



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พืชไร่)

ปริญญา

พืชไร่

พืชไร่นา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การชักนำให้เกิดการกลายในทานตะวันลูกผสม (*Helianthus annuus* L.) โดยการฉายรังสีแกมมา ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Induced Mutation on Hybrid Sunflower (*Helianthus annuus* L.) by Gamma Irradiation through Tissue Culture

نامผู้วิจัย นายปิยนันท์ พวงจันทร์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทน์เปรม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์บุบผา คงสมัย, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทน์เปรม, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา นีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การชักนำให้เกิดการกลายในทานตะวันลูกผสม (*Helianthus annuus* L.) โดยการฉายรังสีแกมมา
ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Induced Mutation on Hybrid Sunflower (*Helianthus annuus* L.) by Gamma Irradiation
through Tissue Culture.

โดย

นายปิยนันท์ พวงจันทร์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)

พ.ศ. 2554

ปิยนันท์ พวงจันทร์ 2554: การชักนำให้เกิดการกลายในทานตะวันลูกผสม
(*Helianthus annuus* L.) โดยการฉายรังสีแกมมา ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่) สาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยปทุมธานี
หลัก: รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทรเปรม, Ph.D. 62 หน้า

ในการศึกษาปริมาณรังสีแกมมาที่เหมาะสมสำหรับก่อกลายพันธุ์ทานตะวัน และศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นหลังจากการฉายรังสี ร่วมกับวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยตรวจสอบด้วยเทคนิคเอฟแอลพี ทำการทดลองโดยใช้ทานตะวันลูกผสมชั่วที่ 1 พันธุ์โอเปร่า โดยชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก (multiple shoot) ด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ BA และ TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ ก่อนนำไปฉายรังสีแกมมาในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า อาหารสูตรที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยอดทานตะวันพันธุ์โอเปร่าคือสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มจำนวนยอดได้เฉลี่ย 6.67 ยอด นำยอดเหล่านี้ไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันปริมาณรังสี 0 1 2 3 และ 4 กิโลแรด และได้ทดลองฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันให้กับเมล็ดที่ปริมาณรังสี 0 12 13 และ 14 กิโลแรด แล้วนำเมล็ดมาเพาะในสภาพปลอดเชื้อในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าเมล็ดทานตะวันพันธุ์โอเปร่าที่ได้รับปริมาณรังสี 13 กิโลแรด มีการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ส่วนปริมาณรังสีที่ทำให้ยอดทานตะวันตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผ่านการฉายรังสีมาแล้ว 60 วันคือ 2.69 กิโลแรด ผลการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ พบเพียง 5 คู่ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยคู่ไพรเมอร์ *EcoRI* (ACC) และ *MseI* (CAT) โดยให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมสูงที่สุด 6.51%

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Piyanan Phuangjan 2011: Induced Mutation on Hybrid Sunflower
(*Helianthus annuus* L.) by Gamma Irradiation through Tissue Culture. Master of science
(Agronomy), Major Field: Agronomy, Department of Agronomy. Thesis Advisor:
Associate Professor Sontichai Chanprame, Ph.D. 62 pages.

The objectives of this research were to determine the suitable doses of gamma rays for induced mutation in F₁ hybrid sunflower 'Opera' and to study the genetic variation occurred after irradiation of the cultured tissue using AFLP technique. Multiple shoots induction of 'Opera' (F₁) hybrid was done in MS medium supplemented with various concentrations of BA or TDZ. It was found that the suitable medium for multiple shoots induction was MS plus 1 mg/l BA. The medium produced the average of 6.67 shoots. These shoots were subjected to acute irradiation at the doses of 0, 1, 2, 3 and 4 Krad. Seeds of this cultivar were also irradiated at 0, 12, 13 and 14 Krad prior to *in vitro* germination in MS medium. The results showed that LD_{50(60 ds)} of Opera seed was 13 Krad while LD_{50(60 ds)} of cultured shoot was 2.69 Krad. Genetic variation study using AFLP technique revealed that 5 out of 10 primer pairs gave polymorphic bands of DNA. The *Eco*RI (ACC) and *Mse*I (CAT) yielded the highest percentage of polymorphism of 6.51%

Student's signature

Thesis Advisor's signature

___ / ___ / ___

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สนธิชัย จันทน์เปรม ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูง ที่กรุณาให้ความรู้ ให้คำปรึกษาถึงหัวข้อ วิธีการดำเนินงานวิจัย และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ รวมทั้งช่วยเหลือด้านอื่น ๆ เสมอมา ขอกราบขอบพระคุณกรรมการที่ปรึกษาร่วม ดร.บุบผา คงสมัย ดร. นงลักษณ์ เทียนเสรี ประธานในการสอบ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กัญจนา แซ่เตียว ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่สั่งสอนวิชาความรู้ จนประสบความสำเร็จในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ศูนย์ความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานักบริหารการศึกษาด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สกอ. ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์การทดลอง

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืช และการถ่ายยีน (A 204) และห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล (A 207) ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ที่คอยให้ความช่วยเหลือให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์เสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่สาว รวมทั้งทุกคนในครอบครัวที่คอยสนับสนุน ให้กำลังใจ ให้คำปรึกษา ให้การส่งเสริมในด้านการศึกษา และในการทำวิทยานิพนธ์แก่ข้าพเจ้าด้วยดีเสมอมา

ปิยนันท์ พวงจันทร์

มีนาคม 2554

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	20
อุปกรณ์	20
วิธีการ	22
ผลและวิจารณ์	34
สรุป	53
ข้อเสนอแนะ	55
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	56
ภาคผนวก	60
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	62

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้น preselective amplification	27
2	คู่ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกลำดับ 3' สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในการทำ selective amplification	28
3	สารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้น selective amplification	29
4	ปริมาณสารที่ใช้สำหรับเตรียมเจลเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์สำหรับขนาดกระจก 38 x 50 เซนติเมตร ปริมาตรรวม 2,000 มิลลิลิตร	31
5	ผลของ BA และ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนยอดทานตะวัน พันธุ์โอเปร่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS	35
6	ผลของปริมาณรังสีที่มีต่อการงอกของเมล็ดทานตะวันพันธุ์โอเปร่าหลังจากการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสีต่าง ๆ (เปอร์เซ็นต์การงอก)	40
7	ผลการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสีต่าง ๆ ที่มีต่อความอยู่รอดของยอดทานตะวันพันธุ์ โอเปร่าบันทึกผลการในสภาพเพาะเลี้ยงภายหลังการฉายรังสี 60 วัน	40
8	คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (polymorphism) ในทานตะวันพันธุ์ โอเปร่าที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค เอเอฟแอลพี	48
9	คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (polymorphism) ในทานตะวันพันธุ์ โอเปร่าที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันเมล็ดที่ปริมาณรังสี 12 กิโลแรด เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี	49

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
10	คู่มือพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (polymorphism) ในทานตะวันพันธุ์ โอเปร่าที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันเมล็ดที่ปริมาณ 13 กิโลเรด เมื่อ ตรวจสอบด้วยเทคนิคเอฟแอลพี	50
11	คู่มือพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (polymorphism) ในทานตะวันพันธุ์ โอเปร่าที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันเมล็ดที่ปริมาณ 14 กิโลเรด เมื่อ ตรวจสอบด้วยเทคนิคเอฟแอลพี	51

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การตอบสนองของยอดทานตะวันพันธุ์โอเปร่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 0 1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 30 วัน	36
2 การตอบสนองของยอดทานตะวันพันธุ์โอเปร่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตร MS ที่เติมสารควบคุม การเจริญเติบโต TDZ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 30 วัน	37
3 เปอร์เซ็นต์การรอดตายเมื่อเทียบกับชุดควบคุมของยอดทานตะวันพันธุ์โอเปร่าเมื่ออายุ 60 วันหลังจากที่ได้รับรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณต่าง ๆ	41
4 การตอบสนองของยอดทานตะวันพันธุ์โอเปร่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่ปราศจากฮอร์โมน เพื่อชักนำให้เกิดรากเมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน	43
5 การตอบสนองของยอดทานตะวันพันธุ์โอเปร่าที่เกิดจากเมล็ดที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่ปราศจากฮอร์โมน เพื่อชักนำให้เกิดรากเมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน	44
6 ทานตะวันพันธุ์โอเปร่าที่ปลูกในกระถาง	45
7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอทานตะวันพันธุ์โอเปร่าที่เกิดจากตู้ไพรเมอร์ E-ACC/M-CTA	52

การชักนำให้เกิดการกลายในทานตะวันลูกผสม (*Helianthus annuus* L.) โดยการฉายรังสี
แกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Induced Mutation on Hybrid Sunflower (*Helianthus annuus* L.) by Gamma
Irradiation through Tissue Culture.

คำนำ

ทานตะวันเป็นพืชน้ำมันที่สำคัญทางเศรษฐกิจรองจากถั่วเหลือง และปาล์มน้ำมัน
ทานตะวันทนแล้งได้ค่อนข้างดีเมื่อเปรียบเทียบกับพืชไร่ชนิดอื่นเช่น ข้าวโพด ถั่วเหลือง และถั่ว
เขียว เมล็ดทานตะวันมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ส่วนกากที่ได้หลังจากสกัดน้ำมันแล้วมีโปรตีน 40 -
50 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันทานตะวันมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวประมาณ 88 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าถั่วเหลือง และ
น้ำมันปาล์ม และมีสาร antioxidants กันหืน ได้ดี สามารถเก็บไว้ได้นานกว่าน้ำมันพืชชนิดอื่น
เนื่องจากน้ำมันทานตะวันมีค่าสูง จึงเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศเพื่อการ
บริโภค และใช้ในอุตสาหกรรมเช่น น้ำมันชักเงา น้ำมันหล่อลื่น สีทาบ้าน ส่วนลำต้นทานตะวัน
สามารถนำไปทำกระดาษคุณภาพดี

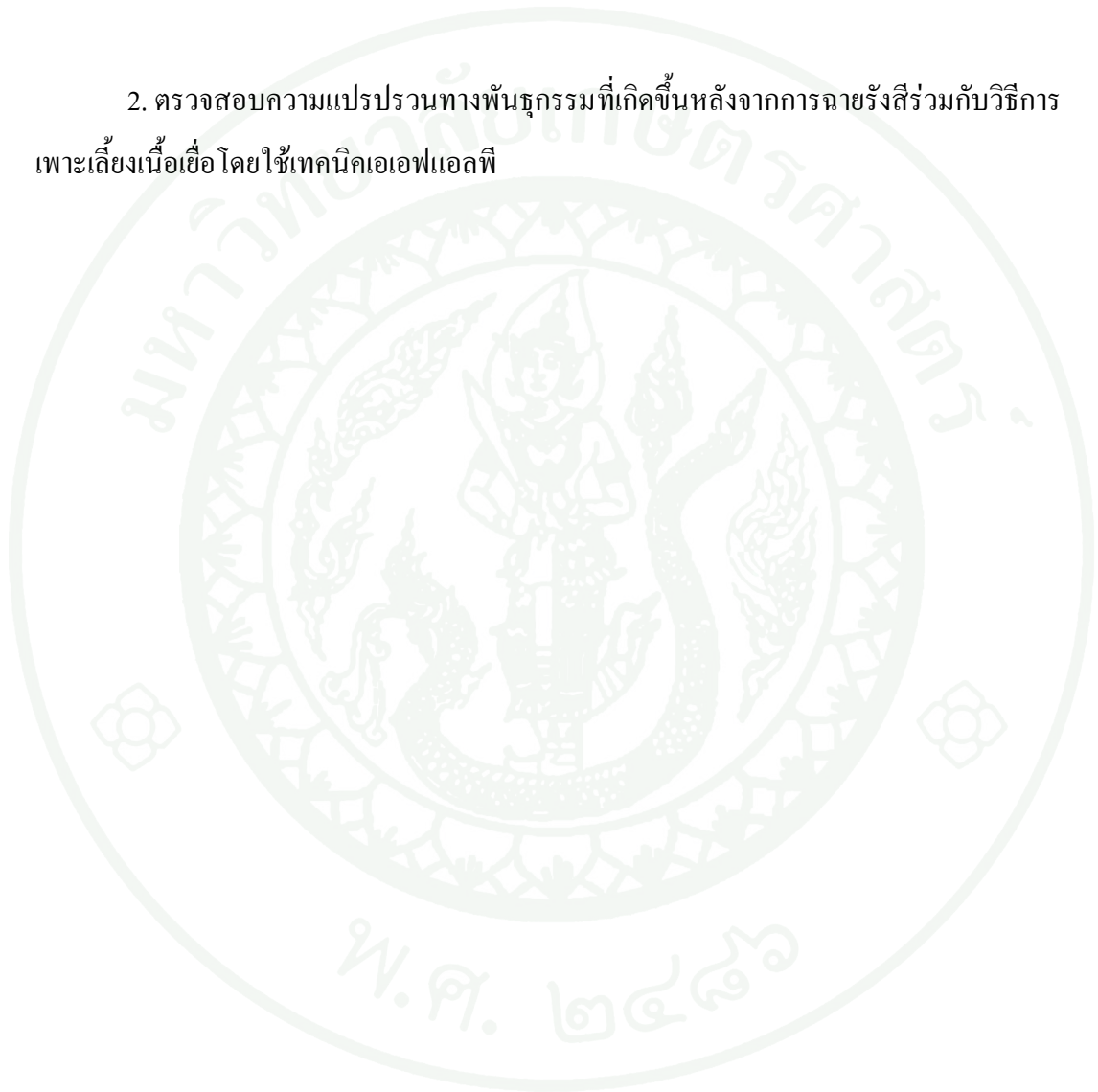
ทานตะวัน เป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่สำคัญพืชหนึ่งของโลก ในบรรดา
พืชไร่ที่เป็นพืชน้ำมัน ได้แก่ ถั่วเหลือง ปาล์มน้ำมัน ฝ้าย เรพส์ด ถั่วลิสง และมะพร้าว เป็นต้น (สุข
เกษม, 2543) ในปีเพาะปลูก 2551 ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกทานตะวันทั่วประเทศรวมประมาณ
168,332 ไร่ คิดเป็นเนื้อที่เก็บเกี่ยวผลผลิต 162,679 ไร่ ผลผลิตทานตะวันทั่วประเทศ 19,346 ตัน
(สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร, 2554) การส่งออกผลิตภัณฑ์ทานตะวันส่วนใหญ่ในรูปน้ำมัน และ
อุตสาหกรรมอาหาร ส่วนที่เหลือใช้ในประเทศในรูปน้ำมัน และอาหารขบเคี้ยว การใช้ประโยชน์
ส่วนใหญ่ร้อยละ 88 เข้าโรงงานสกัดน้ำมันซึ่งน้ำมันส่วนใหญ่ส่งเข้าสู่อุตสาหกรรมอาหารกระป๋อง
อาหารแปรรูป มีบางส่วนใช้บริโภคน้ำมัน และส่วนประกอบเครื่องสำอาง ร้อยละ 12 ใช้ผลผลิตทำ
ขนม อาหารขบเคี้ยว

เนื่องจากการปลูกทานตะวันในประเทศไทยที่ให้ผลผลิตสูง และเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูงยังต้องมีการใช้เมล็ดพันธุ์นำเข้าจากต่างประเทศซึ่งเมล็ดพันธุ์มีราคาสูง ทำให้เกษตรกรมีต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้น ดังนั้นจึงได้มีการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันขึ้นเพื่อให้ได้ทานตะวันพันธุ์ดี ซึ่งเป็นประโยชน์ให้กับเกษตรกร เพื่อลดต้นทุนโดยการซื้อเมล็ดพันธุ์ที่ราคาถูกและมีคุณภาพ (สำนักงานส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร, 2554)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาการชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในทานตะวันลูกผสม (*Helianthus annuus* L.) โดยใช้เทคนิคการฉายรังสีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อหาแนวทางในการสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดจากการกลายพันธุ์ ซึ่งอาจใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ได้ปริมาณของรังสีที่ทำให้เกิดการตายร้อยละ 50 (LD_{50}) และปริมาณรังสีที่เหมาะสมในการฉายรังสีให้กับทานตะวันเพื่อก่อการกลายพันธุ์
2. ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นหลังจากการฉายรังสีร่วมกับวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี



การตรวจเอกสาร

1. ทานตะวัน

ทานตะวัน (sunflower) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus annuus* L. เป็นพืชที่ออกดอกปีละหนึ่งครั้ง (annual plant) อยู่ในแฟมิลี Asteraceae มีการงอกแบบ epigeal germination และระบบรากแก้ว (tap root system) ในระยะแรกการงอกแรดิเคิล (radicle) แทะทะลุออกมาจากเมล็ด และเจริญเป็นรากแก้ว (primary root) ต่อมาจะมีรากแตกมารากแก้ว เรียกว่า รากแขนง (secondary root หรือ lateral root) รากแก้วสามารถหยั่งลึกได้ถึง 150-270 เซนติเมตร ส่วนรากแขนงจะเจริญได้ดีในระดับผิวดินลึก 10-30 เซนติเมตร และแผ่ไปตามแนวนอนได้กว้าง 60-150 เซนติเมตร

