



วิทยานิพนธ์

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวทนเค็มโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉาย
รังสีแกมมา

IMPROVEMENT OF SALT TOLERANT RICE BY TISSUE
CULTURE AND GAMMA IRRADIATION

นางสาวจิรพรรณ ทองสร้อย

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญ

พันธุศาสตร์

สาขา

พันธุศาสตร์

ภาควิชา

เรื่อง การปรับปรุงพันธุ์ข้าวทนเค็มโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกี่ยวกับการฉายรังสีแกมมา

Improvement of Salt Tolerant Rice by Tissue Culture and Gamma Irradiation

นามผู้วิจัย นางสาวจิรพรรณ ทองสร้อย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

ปอติษฐ์ พงศ์ทองคำ

(ศาสตราจารย์ประคิษฐ์ พงศ์ทองคำ, วท.ม.)

กรรมการ

ดร. ปิยะโชค งามกุล

(รองศาสตราจารย์สุรินทร์ ปิยะโชค งามกุล, Dr.Agr.)

กรรมการ

ดร. ศรีพิจิตต์

(รองศาสตราจารย์ประภา ศรีพิจิตต์, Dr.Agr.)

หัวหน้าภาควิชา

ดร. เงินศิริ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เลิศลักษณ์ เงินศิริ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

ดร. อังคณา

(รองศาสตราจารย์วินัย อังคณา, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ๑๑ เดือน มีนาคม พ.ศ. ๒๕๕๑

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวทนเค็มโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเชื่อมร่วมกับการฉายรังสีแกมมา

Improvement of Salt Tolerant Rice by Tissue Culture and Gamma Irradiation

โดย

นางสาวจิรพรรณ ทองสร้อย

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

พ.ศ. 2551

จิรพรรณ ทองสร้อย 2551: การปรับปรุงพันธุ์ข้าวทนเค็มโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
ร่วมกับการฉายรังสีแกมมา ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขา
พันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ ประชานกรรมการที่ปรึกษา: ศาสตราจารย์
ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, วท.ม. 74 หน้า

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมน้ำมะพร้าว
15 เปอร์เซ็นต์ yeast extract 1 กรัมต่อลิตร และ BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิด
จำนวนยอดได้ถึง 6.04 ยอดต่อเมล็ด และเมื่อขยายจำนวนยอดในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 3
มิลลิกรัมต่อลิตรจนได้จำนวนเพียงพอแล้ว นำยอดเหล่านี้ไปฉายรังสี 0 (กลุ่มควบ คุม) และ 30
เกรย์ หลังจากนั้นนำยอดทั้ง 2 กลุ่ม มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 3 มิลลิกรัมต่อ
ลิตรและเติมเกลือความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า กลุ่มของยอดที่ไม่ผ่านการ
ฉายรังสีมีจำนวนยอดที่รอดชีวิตในอาหารที่เติมเกลือ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 19,
20, 1 และ 0 ยอด จากการเพาะเลี้ยง 20 ยอด สำหรับกลุ่มยอดที่ผ่านการฉายรังสีมีจำนวนยอดที่
รอดชีวิตในอาหารที่เติมเกลือ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 35, 34, 8 และ 3 ยอด จากการ
เพาะเลี้ยง 80 ยอด เมื่อนำยอดที่รอดชีวิตเหล่านี้ปลูกในกระถางที่บรรจุทรายและวางในอ่างที่มี
สารละลายของธาตุอาหารตามสูตรของ Yoshida และคณะ (1972) และเติมเกลือแกง 1 เปอร์เซ็นต์
เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าในกลุ่มของยอดที่ไม่ผ่านการฉายรังสี มีจำนวนต้นที่รอดชีวิต 3 ต้น และ
กลุ่มของยอดที่ผ่านการฉายรังสี มีจำนวนต้นที่รอดชีวิต 26 ต้น ซึ่งต้นที่รอดชีวิตเหล่านี้คาดว่าจะ
เจริญกลายเป็นต้นที่ทนเค็ม เมื่อนำต้นข้าวที่คาดว่าจะทนเค็มทั้ง 29 ต้นมาทำการวิเคราะห์ลายพิมพ์
ดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ปกติ ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ 7 คู่ ปรากฏ
แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนสามารถตรวจนับได้ทั้งหมดจำนวน 300 แถบ ให้แถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน 292
แถบ และให้แถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 8 แถบ โดยเกิดแถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 43 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ เกิด
โพลิมอร์ฟิซึมถึง 97.33 เปอร์เซ็นต์

จิรพรรณ ทองสร้อย
ลายมือชื่อนิติ

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ 20 / 51 / 51
ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Jirapan Thongsoi 2008: Improvement of Salt Tolerant Rice by Tissue Culture and Gamma Irradiation. Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Professor Pradit Pongtongkam, M.Sc. 74 pages.

The sterilized seeds of rice variety KDML 105 were cultured on the MS medium supplemented with 15% coconut water, 1g/l yeast extract and 3 mg/l BAP giving the average of 6.04 shoots per seed. Non-irradiated and 30 gray irradiated shoots were cultured on MS medium supplemented with 3 mg/l BAP and 0, 0.5, 1.0 and 1.5% NaCl. The number of non-irradiated surviving shoots on these media were 19, 20, 1 and 0 from 20 shoots, respectively, while those of irradiated shoots on the same media were 35, 34, 8 and 3 from 80 shoots, respectively. These survival plants of both groups were then transferred to grow in the pot containing sand, Yoshida's solution and 1% NaCl. After 4 weeks of growth, 26 out of 80 irradiated plants survived but only 3 out of 40 non-irradiated ones could tolerant the high salt condition. The DNA from the expected salt-tolerant plants were compared by AFLP technique. The total of 300 bands were detected using seven combinations of primers with the average of 43 band per primer pair. The total of 292 band were polymorphic among samples while 8 band were monomorphic. The percentage of polymorphic loci was 97.33.

Jirapan Thongsoi

Student's signature

Pradit Pongtongkam

Thesis Advisor's signature

20 / 03 / 08

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้โดยได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก ศาสตราจารย์ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้แนะนำและให้คำปรึกษาถึงหัวข้อวิทยานิพนธ์ วิธีการดำเนินงาน วิจัย ตลอดจนการประเมินการทดลอง รวมถึงตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล รองศาสตราจารย์ ดร. ประภา ศรีพิจิตต์ กรรมการ และดร.ถวัลย์ศักดิ์ เผ่าสังข์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความคิดเห็น ข้อเสนอแนะ และช่วยเหลือในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่กรุณาสั่งสอนอบรม และถ่ายทอดวิชาความรู้อย่างดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์และช่วยเหลือสำหรับงานวิจัยในแปลงทดลองจนประสบความสำเร็จ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ทุกท่าน เพื่อนๆและพี่ๆ น้องๆ ในภาควิชาพันธุศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ พ่อและแม่ ผู้เป็นที่รักและกำลังใจที่ยิ่งใหญ่ของข้าพเจ้าในทุกๆด้านเสมอมา

จิรพรรณ ทองสร้อย

มีนาคม 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
วิธีการ	25
ผลและวิจารณ์	33
สรุปผลการทดลอง	55
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	56
ภาคผนวก	66
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	74

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปรียบเทียบชนิดของเครื่องหมายโมเลกุลพร้อมคุณลักษณะต่างๆ	19
2	การเกิดแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น	34
3	การเกิดยอดของเมล็ดข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 3	35
4	อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสที่ไม่ผ่านการฉายรังสี และผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 30 เกรย์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 6 สัปดาห์	37
5	อัตราการรอดชีวิตของยอดที่ไม่ฉายรังสีและฉายรังสีแกมมาปริมาณ 30 เกรย์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 8 สัปดาห์	40
6	อัตราการรอดชีวิตของต้นข้าวที่ผ่านการคัดเลือก และย้ายออกปลูกในกระถางที่เติมเกลือแคงความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 4 สัปดาห์	42
7	คู่มือไพรเมอร์ต่างๆที่ใช้ในการตรวจสอบ AFLP	46
8	ผลการวิเคราะห์ AFLP ที่ได้จากไพรเมอร์ 7 คู่	47
9	ค่า similarity index ที่ได้จากการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์กลายรวมจำนวน 30 ตัวอย่าง	52

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ขั้นตอนการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค AFLP ด้วยไพรเมอร์ คู่หนึ่ง	20
2	ลักษณะของแคลลัสที่เจริญมาจากเมล็ดที่เพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	34
3	พัฒนาของเมล็ดข้าวเป็นยอดจำนวนมากเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ ไม่เติม BAP เปรียบเทียบกับต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร	36
4	เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่รอดชีวิตจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ไม่ผ่านการฉายรังสี และผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 30 เกรย์ บนอาหารสูตร MS ที่เติม ไซโตไคนคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 6 สัปดาห์	38
5	แสดงแคลลัสที่ไม่ผ่านการฉายรังสีสามารถเกิดจุดเขียวและสามารถชักนำให้ เป็นต้นได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมไคเนตินร่วมกับไซโตไคนคลอไรด์ และแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีปริมาณ 30 เกรย์สามารถเกิดจุดเขียวได้แต่ไม่ สามารถชักนำให้เป็นต้นได้	38
6	เปอร์เซ็นต์ยอดที่รอดชีวิตจากการเพาะเลี้ยงยอดที่ไม่ผ่านการฉายรังสีและ ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 30 เกรย์ บนอาหารสูตร MS ที่เติมไซโตไคน คลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 8 สัปดาห์	41
7	ลักษณะรากของต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 30 เกรย์ บนอาหารสูตรชักนำให้เกิดยอดหลายยอดที่ไม่เติมเกลือ และเติม เกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์	41
8	เปอร์เซ็นต์ยอดที่รอดชีวิตเมื่อปลูกในกระถางที่ใส่สารละลายอาหารพืชที่เติม เกลือแคง 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	43

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
9	ต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ไม่ผ่านการฉายรังสี และผ่านการฉายรังสีปริมาณ 30 เกรย์ เมื่อออกปลูกในกระถางที่ใส่สารละลายอาหารพืชที่เดิมเกลือแกงความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยวางเปรียบเทียบกับกระถางที่ใส่สารละลายอาหารพืชที่ไม่เติมเกลือแกง	44
10	ต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่มีลักษณะต้นเตี้ย เมื่อเปรียบเทียบกับต้นข้าวปกติ	45
11	ตัวอย่างลายพิมพ์ AFLP ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-AAG/M-CAT	48
12	ตัวอย่างลายพิมพ์ AFLP ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-ACA/M-CTA	49
13	จัดกลุ่มของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีในลักษณะ phylogenetic tree โดยการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.20k	54

