสารละลายเปลี่ยน

3.4.2.2 เขย่าเบาๆในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียสให้ยูเรียละลายหมด รอจนอุณหภูมิลดลงประมาณเท่าอุณหภูมิห้อง

3.4.2.3 เติม 10% APS และ TEMED เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันอย่างรวดเร็ว ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ

3.4.2.4 เทเจลใส่ลงในช่องระหว่างกระจกจนเต็ม ใส่หัวลิงไปด้านบน วางกระจกให้ด้านบนเอียงทำมุมกับแนวระดับประมาณ 30 องศา เพื่อป้องกันการไหลซึมของเจล

3.4.2.5 ปลอ่ยให้เจลแข็งตัว ประมาณ 2 ชั่วโมง ถ้าจะปลอ่ยเจลไว้ข้ามคืนควรใช้แผ่นใสห่ออาหารปิดด้านบนของเจลไว้เพื่อให้มีความชื้น

3.4.3 การทำอิเล็กโตรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

3.4.3.1 เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วใช้น้ำล้างกระจกด้านนอกให้สะอาด แกะเทปกาวและหัวออก และประกอบกระจกเข้ากับชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส เติมบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ลงในช่องด้านบนและด้านล่างระวังอย่าให้มีฟองอากาศอยู่ใต้กระจก

3.4.3.2 ต่อสายไฟเข้ากับเครื่องทำ pre-run 20-30 นาที โดยใช้ความต่างศักย์คงที่ 300 โวลต์

3.4.3.3 ปิดเครื่อง ใช้เข็มฉีดยาดูดบัฟเฟอร์ล้างยูเรียที่อยู่ในช่องหัวแต่ละช่องให้หมด

3.4.3.4 เตรียมตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอผสมกับ loading buffer (loading buffer; 80% formamide, 0.1% xylene cyanol, 0.1% bromphenol blue, 10 mM EDTA pH 8.0) ในอัตราส่วนสารละลายดีเอ็นเอ 5.5 ไมโครลิตร ต่อ loading buffer 1.5 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที เพื่อทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ และทำลาย secondary structure ของดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที

3.4.3.5 หยอดตัวอย่างลงในช่องแต่ละช่อง และหยอดสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder (Invitrogen Life Technology, USA) เพื่อใช้สำหรับเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอ

3.4.3.6 เปิดเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์เท่าเดิม เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง หรือจนกว่าสี xylene cyanol (สีที่อยู่ด้านบน) จะเคลื่อนที่ลงมาประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของเจล จึงปิดเครื่อง

3.4.3.7 ดูดบัฟเฟอร์ออกจากช่องด้านบน นำกระจกออกจากเครื่อง แยกกระจกทั้ง 2 ออกจากกัน ซึ่งเจลจะติดกับกระจกแผ่นหลังที่ทาคด้วย bind silane

3.4.3.8 นำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่มาล้างในน้ำกลั่นนาน 20 นาที เช้าเบาๆ บนเครื่องเขย่า

3.4.3.9 แช่แผ่นเจลในสารละลาย CTAB ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (หรือใช้น้ำกลั่นก็ได้) นาน 30 นาที เขย่าตลอดเวลา

3.4.3.10 นำแผ่นเจลใส่ในสารละลายแอมโมเนียความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา

3.4.3.11 นำแผ่นเจลมาข้อมในสารละลายซิลเวอร์ที่เตรียมใหม่ เป็นเวลา 20 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา

3.4.3.12 นำแผ่นเจลออกมาจุ่มลงในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว ไม่เกิน 5 วินาที เพราะถ้าล้างนานซิลเวอร์จะหลุดหมด ต้องข้อมใหม่

3.4.3.13 ย้ายแผ่นเจลมาใส่ในสารละลาย developer ที่เตรียมใหม่ๆ และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เขย่าอย่างสม่ำเสมอ 5-25 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน (developer; 2% sodium carbonate, 0.02% formaldehyde)

3.4.3.14 นำแผ่นเจลมาจุ่มน้ำอย่างรวดเร็ว และหยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นเจลมาใส่ในสารละลายกลีเซอรอล 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที แล้วผึ่งให้แห้งในอากาศ

วิธีเตรียมสารละลายซิลเวอร์ (1 ลิตร)

ชั่งซิลเวอร์ไนเตรท 1.6 กรัม เติมน้ำ 994 มิลลิลิตร และโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 M 4 มิลลิลิตร คนให้ละลายจะได้สารละลายขุ่นสีน้ำตาล เติมน้ำกลั่น liquid ammonia ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ 2-2.4 มิลลิลิตร โดยค่อยๆ เติมทีละหยด จนสารละลายใสจึงใส่เพิ่มอีก 2 หยด

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	ศิรณา อุทุมพฤษ์พร
วัน เดือน ปี ที่เกิด	15 ตุลาคม 2523
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (สัตวศาสตร์) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	