ทานตะวันมีลำต้นตั้งตรง เป็นไม้เนื้ออ่อน (herbaceous stem) มีขนอ่อน (trichome) ปกคลุมอยู่ทั่วไป ในระยะแรกต้นจะอวบน้ำปรางแตกหักง่าย ต่อมาจะเริ่มแข็งแรงขึ้น มีความสูง 0.5 – 5.0 เมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-10 เซนติเมตร บางพันธุ์สูง 12 เมตร พันธุ์ที่ใช้ปลูกเพื่อการค้าปัจจุบันมีความสูง 1.5-2.5 เมตร เมื่อทานตะวันมีใบจริง 2-3 คู่ มีความสูงประมาณ 10-15 เซนติเมตร ลำต้นส่วนใหญ่จะไม่แตกกิ่งแต่บางพันธุ์อาจแตกกิ่งได้โดยเฉพาะพันธุ์ป่า เมื่อทานตะวันงอกโผล่พื้นผิวดินจะเห็นใบเลี้ยง (cotyledon) ซึ่งมีรูปร่างกลมยาว เมื่อใบเลี้ยงเติบโตเต็มที่ใบจะขยายแผ่กว้างออกจะเห็นใบจริงคู่แรกอยู่ตรงส่วนยอด และเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ใบจะอยู่แบบตรงกันข้ามประมาณ 5 คู่ ทำมุม 90 องศา กับคู่ที่เกิดมาก่อน ใบจริงคู่แรกมีรูปร่างเรียวยาว (lanceolate) และมีขนปกคลุม ส่วนใบที่เกิดมาเป็นใบเดี่ยวเวียนรอบลำต้น การจัดเรียงตัวของใบ (phyllotaxy) เท่ากับ 8/13 โดยทั่วไปมีใบขนาดใหญ่ประมาณ 10-15 เซนติเมตร มีขนหยาบปกคลุมทั่วไป จำนวนใบต่อต้นประมาณ 8-70 ใบ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ และสภาพแวดล้อม ช่อดอกเป็นแบบ head หรือ capitulum รูปร่างต่าง ๆ เช่น เรียบ โค้งแบบ concave หรือ convex

ทานตะวันพันธุ์ที่ใช้สกัดน้ำมันช่อดอกจะมีดอกย่อย (floret) ประมาณ 600 -1,200 ดอก ดอกย่อยมี 2 ชนิด คือ ray flower และ disk flower อยู่บนฐานรองดอก (receptacle) ซึ่งมีส่วนของใบที่เปลี่ยนรูปร่าง และหน้าที่ไปเป็น bract ที่มีขนาดใหญ่ และปลายแหลม bract มี 2 ชั้นคือ ชั้นนอก และชั้นใน มีชื่อเรียกรวมกันว่า involucre bract หรือ phyllaris ก้านช่อดอก (peduncle) จะทำหน้าที่ยึดช่อดอกและลำต้น ray flower หรือ ligulate flower เป็นดอกย่อยที่อยู่บริเวณขอบดอกของช่อดอก กลีบดอกเชื่อมเป็นแผ่นเดียวกัน ขนาดใหญ่และยาว มีสีต่าง ๆ เช่น เหลืองทอง หรือเหลืองส้ม บาง

พันธุ์สีขา มีก้านเกสรตัวเมีย (style) แต่ยอดเกสรตัวเมีย (stigma) เล็กกลีบ และไม่มีอับละอองเกสรตัวผู้จึงเป็นหมัน disk flower เป็นดอกย่อยที่มีจำนวนมากบนช่อดอกอยู่เป็นวงถัดจาก ray flower เข้าไปข้างในจนถึงกลางดอก เป็นดอกสมบูรณ์เพศ (perfect flower) แต่ละดอกย่อยรองรับด้วย flower bract 1 อัน ที่มีรูปร่างคล้ายเรือ ซึ่งเกิดมาจากใบที่เปลี่ยนรูป ถัดเข้าไปเป็นวงของกลีบเลี้ยง (calyx) มีกลีบเลี้ยง (sepal หรือ pappus) 2 กลีบ และกลีบดอก (petal) 5 กลีบ ที่โคนเชื่อมติดกัน (corolla tube) และปลายกลีบดอกแยกกัน มีรังไข่เป็นแบบ inferior ovary ภายในมี 1 ออวูล (ovule) มีเกสรตัวผู้ (anther) จะเชื่อมติดกันแต่ก้านเกสรตัวผู้ทั้ง 5 อันแยกกัน ซึ่งเรียกลักษณะการเกิดเกสรแบบนี้ว่า syngenesious อับละอองเกสรตัวผู้ที่เชื่อมติดกันนั้นจะหุ้มก้านเกสรตัวเมียไว้ ยอดเกสรตัวเมียจะโผล่ออกมา เมื่อเกสรตัวเมียพร้อมผสมพันธุ์ยอดเกสรจะแตกออกเป็นสองแฉก ภายในดอกย่อยเดียวกันความพร้อมที่จะผสมพันธุ์ของเกสรตัวผู้เกิดก่อนที่เกสรตัวเมียจะพร้อม (protandry) ผลเป็นแบบ achene มี 1 เมล็ด แต่ละผลมี pericarp หรือ hull เชื่อมติดเพียงบางส่วนกับเชื้อหุ้มเมล็ด (seed coat หรือ testa) เมล็ดประกอบด้วยเชื้อหุ้มเมล็ด เอนโดสเปิร์ม (endosperm) และคัพภะที่มีใบเลี้ยง (cotyledon หรือ seed embryo) ขนาดใหญ่ สีผลจะแตกต่างกัน เช่น สีดำ ดำแถบเทา ดำแถบขาว ขาวแถบเทา และขาว เป็นต้น เมล็ดมีขนาดกว้าง 4-13 มิลลิเมตร น้ำหนัก 1,000 เมล็ด ประมาณ 40-60 กรัม (ชูศักดิ์, 2542)

2. ระยะการเจริญเติบโตของทานตะวัน

การจำแนกระยะการเจริญเติบโตของทานตะวันที่เป็นพืชปลูกโดยวิธีของ Schneiter and Miller (1981) แบ่งเป็น 2 ระยะใหญ่ ๆ คือ

2.1 ระยะการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นและใบ (vegetative, V)

ระยะนี้เริ่มจากการงอกของต้นกล้าและสิ้นสุดเมื่อเริ่มมองเห็นดอกเกิดขึ้น อาศัยการนับจำนวนใบเป็นเกณฑ์ ระยะการเจริญเติบโตของต้นและใบ จะมีจำนวนวันแตกต่างกันไปตามพันธุ์และปัจจัยทางสภาพแวดล้อม ซึ่งแบ่งย่อยได้ดังนี้

ระยะ vegetative emergence (VE) เริ่มจากต้นกล้าชูใบเลี้ยงโผล่พ้นผิวดิน และมีความยาวของใบจริงใบแรกยาวน้อยกว่า 4 เซนติเมตร

ระยะ V (n) โดยที่ V คือการเจริญเติบโตของต้นและใบ (vegetative growth) n หมายถึงจำนวนใบจริง (number of leaf) ที่มีความยาวตั้งแต่ 4 เซนติเมตรขึ้นไป เช่น V1, V2, V3 และ V4 จะหมายถึงการเจริญเติบโตทางลำต้น ใบที่มีใบจริงที่มีความยาวตั้งแต่ฐานใบที่ติดกับก้านไปจนถึงปลายสุดของยอดใบยาวมากกว่า 4 เซนติเมตร จำนวน 1 ใบ 2 ใบ 3 ใบ และ 4 ใบ ที่ระยะ V ใด ๆ (V(n)) ตามลำดับ การเรียงตัวของใบในช่วงแรกจะอยู่แบบตรงกันข้าม ต่อมาจะมีการเวียนแบบสลับเมื่ออายุการเจริญเติบโตมากขึ้น ใบล่าง ๆ จะเริ่มแก่ ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากความแห้งแล้ง โรคหรือปัจจัยอื่น ๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง เมื่อใบแก่ร่วงไปจะเกิดรอยแผลบนลำต้น (แต่ทั้งนี้จะไม่นับรอยแผลที่เกิดจากการร่วงของใบเลี้ยง) เพิ่มขึ้นทำให้สามารถใช้เป็นเครื่องหมายกำหนดระยะการเจริญเติบโตของพืชได้ดังที่ Siddiqui *et al.* (1975) ได้ใช้การแก่ของใบล่าง (leaf senescence) เป็นสิ่งบอกอายุการแก่ (physiological maturity) ของทานตะวัน แต่ทั้งนี้อาจจะมีความผันแปรการแก่ของใบล่างตั้งแต่ระยะแรกของการเจริญเติบโต ตั้งแต่ระยะการเจริญเติบโตทางต้นและใบจนถึงระยะการถ่ายละอองเกสร

2.2 ระยะเจริญพันธุ์ (reproductive, R)

ระยะเจริญพันธุ์ (R) จะเริ่มเมื่อทานตะวันเริ่มมีดอกเล็ก ๆ เกิดขึ้น (floral initiation) จนถึงระยะต้นแก่เต็มที่ทางสรีรวิทยา (physiology maturity) ระยะนี้ (R) จะแตกต่างจากระยะ vegetative ดังนี้ คือ

ระยะ R1 เป็นระยะที่สามารถมองเห็นดอก (head) ที่หุ้มด้วยใบประดับอ่อนๆ (young bract) ซึ่งหากมองตรงจากด้านบน (top view) ลงมาบนยอดจะเห็นกลีบเลี้ยงอ่อนๆ มากมายเป็นจุดคล้ายดาว (star like) ปรากฏขึ้นมา ระยะนี้จะมีความสัมพันธ์กับจำนวนใบซึ่งจะแตกต่างกันไปตามพันธุ์

ระยะ R2 จะมีช่วงความยาวของข้อบริเวณใต้ฐานรองดอกยาว 0.5 ถึง 2 เซนติเมตร ซึ่งข้อดังกล่าวจะอยู่ระหว่างใบสุดท้ายกับฐานรองดอก (receptacle) ในบางครั้งอาจพบใบประดับพิเศษ (adventitious bracts) ตรงระหว่างข้อดังกล่าวแต่จะไม่นำมาพิจารณา

ระยะ R3 ความยาวข้อตรงใต้ฐานรองดอกกับใบสุดท้ายจะยึดตัวอย่างรวดเร็วจากดอกให้สูงขึ้น ทำให้ข้อตรงช่วงดังกล่าวยาวมากกว่า 2 เซนติเมตร

ระยะ R4 ดอกเริ่มบานกลีบดอก (ray flower) เล็ก ๆ คลี่ตัวออกมา

ระยะ R5 ระยะนี้เริ่มมีการถ่ายละอองเกสร (anthesis) เกิดขึ้น กลีบดอกบานเต็มที่และสามารถมองเห็นดอกย่อย (disk flower) ระยะ R5 สามารถแบ่งย่อยได้อีกโดยอาศัย เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ดอกย่อยที่ถ่ายละอองเกสรแล้ว การถ่ายละอองเกสรจะเริ่มจากดอกย่อย ที่อยู่วงรอบนอกเข้ามาสู่ใจกลางดอก เช่นหากเกิดการถ่ายละอองเกสรเกิดขึ้นแล้วร้อยละ 50 ระยะนี้จะเป็นระยะ R5.5 หากผสมแล้วร้อยละ 80 จะเท่ากับระยะ R5.8 การกำหนดระยะดังกล่าวอาศัยการประมาณจากพื้นที่ที่มีดอกย่อยเท่านั้น (ไม่ได้รวมจากส่วนของกลีบดอก ในการประมาณพื้นที่) และดอกย่อยดังกล่าวต้องบานแล้ว

ระยะ R6 การถ่ายละอองเกสรเกิดขึ้นสมบูรณ์ และกลีบดอก (ray flower) สูญเสียความเต่ง และเริ่มแสดงอาการเหี่ยว แต่ทั้งนี้การเหี่ยวและการร่วงของกลีบดอก อาจจะเกิดขึ้นหรือไม่เกิดก็ได้

ระยะ R7 ด้านหลังจานดอกจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเรื่อ ๆ การเหลืองจะเริ่มเกิดตรงบริเวณส่วนกลางของจานดอกใกล้กับฐานของจานดอก และรอยต่อของก้านชูดอก (penduncle)

ระยะ R8 ด้านหลังของจานดอกมีสีเหลือง แต่ส่วนของใบประดับ (bract) ยังมีสีเขียวอยู่บางครั้งจะพบหรือไม่พบจุดสีน้ำตาลบนหลังจานดอก

ระยะ R9 ส่วนของใบประดับ กลายเป็นสีเหลืองและสีน้ำตาล จุดสีน้ำตาลหลังจานดอกขยายใหญ่ขึ้นเป็นสีน้ำตาลเกือบทั้งหมด ระยะนี้เป็นระยะที่มีการแก่ทางสรีรวิทยา

การประมาณระยะการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะ R7 ถึง R8 จะต้องพิจารณาเฉพาะจานดอกที่สมบูรณ์ปราศจากโรคเท่านั้น แต่ทั้งนี้จำนวนระยะการเจริญเติบโตและช่วงระยะ (stage) จะขึ้นกับสายพันธุ์และสภาพแวดล้อม

3. สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการปลูก

ทานตะวันชอบอากาศอบอุ่นในเวลากลางวันและอากาศเย็นในเวลากลางคืน อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 18-35 องศาเซลเซียส สภาพความเป็นกรด-ด่าง ของดินประมาณ 5.7-8 สามารถขึ้นได้ในดินแทบทุกประเภท แต่ที่ขึ้นได้ดีคือดินที่มีหน้าดินลึกที่อุ้มน้ำได้ดี แต่ไม่ชอบน้ำ

ข้างและไม่ชอบดินที่มีลักษณะเป็นกรด ปริมาณน้ำฝนประมาณ 800 - 1,200 มิลลิเมตรต่อปี หากดินที่ปลูกมีความชื้นต่ำ ผลผลิตของเมล็ดจะต่ำลงมาก

4. สภาพพื้นที่ที่เหมาะสมสำหรับการปลูกทานตะวัน

ทานตะวันเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่แบบที่ราบเชิงเขา และที่ดอน พื้นที่ที่มีการระบายน้ำดี ไม่มีน้ำท่วมขัง ความลาดเอียงพื้นที่ไม่เกิน 5 % ความสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 500 เมตร ดินที่เหมาะสมในการปลูกทานตะวันเป็นดินเนื้อหยาบหรือเนื้อละเอียดปานกลาง ระบายอากาศ ระบายน้ำ และอุ้มน้ำได้ดี โครงสร้างดินไม่แน่นทึบ และไม่เกิดแผ่นแข็งบนผิวน้ำดิน (surface crust) เมื่อดินเปียก และแห้ง มีปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินไม่น้อยกว่าร้อยละ 1.5 (ศรีสุตา, 2549)

5. ฤดูปลูก

ทานตะวันเป็นพืชที่สามารถเจริญเติบโตได้ในทุกฤดูกาล เพราะเป็นพืชที่ไม่ไวต่อช่วงแสง การปลูกในบางท้องที่อาจไม่มีความเหมาะสม เช่น ในที่ลุ่มภาคกลาง ในฤดูฝนจะมีน้ำขังและเกินไป หรือที่ดินในฤดูแล้งที่ไม่มีน้ำชลประทาน ดังนั้นฤดูที่เหมาะสมที่สุดมี 2 ฤดูคือ

1. ปลายฤดูฝน ในสภาพพื้นที่ที่เป็นดินร่วนเหนียว ควรปลูกทานตะวันในปลายฤดูฝน คือ ตั้งแต่เดือนกันยายน-พฤศจิกายน แต่ถ้าสภาพพื้นที่ที่ปลูกเป็นดินร่วนทราย ควรปลูกในเดือน สิงหาคม-ตุลาคม ซึ่งเป็นช่วงกลางฤดูฝน

2. ฤดูแล้ง ถ้าในแหล่งปลูกนั้นสามารถใช้น้ำจากชลประทานได้ก็สามารถปลูกเป็นพืชเสริมได้ โดยปลูกในช่วงเดือนพฤศจิกายน - กุมภาพันธ์ ซึ่งเป็นช่วงหลังจากเก็บเกี่ยวข้าวแล้ว เนื่องจากพันธุ์ลูกผสมนี้ ดอกค่อนข้างใหญ่ เวลาเมล็ดแก่จานดอกจะห้อยลงมาและด้านหลังของจานดอกจะมีลักษณะเป็นแอ่งเหมือนกระทะก้นแบน เมื่อฝนตกลงมาน้ำฝนจะขังในแอ่งดังกล่าว จะทำให้เกิดโรคเน่าได้มากและทำให้เมล็ดเน่าเสียหาย ดังนั้นจึงควรปลูกในปลายฤดูฝน หรือในฤดูแล้ง และถ้ามีฝนตกน้ำขังในแอ่งของจานดอก ให้เขี่ยต้นเพื่อทำให้น้ำไหลออกให้หมด (ศรีสุตา, 2549)