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AFLP	=	amplified fragment length polymorphism
PCR	=	polymerase chain reaction
RAPD	=	random amplified polymorphic DNA
RFLP	=	restriction fragment length polymorphism
SSCP	=	single strand conformation polymorphism
SSR	=	simple sequence repeat

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวทนเค็มโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีแกมมา

Improvement of Salt Tolerant Rice by Tissue Culture and Gamma Irradiation

คำนำ

ข้าวเป็นผลผลิตการเกษตรหลักของประเทศไทย จากพื้นที่การเกษตรของประเทศไทยทั้งหมด 132.49 ล้านไร่ เป็นพื้นที่ปลูกข้าวถึง 68.293 ล้านไร่ คิดเป็นร้อยละ 51.6 ผลผลิตข้าวส่วนใหญ่ใช้เพื่อการบริโภคของประชากรภายในประเทศ นอกจากนั้นยังใช้ในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์และแปรรูป รวมทั้งอาหารสัตว์และอื่นๆ สำหรับข้าวสารส่วนที่เหลือจากการใช้ภายในประเทศ จะส่งเป็นสินค้าออกสู่ตลาดโลก สินค้าข้าว นับเป็นสินค้าเกษตรส่งออกที่มีมูลค่าสูงเป็นอันดับสามของประเทศ ข้าวจึงมีความสำคัญต่อประเทศไทย มิใช่แต่เฉพาะเพื่อการบริโภคหรือใช้ภายในประเทศเท่านั้น แต่ยังมีส่วนช่วยในการนำเงินตรามูลค่ามหาศาลเข้าประเทศอีกด้วย (เอกสงวน, 2544)

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกข้าวที่สำคัญของโลก แต่ผลผลิตเฉลี่ยต่อพื้นที่ของประเทศไทยอยู่ในเกณฑ์ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับประเทศผู้ผลิตอื่น ทั้งนี้เป็นเพราะแหล่งผลิตหลักของข้าวในประเทศไทยอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีพื้นที่ดินเค็มคิดเป็น 17% ของพื้นที่ทั้งภาค ข้าวที่ปลูกในพื้นที่ดินเค็มภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จะให้ผลผลิตต่ำมาก ประมาณ 100-150 กิโลกรัมต่อไร่เท่านั้น และพันธุ์ข้าวที่เกษตรกรปลูกในปัจจุบันส่วนมากจะปลูกข้าวพันธุ์ที่รัฐบาลแนะนำ เช่น กข 6 ขาวดอกมะลิ 105 และ กข 15 เป็นต้น ซึ่งมีความทนทานต่อดินเค็มได้ไม่สูงนัก การปรับปรุงพันธุ์ข้าวจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวที่ทนทานต่อดินเค็ม เมล็ดมีคุณภาพเป็นที่ยอมรับและให้ได้ผลผลิตโดยเฉลี่ยเพิ่มขึ้นถึงประมาณ 350 กิโลกรัมต่อไร่

เนื่องจากข้าวเป็นพืชผสมตัวเองโดยธรรมชาติจึงมีพันธุกรรมอยู่ในสภาพคงตัว (homozygosity) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้น จึงเกิดขึ้นในอัตราที่ต่ำและต้องใช้เวลาาน วิธีที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้เร็วขึ้น ก็โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยการใช้รังสีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในอัตราที่สูง มีขอบเขตของการกลายพันธุ์กว้าง การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเป็นการกลายพันธุ์ทั้งต้น (solid หรือ non-chimeric mutant) และสามารถถ่ายทอดไปยังลูกชั่วต่อไปได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้นำวิธีการฉายรังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการปรับปรุง

พันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้มีลักษณะทนทานต่อดินเค็มได้สูงขึ้น เพื่อให้สามารถนำไปใช้เป็นพันธุ์ปลูกในพื้นที่ดินเค็มต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาถึงผลของรังสีแกมมาที่มีต่อการพัฒนาของเซลล์สไปเป็นต้นและการเกิดยอดจำนวนมาก
2. เพื่อศึกษาถึงความแปรปรวนในลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางการเกษตรของต้นข้าวที่พัฒนามาจากเซลล์สไปและยอดที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา สำหรับใช้ในการคัดเลือกข้าวที่ทนทานต่อความเค็ม
3. เพื่อศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นข้าวที่ผ่านการฉายรังสีเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ผ่านการฉายรังสี

การตรวจเอกสาร

ข้าว

ข้าวเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในตระกูลหญ้า อยู่ในสกุล *Oryza* สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในเขตร้อน (tropical zone) และเขตอบอุ่น (temperate zone) นักวิชาการได้แบ่งข้าวออกเป็นสองชนิดคือ ข้าวเอเชีย (*Oryza sativa* Linn.) และข้าวแอฟริกา (*Oryza glaberrima* Steud) ข้าวเอเชียยังแบ่งได้เป็น 3 พวกได้แก่ ข้าวเมล็ดสั้นเรียกว่า *Japonica* ซึ่งเป็นพวกที่นิยมปลูกในเขตอบอุ่นของจีน เกาหลี และญี่ปุ่น ส่วนพวกที่มีเมล็ดยาวเรียกว่า *Indica* นิยมปลูกในประเทศไทย เวียดนาม พม่า อินเดีย ปากีสถาน อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ พวกสุดท้ายมีเมล็ดป้อมใหญ่ ต้นสูง เรียกว่า *Javanica* สันนิษฐานว่าเป็นลูกผสมที่เกิดจากการคัดเลือกระหว่างพวก *Indica* และ *Japonica* ซึ่งมีเฉพาะในหมู่เกาะชาวหรืออินโดนีเซียในปัจจุบัน (ศิริพล, 2537; อำพล, 2545)

ข้าวเป็นพืชดิพลอยด์ (diploid) มีโครโมโซม $2n=24$ (นอกจากข้าวป่าบางชนิดอาจมีโครโมโซม $2n=48$) (นพพร, 2546) ข้าวเป็นพืชที่มีความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมเป็นอย่างมากซึ่งเป็นรากฐานอันสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวทั้งในด้านคุณภาพ (qualitative) และปริมาณ (quantitative) ประเทศไทยมีทรัพยากรเชื้อพันธุกรรมข้าวมากแห่งหนึ่งของโลก พบพันธุ์ข้าวพื้นเมืองของไทยมีมากกว่า 5,900 สายพันธุ์ และประเทศไทยยังมีพันธุ์ข้าวดี ๆ ที่เป็นที่ต้องการของตลาดติดอันดับหนึ่งของโลกด้วยเช่น พันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ฯลฯ (สถาบันวิจัยข้าว, 2544)

ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์ข้าวหอม ที่ได้จากการนำข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากนาเกษตรกรอำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 199 รวง มาปลูกเพื่อศึกษาพันธุ์ และได้ข้าวที่มีลักษณะพิเศษ คือ มีกลิ่นหอม และเมล็ดอ่อนนุ่มเมื่อนำมาหุงต้ม ดังนั้นจึงมีการปรับปรุงพันธุ์ให้บริสุทธิ์ตามหลักวิชาการจนได้พันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และรัฐบาลประกาศให้ขยายพันธุ์ส่งเสริมการปลูกเมื่อวันที่ 25 พฤษภาคม 2502 เป็นต้นมา สำหรับพื้นที่ปลูกข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่เหมาะสม ได้แก่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคกลางบางพื้นที่ ลักษณะทั่วไปเป็นข้าวเจ้าที่ไวต่อช่วงแสง ต้นข้าวสูงประมาณ 140-150 เซนติเมตร ข้าวจะออกดอกประมาณวันที่ 20 ตุลาคม และสุกแก่เก็บเกี่ยวได้ประมาณวันที่ 20 พฤศจิกายนของทุกปี ระยะพักตัวของเมล็ด ประมาณ 8 สัปดาห์ ขนาดเมล็ดข้าวกล้อง ยาว 7.5 มิลลิเมตร กว้าง 2.1 มิลลิเมตร หนา 1.8 มิลลิเมตร ผลผลิตเฉลี่ย 363 กิโลกรัมต่อไร่ (กรมวิชาการเกษตร, 2546)

ลักษณะที่ดีของข้าวขาวดอกมะลิ 105 คือ เป็นข้าวที่มีกลิ่นหอม เมล็ดอ่อนนุ่มเมื่อนำมาหุง ต้ม ทนต่อสภาพแล้ง ทนต่อดินเปรี้ยวและดินเค็มได้ดีพอสมควร คุณภาพการขัดสีดี เมล็ดข้าวสาร ใส มีท้องไข่น้อย นวดง่าย เมล็ดหลุดร่วงจากรวงได้ง่าย เป็นที่ต้องการของตลาด ขายได้ราคาดี แต่มีข้อจำกัดอยู่บ้างตรงที่ไม่ต้านทานโรคขอบใบแห้ง โรคใบสีส้ม โรคใบจุดสีน้ำตาล โรคไหม้และโรคใบหงิก ไม่ต้านทานแมลงบั่ว เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ต้นอ่อนล้มง่ายถ้าปลูกในบริเวณที่ดินมีความอุดมสมบูรณ์สูง

ถึงแม้ว่าข้าวขาวดอกมะลิ 105 จะมีลักษณะที่ดีเด่นอยู่หลายประการแต่ก็ยังคงมีข้อเสียอยู่ เช่น เป็นข้าวที่ไวต่อแสง และไม่ทนเค็มเท่าที่ควร ดังนั้นจึงมีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวพันธุ์นี้อยู่ตลอดเวลา และวิธีการหนึ่งซึ่งนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 คือ การเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์ด้วยรังสี ซึ่งปรากฏว่าประสบความสำเร็จได้ข้าวเหนียวพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะดี คือ พันธุ์ กข 6 (กรมวิชาการเกษตร, 2546)

ดินเค็ม

ดินเค็ม หมายถึง ดินที่มีเกลือหรือสารเคมีพวกเกลือชนิดต่างๆ รวมทั้งธาตุโซเดียมที่สามารถแลกเปลี่ยนได้ในดิน สะสมอยู่เป็นจำนวนมากพอที่จะเป็นอุปสรรคต่อการเจริญเติบโตของพืช ส่วนมากเกลือที่พบเป็น คลอไรด์หรือซัลเฟต ของโซเดียม แคลเซียมและแมกนีเซียม นอกนั้นเป็นเกลือชนิดอื่นปะปนอยู่บ้าง เช่น ไบคาร์บอเนต คาร์บอเนต บอเรต และไนเตรตของแคลเซียม แมกนีเซียม โซเดียม หรือโพแทสเซียม (ไพบูลย์, 2542) เราสามารถจำแนกดินเค็มออกได้เป็น 3 ประเภทดังนี้

1. ดินเค็ม (saline soil) เป็นดินที่มีเกลืออยู่มากจนเป็นอันตรายต่อพืชที่ปลูก เกลือที่พบส่วนใหญ่เป็นเกลือคลอไรด์ และซัลเฟตของโซเดียม แคลเซียมและแมกนีเซียม pH ของดินมีค่าประมาณ 8.5 หรือต่ำกว่า มีปริมาณโซเดียมไอออนที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable Na) น้อยกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับความจุในการแลกเปลี่ยนประจุบวกของดิน (cation exchange capacity) ซึ่งหมายถึงปริมาณของไอออนที่มีประจุบวกทั้งหมดที่ดินสามารถดูดซับไว้ได้

2. ดินเค็ม-โซดิก (saline-sodic soil) เป็นดินที่มีเกลืออยู่มากจนเป็นอันตรายต่อพืชที่ขึ้นอยู่ มีปริมาณโซเดียมไอออนที่แลกเปลี่ยนได้มากกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ มี pH 8.5 หรือน้อยกว่า

3. ดินโซดิก (sodic soil) เป็นดินที่มีเกลืออยู่มากจนเป็นอันตรายต่อพืช แต่มีปริมาณโซเดียมไอออนที่แลกเปลี่ยนได้สูงกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ มี pH สูงกว่า 8.5 ดินพวกนี้จะปลดปล่อยโซเดียมออกมาจนเป็นอันตรายต่อพืชได้ และการที่มีโซเดียมมากจะทำให้ดินเหนียวและแน่นทึบ เมื่อแห้งจะแข็ง ทำให้ยากต่อการไถพรวน (คณาจารย์ภาควิชาปฐพี, 2535)

ดินเค็มในประเทศไทย ครอบคลุมพื้นที่ถึง 22 ล้านไร่ อาจแบ่งออกได้เป็น 2 พื้นที่ คือ ดินเค็มชายฝั่งทะเล (coastal saline soil) และดินเค็มในภาคพื้นทวีปหรือดินเค็มนอกพื้นที่ชายทะเล (inland saline soil) ดินเค็มชายฝั่งทะเลมีประมาณ 4 ล้านไร่ ซึ่งบางแห่งเป็นดินเค็มที่มีความเปรี้ยวแฝงอยู่ (acid-saline soil) ประมาณ 3 ล้านไร่ ดินเค็มชายฝั่งทะเลที่ใช้ในการปลูกข้าวจะกระจายอยู่ตามลุ่มน้ำ และสันดอนปากแม่น้ำตลอดชายฝั่งของประเทศไทย พบมากที่สุด ในภาคกลาง ภาคใต้ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวมทั้งหมดประมาณ 2.2 ล้านไร่ โดยเฉพาะชายฝั่งทะเลภาคใต้ มีพื้นที่ดินเค็มถึง 1 ล้านไร่ (กรมพัฒนาที่ดิน, 2539)

พื้นที่ดินเค็มชายฝั่งทะเลเป็นปัญหาสำหรับการผลิตข้าว ซึ่งเกิดจากดินและน้ำโดยตรง เนื่องจากน้ำทะเลท่วมถึงตลอดปี ระดับน้ำใต้ดินอยู่สูงเกือบถึงผิวดิน มีดินเหนียวมากกว่า 75% มีการระบายน้ำไม่ดี มีธาตุหรือสารประกอบบางชนิดเป็นพิษต่อข้าวเนื่องจากมีความเข้มข้นสูงเกินไป เช่น โซเดียม คลอไรด์ โบรอน และไบคาร์บอเนต รวมทั้งเกิดความไม่สมดุลของธาตุอาหารพืช และดินเค็มบางแห่งดินมีการสะสมไพไรต์ (pyrite) ทำให้ดินเป็นกรด ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการเจริญเติบโตของข้าว วิทยาการการผลิตที่เกษตรกรใช้อยู่ขณะนี้สามารถทำได้เพียงอาศัยน้ำฝนมาชะล้างความเค็มจากดินเท่านั้น ส่วนวิธีการอื่น ๆ ต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูงมาก ไม่สามารถดำเนินการได้โดยเกษตรกร

พื้นที่ดินเค็ม ในภาคพื้นทวีปหรือดินเค็มนอกพื้นที่ชายทะเล มีประมาณ 18 ล้านไร่ พบอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ หรือคิดเป็น 17% ของพื้นที่ทั้งภาค พบในทุกจังหวัด ยกเว้นจังหวัดเลย ดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจะกระจายเป็นหย่อม ไม่ค่อยสม่ำเสมอในพื้นที่เดียวกัน และในชั้นดินต่างกันก็จะมีเกลือสะสมอยู่ไม่เท่ากัน และยังเปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาลด้วย โดยทั่วไปในฤดูฝนเกลือจะถูกชะล้างไปสะสมอยู่ที่ชั้นล่างของดิน แต่ในฤดูแล้งเกลือจะระเหยขึ้นมาที่ดินชั้นบนสลับกัน เนื่องจากดินส่วนใหญ่เป็นดินทราย การขึ้นลงของเกลือจึงเป็นไปได้รวดเร็ว ทำให้ทิศทางการไหลและการสะสมของเกลือเปลี่ยนไปอย่างรวดเร็ว

การเกิดดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนมีสาเหตุจากชั้นดินดานและหินทรายในดิน ซึ่งมีเกลือคลอไรด์เป็นองค์ประกอบ ทำให้น้ำใต้ดินบริเวณดังกล่าวกลายเป็นน้ำเค็ม เมื่อเกิดการยกตัวของน้ำใต้ดินขึ้นมาในระดับที่กระบวนการ capillary rise สามารถเกิดขึ้นได้ ทำให้เกิดการกระจายตัวของดินเค็มขึ้นอย่างกว้างขวาง ลักษณะการแพร่กระจายของดินเค็มส่วนหนึ่งเกิดจากสภาพภูมิประเทศแห้งแล้ง มีปริมาณฝนน้อยกว่าการระเหยของน้ำออกไปจากดิน ซึ่งการระเหยของน้ำนี้จะนำเอาเกลือมาสะสมที่บริเวณรากพืช หรือบนผิวดินทำให้เกิดเป็นพื้นที่ดินเค็มในที่สุด ตลอดจนการสร้างแหล่งกักเก็บน้ำขนาดใหญ่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่งผลให้บริเวณโดยรอบมีระดับน้ำเค็มใต้ดินตื้นขึ้น เกิดการสะสมเกลือที่ผิวดินและชั้นหน้าตัดดิน ทั้งนี้ความเค็มของดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือแบ่งเป็น 5 ชั้น คือ (กรมพัฒนาที่ดิน, 2539)

1. บริเวณที่ลุ่มที่มีเกลือมาก มีประมาณ 1.5 ล้านไร่ พื้นที่ส่วนใหญ่เป็นหย่อมว่างเปล่า เนื่องจากมีเกลือมาก มีพื้นที่เป็นนาข้าวเป็นส่วนน้อย พืชที่ขึ้นได้มักเป็นไม้ทรงพุ่มมีหนาม
2. บริเวณที่ลุ่มที่มีเกลือปานกลาง มีประมาณ 3.7 ล้านไร่ พบคราบเกลือตามผิวดินเป็นหย่อม พื้นที่ส่วนใหญ่เป็นนาข้าว
3. บริเวณที่ลุ่มที่มีเกลือน้อย มีประมาณ 12.6 ล้านไร่ ไม่พบคราบเกลือตามผิวดิน พื้นที่ส่วนใหญ่เป็นนาข้าวและต้นไม้หลายชนิดขึ้นประปราย
4. บริเวณที่ราบสูงประกอบด้วยหินที่มีเกลือ มีประมาณ 19.4 ล้านไร่ ไม่พบคราบเกลือตามผิวดินแต่พบในชั้นใต้ดินจะมีหินทรายและหินดินดานที่มีเกลือเป็นองค์ประกอบ เมื่อสลายตัวก็จะถูกน้ำชะ และพัดพาไป ทำให้เกิดดินเค็มในบริเวณพื้นที่ที่ต่ำกว่า
5. บริเวณที่ไม่มีเกลือเลย มีประมาณ 67.4 ล้านไร่ ไม่ปรากฏว่ามีเกลืออยู่เลย

ข้าวที่ปลูกในพื้นที่ดินเค็มภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จะให้ผลผลิตต่ำมาก ประมาณ 100-150 กิโลกรัมต่อไร่เท่านั้น เนื่องจากธาตุอาหารในดินจะอยู่ในรูปที่ไม่เป็นประโยชน์ต่อข้าว และกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดินลดลง ซึ่งจะมีผลต่อกระบวนการปลดปล่อยไนโตรเจนจากการสลายตัวของอินทรีย์วัตถุในดิน (<http://www.pathumthani.rice.thai.land.org/stress1.html>)

พืชทนเค็ม

พืชทนเค็ม (halophyte) หมายถึงพืชที่สามารถเจริญเติบโต และดำรงชีวิตจนครบวงจรชีวิตในพื้นที่ดินเค็ม ซึ่งพืชแต่ละชนิด แต่ละสายพันธุ์ จะมีความสามารถในการทนเค็มได้ต่างกัน สาเหตุที่พืชบางชนิดสามารถเติบโตในบริเวณดินเค็ม หรือบริเวณที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงๆได้นั้น เป็นเพราะพืชเหล่านั้นมีกลไกที่ทำให้สามารถทนต่อความเป็นพิษของเกลือในลักษณะต่าง ๆ กัน

พืชบางอย่างอาจมีกลไกในการทนทาน (tolerance mechanism) ซึ่งพืชทนเค็มชนิดนั้นจะป้องกันหรือสร้างเอนไซม์ต่างๆที่มีความทนทานต่อความเข้มข้นของเกลือสูง โดยที่เอนไซม์บางชนิดยังคงมีกิจกรรมตามปกติ แม้ว่าจะได้รับอิทธิพลจากความเค็มของเกลือ (Ahmad *et al.*, 1979) นอกจากนี้พืชบางอย่างอาจต้องมีการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมตาบอลิซึม (Demiral, 2004) และกระบวนการสังเคราะห์สารบางอย่างเช่น กรดอะมิโน น้ำตาล (Greenway and Munns, 1980) โดยส่วนมากพืชทนเค็มเกือบทุกชนิดจะสามารถปรับแรงดันออสโมติกให้สูงขึ้นได้ โดยการขับออกส่วนเกินที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ไปไว้ในแวคิวโอล และสะสมสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ไว้ในเซลล์ ทำให้พืชสามารถดูดแร่ธาตุและสารอาหารจากดินบริเวณที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงๆได้ดีกว่าพืชปกติที่ไม่ทนเค็ม (Wu, 2003)