6. การเก็บเกี่ยว

ทานตะวันจะมีอายุการเก็บเกี่ยวแตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ที่ปลูก (พันธุ์ลูกผสมอายุเก็บเกี่ยว 90-100 วัน) วิธีการเก็บเกี่ยวนั้นให้สังเกตจากด้านหลังของจานดอกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองซึ่งเป็นช่วงการสร้างน้ำมันในเมล็ดจะเริ่มลดลง และจะหยุดสร้างน้ำมันเมื่อจานดอกเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลก็เริ่มเก็บเกี่ยวได้ หลังจากนั้นให้นำไปผึ่งแดดจัด ๆ 1-2 แดด โดยแขวนให้หัวห้อยลงและหมั่นกลับข้อดอก เพื่อให้ดอกแห้งอย่างสม่ำเสมอ ถ้าเก็บเกี่ยวในช่วงที่ยังมีฝนชุกให้นำมาผึ่งในร่มหลาย ๆ วันจนแห้งสนิท แล้วจึงรวบรวมไปนวด อาจใช้แรงคนหรือสัตว์ หรือใช้เครื่องนวดเมล็ดด้วยเหล็กหรือถั่วลิสงก็ได้ เสร็จแล้วนำไปทำความสะอาดแล้วเก็บไว้ในถุงฉางที่ป้องกันแดด-ฝน และแมลงศัตรูได้ เพื่อรอจำหน่าย (ความชื้นของเมล็ดที่จะเก็บรักษาไว้ ควรไม่เกิน 10%) (ศรีสุตา, 2549)

7. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเริ่มแรกเมื่อปี ค.ศ. 1902 โดย Gottlieb Haberlandt นักพฤกษศาสตร์ชาวเยอรมัน แต่ยังไม่ค่อยประสบความสำเร็จเนื่องจากยังไม่มีการนำฮอร์โมนพืชมาใช้ ในปี 1930 สามารถพัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่แยกจากรากพืชหลายชนิดในสภาพปลอดเชื้อ ต่อมาในปี 1938 สามารถเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ และแคลลัสของพืชได้หลายชนิด และหลังจากนั้นก็ได้มีการค้นพบเทคนิคใหม่ ๆ ขึ้นมากมาย (ประศาสตร์, 2538)

การใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปัจจุบันมีความสำคัญและมีประโยชน์อย่างมากในการขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์พืช ในกรณีที่ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์พืช นิยมเรียกว่า micropropagation ต้นพืชที่ได้รับการขยายพันธุ์ถูกเรียกว่า clone ดังนั้นในพืชส่วนใหญ่ นิยมขยายพันธุ์ด้วยส่วนของลำต้นเพื่อสร้าง clone ต่าง ๆ โดยทั่วไปประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 4 ขั้นตอนดังนี้ (รังสฤษฎี, 2540)

1. เทคนิคการทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อ และนำมาเพาะเลี้ยง
2. การชักนำให้เพิ่มจำนวนหน่อมากขึ้น
3. การชักนำให้เกิดราก
4. การย้ายปลูกต้นที่ชักนำได้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะประสบความสำเร็จมากน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างที่มีบทบาทควบคุมการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืช (ไพบูลย์, 2524) สรุปได้ ดังนี้

1. ปัจจัยภายในพืช (endogenous factors)

1.1 ลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) คือ การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อไปเป็นยอดหรือรากนั้นขึ้นอยู่กับชนิดพืช พืชบางชนิดอาจเกิดเป็นยอดหรือรากได้ง่าย ในขณะที่พืชอีกชนิดหนึ่งเกิดได้ยาก แม้จะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของพันธุกรรม

1.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (phytohormone) ในชิ้นส่วนพืช ฮอโมนบางชนิดอาจช่วยส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช และฮอโมนบางชนิดก็สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้เช่นกัน

2. ปัจจัยภายนอก

2.1 แสง (light) แสงไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการปรุงอาหารของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง แต่แสงช่วยให้เนื้อเยื่อมีการพัฒนาไปเป็นส่วนต่าง ๆ ของพืชได้ ซึ่งการให้แสงควรพิจารณาถึงคุณภาพของแสง ความเข้มของแสง และระยะเวลาในการให้แสง

2.2 อุณหภูมิ (temperature) โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อจะประมาณ 25 องศาเซลเซียส

2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators) การเกิดเป็นต้นรากหรือแคลลัสของพืชแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับความสมดุลของปริมาณออกซินและไซโตไคนินในอาหาร

3. ปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่ ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเลี้ยง สภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและส่วนประกอบของพืช

8. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลาย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลาย สามารถนำไปใช้ได้ทั้งพืชที่ขยายพันธุ์โดยเมล็ดและพืชที่ขยายพันธุ์โดยเนื้อเยื่อต้นพืช สำหรับพืชที่ขยายพันธุ์โดยเนื้อเยื่อจะมีข้อได้เปรียบค่อนข้างมาก เพราะเป็นการปฏิบัติกับพืชจำนวนมาก แต่ใช้พื้นที่น้อย และสามารถลดเวลาในการปรับปรุงพันธุ์

การใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสี ทำให้เกิดการกลายและสามารถคัดพันธุ์ได้หลายชนิด เพราะเทคนิคดังกล่าว สามารถช่วยในการแยกส่วนกลาย (mutated sector) ออกจากส่วนปกติ ในกรณีที่เกิดโคเมอร่า แล้วนำไปขยายพันธุ์ต่อไปได้ ดังนั้นจึงเป็นวิธีการที่ช่วยรักษาส่วนกลายมิให้มีการสูญเสียไป (อรุณี, 2550)

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

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

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

9. การแปรผันทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอย่างฉับพลันหรือที่เรียกว่า การกลาย ที่เกิดกับเนื้อเยื่อหรือเซลล์ร่างกาย ที่อยู่ระหว่างการเพาะเลี้ยงก่อนการชักนำให้เกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ เป็นสาเหตุการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม หรือจีโนไทป์ ซึ่งหมายถึงการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม คือ ยีน หรือ ดีเอ็นเอ และเป็นผลของการเกิดโซมาโคลนอลารีเอชัน โดยแสดงออกมาทางจีโนไทป์ (อรุณี, 2550)

ตามหลักการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์ ต้นใหม่ที่ได้ควรมีจีโนไทป์ที่เหมือนต้นแม่ทุกประการ แต่ทางปฏิบัติมักพบต้นที่มีจีโนไทป์แตกต่างจากต้นแม่เกิดขึ้นในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเซลล์หรือเนื้อเยื่อเหล่านี้จะมีการแบ่งเซลล์หรือเพิ่มจำนวนสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ นอกจากนี้ลักษณะทางฟีโนไทป์สามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมหรือจีโนไทป์ พบว่าบางลักษณะมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เรียกลักษณะพืชเหล่านี้ว่า clonal variation ความแปรผันทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นแหล่งความแปรผันทางพันธุกรรมของพืช และอาจมีผลต่อวิวัฒนาการของพืชได้

10. รังสีที่นิยมเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์

1. รังสีเอกซ์ (X-rays)

รังสีเอกซ์ผลิตจากเครื่องกำเนิดรังสีเอกซ์ ที่ประกอบด้วยหลอดสุญญากาศ ภายในมีเป้าที่ทำจากวัสดุที่มีจุดหลอมเหลวสูง เช่น ทังสเตน โมลิบดีนัม ทำหน้าที่เป็นขั้วบวก (anode) และไส้หลอด (filament) ที่ทำจากทังสเตน ซึ่งสามารถทนความร้อนได้สูง ทำหน้าที่เป็นขั้วลบ (cathode) เป้าและไส้หลอดต่อเข้ากับแหล่งจ่ายไฟแรงดันสูง เมื่อไส้หลอดร้อนจะปลดปล่อยอิเล็กตรอนให้เคลื่อนที่ไปปะทะเป้า แล้วให้รังสีเอกซ์ออกมา รังสีเอกซ์เกิดนอกนิวเคลียสจึงไม่จัดเป็นรังสีนิวเคลียร์

2. รังสีแกมมา (gamma-rays)

รังสีแกมมาเป็นรังสีไฟฟ้าที่มีความถี่สูง ไม่มีมวล ไม่มีประจุ มีอำนาจทะลุทะลวงสูง เกิดจากการปล่อยพลังงานของนิวไคลด์กัมมันตรังสี (radionuclide หรือ radioactive nuclide) ที่สลายตัวให้รังสีชนิดอื่นแล้ว แต่มีพลังงานเหลืออยู่ จึงปลดปล่อยออกมาในรูปของรังสีแกมมา รังสีแกมมาจัดเป็นรังสีนิวเคลียร์ เนื่องจากเกิดจากนิวเคลียสของนิวไคลด์กัมมันตรังสี ตัวอย่างนิวไคลด์ของกัมมันตรังสีคือ โคบอลต์-60 และ ซีเซียม-137

3. รังสีนิวตรอน (neutron)

รังสีนิวตรอนเป็นอนุภาคที่ไม่มีประจุไฟฟ้า จึงสามารถผ่านเข้าไปในตัวกลางได้ดี รวมทั้งเซลล์ของสิ่งมีชีวิต นิวตรอนจัดเป็นรังสีนิวเคลียร์ แต่แตกต่างจากรังสีนิวเคลียร์ชนิดอื่นที่มักไม่เกิดการสลายตัวของธาตุกัมมันตรังสี ในปริมาณรังสีที่เท่ากัน นิวตรอนมีความรุนแรงมากกว่ารังสีเอกซ์และรังสีแกมมา โดยเกิดอันตรายมากกว่ารังสีเอกซ์และรังสีแกมมาถึง 10 เท่า มีความยุ่งยากจึงไม่ค่อยนิยมวิธีนี้

4. ไอออนบีม (ion beams)

เป็นลำอนุภาคที่มีประจุ เช่น อิเล็กตรอน หรือ ไอออนอื่นๆ ได้แก่ คาร์บอนไอออน ในโตรเจนไอออน นีออนไอออน เคลื่อนที่ไปในทิศทางเดียวกันและมุ่งเข้าสู่เป้าหมายเดียวกัน หลังจากมีการนำเอารังสีแกมมา รังสีเอกซ์ และรังสีนิวตรอนมาใช้เป็นสิ่งที่ก่อกลายพันธุ์เป็นเวลานาน จึงได้มีการค้นคิดสิ่งกลายพันธุ์ใหม่เกิดขึ้น ไอออนบีมจึงเข้ามามีบทบาทในช่วงศตวรรษที่ 20 จึงเรียกการปรับปรุงพันธุ์ซึ่งใช้ไอออนบีมว่า “ion beam breeding” (อรุณี, 2550)

11. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการฉายรังสีแกมมา

ชุดินทร (2532) ได้ศึกษาการชักนำเบญจมาศให้กลายพันธุ์โดยการฉายรังสีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำเบญจมาศที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อมาอบรังสีที่อัตรา 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 กิโลเรด พบว่าปริมาณรังสีที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์คือ 1 กิโลเรด ปริมาณรังสีที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตลดลง และก่อให้เกิดลักษณะผิดปกติ เช่น ขั้วถิ้น ใบด่าง ปริมาณรังสีตั้งแต่ 4 กิโลเรด ขึ้นไปทำให้การเจริญเติบโตเบญจมาศหยุดชะงักและตายไปในที่สุด

โกศล (2533) ได้ศึกษาการฉายรังสีที่มีผลต่อเมล็ดทานตะวันพันธุ์แปซิฟิก 33 ที่ปริมาณรังสีแกมมาที่ระดับ 21.29 กิโลเรด ทำให้เปอร์เซ็นต์ความงอกลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณรังสีที่ 12 กิโลเรด ทำให้ความยาว hypocotyl ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณรังสีที่ 25 กิโลเรด ทำให้ความยาวรากลดลง 35 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณรังสีที่ 14.44 กิโลเรด มีผลทำให้ทานตะวันพันธุ์แปซิฟิก 33 ตายไป 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) และปริมาณรังสีที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในทานตะวันพันธุ์แปซิฟิก 33 เท่ากับ 10 กิโลเรด ซึ่งมีผลให้เกิดลักษณะทางคุณภาพเปลี่ยนแปลง คือ ความสูง ขนาดดอก และจำนวนเมล็ดต่อดอกลดลง ส่วนเปอร์เซ็นต์น้ำมันไม่แตกต่างทางสถิติ

อุไร (2542) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการชักนำให้เกิดการกลายในต้นอเมซอนด้วยรังสีแกมมาโดยศึกษาอิทธิพลของรังสีแกมมาต่อการตายของต้นอเมซอน 30 เปอร์เซ็นต์ และ 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 4 เดือน ได้ค่า LD_{30} และ LD_{50} ประมาณ 335 และ 550 แรค จากการศึกษาอิทธิพลของรังสีแกมมาในช่วงค่า LD_{30} - LD_{50} ที่มีผลต่อการตายของต้นอเมซอน พบว่ารังสีไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตาย จำนวนหน่อ การจัดเรียงของใบ และสีของใบ รังสีแกมมามีผลทำให้ต้นอเมซอนที่ได้รับการฉายรังสีทุกปริมาณเจริญเติบโตช้ากว่าต้นอ่อนที่ไม่ได้รับการฉายรังสี แกมมาทุกปริมาณมีจำนวนโครโมโซมผิดปกติเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการฉายรังสีซึ่งมีโครโมโซม $2n=22$

ศิริรัตน์ (2546) ศึกษาผลของการฉายรังสีแกมมาที่มีต่อเมล็ดทานตะวัน 3 ลักษณะคือ เมล็ดที่ไม่แกะเปลือก เมล็ดไม่แกะเปลือกแช่น้ำ 8 ชั่วโมง และเมล็ดที่แกะเปลือก โดยนำเมล็ดทั้ง 3 ลักษณะมาฉายรังสีแกมมาปริมาณ 0 5 10 15 20 และ 25 กิโลเรด พบว่า ควรเลือกใช้ปริมาณรังสีในเมล็ดไม่แกะเปลือกที่ 14.86-16.85 กิโลเรด เมล็ดไม่แกะเปลือกแช่น้ำ 8 ชั่วโมง 9.57-10.75 กิโลเรด เมล็ดที่แกะเปลือก 14.67-16.70 กิโลเรด

Bowen (1962) รายงานถึงผลของรังสีแกมมาที่มีต่อกิ่งปักชำเบญจมาศ 7 พันธุ์ ว่ามีค่า LD_{50} อยู่ในช่วงระหว่าง 3.0-4.3 กิโลเรด และมีผลทำให้ออกดอกช้า ต้นที่ผ่านการฉายรังสีจะมีการเปลี่ยนแปลงสีดอกประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ การเปลี่ยนสีดอก และรูปร่างของดอกขึ้นอยู่กับพันธุ์ และจากลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปในพันธุ์หนึ่ง ๆ นั้น อาจเกิดขึ้นจาก periclinal chimera มีการตั้งสมมุติฐานว่า การใช้รังสีชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทำให้จำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นมากกว่าจะทำให้ลดลง

Kirenmai and Devi (1995) ทดลองชักนำให้เกิดการกลายในเมล็ดทานตะวัน (*Helianthus annuus* cv. SS56) ผลที่ได้มีดังนี้คือ เมื่อใช้ Hydroxylamine 1 เปอร์เซ็นต์ ได้พันธุ์กลายเมล็ดกลม เมื่อใช้ N-methyl-N-nitrosourea 0.04 เปอร์เซ็นต์ ได้พันธุ์กลายเมล็ดที่มีความหนาขึ้น ส่วนการใช้รังสีแกมมาปริมาณ 20 กิโลเรด ได้พันธุ์กลายเมล็ดกลาย จากนั้นได้ศึกษาความแตกต่างของฮอร์โมนพืชจากแคลลัสและความสามารถในการเจริญเติบโตของพันธุ์กลายเหล่านี้โดยการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยง (cotyledon) การตรวจสอบพันธุ์กลายเปรียบเทียบกับพันธุ์ปกติ พบว่าชิ้นส่วนใบเลี้ยงที่มาจากพันธุ์ปกติ มีความสามารถในการเกิดแคลลัสได้ดีกว่าชิ้นส่วนใบเลี้ยงที่มาจากพันธุ์กลาย

Ozyigit and Semiz (2006) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทานตะวัน 5 สายพันธุ์จากเมล็ด ได้แก่ Trakya 80, Trakya 129, Trakya 259, Trakya 2098 และ Viniimk 8931 บนสูตรอาหารพื้นฐาน MS (Murashige and Skoog, 1962) พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ ซึ่งการเกิดแคลลัสจากอาหารสูตรชักนำแคลลัสเกิด 80-92 % ทั้ง 5 พันธุ์ สามารถชักนำให้เกิดรากได้ในอาหารสูตร MS ร่วมกับ IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหาร MS ที่ปราศจากฮอร์โมนก็สามารถชักนำให้เกิดรากได้เช่นเดียวกันทั้ง 5 สายพันธุ์

12. การตรวจสอบสายพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี

เอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism, AFLP) เป็นเทคนิคของเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) แบบหนึ่ง พื้นฐานของเอเอฟแอลพี คือการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) ซึ่งรวมเอาความน่าเชื่อถือของเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (restriction fragment length polymorphism, RFLP) และประสิทธิภาพของพีซีอาร์เข้าด้วยกัน เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นโดย Vos และ Zabeau นักวิจัยของบริษัท Keygene N.V. ประเทศเนเธอร์แลนด์ (Vos *et al.*, 1995)