นอกจากกลไกในการทนทานแล้ว พืชทนเค็มยังมีกลไกที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งคือกลไกการหลีกเลี่ยง (avoidance mechanism) เป็นกลไกที่พืชหลีกเลี่ยงการสะสมเกลือในไซโทพลาซึม ซึ่งป้องกันไม่ให้มีเกลืออยู่ในไซโทพลาซึมสูงเกินไปจนอาจเกิดอันตรายต่อพืชได้ (Glenn, 1999) โดยกลไกการหลีกเลี่ยงนี้ก็มีอยู่หลายวิธีด้วยกัน เช่น การที่รากพืชหลีกเลี่ยงการดูดเกลือเข้ามาในรากพืช (salt avoidance) โดยพืชทนเค็มจะมีการสร้างเซลล์ในชั้นเอนโดเดอร์มิสและแถบแคสพาเรียนเพิ่มขึ้นและหนาขึ้น ทำให้เกลือผ่านเข้าสู่ระบบลำเลียงได้ยากขึ้น หรือพืชบางชนิดที่มีการหลีกเลี่ยงไม่ให้เกลือไปสะสมที่ใบหรือยอดแต่จะไปสะสมที่รากหรือต้นแทน นอกจากนี้ยังมีพืชบางชนิดที่มีกระบวนการขับเกลือ (excretion) ซึ่งพืชจะขับเกลือจากไซโทพลาซึมไปสะสมไว้ที่ต่อมเกลือซึ่งอยู่ที่ใบ เมื่อใบร่วงก็เท่ากับเป็นการกำจัดเกลือออกไปจากพืชด้วย (Flowers, 2005) และกลไกอีกกลไกหนึ่งซึ่งสามารถพบได้ในพืชคือ กลไกการอวบน้ำ (succulence) ซึ่งพืชจะเพิ่มปริมาณน้ำในเซลล์และปิดปากใบเพื่อลดการคายน้ำ น้ำจึงสะสมในเซลล์มากขึ้นทำให้ความเข้มข้นของเกลือภายในเซลล์ลดลง (Flowers *et al.*, 1977)

ข้าวเป็นพืชที่ทนความเค็มปานกลาง โดยที่ข้าวพันธุ์ต่างๆจะทนความเค็มได้ไม่เท่ากัน แม้แต่ข้าวพันธุ์เดียวกันเอง ในแต่ละช่วงของการเจริญเติบโตข้าวก็จะมี ความทนทานต่อความเค็มต่างกันด้วย (Zafar, 2004) ซึ่งข้าวจะมีความทนทานมากในช่วงระยะงอก แต่ต้นกล้าข้าวจะไม่ทนทานจนกว่าจะมีอายุครบ 4 สัปดาห์ ความทนต่อความเค็มจะมีอีกในช่วงแตกกอ และจะไม่ทนทานในช่วงออกดอก แต่เมื่อถึงระยะแก่ความทนทานก็จะเพิ่มขึ้นอีก ซึ่งจะเห็นได้ว่าข้าวมีบางช่วงที่ไม่ทนต่อความเค็มหรือทนได้น้อย ประกอบกับปัญหาบางอย่างที่เกิดขึ้นจากดินเค็มทำให้ข้าวดูดสารอาหารที่จำเป็นจากดินมาใช้ได้น้อยลง (Hussain, 2003) จึงส่งผลให้ข้าวที่ปลูกในบริเวณดินเค็ม ถึงแม้ว่าจะไม่ตายแต่ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตลดลง (อำนาจ, 2525; Baloch, 2003) ตัวอย่างเช่น ภาคใต้มีพันธุ์ข้าวแนะนำที่ให้เกษตรกรปลูก คือ ข้าวแดง ข้าวลูกแดง อัลฮัมดุลิลละห์ ซึ่งให้ผลผลิตเฉลี่ยไม่เกิน 300 กิโลกรัมต่อไร่ ในภาคอีสานพันธุ์ข้าวที่ปลูกอยู่ในปัจจุบันส่วนมากจะเป็นข้าวพันธุ์แนะนำ เช่น กข 6 ขาวดอกมะลิ 105 และ กข 15 เป็นต้น ซึ่งมีความทนทานต่อดินเค็มได้ไม่ดีพอ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวที่ทนทานต่อดินเค็ม คุณภาพเมล็ดเป็นที่ยอมรับ ด้านทานโรคแมลงและมุ่งเป้าหมายให้ได้ผลผลิตโดยเฉลี่ยเพิ่มขึ้นถึง 350 กิโลกรัมต่อไร่

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การนำเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆของพืชมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารที่จำเป็นต่อการพัฒนาของพืช ในสภาพที่ปลอดเชื้อ ทำให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ เซลล์มีการพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อ และเป็นต้นขึ้นในที่สุด ดังนั้นการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองจึงแบ่งออกได้เป็นหลายชนิด เช่น การเพาะเลี้ยงพืชทั้งต้น การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ การเพาะเลี้ยงอวัยวะ การเพาะเลี้ยงแคลลัส การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยและการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ (คำานูณ, 2542)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายประการ เช่น การขยายพันธุ์พืชให้มีปริมาณมากขึ้นในเวลาอันรวดเร็ว (Hi and Lanka, 1988) การผลิตพืชที่มีพันธุกรรมที่ต้องการให้ปราศจากโรค การผสมพันธุ์พืชที่ไม่สามารถผสมกันได้ด้วยวิธีธรรมชาติ ช่วยในการสร้างพืชสายพันธุ์แท้ในระยะเวลาอันรวดเร็วกว่าการผสมตัวเอง การปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะตามต้องการโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งอาจใช้วิธีการถ่ายยีน การใช้สารเคมี หรือการฉายรังสี เพื่อให้ได้พืชสายพันธุ์ใหม่เกิดขึ้น (บุญยืน, 2544)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคนิคที่กำลังได้รับความสนใจ มีการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อประโยชน์ในการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับพืชทุกแขนงวิชาอย่างแพร่หลาย ในปัจจุบันมีพืชหลายชนิดที่ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้งเพื่อการเกษตร การค้า และ อุตสาหกรรม (Mahmood, 2002)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดอาจใช้สารอาหาร หรือสารเคมีบางตัวที่แตกต่างกันออกไป พืชบางชนิดจำเป็นต้องใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) ลงไปในอาหารด้วย เพื่อช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตหรือการกำเนิดอวัยวะ สารควบคุมการเจริญเติบโตที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายมีอยู่ 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 คือออกซิน ที่นิยมใช้มากเช่น IAA, NAA, 2,4-D สารกลุ่มที่ 2 คือไซโตไคนินที่นิยมใช้ได้แก่ BAP, kinetin สมดุลของออกซินและไซโตไคนินมีผลต่อการสร้างอวัยวะ และสารทั้ง 2 ชนิดนี้จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการกำเนิดอวัยวะของเซลล์ที่เลี้ยง กล่าวคือชนิดของพัฒนาการ ได้แก่ การเกิดเป็นแคลลัส ราก หรือยอด ถูกกำหนดโดยความสัมพัทธ์ของสารทั้งคู่ (รังสฤษฎี, 2541)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวเพื่อให้เจริญเป็นแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นอ่อนเป็นงานที่สำคัญมากในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวทำสำเร็จมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1960 โดยกลุ่มนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่น ต่อจากนั้นก็มีการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวอีกมากมาย ซึ่งทำให้ได้ข้อมูลใหม่ๆที่น่าสนใจเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวอีกหลายประการเช่น ในปี ค.ศ.1978 Henke *et al.* ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวโดยใช้ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสจากรากและใบ คือ 2 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ต่อมาในปีค.ศ. 1992 Tsukahara and Hirokawa พบว่าการลดปริมาณน้ำของแคลลัสลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยการวางแคลลัสไว้บนกระดาษกรองในจานแก้ว 1-3 วัน จะพบอัตราการเกิดต้นได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แคลลัสที่ไม่ผ่านขั้นตอนนี้มีโอกาสการเกิดต้นน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์

Siriwardana *et al.* (1993) พบว่าหลังจากนำแคลลัสของข้าวพันธุ์ IR66 ที่เลี้ยงอยู่ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ย้ายลงไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่มี L-proline ต่างๆกัน พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี L-proline

ความเข้มข้นต่ำ คือ 0.1-0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเกิดต้นได้สูงถึง 30-50 เปอร์เซ็นต์ แต่หากใช้ที่ระดับความเข้มข้นสูงคือ 0.5-1 มิลลิกรัมต่อลิตรจะยับยั้งการเกิดต้น

ต่อมาในปีค.ศ. 1999 Lutts *et al.* ได้เพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวพวก *Japonica* 2 พันธุ์คือ I Kong Pao และ Aiwu และข้าวพวก *Indica* 2 พันธุ์คือ IR 2153 และ Nona Bokra โดยใช้ abscisic acid (37.8 ไมโครโมลต่อลิตร), polyethylene glycol (5%), proline (10 มิลลิโมลต่อลิตร), tryptophan (490 ไมโครโมลต่อลิตร) และ indoleacetic acid (5.7 ไมโครโมลต่อลิตร) ลงไปในอาหารสูตร MS ที่มี NaCl ความเข้มข้น 0, 50 และ 100 มิลลิโมลต่อลิตร เพื่อศึกษาว่าสารต่างๆ ดังกล่าวจะมีส่วนช่วยให้แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่มีเกลือเดบิตและมีชีวิตรอดได้ดีขึ้น ซึ่งผลปรากฏว่า tryptophan สามารถช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด และช่วยให้ข้าวสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ดีขึ้น ส่วน abscisic acid และ polyethylene glycol นั้น ถึงแม้ว่าจะไม่มีผลที่จะช่วยให้ข้าวพัฒนาเป็นต้นได้ดีขึ้น แต่ก็ช่วยให้รากของข้าวพวก *Indica* เจริญได้ดีขึ้น เช่นเดียวกับ indoleacetic acid ที่ช่วยในการพัฒนาและเพิ่มจำนวนรากให้มากขึ้น ส่วน praline ไม่มีผลต่อการพัฒนาทั้งของต้นและราก ในปัจจุบันก็ยังมีผู้ทำการศึกษาคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวกันอยู่อย่างต่อเนื่อง

ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ก็มีผู้สนใจศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเช่นกัน ในปี พ.ศ. 2533 ธีรารัตน์ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวสามารถทำให้เมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 เกิดแคลลัสได้สูงสุดถึง 80.95 เปอร์เซ็นต์

ในปี พ.ศ. 2537 ประภาและพรทิพย์ พบว่าเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ casein hydrolysate 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมีแสง สามารถสร้างแคลลัสในอัตราที่สูงถึง 96.3% และแคลลัสมีขนาดเฉลี่ยใหญ่ที่สุดคือ 9.4 มิลลิเมตร

มีการทดลองอื่นที่ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของประภาและพรทิพย์ ซึ่งพบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 เกิดแคลลัสได้ในอัตราที่สูง เช่น จตุพร (2540) พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร proline 10 ไมโครโมลต่อลิตร ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นผง 0.8 เปอร์เซ็นต์ ชักนำเมล็ดให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุดคือ 76.23 เปอร์เซ็นต์ ลาวัลย์ (2543) พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร L-proline 1 กรัมต่อลิตร casein hydrolysate 1 กรัมต่อลิตร ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นผง 0.8 เปอร์เซ็นต์ ชักนำเมล็ดให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุดคือ 86.50

เปอร์เซ็นต์ และเมื่อย้ายแคลลัสไปวางไว้บนกระดาษกรองในจานแก้ว 3 วัน จะเพิ่มอัตราการเกิดต้นได้ดีที่สุด ส่วนอาหารสูตรที่ชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นได้สูงสุดคืออาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร L-proline 1 กรัมต่อลิตร casein hydrolysate 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นผง 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยให้อัตราการเกิดต้นอ่อน 94.99 เปอร์เซ็นต์

นอกจากจะชักนำให้เมล็ดพืชพัฒนาเป็นต้นโดยการเจริญผ่านแคลลัสแล้ว ยังสามารถชักนำให้เมล็ดพัฒนาไปเป็นต้นโดยตรงที่ไม่ผ่านการเกิดแคลลัสด้วย โดยการชักนำนั้นต้องใส่สารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิด เช่น BAP ซึ่งมีผู้วิจัยทำการทดลองมาแล้วในพืชหลายชนิด

ในปี พ.ศ. 2534 สุริดา พบว่าในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกล้าไผ่ซางที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถทำให้เกิดหน่อได้ถึง 11 หน่อต่อต้นอ่อน

ในปี พ.ศ. 2536 ประดิษฐ์และคณะ ได้เพาะเลี้ยงคัพพะอ่อนของเมล็ดข้าวลูกผสมที่มีอายุ 9-14 วัน พบว่าสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม yeast extract 1 กรัมต่อลิตร และ BAP 2-3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในปี พ.ศ. 2537 กมลพรรณ ได้ทดลองขยายพันธุ์หญ้าพริกพราณ (*Apluda mutica* L.) ในหลอดทดลองโดยการเลี้ยงขีบนอาหารแข็งสูตร MS ซึ่งเติม BAP ความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 15 ไมโครโมลต่อลิตรร่วมกับ NAA 0, 1, 2 และ 4 ไมโครโมลต่อลิตร ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าอาหารที่เติม BAP 10 ไมโครโมลต่อลิตร สามารถกระตุ้นให้ข้อสร้างยอดได้สูงสุดคือ 4.25 ยอด ในระยะเวลา 30 วัน

นอกจากนี้ มีผู้วิจัยศึกษาผลของ BAP ในพืชชนิดใหม่ๆ กันมากขึ้น เช่น ในปี พ.ศ. 2544 ประสิทธิ์และคณะ ได้เพาะเลี้ยงตาข้างของไม้ชิงชัน (*Dalbergia oliveri* Gamble.) บนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ที่ระดับความเข้มข้น 20 ไมโครโมลต่อลิตรภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการให้แสงความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ (lux) นาน 12 ชั่วโมง/วัน พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างเฉลี่ย 4.75 ยอด ภายในระยะเวลา 3-4 สัปดาห์ และสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสเมื่อใช้ BAP ที่ความเข้มข้น 30 และ 40 ไมโครโมลต่อลิตร ในเวลา 3 สัปดาห์ ผลการศึกษาการยืดตัว (shoot elongation) ของยอดที่เกิดขึ้น พบว่าการใส่ gibberellic acid (GA_3) 0.6 ไมโครโมลต่อลิตรในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลต่อลิตร สามารถช่วยให้ยอดยืด

ตัวได้ดี และสามารถชักนำยอดให้เกิดรากในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ IBA 1 ไมโครโมลต่อลิตร และ NAA 1 ไมโครโมลต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์

อำพรและคณะ (2547) ได้ขยายพันธุ์ต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 8 สัปดาห์ พบว่า BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เนื้อเยื่อสามารถสร้างยอดใหม่ที่สมบูรณ์มากที่สุดเฉลี่ย 3.0 ยอดต่อชิ้นส่วน

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ (mutation) เป็นการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมและสามารถถ่ายทอดได้ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้ลักษณะหนึ่งลักษณะใดเปลี่ยนแปลงไป การกลายพันธุ์อาจเป็นการเปลี่ยนแปลงจำนวนหรือโครงสร้างของโครโมโซมที่เรียกว่าการกลายพันธุ์ระดับโครโมโซม (chromosome mutation) หรืออาจเกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของยีนที่เรียกว่าการกลายพันธุ์ระดับของยีน (gene mutation) ก็ได้ การกลายพันธุ์อาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) หรืออาจเกิดจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induced mutation) ก็ได้โดยใช้สิ่งก่อการกลายพันธุ์ (mutagen) การกลายพันธุ์ทำให้เกิดลักษณะใหม่ๆ ขึ้นในพืชชนิดต่างๆ ซึ่งอาจนำไปสู่การได้พันธุ์ดี สิ่งก่อการกลายพันธุ์อาจแยกได้เป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ

1. รังสี (radiation) เป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีช่วงคลื่นสั้นกว่า 10^{-6} เซนติเมตร (ไพศาล, 2525) ประกอบด้วยอนุภาคขนาดเล็ก ที่เคลื่อนที่ด้วยแรงและความเร็วขนาดต่างๆ กัน เมื่ออนุภาคดังกล่าวเคลื่อนที่เข้ามากระทบสารพันธุกรรม จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับส่วนของสารพันธุกรรมนั้น ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของลักษณะ และพฤติกรรมการถ่ายทอดลักษณะนั้นๆ เนื่องจากการกระทบเป็นไปแบบสุ่มและมีผลไปในทางการทำลายเป็นส่วนใหญ่ การใช้รังสีจึงมักให้ผลที่แตกต่างกันบ้างในการปฏิบัติแต่ละครั้ง และลักษณะที่ได้ส่วนใหญ่เป็นลักษณะที่ผิดปกติ ฉะนั้นจึงควรทำกับพืชจำนวนมาก เพื่อเพิ่มโอกาสที่จะพบลักษณะที่ต้องการ (นพพร, 2546)

รังสีที่นำมาใช้ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์มี 2 ประเภท คือรังสีก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) เป็นรังสีที่มีอำนาจการทะลุทะลวงสูง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับโครโมโซม รังสีที่นิยมใช้เช่น รังสีเอกซ์ รังสีนิวตรอน และรังสีแกมมา ส่วนอีกประเภทหนึ่งคือรังสีที่ไม่ก่อให้เกิด

ไอออน (non - ionizing radiation) เป็นรังสีที่มีอำนาจการทะลุทะลวงน้อยมักทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับยีน เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต

วิธีการฉายรังสี (irradiation) มี 2 วิธี คือการฉายรังสีแบบเฉียบพลัน (acute irradiation) การฉายรังสีวิธีนี้ใช้ปริมาณรังสีสูงในเวลาสั้น นิยมใช้กับเมล็ด ละอองเกสรตัวผู้ นอกจากนี้ยังนิยมทำในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพราะฉายรังสีให้กับเซลล์ได้ครั้งละมากๆ ทำให้มีโอกาสที่จะได้เซลล์กลายพันธุ์ที่ต้องการสูงขึ้น และอีกวิธีหนึ่งคือ การฉายรังสีแบบเรื้อรัง (chronic) การฉายรังสีวิธีนี้ใช้ปริมาณรังสีน้อย เวลานาน นิยมใช้กับพืชทั้งต้น หน่อ กิ่งตอน กิ่งชำ เนื่องจากเซลล์ที่ถูกรังสีเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อเจริญที่กำลังแบ่งตัว ไม่มีความทนทานต่อรังสีในปริมาณสูงๆ การฉายโดยใช้ปริมาณรังสีน้อย เป็นเวลานาน จะทำให้เซลล์ที่เกิดใหม่มีโอกาสได้รับรังสีอย่างทั่วถึง

2. สารเคมี ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยีนมากกว่าโครงสร้างหรือจำนวนชุดของโครโมโซม สารที่นิยมใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชเช่น โคลชิซิน และ ethyl methane sulfonate หรือ EMS (อรุณี, 2539)

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีมีผู้นำมาใช้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นครั้งแรกในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2504 โดยการใช้รังสีแกมมากับพุทธรักษาเพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ผลการทดลองปรากฏว่ารังสีแกมมาทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะสีดอก รูปทรงของดอก ความสูงของต้น ฯลฯ (สิรินุช, 2540) งานวิจัยทางด้านการใช้รังสีแกมมากับพืชที่มีการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังคงมีการวิจัยติดต่อกันมาปีนระยะๆ ตัวอย่างเช่น การศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีต่อดอกหน้าวัว พบว่าการเจริญเติบโตของราก ลำต้น ใบ จานรองดอก และปลี ของดอกหน้าวัวมีแนวโน้มลดลงตามปริมาณรังสีแกมมาที่เพิ่มขึ้น (บุญมี, 2518) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของถั่วเขียวโดยใช้รังสีแกมมา พบว่ารังสีแกมมาทำให้ถั่วเขียวมีอัตราการงอก ความสูง และจำนวนข้อต่อต้นลดลง (ธีระ, 2525) ในทำนองเดียวกันรังสีแกมมามีผลทำให้ทานตะวันมีความยาว hypocotyl และ epicotyl ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ความยาวรากลดลง 35 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าปริมาณรังสีที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันคือ 10 กิโลเรด (โกศล, 2533)