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มาจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทำได้โดยการเชื่อมต่อ adapter เข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอต่อจากตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์โดย adapter เป็นดีเอ็นเอสายคู่สั้น ๆ ที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นปลายเหนียวเหมือนกับปลายโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ที่เลือกจึงสามารถเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดไว้โดยใช้ปลายเหนียว (sticky end ligation) และทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ต่อไป ด้วยวิธีการดังกล่าวนี้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ จะสามารถเพิ่มปริมาณขึ้นได้โดยใช้ไพรเมอร์ซึ่งมีลำดับเบส

ตรงกับส่วนของ adapter ร่วมกับส่วนของเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ อย่างไรก็ตาม จำนวนขึ้นดิเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้คราวเดียวกันมีมาก และไม่สามารถจะแยกจากกัน หรือ ตรวจสอบโดยวิธีทั่ว ๆ ไป เช่น การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ดังนั้นการสังเคราะห์ไพรเมอร์ ในการทำเอเอฟแอลพีจึงเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกว่าเข้าที่ปลาย 3' ต่อจากเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ เพื่อให้เลือกจับกับขึ้นดิเอ็นเอที่มีลำดับเบสส่วนที่อยู่ต่อจากบริเวณตัดจำเพาะสอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์นั้น ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณขึ้นดิเอ็นเอเพียงบางส่วน และสามารถ กำหนดจำนวนขึ้นดิเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณได้โดยจำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปนั่นเอง ถ้าดิเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตหรือจีโนมที่ศึกษามีส่วนประกอบของเบสทั้ง 4 ชนิด (G, A, C, T) ในสัดส่วนเท่ากัน การเพิ่มเบสที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์เพื่อคัดเลือกว่า 1 เบสจะช่วยลดจำนวนขึ้นดิเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณเหลือเพียง 1 ใน 4 ของทั้งหมด ถ้าเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกว่า 2 เบส จำนวนขึ้นดิเอ็นเอที่ตรวจสอบได้ก็จะลดลงเหลือ $(1/4)^2$ หรือ 1 ใน 16 ของขึ้นส่วนดิเอ็นเอที่ตัดได้ทั้งหมด ดังนั้น จึงสามารถควบคุมให้เกิดการเพิ่มปริมาณขึ้นดิเอ็นเอในจำนวนที่เหมาะสมได้ โดยจำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปแต่ละเบสจะลดปริมาณขึ้นดิเอ็นเอลงเหลือ $(1/4)^n$ ของทั้งหมดซึ่ง n คือจำนวนเบสสำหรับคัดเลือกว่าเพิ่มขึ้น ในทางปฏิบัติ ต้องการให้มีจำนวนขึ้นดิเอ็นเอในช่วง 50-100 แถบ ซึ่งเป็นช่วงที่สามารถตรวจสอบได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel ในสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดเล็กจะใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกว่าจำนวนน้อย ในขณะที่ทำการตรวจสอบดิเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดใหญ่หรือมีความซับซ้อนมาก ต้องใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกว่าจำนวนมากขึ้น เพื่อปรับจำนวนขึ้นดิเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณให้มีจำนวนพอเหมาะ (สุรินทร์, 2552)

หลักการทำ เอเอฟแอลพี (สุรินทร์, 2552)

ขั้นแรก คือ การนำดิเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด นิยมใช้เอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส ซึ่งตัดดิเอ็นเอห่างกันประมาณ $4^6 (=4,096)$ คู่เบส เรียกว่า rare cutter ร่วมกับเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส ซึ่งตัดดิเอ็นเอห่างกันประมาณ $4^4 (=256)$ คู่เบส เรียกว่า frequent cutter แล้วเชื่อมต่อกับขึ้นดิเอ็นเอกับ adapter ของเอนไซม์ทั้งสองชนิด เพื่อให้เป็นที่จับของไพรเมอร์ ในการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์ โดยเอนไซม์ที่ใช้ได้มีหลายชนิด เช่น *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *BglII*, *XbaI* (6-cutter) หรือ *Sse8387I* (8-cutter) ร่วมกับ *MseI* หรือ *TaqI* ซึ่งเป็น 4-cutter เอนไซม์ *MseI* มีตำแหน่งจดจำ คือ 5'-TTAA-3' และเอนไซม์ *TaqI* มีตำแหน่งจดจำ คือ 5'-TCGA-3' ปัจจุบันนิยมใช้เอนไซม์ *MseI* มากกว่า เพราะตัดดิเอ็นเอได้ขนาดพอเหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์ และการแยกโดยใช้ denaturing polyacrylamide gel ส่วนเอนไซม์ที่ใช้เป็นคู่กันมักใช้เอนไซม์

EcoRI เนื่องจากมีราคาสูงและการตัดดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพดี โดยมีโอกาสพบการตัดไม่สมบูรณ์ได้น้อย

ขั้นที่สอง คือ การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ ไพรเมอร์ที่ใช้มีลำดับเบสทางปลาย 5' เหมือนกับลำดับเบสของ adapter ต่อด้วยลำดับเบสบริเวณจดจำ หรือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ และเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3' อีกส่วนหนึ่งเพื่อให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วน ส่วนของไพรเมอร์ที่เหมือนกับ adapter และบริเวณจดจำของเอนไซม์เรียกว่า common part ส่วนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' เรียกว่า selective part จำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณลง โดยชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณได้ต้องมีลำดับเบสที่อยู่ต่อกับตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์สอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไป ถ้าเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกรวมขึ้นจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณลดลงประมาณ 4 เท่าต่อทุก ๆ เบสที่เพิ่มขึ้น การศึกษาจีโนมขนาดเล็ก หรือโคลนที่อยู่ในพลาสมิด คอสมิด หรือ bacterial artificial chromosome (BAC) ไม่จำเป็นต้องเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก เนื่องจากจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีจำนวนน้อยอยู่แล้ว และสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดเล็กไม่ใหญ่มาก เช่น แบคทีเรีย หรือเชื้อรา จะเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก 1-2 เบส จึงทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณเพียงครั้งเดียว ส่วนพวกที่มีจีโนมขนาดใหญ่จะเพิ่มเบสมากกว่า 2 เบสที่ไพรเมอร์ทั้งสองชนิด และจะทำปฏิกิริยาเพิ่มประมาณ 2 ครั้ง ครั้งแรก เรียกว่า preselective amplification และการทำพีซีอาร์ครั้งที่ 2 เรียกว่า selective amplification โดยไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกที่ปลาย 3' จะเรียกเป็นไพรเมอร์ +1, +2, +3, +4 ตามลำดับ เช่น ไพรเมอร์ทางปลาย *EcoRI* adapter จะเรียกว่า *EcoRI*+1, *EcoRI*+2, *EcoRI*+3 และ *EcoRI*+4 เป็นต้น

ขั้นสุดท้าย คือการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้โดยทำอิเล็กโตรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel แถบดีเอ็นเอที่เหมาะสมที่แยกได้คือในช่วง 50-100 แถบ การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยการย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท การทำออโตเรดิโอกราฟ หรืออาจใช้วิธีติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorescent dye) แล้วตรวจสอบผลโดยใช้เครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ หรือวิธีการตรวจสอบแบบประยุกต์ใช้วิธีการตรวจสอบด้วยวิธีการไฮบริดเซชันโดยใช้โพรบ (probe) ที่ติดฉลากด้วยสารปลดรังสี (non radioactive label) หรือวิธีย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรต (silver staining) ซึ่งสามารถทำในห้องปฏิบัติการทั่วไป (สุรินทร์, 2552)

กฤษณา (2546) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหญ้าเนเปียร์ (*Pennisetum* sp.) หญ้ารูซี่ (*Brachiaria ruziziensis*) และหญ้ากินนีสีม่วง (*Panicum maximum* TD58) และตรวจสอบหญ้าเนเปียร์แคะที่ผ่านการฉายรังสีเปรียบเทียบกับหญ้าเนเปียร์แคะที่ไม่ได้ฉายรังสีโดยใช้เทคนิค

เอเอฟแอลพี พบว่าการศึกษาหาพันธุ์ในสกุล *Pennisetum* โดยใช้ไพรเมอร์ 15 คู่ ได้แถบดีเอ็นเอ ทั้งหมด 930 แถบ ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของหญ้าเนเปียร์สอดคล้องกับลักษณะภายนอก คือหญ้า ชนิดที่มีลำต้นเดี่ยวและชนิดที่มีลำต้นสูงจัดอยู่คนละกลุ่มกัน และเมื่อนำหญ้าเนเปียร์เคราะห์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่ไม่ได้ฉายรังสีกลับมาเปรียบเทียบกับหญ้าเนเปียร์เคราะห์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสี และหญ้าเนเปียร์เคราะห์ที่เพาะจากเมล็ด โดยใช้ไพรเมอร์ 11 คู่ พบว่า หญ้าเนเปียร์เคราะห์ที่ผ่านการฉายรังสีมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นเมื่อดูจากแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด ของแถบแตกต่างไปจากหญ้าเนเปียร์เคราะห์ดั้งเดิมที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสี และเมื่อนำมาจัดกลุ่ม ความสัมพันธ์พบว่าหญ้าเนเปียร์เคราะห์ดั้งเดิมที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีแยกตัวออกจากกลุ่มที่ฉายรังสี อย่างชัดเจน และในการศึกษาหาพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ 10 คู่ ได้แถบดีเอ็นเอ 862 แถบ พบว่า มีความแปรปรวนสูงในแต่ละกลุ่มประชากร ยกเว้นตัวอย่างจากจังหวัดลำปางมีความแตกต่างในกลุ่ม ประชากรต่ำ และจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วนการศึกษาหาพันธุ์ในสีม่วง โดยใช้ไพรเมอร์ 10 คู่ พบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกันทั้งหมด แสดงว่าหญ้าพันธุ์สีม่วงมีความแปรปรวนในสายพันธุ์น้อย เนื่องจากเป็นพืช *apomixis* จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าเทคนิคเอเอฟแอลพี เป็น เทคนิคที่มีประสิทธิภาพมีความเหมาะสมในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม และยังสามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นได้

ลลิตา (2552) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์ตรวจสอบเป็นพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ (Hybrid I, Hybrid II, และ Hybrid III) โดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี จำนวน 59 คู่ไพรเมอร์ พบว่า มีเพียง 23 คู่ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอ ต่างกัน (polymorphic bands) เมื่อศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 1,963 แถบ (เฉลี่ย 85.35 แถบ/ไพรเมอร์) เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 1,278 แถบ (64.85%) ค่า Polymorphic Information Contents (PICs) มีค่าอยู่ในช่วง 0.00-0.50 โดยมีค่า PICs เฉลี่ย 0.293 และพบ 247 แถบ มีค่าอยู่ในช่วง 0.45-0.50 คิดเป็น 12.58 % ของจำนวนแถบดีเอ็นเอ ทั้งหมด เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม อยู่ในช่วง 0.37-1.00 และ สามารถจัดกลุ่มแบ่งทานตะวันสายพันธุ์แท้ออกจากกันได้อย่างชัดเจนได้ ทั้งหมด 2 กลุ่มโดยวิธี UPGMA คือ ทานตะวันกลุ่ม restorer (R) line และกลุ่ม maintainer (B) line ซึ่งแบ่งย่อยเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ ทานตะวันชนิดน้ำมัน และชนิดบริโภคเมล็ด

จักรพันธ์ และ สุจิตรา (2547) ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*Paphiopedilum exul* (Ridl.) Rolfe) โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี โดยรวบรวมพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่จาก 6 แหล่งในบริเวณจังหวัดตรัง กระบี่ และพังงา จากการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี

ของ CTAB ในใบอ่อนพบว่ามีความเข้มข้นและบริสุทธิ์สูงกว่าการสกัดจากใบแก่ การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยไมโครแท่งอาร์เอมีสัดส่วนทั้งหมด 64 คู่ พบว่า มีจำนวนคู่ไพรเมอร์ 13 คู่ สามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่ศึกษา โดยให้จำนวนแถบดีเอ็นเอจำนวนมากและลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่คมชัด

Dong *et al.* (2007) ศึกษาความหลากหลายของทานตะวันบริโกลเมล็ด 70 สายพันธุ์ด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ 8 คู่ พบว่า คู่ไพรเมอร์ทั้ง 8 คู่แสดงแถบดีเอ็นเอมีสัดส่วนค่าโพลิมอร์ฟิซึมเท่ากับ 78.50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสายพันธุ์ทานตะวันที่แตกต่างกัน และการใช้จำนวนไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน ทำให้ค่าโพลิมอร์ฟิซึมแตกต่างกัน

Oliveira *et al.* (2004) ซึ่งศึกษาผลของการฉายรังสีแกมมาให้เมล็ดทานตะวันพันธุ์ HA BR 104 เพื่อให้ต้านทานโรคใบจุด (*Alternaria leaf spot*) โดยนำเมล็ดฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 150 และ 165 เกรย์ พบว่า ทานตะวันพันธุ์ HA BR 104 ที่ผ่านการฉายรังสีสามารถต้านทานโรคใบจุดในระดับที่ไม่เกิดโรค หรือ ในระดับที่เกิดโรคน้อยกว่า 5%

Rashid *et al.* (2009) ศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีต่อเมล็ดข้าวพันธุ์ Basmati-370 และพันธุ์ Basmati-Pak โดยนำเมล็ดไปฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 150 200 250 และ 300 เกรย์ แล้วตรวจสอบการกลายด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ *Pst I* ร่วมกับ *Mse I* จำนวน 16 คู่ พบว่า คู่ไพรเมอร์ทั้ง 16 คู่แสดงแถบดีเอ็นเอมีสัดส่วนค่าโพลิมอร์ฟิซึมเท่ากับ 37.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสิ่งบ่งชี้ว่าอาจเกิดการกลายพันธุ์ขึ้นในข้าวภายหลังการฉายรังสีในปริมาณต่าง ๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ เมล็ดทานตะวันพันธุ์โอเปร่า ของบริษัท Syngenta
2. วัสดุและอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและอุปกรณ์กักตุนพันธุ์
 - 2.1 เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น ขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์ 4 ออนซ์ ปีกเกอร์ กระบอกตวง
 - 2.2 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
 - 2.3 ตู้อบ (hot air oven)
 - 2.4 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
 - 2.5 เครื่องชั่งน้ำหนัก
 - 2.6 เตาไมโครเวฟ (microwave oven)
 - 2.7 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar air flow cabinet)
 - 2.8 มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว (Petri dish) และตะเกียงแอลกอฮอล์
 - 2.9 ชั้นวางขวดเนื้อเยื่อพืช และเครื่องเขย่า
 - 2.10 เครื่องฉายรังสีแกมมา มาร์ค วัน รุ่น Mark I 30 (Serial Number 1116)
3. โรงเรือนปลูกทานตะวัน
4. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์เอเอฟแอลพี
 - 4.1 โกร่งบดตัวอย่าง
 - 4.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) และเครื่อง vortex
 - 4.3 เครื่อง Thermal Cycler สำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์
 - 4.4 เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis)
 - 4.5 อุปกรณ์เตรียมเจล (gel caster)
 - 4.6 เครื่องถ่ายภาพเจล (gel document)
 - 4.7 เครื่อง denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

5. สารเคมี

5.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS

(Murashige and Skoog, 1962)

5.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ 6-benzyladenine (BA) และ TDZ

5.3 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ Haite® และ Tween 20

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

5.5 สารเคมีที่ใช้ในการทำเอเอฟแอลพี

5.5.1 สารเคมีในปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการต่อกับ adapter เช่น เอนไซม์ *EcoRI*, *MseI*, T4 ligase, *EcoRI* adapter, *MseI* adapter และ ATP เป็นต้น

5.5.2 สารเคมีในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ เช่น *EcoRI* primer, *MseI* primer, $MgCl_2$, dNTP และ *Taq* polymerase เป็นต้น

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

5.5.4 สารเคมีในการแยกดีเอ็นเอโดย denaturing polyacrylamide gel electrophoresis เช่น polyacrylamide gel, ammonium persulfate, TEMED, acetic acid, silver nitrate, sodium carbonate, sodiumthiosulfate, formaldehyde, sequencing dye, 5x TBE และ 0.5x TBE เป็นต้น

6. ไพรเมอร์สำหรับการทำเอเอฟแอลพี ดังตารางที่ 2

7. อุปกรณ์สำหรับปลูกพืชในสภาพธรรมชาติ ได้แก่ กระถางพลาสติกขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้ว และ ดิน : แกลบเผา : แกลบ : ปุ๋ยคอก ในสัดส่วน 1 : 1 : 1 : 1 สำหรับลงปลูก ในกระถางขนาด 8 นิ้ว

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงทานตะวันพันธุ์โอเปร่าในสภาพปลอดเชื้อ

1.1 นำเมล็ดทานตะวันพันธุ์โอเปร่ามาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดด้วยสารละลาย Haiter® 20 เปอร์เซนต์ เติม Tween 20 1-2 หยด เขย่านาน 20 นาที หลังจากนั้นฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดด้วยสารละลาย Haiter® 10 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

1.2 นำเมล็ดทานตะวันเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตร MS ที่มีค่า pH 5.7 เพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส โดยให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 14-21 วัน

2. ศึกษาสูตรอาหารสำหรับเพิ่มจำนวนทานตะวันโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.1 การเตรียมเนื้อเยื่อ

เพาะต้นทานตะวันในสภาพปลอดเชื้อจนเกิดใบจริง 2-3 คู่ใบ ทำการตัดจากบริเวณยอดลงมาประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร

2.2 การเพิ่มยอดทานตะวัน

นำยอดไปเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยฮอร์โมนที่ช่วยในการเพิ่มจำนวนยอด โดยทดลองสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด ได้แก่ BA ที่มีความเข้มข้นของสาร 0 1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ ที่มีความเข้มข้นของสาร 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ pH 5.7 เพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส โดยให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

3. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยฉายรังสีแบบเฉียบพลัน

นำเมล็ดทานตะวันพันธุ์โอเปรามาฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน ในปริมาณต่าง ๆ คือ 0 12 13 และ 14 กิโลเรด และ ส่วนยอดทานตะวันที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ อายุประมาณ 2 อาทิตย์แล้วตัดส่วนยอดความยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำไปฉายรังสีที่ระดับ ปริมาณ 1 2 3 และ 4 กิโลเรด จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 1 เดือน วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) สิ่งทดลองละ 10 ซ้ำ บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอก จำนวนยอด อัตราการรอดชีวิต

4. ตรวจสอบความแปรปรวนของต้นทานตะวันพันธุ์โอเปร่าหลังจากฉายรังสีแกมมาโดยการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอฟแอลพี

4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืช (DNA extraction)

4.1.1 สกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB ซึ่งดัดแปลงมาจาก Aldrich and Cullis (1993) โดย นำใบอ่อนทานตะวันประมาณ 0.3-0.5 กรัม มาบดในโกร่งที่เย็นด้วยไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ให้ท่วมและบดจนกลายเป็นผงแป้ง ร่อนไนโตรเจนเหลวระเหยจนหมด

4.1.2 ย้ายตัวอย่างผงใบลงในหลอดไมโครเซนติฟิวซ์ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ที่เย็นจัด โดยนำหลอดไปแช่ไนโตรเจนเหลวก่อน เติม DNA extraction buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตรที่ ประกอบด้วย 2 % CTAB, 2% PVP, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2 % (V/V) α -mercaptoethanol ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่า นำไปบ่มในอ่างน้ำร้อน (water bath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

4.1.3 นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ย้ายใส่หลอดใหม่ เติม chloroform : isoamyl

alcohol อัตราส่วน 24:1 ; v:v ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 10,000 รอบ นาน 10-15 นาที

4.1.4 คัดส่วนใสชั้นบนใส่หลอดใหม่ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ย้ายใส่หลอดใหม่ เติม chloroform : isoamyl alcohol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 10,000 รอบ นาน 10-15 นาที อีกหนึ่งครั้ง คัดส่วนใส่ชั้นบนใส่หลอดใหม่ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ย้ายใส่หลอดใหม่ เติม 3 M sodium acetate (NaOAc pH 5.2) โดยเติม 0.1 เท่าของปริมาตรของส่วนใส่ที่คัดมา (เท่ากับปริมาตร 40 ไมโครลิตร) เติมเอทานอลแอลกอฮอล์ 95 % 2 เท่าของส่วนใส่ (เท่ากับปริมาตร 800 ไมโครลิตร) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมานำไปปั่นที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือข้ามคืน

4.1.5 นำมาปั่นเหวี่ยง 15 นาที เทส่วนใส่ทิ้งล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 % ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 10,000 รอบ นาน 10-15 นาที แล้วเทส่วนใส่ทิ้ง ทำซ้ำ 2 รอบ ตากตะกอนให้แห้งโดยเปิดฝาลอด แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอและกำจัดอาร์เอ็นเอด้วย TE buffer 30 ไมโครลิตร ร่วมกับ Rnase 2 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ Rnase ย่อยสลาย RNA ของพืช แล้วเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปใช้ในขั้นต่อไป

4.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

4.2.1 วัดคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธีการอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเตรียมอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 0.8 % ใช้ 0.5 X TBE buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM Boric acid, 1 mM EDTA) ผสมกับเจลอะกาโรส แล้วนำไปอุ่นให้เดือดในเตาไมโครเวฟ ทิ้งให้อุ่นแล้วเทลงในพิมพ์ของเจลอะกาโรสให้มีความหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร

4.2.2 เตรียมสารละลายดีเอ็นเอจากการสกัดดีเอ็นเอข้างต้นผสมกับโบลด์คิงดาเย (bromophenol blue 0.25%, glycerol 30%) ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 แล้วหยอดลงในช่องแผ่นพิมพ์

เจล โดยมีดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น 50 และ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบความเข้มข้น

4.2.3 ต่อกระแสไฟฟ้าเข้าเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ใช้ระยะเวลาให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ 30 นาที

4.2.4 นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรนาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ 10 นาที

4.2.5 นำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ถ่ายภาพด้วยเครื่อง gel documentation system เปรียบเทียบความเข้มข้นกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

4.3 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเชื่อมต่อกับ adapter

การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดพร้อมกัน คือ *EcoRI* และ *MseI* เพื่อให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดพอเหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการทำฟิชัวร์ และมีขนาดที่เหมาะสมในการแยกบน denaturing polyacrylamide gel จากนั้นนำดีเอ็นเอไปเชื่อมต่อกับ adapter เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ สำหรับการเพิ่มปริมาณ โดย adapter ที่ต่อเข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอจะทำหน้าที่เป็นตำแหน่งจับของไพรเมอร์ในการทำฟิชัวร์ ซึ่ง adapter ที่ใช้คือ *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter

การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเชื่อมต่อกับ adapter ทำโดยเติมดีเอ็นเอและสารละลายแต่ละชนิดในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2.50 ไมโครลิตร สารละลายบัฟเฟอร์ *SuRE/Cut Buffer A* (Roche Diagnostics Corporation, U.S.A.) เข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 3 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร, Fermentas, U.S.A.) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ *MseI* (10

ยูนิตต่อไมโครลิตร, Fermentas, U.S.A.) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ร่วมกับสารละลาย *EcoRI* adpter (5 พิโคโมล) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ *MseI* adapter (5 พิโคโมล) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย ATP (100 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร และเอนไซม์ T4 DNA ligase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้วให้ได้ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 60 วินาที เพื่อป้องกันสารละลายติดค้างที่ข้างผนังหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน หลังจากนั้นแบ่งดีเอ็นเอ 10 ไมโครลิตรมาเจือจาง 10 เท่าด้วยสารละลาย TE เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณขั้นต่อไป ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

4.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ในขั้น preselective amplification

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในขั้นตอนนี้จะใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 ตัวที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์เพื่อลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้และให้มีความเฉพาะในขั้นหนึ่งก่อนไพรเมอร์ที่ใช้ มีดังนี้

EcoRI primer +1 (E-A) 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'

MseI primer +1 (M-C) 5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'

ตารางที่ 1 สารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้น preselective amplification

สารที่ใช้	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. สารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ และเชื่อมต่อกับ adapter แล้ว	4.0
2. primer E-A หรือ E-C (5 pmole)	1.0
3. primer M-C หรือ M-A (5 pmole)	1.0
4. dNTP mix (2mM)	4.0
5. 10X PCR buffer	2.0
6. $MgCl_2$	1.2
7. <i>Taq</i> polymerase (5 U/ μ l)	0.4
8. น้ำกลั่น	6.4
ปริมาตรรวม	20.0

เตรียมสารละลายสำหรับทำพีซีอาร์ตามตารางที่ผสมให้เข้ากันนำเข้าเครื่องพีซีอาร์โดยใช้
อุณหภูมิและเวลาของแต่ละขั้นตอน ดังนี้

pre denaturation	ที่อุณหภูมิ	94 องศาเซลเซียส	2 นาที	} จำนวน 20 รอบ
denaturation	ที่อุณหภูมิ	94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
annealing	ที่อุณหภูมิ	56 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
extention	ที่อุณหภูมิ	72 องศาเซลเซียส	60 วินาที	
post extention	ที่อุณหภูมิ	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	

นำผลผลิตที่ได้จากการทำพีซีอาร์ขั้นแรกมาเจือจางลง 20 เท่าด้วย deionize เพื่อใช้เป็น
ต้นแบบในการเพิ่มปริมาณขั้นต่อไป โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอที่เจือจางปริมาณ 2 ไมโครลิตร ส่วน
ปริมาณดีเอ็นเอที่เหลือเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

4.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ในขั้น selective amplification

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นตอนนี้จะใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 ตัวที่
ปลาย 3' ของไพรเมอร์เพื่อให้เกิดการคัดเลือกการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วน กลุ่มสมของไพร
เมอร์ทั้ง 2 ชนิด ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 คู่ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือที่ปลาย 3' สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในการทำ
selective amplification

คู่ที่	<i>Eco</i> RI primer	<i>Mse</i> I primer
1	E-AAC	M-CAT
2	E-AAC	M-CTG
3	E-ACC	M-CAT
4	E- ACC	M-CAC
5	E- ACC	M-CTG
6	E- ACC	M-CTA
7	E-ACG	M-CAT
8	E-CAG	M-ACT
9	E-CAG	M-AGC
10	E-CGT	M-ATT

หมายเหตุ E คือ *Eco*RI primer M คือ *Mse*I primer

ตารางที่ 3 สารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้น selective amplification

สารที่ใช้ปริมาณ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
1. สารละลายดีเอ็นเอ จาก preselective amplification	2.00
2. primer E-ANN หรือ E-CNN (5 pmole/ μ l)	1.00
3. primer M-CNN หรือ M-ANN (5 pmole/ μ l)	1.00
4. dNTP mix (2mM)	4.00
5. 10X PCR buffer	2.00
6. $MgCl_2$ (50mM)	1.20
7. Taq polymerase (1 U/ μ l)	0.40
8. น้ำกลั่น	8.40
ปริมาณรวม	20.00

ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณจำนวน 36 รอบ โดยใช้โปรแกรม touch down PCR ดังนี้

pre-denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที (รอบแรก)	
denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที	จำนวน 12 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที	

โดยจะลดอุณหภูมิในขั้น annealing (65 องศาเซลเซียส) ลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียส

จำนวน 12 รอบ และทำปฏิกิริยาต่อ ดังนี้

denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที	จำนวน 23 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที	
post extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที	

4.6 การวิเคราะห์สารละลายดีเอ็นเอโดย denaturing polyacrylamide gel

4.6.1 การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

4.6.1.1 นำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง ให้สะอาดทั้ง 2 แผ่น

4.6.1.2 เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 1 มิลลิลิตร, glacial acetic acid 1 มิลลิลิตร และเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร) เพื่อให้เจลเกาะติดกับกระจก

4.6.1.3 กระจกแผ่นที่ใช้เป็น chamber เช็ดให้ทั่วด้วย clearview เพื่อไม่ให้เจลเกาะติด chamber ปลอ่ยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที

4.6.1.4 นำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกอบเข้าชุด โดยวาง spacer ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง โดยหันด้านที่เช็ดด้วย bind silane และ clearview เข้าหากันใช้คลิปหนีบยึดให้อยู่คงที่

4.6.2 เตรียม polyacrylamide gel ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้อัตราส่วนของ acrylamide:bisacrylamide 19:1 และยูเรีย (urea) เข้มข้น 7 โมลาร์ มีส่วนผสมดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาณสารที่ใช้สำหรับเตรียมเจลเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์สำหรับขนาดกระจก 38 x 50 เซนติเมตร ปริมาตรรวม 2,000 มิลลิลิตร

สารที่ใช้	ปริมาตรรวม
40% acrylamide (19:1)	250 มิลลิลิตร
5x TBE	200 มิลลิลิตร
ยูเรีย	840 กรัม
10% APS	90 ไมโครลิตร
TEMED	56 ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	ปรับปริมาตรภายหลังจนครบ 2 ลิตร

เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันอย่างรวดเร็ว อย่าให้เกิดฟองอากาศ เทเจลใส่ลงในช่องว่างระหว่างกระจกจนเต็ม แล้วเสียบหัวด้านที่เรียบเป็นเส้นตรง ลงไปด้านบน ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง

4.6.3 การทำ pre- run อิเล็กโตรโฟรีซิส

เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว ดึงหัวออก และใช้น้ำล้างกระจกด้านนอกให้สะอาด เพื่อล้างเศษเจลโพลีอะคริลาไมด์ แล้วประกอบกระจกเข้ากับชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส เดิมบัฟเฟอร์ 0.5x TBE ลงในช่องสำหรับใส่บัฟเฟอร์ทั้งด้านบนและด้านล่าง ต่อสายไฟเข้ากับเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส ทำ pre- run ใช้ความต่างศักย์ 3000 โวลต์ 70 วัตต์ เป็นเวลา 60 นาที

4.6.4 การทำอิเล็กโทรโฟริซิส

ปิดเครื่องจากการทำ pre-run ใช้เข็มฉีดยาฉีดบัฟเฟอร์ลงในช่องหัวเพื่อล้างยูเรียที่อยู่ในช่องหัวแต่ละช่องให้หมด คือดสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการทำพีซีอาร์มา 5 ไมโครลิตร ผสมกับ sequencing dye (98% formamide, 10 mM EDTA, 0.01% (w/v) bromophenol blue, 0.01% (w/v) xylene cyanal) 10 ไมโครลิตร แล้วหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอลงในช่องแต่ละช่องของเวล พร้อม กับหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน (ØX174 DNA/HinfI) หลังจากนั้นเปิดเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์ 70 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือจนกว่า loading buffer จะเคลื่อนที่ลงมาประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของเจล ปิดเครื่อง นำกระบอกออกจากเครื่อง แยกกระบอกทั้ง 2 แผ่นออกจากกัน

4.6.5 การย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

4.6.5.1 นำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่มาแช่ในสารละลาย fixative (10% acetic acid) นาน 20 นาที เขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่า แล้วล้างในน้ำ deionized 3 นาที เปลี่ยนน้ำล้างใหม่ และล้างต่ออีก 3 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา

4.6.5.2 นำแผ่นเจลใส่ในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (1% silver stain, 0.56% formaldehyde) เพื่อย้อมเจลเป็นเวลา 30 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ แล้วนำแผ่นเจลออกมาจุ่มในน้ำ deionized อย่างรวดเร็ว ไม่เกิน 5 วินาที เพราะถ้าล้างนานซิลเวอร์ไนเตรทจะหลุดหมดแล้วต้องย้อมใหม่

4.6.5.3 นำแผ่นเจลมาใส่ในสารละลาย developer (30% sodium carbonate, 0.1% sodium thiosulfate, 0.56% formaldehyde) ที่เตรียมใหม่ ๆ และแช่เย็นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เขย่าอย่างสม่ำเสมอ 5-10 นาที หรือจนกว่าจะปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดเจน

4.6.5.4 หยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นเจลมาใส่ในสารละลายอะซิติกเข้มข้น 10 % นาน 3-5 นาที แล้วจึงนำแผ่นเจลมาแช่ในน้ำ deionized นาน 10 นาที แล้วผึ่งให้แห้งในอากาศ

4.6.6 การอ่านผลจากการทำเอเอฟแอลพี

เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันของทุกตัวอย่าง แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏขึ้นให้สัญลักษณ์ “1” และแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏให้สัญลักษณ์ “0” แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างทางพันธุกรรม

5. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและถ่ายยีน และห้องปฏิบัติการชีววิทยาโมเลกุล ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ศูนย์ความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานับพันธุศาสตร์และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สกอ.

6. ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง

เดือนมกราคม 2552 ถึง เดือน ธันวาคม 2553

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาการเพาะเลี้ยงทานตะวันพันธุ์โอเปร่าในสภาพปลอดเชื้อ

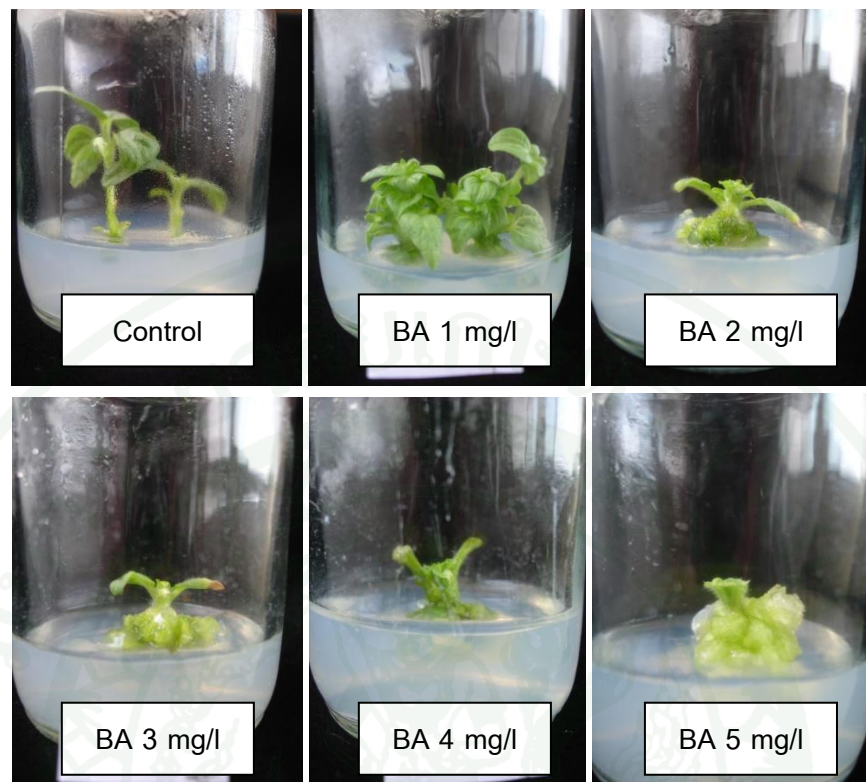
ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยอดทานตะวันพันธุ์โอเปร่าในสภาพปลอดเชื้อ นำเมล็ดทานตะวันพันธุ์โอเปร่ามาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดด้วยสารละลาย Haiter® 20 เปอร์เซ็นต์ เดิม Tween 20 1-2 หยด เขย่านาน 20 นาที หลังจากนั้นฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดด้วยสารละลาย Haiter® 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ทำการทดลองโดยการเพาะเมล็ดทานตะวันพันธุ์โอเปร่าในหิ้งอกในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 7-14 วัน มีใบจริง 2-3 คู่ใบ ตัดปลายยอดขนาดประมาณ 0.5 – 1 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารแข็ง MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่มีความเข้มข้นของสาร 0 1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหารแข็ง MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่มีความเข้มข้นของสาร 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ pH 5.7 เพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส โดยให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำการทดลองอย่างละ 10 ตัวอย่าง จำนวน 3 ซ้ำ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่า ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ต่างชนิดกัน มีเพียงอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่านั้นที่สามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ มีค่าเฉลี่ยจำนวนยอดต่อชิ้นเนื้อเชื้อเริ่มต้น 6.67 ยอด ส่วนสูตรอาหารที่มีความเข้มข้น BA ที่มากกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดจะตายและเกิดเป็นแคลลัสเกิดขึ้น (ภาพที่ 1) สำหรับอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเพียงสูตรที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และที่ไม่เติม TDZ เท่านั้นที่มีชีวิตรอดแต่ก็ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยอดได้ อาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.4 0.6 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน บริเวณโคนจะเกิดแคลลัสที่เกาะกันแบบหลวม ๆ (friable callus) ส่วนยอดไม่มีการเจริญเติบโต (ภาพที่ 2) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ยอดก็จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายไปในที่สุด

ตารางที่ 5 ผลของ BA และ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนยอดทานตะวันพันธุ์โอเปร่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS

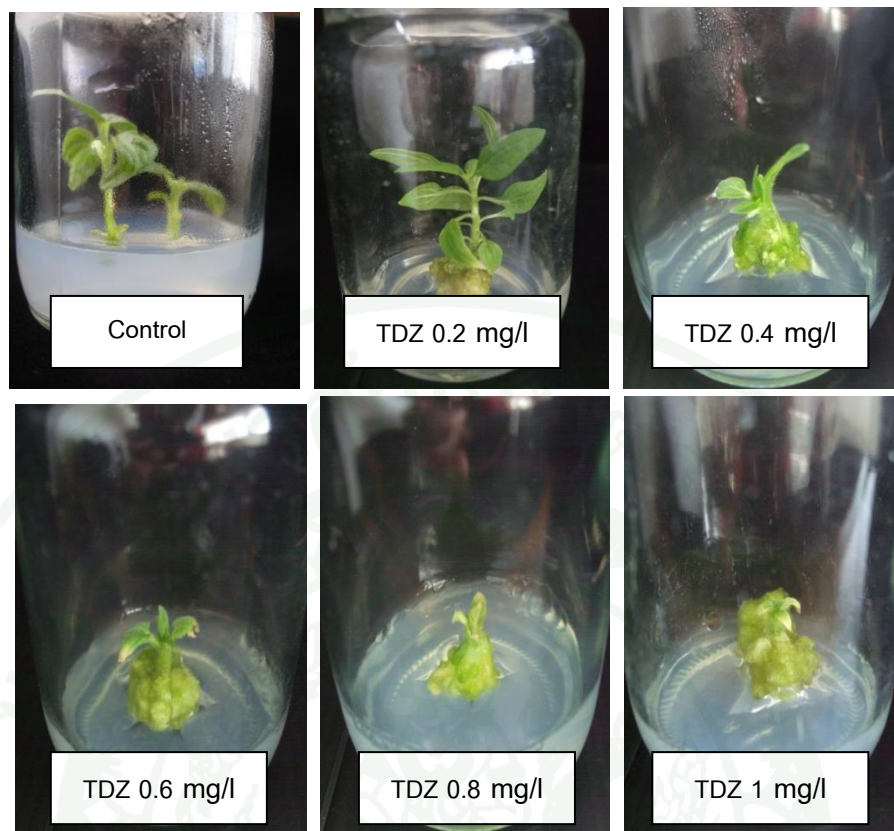
สูตรอาหาร	จำนวนยอดที่เพิ่มขึ้น (ยอด)			เฉลี่ย	ยอดเกิดขึ้น	ลักษณะเนื้อเยื่อ
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3			
MS + BA 0 มก./ล.	0	0	0	0b ^{1/}	single shoot	ยอดมีการเจริญเติบโตปกติมีรากเมื่ออายุ 60 วัน
MS + BA 1 มก./ล.	6.7	6.9	6.4	6.67a	multiple shoot	มียอดเพิ่มขึ้นบริเวณข้อ
MS + BA 2 มก./ล.	0	0	0	0b	single shoot	ยอดเหลือง เกิด friable callus บริเวณโคน
MS + BA 3 มก./ล.	0	0	0	0b	single shoot	ยอดไม่มีการเจริญเติบโต เกิด friable callus บริเวณโคน
MS + BA 4 มก./ล.	0	0	0	0b	single shoot	ยอดตาย เกิด friable callus บริเวณโคน
MS + BA 5 มก./ล.	0	0	0	0b	single shoot	ยอดตาย เกิด friable callus บริเวณโคน
MS + TDZ 0 มก./ล.	0	0	0	0b	single shoot	ยอดมีการเจริญเติบโตปกติมีรากเมื่ออายุ 60 วัน
MS + TDZ 0.2 มก./ล.	0	0	0	0b	single shoot	ยอดมีการเจริญเติบโตปกติ ไม่เกิดราก เกิด friable callus บริเวณโคน
MS + TDZ 0.4 มก./ล.	0	0	0	0b	single shoot	ยอดสีเขียวแคระแกรน เกิด friable callus บริเวณโคน
MS + TDZ 0.6 มก./ล.	0	0	0	0b	single shoot	ยอดสีเหลืองแคระแกรน เกิด friable callus บริเวณโคน
MS + TDZ 0.8 มก./ล.	0	0	0	0b	single shoot	ยอดตาย เกิด friable callus บริเวณโคน
MS + TDZ 1 มก./ล.	0	0	0	0b	single shoot	ยอดตาย เกิด friable callus บริเวณโคน

CV (%) = 75.73

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ตามวิธีการวิเคราะห์แบบ LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %



ภาพที่ 1 การตอบสนองของยอดทานตะวันพันธุ์โอเปร่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 0 1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 30 วัน



ภาพที่ 2 การตอบสนองของยอดทานตะวันพันธุ์โอเปร่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 30 วัน

การชักนำให้เกิดยอดมีสามารถชักนำได้จากเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น การชักนำยอดจาก hypocotyl ใบเลี้ยง (cotyledon) ใบ และเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) ที่เป็นเนื้อเยื่อที่มีอายุน้อย ซึ่งชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลทำให้การออกดอกซึ่งเป็นลักษณะแก่ก่อนอายุ และชักนำให้เกิดรากมีรากจำนวนน้อย นอกจากนี้การชักนำยอดที่เกิดขึ้นที่มีลักษณะที่แตกต่างกันหรือเกิดลักษณะที่ผิดปกติเกิดขึ้นนั้นขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมของพืชกับสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Ozyigit and Semiz, 2006) ความแตกต่างของพันธุกรรมของทานตะวันและความแตกต่างของสารควบคุมการเจริญเติบโตส่งผลให้เกิดการชักนำที่แตกต่างกันซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการทดลอง พบว่า พันธุกรรมของทานตะวันพันธุ์โอเปร่าที่ใช้ในการทดลองชักนำยอดใช้ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อในการทดลองเป็นเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่มีอายุน้อยตอบสนองกับอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ชักนำให้เกิดยอดเพิ่มขึ้นเพียงสูตรเดียวเท่านั้น ซึ่งสูตรอาหารอื่น ๆ ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ เนื่องจากผลของพันธุกรรมของทานตะวันกับสารควบคุมการเจริญเติบโตของสูตรอาหารที่ไม่เหมาะสมจึงไม่สามารถชักนำยอดได้

ผลของการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่มีผลต่อความมีชีวิตของเมล็ด และยอดทานตะวัน พันธุ์โอเปร่า

ศึกษาการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันให้กับเมล็ด และส่วนยอด แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ยอดผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสี 0 1 2 3 และ 4 กิโลเรด จำนวนอย่างละ 30 ยอด เมล็ดที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสี 0 12 13 และ 14 กิโลเรด โดยการฉายรังสีแต่ละครั้งแบ่งเป็น 3 ชั่วโมง ชั่วโมงละ 100 เมล็ดพบว่า เมล็ดทานตะวันที่ได้รับปริมาณรังสี 13 กิโลเรด มีการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ในเวลา 60 วัน เมื่อปริมาณรังสีที่เพิ่มมากขึ้นทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดทานตะวันลดลง (ตารางที่ 6) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ โกศล (2533) ที่ฉายรังสีแกมมาให้กับเมล็ดทานตะวันพันธุ์ลูกผสมพันธุ์แปซิฟิก 33 พบว่าปริมาณรังสีที่ 14.44 กิโลเรด มีผลทำให้ทานตะวันพันธุ์แปซิฟิก 33 ตายไป 50 เปอร์เซ็นต์ และสอดคล้องกับงานวิจัยของศิริรัตน์ (2546) ที่พบว่า ปริมาณรังสีที่เพิ่มมากขึ้นทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดทานตะวันลดลง ส่วนปริมาณรังสีที่ทำให้ยอดทานตะวันพันธุ์โอเปร่ามีการตาย 50 เปอร์เซ็นต์คือ 2.69 กิโลเรด เมื่อผ่านการฉายรังสีมาแล้ว 60 วัน (ตารางที่ 7 และภาพที่ 3)

ตารางที่ 6 ผลของปริมาณรังสีที่มีต่อการงอกของเมล็ดทานตะวันพันธุ์โอเปร่าหลังจากการฉายรังสี
แบบแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสี 0 12 13 และ 14 กิโลแรด

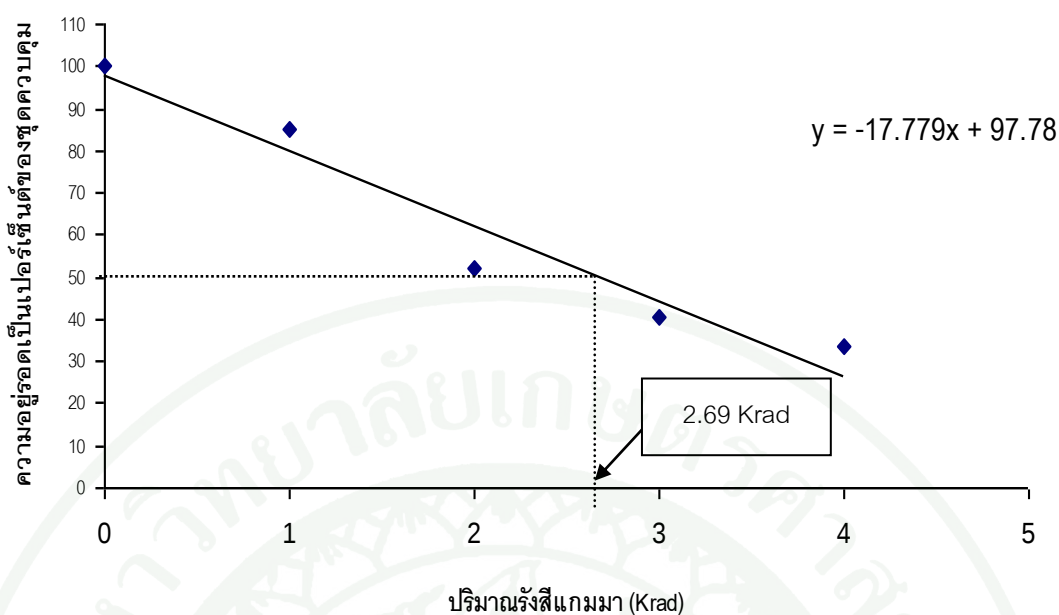
ปริมาณรังสี	ฉายรังสีครั้งที่ 1			ฉายรังสีครั้งที่ 2			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
0 Krad	76.25	73.75	70	72.5	73.75	75	73.54a
12 Krad	38.75	63.75	53.75	61.25	61.25	85	60.63b
13 Krad	35	38.75	48.75	51.25	62.5	63.75	50c
14 Krad	28.5	30	42.5	41.25	63.75	65	45.17d

CV (%) = 25.08

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ตารางที่ 7 ผลการฉายรังสีแบบแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสีต่าง ๆ ที่มีต่อความอยู่รอดของยอด
ทานตะวันพันธุ์โอเปร่าในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายหลังการฉายรังสี 60 วัน

ปริมาณรังสี (Krad)	จำนวนยอดที่ใช้ ในการทดลอง	จำนวนยอดที่ รอดชีวิตทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ ความอยู่รอด	เปอร์เซ็นต์ เทียบกับชุด ควบคุม
	ใน	รอด	เปอร์เซ็นต์	เปอร์เซ็นต์
0	30	27	90	100
1	30	23	76.67	85.19
2	30	14	46.67	51.85
3	30	11	36.67	40.74
4	30	9	30	33.33

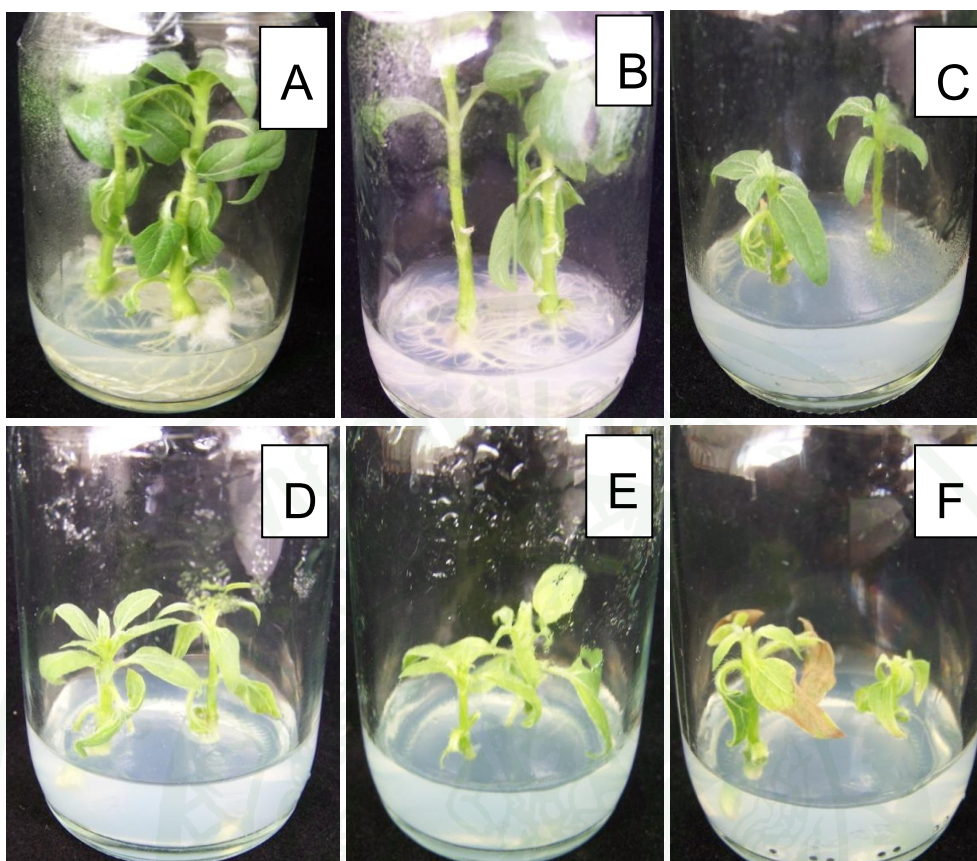


ภาพที่ 3 เปอร์เซนต์การรอดตายเมื่อเทียบกับชุดควบคุมของยอดทานตะวันพันธุ์โอเปร่าเมื่ออายุ 60 วันหลังจากที่ได้รับรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณต่าง ๆ