ในปี พ.ศ. 2547 ทิวา สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในงาด้วยรังสีแกมมาปริมาณ 0, 30, 60 และ 90 เกรย์ ผลของการฉายรังสีพบว่ารังสีแกมมามีผลต่อสีดอก ความสูงและระยะเวลาใน

การออกดอก อย่างไรก็ตามรังสีไม่มีผลต่อกลีบดอกด้านล่าง ความสูงข้อแรกที่อยู่ดอก และการแตกกิ่งของงา

การใช้รังสีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถทนต่อสภาพดินเค็มเป็นอีกหัวข้อหนึ่งซึ่งได้รับความสนใจมากขึ้นในปัจจุบัน โดยในประเทศไทยเองก็มีการศึกษาในพืชหลายชนิด เช่น การชักนำให้กลายพันธุ์ Williams เกิดการกลายพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ที่ทนเค็มโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าสามารถคัดเลือกลายพันธุ์ที่ทนเค็มได้ในระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.4 เปอร์เซ็นต์ (สุภัทรา, 2533) หรือการศึกษาผลของรังสีแกมมา ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีผลต่อการเติบโตของหญ้านกนิ่มงบนอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งพบว่าต้นที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณ 20 เกรย์ สามารถเจริญบนอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5, 1.0, 1.5 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำหน่อออกปลูกในสภาพธรรมชาติพบว่าหญ้ามืดราการรอดชีวิตเท่ากับ 26.92 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ยังพบต้นที่คาดว่าจะมีลักษณะทนเค็มที่ระดับความเข้มข้นของเกลือ 2.0 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 4 โคลนด้วย (สุมล, 2546)

การทดลองในต่างประเทศที่น่าสนใจในการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวพันธุ์ *Hawsungbyeol* บนอาหารสูตร N6 ที่เติม 2, 4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร gelrite 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (pH 5.8) แล้วนำไปฉายรังสีปริมาณ 30, 50, 70 และ 90 เกรย์ หลังจากการฉายรังสี พบว่าแคลลัสที่ได้รับรังสี 30 และ 50 เกรย์ สามารถเติบโตได้บนอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1.25 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อย้ายไปเลี้ยงต่อไปสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนเค็มชั่ว M_2 จำนวน 5 สายพันธุ์ และชั่ว M_3 จำนวน 13 สายพันธุ์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้รังสี สามารถชักนำให้เกิดการทนเค็มในข้าวได้ (Lee, 2003)

การทดลองเกี่ยวกับการกลายพันธุ์ที่เกิดจากรังสีแกมมายังมีอย่างต่อเนื่อง Beak *et al* (2004) พบว่าการฉายรังสีแกมมาจะช่วยให้เกิดการเพิ่มเอนไซม์ในกลุ่ม antioxidant เช่น เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) และ ascorbate peroxidase (APX) การทดลองทำโดยการฉายรังสีแกมมา 80 เกรย์ ให้แก่เมล็ดข้าว 2 สายพันธุ์คือ *Ilpumbyeo* และ *Sanghaehyanghyella* ปรากฏว่าข้าวทั้งสองสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตในสารละลายที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิโมลต่อลิตร ได้ดีกว่าต้นที่เพาะจากเมล็ดที่ไม่ผ่านการฉายรังสีแกมมา

การจัดจำแนกพันธุ์สิ่งมีชีวิตด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

การศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต มักจัดจำแนกตามลักษณะที่ปรากฏซึ่งแสดงออกทั้งภายนอกและภายใน ว่ามีความคล้ายคลึงกันมากเท่าใด โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม (ปรีชาและนงลักษณ์, 2536) คือ

1. ความคล้ายคลึงของการเจริญเติบโตในระยะตัวอ่อน พบว่า สัตว์ยังมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันจะมีลักษณะแบบแผนการเจริญเติบโตคล้ายกันมากกว่าสัตว์ที่มีความสัมพันธ์ห่างกัน และจากลักษณะแบบแผนการเจริญเติบโตของตัวอ่อนนั้นยังแสดงถึงผลของการวิวัฒนาการว่า สิ่งมีชีวิตชนิดใดเจริญเปลี่ยนแปลงมาจากสิ่งมีชีวิตชนิดใดได้อีกด้วย

2. ความคล้ายคลึงกันของสารพันธุกรรม หรือโครงสร้างของเซลล์ในการสังเคราะห์สารเคมีภายในเซลล์ ซึ่งมีความสำคัญในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต โดยจะดูจากความเหมือนหรือต่างกันของสารพันธุกรรม ซึ่งข้อมูลที่ได้มาเหล่านี้ นักวิทยาศาสตร์นำมาสร้างเป็นต้นไม้แห่งวิวัฒนาการชาติพันธุ์ได้ (phylogenetic tree) เพื่อแสดงการเกิดวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตหรือที่เรียกว่า phylogeny (Avisé, 1994)

ในบางครั้งก็อาจมีสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะและรูปร่างพื้นฐานเหมือนกันมากๆ จนไม่สามารถแยกได้ ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงได้มีการพัฒนาวิธีใหม่ในการจำแนก นั่นคือการใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ซึ่งมีการพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง จากเทคนิค PCR ที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นพื้นฐานสำหรับการทำเครื่องหมายโมเลกุล ในปัจจุบันการหาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยเฉพาะการตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่มีหลายรูปแบบ (polymorphism) ในสิ่งมีชีวิต สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 วิธี (Ayad *et al.*, 1997) คือ

1. Non-PCR based screening technique เป็นวิธีที่ใช้ในการจำแนกพันธุ์โดยไม่ใช้เทคนิค PCR ตัวอย่างเช่น เทคนิค RFLP ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบการเกิด polymorphism ของลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอได้ โดยเริ่มจากการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นจึงนำมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ถ่ายลงบนเมมเบรน แล้วใช้โพรบ (probe) มาจับที่ตำแหน่งจำเพาะ ซึ่งโพรบที่นำมาจับนั้นจะมีขนาดสั้นๆ โดยเมื่อโพรบเข้าไปจับแล้ว จะเป็นตัวแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เนื่องจากตำแหน่งที่โพรบเข้าไปจับนั้นอาจเกิดมิวเทชันทำให้เห็นความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (สุรินทร์, 2545; Brettschneider, 1998) ซึ่งวิธีนี้นิยมใช้กันมาก เนื่องจากเป็น

เทคนิคที่ให้ผลค่อนข้างแม่นยำ สามารถตรวจสอบสิ่งมีชีวิตที่เป็นเฮเทอโรไซโกต (heterozygote) ได้และไม่จำเป็นต้องรู้ลำดับเบส เนื่องจากโพรบจะมาจับที่ตำแหน่งจำเพาะในจีโนม

2. Targeted PCR เป็นวิธีการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต โดยใช้ปฏิกิริยาการ PCR แบบจำเพาะ ซึ่งจำเป็นจะต้องทราบตำแหน่งและลำดับเบสที่แน่นอนก่อน เพื่อที่จะได้สังเคราะห์ไพรเมอร์กับลำดับเบสนั้น ตัวอย่างของเทคนิคนี้ได้แก่ SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) เป็นวิธีตรวจหา polymorphism จากดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอซึ่งมีความแตกต่างกันเพียงแค่เบสใดเบสหนึ่งในสายดีเอ็นเอ ซึ่งนำไปสู่การกลายพันธุ์ที่เรียกว่า point mutation โดยอาศัยหลักการที่ว่าดีเอ็นเอสายเดียวในสภาพธรรมชาติจะมีการขดหรือพันกันภายในโมเลกุล เกิดเป็นโครงสร้างจำเพาะขึ้นกับองค์ประกอบของเบสภายในดีเอ็นเอสายนั้น ซึ่งจะมีผลต่อการเคลื่อนที่ระหว่างการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบน nondenaturing polyacrylamide gel โดยโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีเบสต่างกันแม้เพียงเบสเดียวก็สามารถทำให้เกิดโครงสร้างที่แตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลให้การเคลื่อนที่ในระหว่างการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสเร็วหรือช้าต่างกันออกไป (สุรินทร์, 2543) SSR (Simple Sequence Repeat) เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่ใช้ตรวจหาการกระจายตัวทางพันธุกรรมโดยดูจากจำนวนซ้ำของลำดับเบส เช่น (GC)_n หรือ (AC)_n ว่ามีจำนวนมากน้อยเท่าใดโดยใช้ไพรเมอร์เข้าไปจับ แล้วนำไปทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ซึ่งการเกิด polymorphism นั้นจะมาจากจำนวนชุดของลำดับเบสที่ยาวไม่เท่ากันในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ดังนั้นเมื่อนำมาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสดีเอ็นเอสายที่ยาวหรือที่มีจำนวนชุดซ้ำกันมากๆ จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีจำนวนชุดซ้ำน้อย ซึ่งสามารถตรวจสอบผลด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสใน polyacrylamide ซึ่งข้อดีของวิธีการนี้คือ สามารถตรวจสอบลูกที่เป็นเฮเทอโรไซโกตได้และไม่มีการใช้สารกัมมันตรังสี (radioactive isotope) (Brown *et al.*, 1996) และ PCR-RFLP ซึ่งต่างจาก RFLP ธรรมดา คือ จะเป็นการใช้ไพรเมอร์มาจับที่ตำแหน่งจำเพาะแล้วนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยไม่ต้องทำโฮบริเคชัน นำผลที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วตรวจสอบผลได้โดยการย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ซึ่งข้อดีของวิธีการนี้คือ สามารถตรวจสอบเฮเทอโรไซโกตได้ อีกทั้งยังให้ข้อมูลที่แม่นยำ

3. PCR arbitrary priming technique เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ปฏิกิริยา PCR แบบสุ่ม ตัวอย่างเทคนิคนี้คือ RAPD และ AFLP ซึ่ง RAPD เป็นการใช้ไพรเมอร์สายสั้นๆ ความยาวประมาณ 10-20 เบส มาจับที่ตำแหน่งต่างๆ บนสายนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ แล้วจึงนำมาตรวจสอบด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสใน agarose gel แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ผลที่ได้จากการย้อมจะเห็นเป็นแถบดีเอ็นเอ (band) เรืองแสง