การชักนำให้เกิดรากโดยนำยอดที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสี 0 1 2 3 4 และ 5 กิโลเรด และยอดที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสี 0 12 13 และ 14 กิโลเรด นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่ปราศจากฮอร์โมนเมื่อนำยอดทานตะวันผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันมาชักนำให้เกิดรากในอาหารสูตร ½ MS ที่ปราศจากฮอร์โมน พบว่า ทานตะวันพันธุ์โอเปร่าที่ฉายรังสีแกมมาปริมาณ 0 และ 1 กิโลเรด เกิดราก (ภาพที่ 4) และสามารถนำออกปลูกได้ในสภาพธรรมชาติ ส่วนยอดที่ฉายปริมาณรังสี 2 3 4 และ 5 กิโลเรด ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ และเมื่อเวลาผ่านไป 60 วันยอดก็จะกลายเป็นสีน้ำตาลและตายไปในที่สุด

ยอดที่เกิดจากเมล็ดที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสี 0 12 13 และ 14 กิโลเรด เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่ปราศจากฮอร์โมน พบว่า สามารถชักนำให้เกิดรากได้ทั้งหมด (ภาพที่ 5) และสามารถย้ายปลูกตามธรรมชาติได้ เช่นเดียวกับยอดที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณรังสี 1 กิโลเรดที่สามารถชักนำราก และออกปลูกตามธรรมชาติได้ มีลำต้น

แกระสูงประมาณ 15-20 เซนติเมตร ลำต้นมีสีแดง ดอกเล็ก ติดเมล็ดเพียง ประมาณ 8-10 เมล็ด สี
 ดอกไม่มีความแตกต่างจากต้นปกติ โดยปริมาณรังสีแกมมาที่เพิ่มขึ้นทำให้ลำต้นเตี้ยลง (ภาพที่ 6)
 ผลการทดลองนี้สอดคล้องใกล้เคียงกับงานวิจัยของ ชูตินทร (2532) ที่ทดลองฉายรังสีแกมมาแบบ
 เฉียบพลันกับเบญจมาศ พบว่าปริมาณรังสีที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์คือ 1 กิโลเรด และ
 ปริมาณรังสีที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตลดลง ปริมาณรังสีตั้งแต่ 4 กิโลเรด ขึ้น
 ไปทำให้การเจริญเติบโตของเบญจมาศหยุดชะงักและตายไปในที่สุด จึงนำต้นที่ผ่านการฉายรังสี
 แกมมาแบบเฉียบพลันที่สามารถย้ายปลูกในสภาพธรรมชาติได้แก่ ต้นที่เกิดจากการฉายรังสียอด
 ปริมาณ 1 กิโลเรด ต้นที่เกิดจากการฉายรังสีแกมมาเมล็ด 12 13 และ 14 กิโลเรด นำไป
 ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอเอฟแอลพีเพื่อหาความแตกต่างทางพันธุกรรมในขั้นต่อไป



ภาพที่ 4 การตอบสนองของยอดทานตะวันพันธุ์โอเปร่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่ปราศจากฮอร์โมน เพื่อชักนำให้เกิดรากเมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน

A : รากที่เกิดขึ้นจากต้นควบคุมทานตะวันพันธุ์โอเปร่า

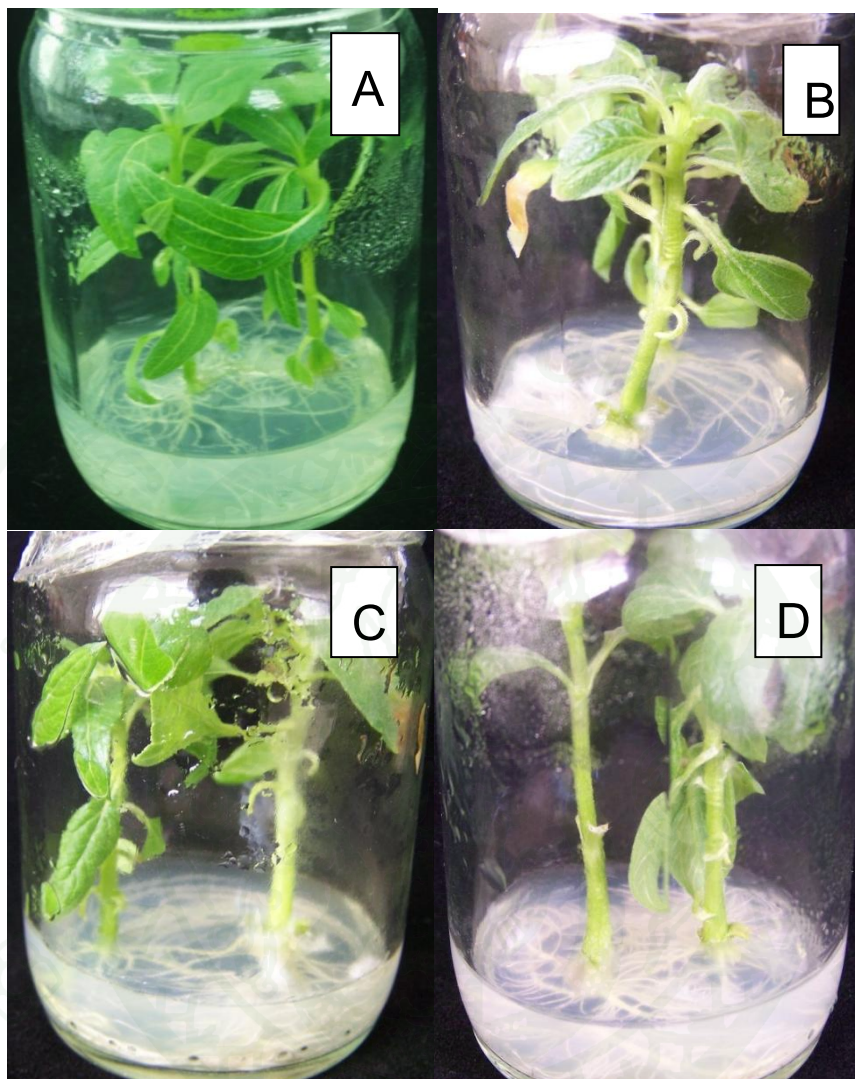
B : รากที่เกิดขึ้นจากต้นทานตะวันพันธุ์โอเปร่าที่ผ่านการฉายรังสี 1 กิโลแตร

C : รากที่เกิดขึ้นจากต้นทานตะวันพันธุ์โอเปร่าที่ผ่านการฉายรังสี 2 กิโลแตร

D : รากที่เกิดขึ้นจากต้นทานตะวันพันธุ์โอเปร่าที่ผ่านการฉายรังสี 3 กิโลแตร

E : รากที่เกิดขึ้นจากต้นทานตะวันพันธุ์โอเปร่าที่ผ่านการฉายรังสี 4 กิโลแตร

F : รากที่เกิดขึ้นจากต้นทานตะวันพันธุ์โอเปร่าที่ผ่านการฉายรังสี 5 กิโลแตร



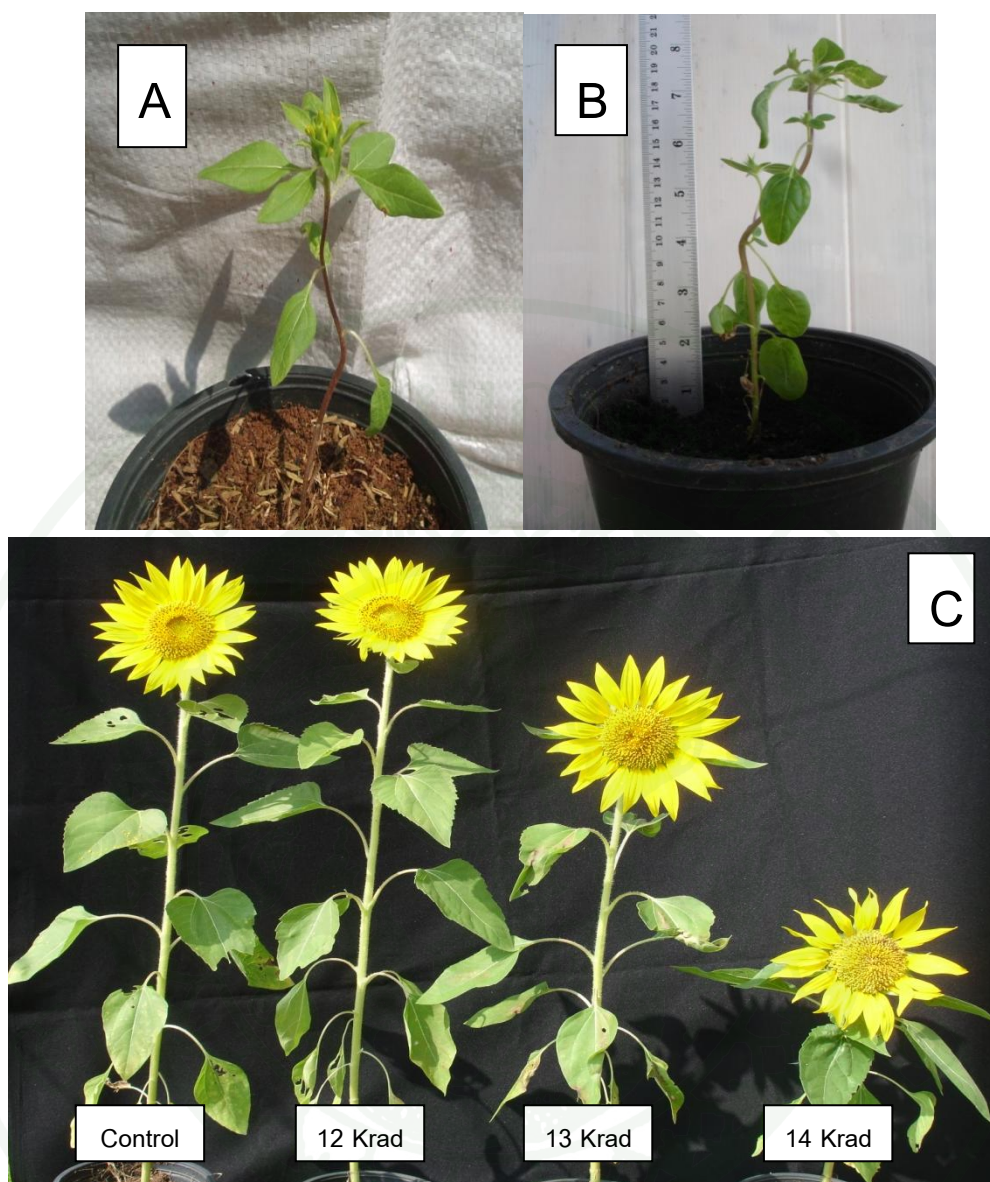
ภาพที่ 5 การตอบสนองของยอดทานตะวันพันธุ์โอเปราที่เกิดจากเมล็ดที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่ปราศจากฮอร์โมน เพื่อชักนำให้เกิดรากเมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน

A : รากที่เกิดขึ้นจากต้นควบคุมทานตะวันพันธุ์โอเปรา

B : รากที่เกิดขึ้นจากต้นทานตะวันพันธุ์โอเปราที่ผ่านการฉายรังสี 12 กิโลแรด

C : รากที่เกิดขึ้นจากต้นทานตะวันพันธุ์โอเปราที่ผ่านการฉายรังสี 13 กิโลแรด

D : รากที่เกิดขึ้นจากต้นทานตะวันพันธุ์โอเปราที่ผ่านการฉายรังสี 14 กิโลแรด



ภาพที่ 6 ทานตะวันพันธุ์โอเปร่าที่ปลูกในกระถาง

A : ต้นควบคุมที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วออกปลูกในสภาพ
กระถาง

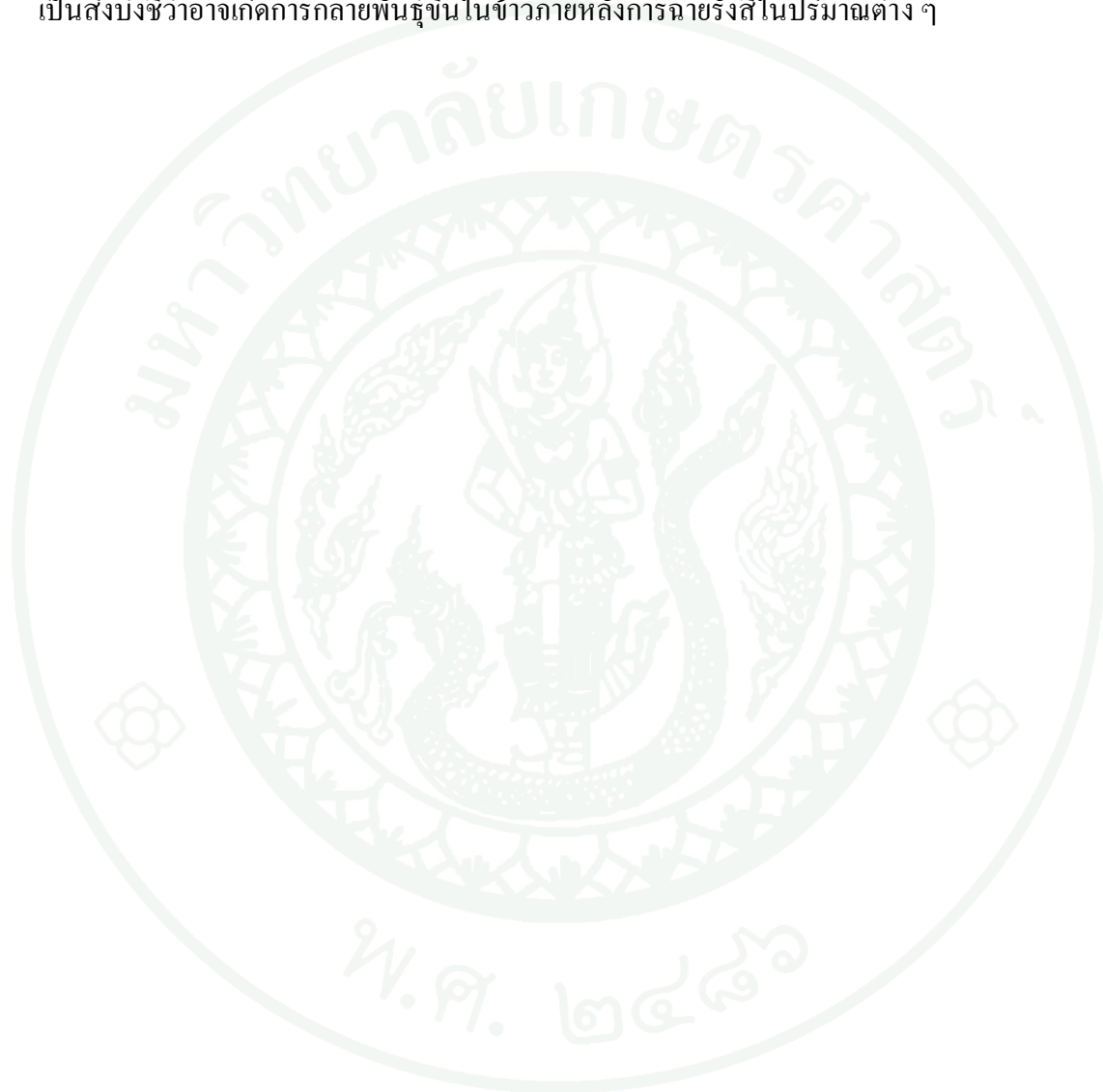
B : ต้นที่ผ่านการฉายรังสีที่เพาะเลี้ยงในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วออกปลูกในสภาพ
กระถาง

C : ต้นที่เกิดจากการปลูกในสภาพธรรมชาติจากเมล็ดที่ฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี

ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทานตะวันจากใบของเมล็ดที่ฉายรังสีที่ปริมาณ 12 13 14 กิโลเรด ส่วนยอดที่ผ่านการฉายรังสี 1 กิโลเรด อย่างละ 10 ต้น และ ต้นควบคุม 2 ต้นโดยเทคนิคเอเอฟแอลพีโดยนำคู่ไพรเมอร์มาเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในขั้น selective amplification และแยกขนาดด้วยวิธีการอิเล็กโตรโฟรีซิสในตัวกลาง denature polyacrylamide gel และคัดเลือ่อกคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอได้ 10 คู่ไพรเมอร์ มีเพียง 5 คู่ไพรเมอร์ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) โดยคู่ไพรเมอร์ *EcoR* I (ACC) และ *Mse* I (CAT) แสดงร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึม (percentage of polymorphism) สูงที่สุด 6.51% (ตารางที่ 8) เมื่อพิจารณาจำนวนแถบดีเอ็นเอแต่ละปริมาณรังสี พบว่า เมล็ดทานตะวันที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 13 กิโลเรด แสดงร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมเฉลี่ย (percentage of polymorphism) สูงที่สุด 4.16 % (ตารางที่ 10) เมล็ดทานตะวันที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 12 กิโลเรด แสดงร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมเฉลี่ย 2.56 % (ตารางที่ 9) เมล็ดทานตะวันที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 14 กิโลเรด แสดงร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมเฉลี่ย 3.29 % (ตารางที่ 11) ส่วนแถบดีเอ็นเอของยอดทานตะวันที่ผ่านการฉายรังสี 1 กิโลเรด ไม่มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน แสดงว่า การฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันให้กับยอดทานตะวันที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา 1 กิโลเรด ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมที่สามารถตรวจพบด้วยวิธีเอเอฟแอลพี และเมล็ดทานตะวันที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 12 13 และ 14 กิโลเรด มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอขึ้นเช่นเดียวกับการทดลอง Oliveira *et al.* (2004) ซึ่งศึกษาผลของการฉายรังสีแกมมาให้เมล็ดทานตะวันพันธุ์ HA BR 104 เพื่อให้ต้านทานโรคใบจุด (*Alternaria* leaf spot) โดยนำเมล็ดมาฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 150 และ 165 เกรย์ พบว่า ทานตะวันพันธุ์ HA BR 104 ที่ผ่านการฉายรังสีสามารถต้านทานโรคใบจุดในระดับที่ไม่เกิดโรค หรือ ในระดับที่เกิดโรคน้อยกว่า 5% และจากการทดลองของ Dong *et al.* (2007) ศึกษาความหลากหลายของทานตะวันบริโกลเมล็ด 70 สายพันธุ์ด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ 8 คู่ พบว่า คู่ไพรเมอร์ทั้ง 8 คู่แสดงแถบดีเอ็นเอมีสัดส่วนค่าโพลิมอร์ฟิซึมเท่ากับ 78.50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสายพันธุ์ทานตะวันที่แตกต่างกัน และการใช้จำนวนไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน ทำให้ค่าโพลิมอร์ฟิซึมแตกต่างกัน และการ

ทดลองของ Rashid *et al.* (2009) ศึกษาผลของรังสีแกมมาให้กับเมล็ดข้าวพันธุ์ Basmati-370 และพันธุ์ Basmati-Pak โดยนำเมล็ดไปฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 150, 200, 250 และ 300 เกรย์ แล้วตรวจสอบการกลายด้วยเครื่องหมายเอแอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ *Pst* I ร่วมกับ *Mse* I จำนวน 16 คู่ พบว่า คู่ไพรเมอร์ทั้ง 16 คู่แสดงแถบดีเอ็นเอมีสัดส่วนค่าโพลิเมอร์ฟีซิมเท่ากับ 37.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสิ่งบ่งชี้ว่าอาจเกิดการกลายพันธุ์ขึ้นในข้าวภายหลังการฉายรังสีในปริมาณต่าง ๆ



ตารางที่ 8 คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (polymorphism) ในทานตะวัน
พันธุ์โอเปร่าที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ 12 13 และ 14 กิโลเรด เมื่อ
ตรวจสอบด้วยเทคนิคเอฟแอลพี

ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			% Polymorphism
	ที่แตกต่าง	ที่เหมือนกัน	ทั้งหมด	
ACC-CAT	14	201	215	6.51
ACC-CTA	11	246	257	4.28
CAG-ACT	6	255	261	2.30
CAG-AGC	3	183	186	1.61
CGT-ATT	3	141	144	2.08
ผลรวม	37	1026	1063	31.22
ค่าเฉลี่ย	7.4	64.4	212.6	6.24

ตารางที่ 9 คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (polymorphism) ในเมล็ดทานตะวัน
พันธุ์โอเปร่าที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสี 12 กิโลเรด แล้ว
นำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี

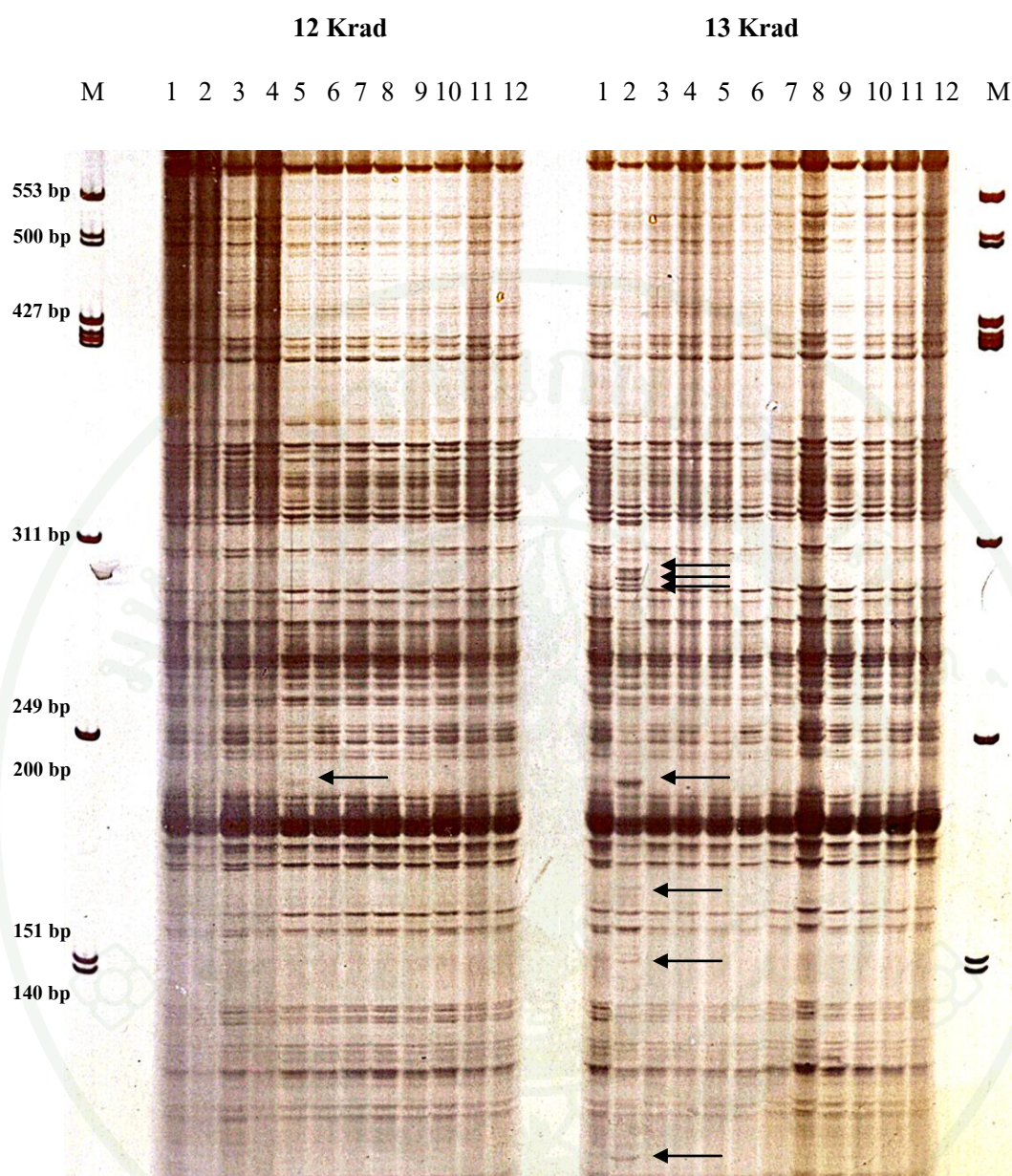
ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			% Polymorphism
	ที่แตกต่าง	ที่เหมือนกัน	ทั้งหมด	
ACC-CAT	4	67	71	5.63
ACC-CTA	1	82	83	1.20
CAG-ACT	2	85	87	2.30
CAG-AGC	1	61	62	1.61
CGT-ATT	1	47	48	2.08
ผลรวม	9	342	351	12.82
ค่าเฉลี่ย	1.8	68.4	70.2	2.56

ตารางที่ 10 คู่ไพรมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (polymorphism) ในเมล็ดทานตะวัน
พันธุ์โอเปร่าที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันเมล็ดที่ปริมาณ 13 กิโลเรด แล้ว
นำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคเอฟแอลพี

ไพรมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			% Polymorphism
	ที่แตกต่าง	ที่เหมือนกัน	ทั้งหมด	
ACC-CAT	5	67	72	6.94
ACC-CTA	7	82	89	7.87
CAG-ACT	2	85	87	2.30
CAG-AGC	1	61	62	1.61
CGT-ATT	1	47	48	2.08
ผลรวม	16	342	358	20.8
ค่าเฉลี่ย	3.2	68.4	71.6	4.16

ตารางที่ 11 คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (polymorphism) ในเมล็ดทานตะวัน
พันธุ์โอเปร่าที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันเมล็ดที่ปริมาณ 14 กิโลเรด แล้ว
นำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี

ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			% Polymorphism
	ที่แตกต่าง	ที่เหมือนกัน	ทั้งหมด	
ACC-CAT	5	67	72	6.94
ACC-CTA	3	82	85	3.53
CAG-ACT	2	85	87	2.30
CAG-AGC	1	61	62	1.61
CGT-ATT	1	47	48	2.08
ผลรวม	12	342	354	16.46
ค่าเฉลี่ย	2.4	68.4	70.8	3.29



ภาพที่ 7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอทานตะวันพันธุ์โอเปร่าที่เกิดจากคูไพร์เมอร์ E-ACC/M-CTA แสดงตำแหน่งดีเอ็นเอที่บอกความแตกต่าง (ลูกศรชี้) แถว M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (ØX174 DNA/*Hin*II) 1-10 คือจำนวนต้นทานตะวันผ่านการฉายรังสีแกมมาที่สุ่มมาตรวจสอบ, 11-12 คือ ต้นควบคุม (Control)

สรุปและเสนอแนะ

สรุป

1. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มยอดทานตะวันพันธุ์โอเปร่าคือ อาหารเชิงสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. ปริมาณรังสีที่ทำให้ยอดทานตะวันพันธุ์โอเปร่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาย 50% (LD_{50}) คือ 2.69 กิโลเรด แต่เมื่อนำยอดที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารชักนำรากพบเพียงยอดที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ 1 กิโลเรด ที่ออกรากและนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้เท่านั้น ส่วนยอดที่ผ่านการฉายรังสีที่ระดับสูงกว่า 1 กิโลเรด ตายทั้งหมดเมื่อในเวลา 90 วัน
3. สูตรอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดรากของทานตะวันพันธุ์โอเปร่าที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันคือ อาหารเชิงสูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน
4. เมล็ดทานตะวันพันธุ์โอเปร่าที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ 13 กิโลเรด พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การงอกเหลือ 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50})
5. เมล็ดทานตะวันพันธุ์โอเปร่าที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 12 13 และ 14 กิโลเรด แสดงร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมเฉลี่ย (percentage of polymorphism) สูงที่สุด 2.56 4.16 3.29 % ตามลำดับ ส่วนแถบดีเอ็นเอของยอดทานตะวันที่ผ่านการฉายรังสี 1 กิโลเรด ไม่มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน

6. ผลการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลด้วยเทคนิคเอฟแอลพีโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ พบเพียง 5 คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยคู่ไพรเมอร์ *EcoRI* (ACC) และ *MseI* (CAT) แสดงค่าร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมสูงที่สุด 6.51%



ข้อเสนอแนะ

1. เพื่อให้ผลการศึกษาความแปรปรวนของทานตะวันที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้นควรเพิ่มระดับปริมาณรังสีแกมมา และอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษาเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่มความถูกต้องของข้อมูลมากยิ่งขึ้น

2. การทดลองครั้งนี้ก็ยังพบปัญหาทานตะวันออกดอกบางส่วนในขณะยังอยู่ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่การใช้เทคนิคการฉายรังสีแล้วนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็ยังมีความสำคัญ เพราะเทคนิคนี้สามารถแยกพันธุ์กลายจากต้นที่ปกติซึ่งเซลล์กลายกับเซลล์ปกติเจริญอยู่ด้วยกันซึ่งเซลล์กลายจะไม่สามารถแข่งขันกับเซลล์ปกติได้ ด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงสามารถแยกเซลล์กลายออกมาเพาะเลี้ยงได้ จึงเป็นที่มาของการทดลองครั้งนี้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กฤษณา โกวิทวณิช. 2546. การศึกษาความหลากหลายของพืชอาหารสัตว์บางชนิดและตรวจสอบพันธุ์กลายที่เหนียวนำด้วยรังสีโดยเทคนิค AFLP. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โกศล พวงจิตร. 2533. ผลของรังสีแกมมาที่มีผลต่อทานตะวัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จักรพันธ์ วณิชกุล และ สุจิตรา จางตระกูล. 2547. การพัฒนาเทคนิคเอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism) เพื่อการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*Paphiopedilum exul* (Ridl.) Rolfe) น.158-165 ในรายงานการประชุมความหลากหลายทางชีวภาพ งานวิจัยจากอดีต ตู้อานาค ณ โรงแรมเวียงอินทร์ จ.เชียงราย 30 สิงหาคม – 3 กันยายน 2547. กลุ่มงานวิจัยอนุรักษ์ พันธุกรรมไม้ป่าและเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช.

ชุดินทร บุรณะกนิษฐ. 2532. การชักนำให้เบญจมาศกลายพันธุ์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ร่วมกับการฉายรังสี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชูศักดิ์ จอมพุท. 2542. ทานตะวัน, น. 91-95. ใน พฤษศาสตร์พืชเศรษฐกิจ. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 158 น.

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

รังสฤษฎ์ กาวิต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช:หลักการและเทคนิค ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 219 น.

ลลิตา อาจสูงเนิน. 2552. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์กรรมทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) สายพันธุ์แท้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเครื่องหมายเอเอฟแอลพี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริรัตน์ วชิรจิรากร. 2546. ผลของรังสีแกมมาที่มีผลต่อเมล็ดทานตะวัน. ปัญหาพิเศษ ภาควิชาพืชสวน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

ศรีสุดา เตชะสาน. 2549. CROP REQUIREMENT: ทานตะวัน. แหล่งที่มา:
http://www.agriman.doe.go.th/home/t.n/t.n1/2filcrop_Requirement/01-011-crope-sunflower.pdf, 28 มีนาคม 2554.

สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร. 2554. ทานตะวัน: เนื้อที่เพาะปลูก เนื้อที่เก็บเกี่ยว ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ ปี 2551. ข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร. แหล่งที่มา:
http://www.oae.go.th/main.php?filename=agri_production

สำนักงานส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร. 2554. สถานการณ์การผลิตพืช ปี 2553-2554. รายงานสถานการณ์ทานตะวัน. แหล่งที่มา:
www.agriman.doe.go.th/home/news/J-D2010/055_Sunflower.pdf, 29 มีนาคม 2554.

สุขเกษม จิตรสิงห์. 2543. การพัฒนาพันธุ์ทานตะวันของภาคเอกชน น. 54-60. ใน เอกสารประกอบสัมมนาวิชาการวิชาการปรับปรุงพันธุ์ และขยายพันธุ์พืช ครั้งที่ 13 เทคโนโลยีใหม่-พันธุ์พืชใหม่. สมาคมขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พืชแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. ภาควิชาพันธุศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 269 น.

อุไร เรืองณรงค์. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการชักนำให้เกิดการกลายในต้นอเมซอนโดยใช้รังสีแกมมา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์. 2550. การกลายพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 279 น.

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

Bowen, H. J. M. 1962. **Mutation of Horticultural Chrysanthemum: The Use of Induced Mutation in Plant Breeding.** (Sup. To Rad. Bot. Vol. 5). Pergamon Press, Great Britain. 832 p.

Dong, G.J., G.S. Liu and K.F. Li. 2007. Studying genetic diversity in the core germplasm of confectionary sunflower (*Helianthus annuus* L.) in China based on AFLP and morphological analysis. **Russian J. Genet.** 43: 627-635

Kirenmai, V. and P. Devi. 1995. *In vitro* response of certain mutants of sunflower. **Adv. plant Sci.** 8: 326-329.

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

Oliveira, M.F.de., A.T. Neto, R.M.V.B.C. Leite, V.B.R. Castiglioni and C.A.A. Arias. 2004. Mutation breeding in sunflower for resistance to *Alternaria* leaf spot. **Helia** 27: 41-50.

Ozyigit, N. G. and B.D. Semiz. 2006. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of sunflower. **Russian J. Plant Physiol.** 53: 556-559.

- Ozyigit, N. G. and B.D. Semiz. 2007. Genotype dependent callus induction and shoot regeneration in sunflower **African J. Biot.** 6: 1498-1502.
- Rashid, M., L. Ren-Hu, J. Wei, X. Yong-Han, W. Fu-Lin, T. Yue-Zhi, W. Jun-Mei, A. A. Cheema, C. Jing-Qing and G. He. 2009. Genomic diversity among Basmati rice (*Oryza sativa* L.) mutants obtained 60 Co gamma radiations using AFLP markers. **Africa J. Biot.** 8: 6777-6783.
- Schneider, A.A. and J.F. Miller. 1981. Description of sunflower growth stages. **Crop Sci.** 21: 901-903.
- Siddiqui, M.Q., J.F. Brown and S.J. Allen. 1975. Growth stages of sunflower and intensity for white blister and rust. **Plant Dis. Repr.** 59: 7-11.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleekers, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acid Res.** 23: 4407-4414.



องค์ประกอบของอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

	มิลลิกรัม/ลิตร
NH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
H_3BO_3	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6.9
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6.14
KI	0.83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Na_2EDTA	37.25
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85
Glycine	2
Myo-inositol	100
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine.HCl	0.5
Thiamine.HCl	0.1
Sucrose	30,000

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ – นามสกุล	นายปิยนันท์ พวงจันทร์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	20 ธันวาคม 2526
สถานที่เกิด	จังหวัดนครสวรรค์
ประวัติการศึกษา	จบการศึกษาปริญญาตรี ปีการศึกษา 2549 ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักวิชาการเกษตร
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรนครปฐม กรมวิชาการเกษตร