ภายใต้แสง UV ที่มีขนาดต่างๆ ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ (สุรินทร์, 2545; Edwards, 1998) ผลที่ได้นี้จะดีกว่าเทคนิค RFLP เนื่องจากจะให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากกว่า และเทคนิคนี้ทำได้รวดเร็วและง่ายกว่า RFLP มาก เพราะไม่ต้องใช้โพรบเข้ามาจับ ไม่ต้องใช้ไพรเมอร์จำเพาะในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังสามารถทำได้ในเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพียงครั้งเดียว เทคนิคอีกชนิดหนึ่งที่จัดอยู่ในประเภทนี้คือ AFLP ซึ่งให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากกว่า RAPD และ RFLP เนื่องจากเทคนิคนี้เป็นการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งคล้ายกับเทคนิค RFLP แต่เปลี่ยนการตรวจสอบผลจากวิธี Southern blot hybridization เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนด้วยปฏิกิริยา PCR (Vos *et al.*, 1995; Matthes *et al.*, 1998)

เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

เทคนิค AFLP เป็นเทคนิคที่มีรายงานในปี ค.ศ. 1995 (Vos *et al.*, 1995) ใช้สำหรับการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ช่วยในการแยกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิต ใช้เป็นเครื่องมือในการจัดจำแนกหรือหาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต โดยการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วนำมาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR (Vos and Kuiper, 1997) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนย่อยคือ การทำ pre-selective amplification และ selective amplification ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ adaptor มาจับ โดยมีเบสคัดเลือกรวมจำนวน 1 และ 3 เบส ตามลำดับ (Vos *et al.*, 1995) จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel บันทึกผลโดยดูการเกิดจำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีหลายรูปแบบ ซึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดความแตกต่างนี้เป็นผลมาจากการเกิดมิวเทชันที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ทั้งสองชนิด (สุรินทร์, 2545) จากนั้นจึงนำไปคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรมและสร้างเป็น phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYSpc 2.02i (Rohlf, 1993) นอกจากนี้จะพบว่า เทคนิค AFLP นั้นมีคุณลักษณะที่ดีหลายอย่าง โดยเฉพาะความน่าเชื่อถือเพราะว่า เมื่อทำซ้ำจะได้ผลเหมือนเดิม

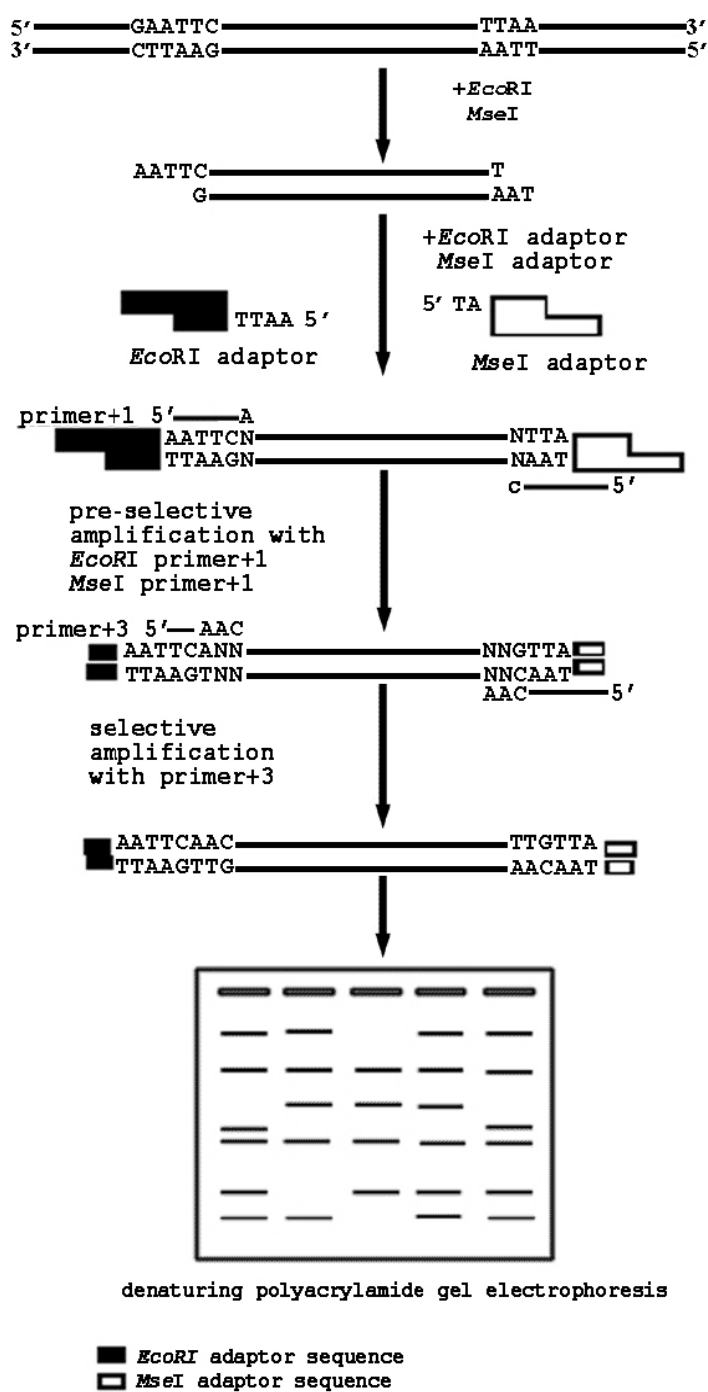
ตารางที่ 1 เปรียบเทียบชนิดของเครื่องหมายโมเลกุลพร้อมคุณลักษณะต่างๆ

Characteristic	RFLPs	RAPDs	SSRs	AFLPs
Development costs	Medium	Low	High	Low
Level of polymorphism	Low-Medium	Medium	High	Medium
Automation	No	Yes/No	Yes/No	Yes/No
Reliability	High	Low	High	High
Level of skill Required	Low	Low	Low-Medium	Medium
Cost	High	Low	Low	Medium
Radioactivity	Yes/No	No	Yes/No	Yes/No

ที่มา : Ayad *et al.*, 1997

ขั้นตอนการทำ AFLP สามารถแบ่งเป็นขั้นตอนหลักๆ ได้ 3 ขั้นตอน คือ

1. การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเชื่อมต่อปลายทั้งสองด้วย adaptor ในขั้นตอนตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะนี้จะใช้เอนไซม์สองชนิดที่มีตำแหน่งจดจำต่างกันมาตัดสายดีเอ็นเอ เอนไซม์ที่ใช้ได้แก่ *EcoRI* ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส และ *MseI* ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส นอกจากเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่กล่าวมาแล้วยังอาจใช้เอนไซม์ชนิดอื่นได้อีกด้วย เช่น *TaqI* ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส เท่ากับ *MseI* (Vos *et al.*, 1995) และ *PstI* (Massawe, 2002) เมื่อตัดออกมาแล้วจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก เหมาะสำหรับการทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยชิ้นดีเอ็นเอที่ได้นั้นควรมีขนาดไม่เกิน 1 กิโลเบสเพื่อจะได้สามารถเห็นความแตกต่างได้ชัดเจน เมื่อทำอิเล็กโตรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel จากนั้นจึงนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมด้วย adaptor ที่ปลายทั้ง 2 ด้าน เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเข้ามาจับได้ในปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค AFLP ด้วยไพรเมอร์ คู่หนึ่ง
ที่มา : ดัดแปลงจาก Lin and Kuo (1995)

2. ปฏิกริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ในขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอนี้จะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนย่อย คือ

2.1 Pre-selective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอต้นแบบให้มากขึ้นและช่วยให้เกิดการคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอให้ถูกต้อง ขั้นตอน pre-selective amplification นิยมใช้เมื่อต้องการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีจีโนมขนาดใหญ่และต้องใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3' มากกว่า 2 เบส ในขั้นตอน selective amplification ไพรเมอร์ที่ใช้ส่วนมากนิยมเพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 เบสเข้าที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ ทำให้มีผลต่อจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบ โดยพบว่า ถ้าใช้ไพรเมอร์ที่ไม่มีการเพิ่มเบส จะได้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากกว่าการใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 เบส (Mackill *et al.*, 1996)

2.2 Selective amplification เป็นขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้มากขึ้นพร้อมๆกับการคัดเลือกชนิดของนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ดีเอ็นเอจากขั้นแรกเป็นแม่แบบ แล้วใช้ไพรเมอร์ที่มีนิวคลีโอไทด์เพิ่มด้านปลาย 3' เป็นตัวคัดเลือก ซึ่งอาจไม่ใช้ได้ในกรณีที่มีจีโนมขนาดเล็ก เช่น พลาสมิด และคอสมิด เป็นต้น แต่ถ้ามีจีโนมมีขนาดใหญ่ขึ้นมามากขึ้นก็อาจใช้เบสคัดเลือกเพียงแค่ 2 เบสก็ได้ (Caetano-Anolles *et al.*, 1997) ซึ่งในขั้นตอนนี้มีความสำคัญมาก เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่ทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และเป็นตัวกำหนดปริมาณแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่พบหลังจากทำอิเล็กโทรโฟริซิสแล้ว ควรมีประมาณ 50-100 แถบ และในขั้นตอนนี้อาจยังอาจใช้สารที่ไม่ใช่กัมมันตรังสีติดบริเวณไพรเมอร์ เพื่อง่ายต่อการตรวจสอบโดยใช้คอมพิวเตอร์ (Vrielling *et al.*, 1997)

3. การแยกชิ้นดีเอ็นเอใน denaturing polyacrylamide gel ผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในขั้นตอนที่ 2 สามารถนำมาแยกให้เห็นความแตกต่างกันได้ใน denaturing polyacrylamide gel ที่มีความเข้มข้นประมาณ 5-6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลผลิตที่ได้จะออกมาในรูปแบบของดีเอ็นเอ (DNA pattern) ที่มีความแตกต่างในแต่ละตัวอย่างหรือพันธุ์

ในปัจจุบันมีการนำเทคนิค AFLP มาใช้ในการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชหลายชนิด เช่น ในข้าว กาญจนนา (2544) สามารถใช้เทคนิค AFLP เป็นตัวบ่งชี้ให้เห็นถึงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ NIL (IRBB5) ซึ่งมีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอกับพันธุ์ IR 24 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ไม่ต้านทานต่อโรคดังกล่าว โดยใช้เครื่องหมาย AFLP จำนวน 64 คู่ไพรเมอร์ พบว่ามีจำนวน 12 คู่ไพรเมอร์ที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานกับพันธุ์ไม่ต้านทานทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอในพันธุ์ NIL (IRBB5) แต่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันในพันธุ์ IR 24

การนำเทคนิค AFLP มาใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวยังมีมาอย่างต่อเนื่อง ในปี พ.ศ. 2548 วรรณิ์ ตรวจสอบความแตกต่างของเครื่องหมาย AFLP ที่ตอบสนองต่อช่วงแสงโดยกลไกการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และสุพรรณบุรี 1 ที่ควบคุมให้ได้รับช่วงแสงสั้น 11 ชั่วโมงต่อวัน และช่วงแสงยาว 13 ชั่วโมงต่อวัน โดยการตัดดีเอ็นเอของข้าวด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HpaII* พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้รับช่วงแสงสั้นและช่วงแสงยาว 2 แถบ คือแถบดีเอ็นเอ PG-AG และ PG-GG เนื่องจากเครื่องหมาย PG-AG และ PG-GG มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับลำดับเบสของ cDNA และ mRNA ใน database ของ GenBank 98% และ 100% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมาย PG-AG, PG-GG อาจเป็นยีนหรือเป็นส่วนหนึ่งของยีนที่อาจถูกชักนำหรือยับยั้งการแสดงออกโดยกลไกการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอภายใต้สภาพแสงสั้น โดยเครื่องหมาย PG-AG น่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนาดอกของข้าว ส่วนเครื่องหมาย PG-GG อาจจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการชักนำให้เกิดการออกดอกของข้าว

ในพืชชนิดอื่น ๆ ก็มีการนำเทคนิค AFLP มาใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมกันเป็นจำนวนมาก เช่น ในมะกอกโอลีฟ ปิตชัย (2547) ได้ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะกอกโอลีฟ 31 พันธุ์ ที่นำเข้ามาจากประเทศต่างๆ ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 11 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 634 แถบ หรือ 634 AFLP markers คิดเป็น 57.40 markers ต่อ 1 คู่ไพรเมอร์ และ 452 markers แสดง polymorphism ระหว่างตัวอย่างที่ศึกษา คิดเป็น 70.29 เปอร์เซ็นต์ของ markers ทั้งหมด เมื่อวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYSpc 2.02i เพื่อแบ่งกลุ่มตัวอย่างมะกอกโอลีฟโดยวิธี UPGMA สามารถแบ่งมะกอกโอลีฟออกได้เป็น 8 กลุ่ม ในปีเดียวกันอุไรวรรณ ทำการวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุล AFLP ของถั่วเนาวนางแดง จากกลุ่มดีเอ็นเอ 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ตอบสนองต่อช่วงแสงและไม่ตอบสนองต่อช่วงแสง กลุ่มละ 14 ต้น พบว่า จาก 48 คู่ไพรเมอร์ที่ศึกษา มี 5 คู่ไพรเมอร์ จำนวน 7 ตำแหน่ง ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่ หรือในถั่วเหลืองซึ่งกลอยตา (2550) ตรวจสอบความแตกต่างของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่กลายพันธุ์จากการฉายรังสีกับถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ปกติ ทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบยอดจำนวน 9 ตัวอย่างด้วยวิธี CTAB ตรวจสอบความแตกต่างด้วยวิธี AFLP ใช้ไพรเมอร์จำนวน 15 คู่ พบว่าเกิดความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (polymorphism) รวมทั้งหมด 61 แถบ นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์และจัดกลุ่มโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc version 2.20e ใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนแบบ Dice similarity coefficient ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์พบว่า ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่ได้รับการฉายรังสีทุกตัวอย่าง มีความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอกับพันธุ์เชียงใหม่ 60 ปกติ

ในต่างประเทศก็มีการใช้เทคนิค AFLP ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชตระกูลข้าวหลายการทดลอง เช่น Pakniyat *et al.* (1997) ศึกษาข้าวบาร์เลย์พันธุ์ป่า 39 ชนิดจากตะวันออกกลางโดยใช้เทคนิค AFLP โดยเลือกบริเวณที่มีภูมิประเทศแตกต่างกัน 3 บริเวณ เมื่อใช้ไพรเมอร์ 12 คู่ จะเกิดแถบทั้งหมด 268 แถบ แบ่งเป็นแถบที่พบในทุกตัวอย่างจำนวน 64 แถบ (monomorphic) และแถบที่พบในบางตัวอย่าง (polymorphic) จำนวน 204 แถบ ซึ่งคิดเป็น 76% ของทั้งหมด มีขนาดตั้งแต่ 83 ถึง 500 คู่เบส สามารถแบ่งกลุ่มได้ 3 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับแหล่งที่เก็บตัวอย่าง 3 แหล่ง มีเพียง 2 ตัวอย่างที่แบ่งแยกออกจากกลุ่ม และเมื่อนำตัวอย่างไปทดสอบความทนเค็มและสังเกตแถบดีเอ็นเอของพืชทนเค็ม พบว่า มีแถบดีเอ็นเอที่พบในตัวอย่างของพืชที่ทนเค็มทุกตัวอย่าง จำนวน 12 แถบและใน 12 แถบนี้มี 6 แถบ ที่พบในพืชที่ไม่ทนเค็มด้วย

Agrawal *et al.* (1999) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชสกุล *Oryza* 23 สายพันธุ์ จาก 77 ตัวอย่างโดยใช้เทคนิค AFLP และศึกษาในพืชที่มีความใกล้ชิดกับพืชสกุล *Oryza* รวมทั้งข้าวโพด อ้อย และถั่วเหลือง โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 5 คู่ พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 1,191 แถบ เมื่อนำมาวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ สามารถอธิบายวิวัฒนาการในพืชสกุลนี้ซึ่งมีบรรพบุรุษร่วม หรือกลุ่มของยีนที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด ซึ่งแยกออกจากกันในช่วงแรกของกระบวนการวิวัฒนาการ เกิดเป็นหลายสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกัน และต่อมาก็เกิดกระบวนการวิวัฒนาการแบบขนาน นำไปสู่การสูญพันธุ์ของจีโนมบางจีโนมได้ หรือใช้ศึกษาการกระจายตัวทางพันธุกรรมของข้าวป่าที่มี

ต่อมาในปี ค.ศ. 2001 Federici *et al.* ศึกษาการกระจายตัวทางพันธุกรรมของข้าวป่าที่มีลักษณะเหมือนกับข้าวปลูกโดยใช้ข้าวทั้งหมด 32 ตัวอย่าง แบ่งเป็นข้าวป่า 26 ตัวอย่าง และข้าวปลูก 6 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค AFLP พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มประชากรได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของข้าวป่าทั้งหมด ส่วนในกลุ่มที่ 3 เป็นการผสมกันระหว่างข้าวปลูกและข้าวป่าซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกัน

ในพืชชนิดอื่นก็มีการนำเทคนิค AFLP ไปใช้ในการทดลองเช่นกัน เช่น ในกล้วย Ude *et al.* (2003) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ african plantain โดยใช้ ไพรเมอร์ 15 คู่ของ AFLP และ 60 ไพรเมอร์ที่มีขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ของ RAPD พบว่า เทคนิค AFLP มีประสิทธิภาพดีกว่าเทคนิค RAPD ในการให้แถบโพลิมอร์ฟิซึม และเมื่อทำการวิเคราะห์ผลแบบ UPGMA และ PCO พบว่ามีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันระหว่างสายพันธุ์ที่มีช่อดอกคล้ายคลึงกันมากกว่าข้อมูลที่ได้จาก RAPD ต่อมา Bhat *et al.* (2004) ทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ของ indian banana และ plantain จำนวน 92 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค AFLP พบว่า จากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 12 คู่ สามารถทำให้เกิดแถบที่มีโพลิมอร์ฟิซึมและมีค่าเฉลี่ยของ PIC อยู่ระหว่าง 0.270 ถึง 0.341 เมื่อนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่า สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ คือกลุ่มที่ 1 เป็นกล้วยที่มีจีโนม *AAB* กลุ่มที่ 2 เป็น *BB* หรือ *ABB* กลุ่มที่ 3 มี 2 กลุ่มย่อย A และ B คือ *AA*, *AB*, *AAA* หรือ *AAB* และกลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของ *ABB* ทั้งหมด

วิธีการ

การเตรียมแคลลัสและยอดจำนวนมากของข้าวขาวดอกมะลิ 105 สำหรับใช้ในการทดลอง

1. การเตรียมแคลลัสจากเมล็ดข้าว

นำเมล็ดข้าวเปลือกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มาแกะเอาเปลือกออก จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในสารละลาย clorox 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม tween 20 2-3 หยด เป็นเวลานาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง แล้วนำไปฟอกอีกครั้งในสารละลาย clorox 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม tween 20 2-3 หยด เป็นเวลานาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ casein hydrolysate 1 กรัมต่อลิตร L-proline 1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร วุ้นผง 0.8 เปอร์เซ็นต์ (ลาวัลย์, 2543) ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.8 นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ใช้เมล็ดข้าวทั้งหมด 800 เมล็ด โดยเพาะเลี้ยง 4 เมล็ดต่อขวด วางเมล็ดในแนวนอนให้เมล็ดสัมผัสอาหาร กดเบาๆ ให้ชั้นส่วนจมลงในอาหารเล็กน้อย นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ (lux) สว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ลักษณะและสีของแคลลัสที่เกิดขึ้น

2 การชักนำให้เมล็ดข้าวสร้างยอดจำนวนมาก (multiple shoots)

นำเมล็ดข้าวเปลือกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มาแกะเอาเปลือกออก จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้วิธีการเดียวกับข้อที่ 1 นำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้วไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ yeast extract 1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร วุ้นผง 0.8 เปอร์เซ็นต์ (ประดิษฐ์และคณะ, 2536) ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.8 นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ใช้เมล็ดข้าวทั้งหมด 800 เมล็ด โดยเพาะเลี้ยง 2 เมล็ดต่อขวด วางเมล็ดในแนวนอนให้เมล็ดสัมผัสอาหาร กดเบาๆ ให้ชั้นส่วนจมในอาหารเล็กน้อย นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ (lux) สว่าง 16 ชั่วโมง

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสและยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้นต่างๆ

1.1 นำแคลลัสของข้าวอายุ 4 สัปดาห์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังได้กล่าวแล้วข้างต้น มาแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

1.1.1 กลุ่มควบคุม ซึ่งไม่ผ่านการฉายรังสี นำแคลลัสไปตั้งน้ำออกบางส่วน โดยนำแคลลัสไปวางพักไว้ในจานแก้ว (petridish) ที่มีฝาปิด วางไว้ในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ก่อนนำไปเลี้ยงต่อในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไโคเนติน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ casein hydrolysate 300 กรัมต่อลิตร L-proline 1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร phytagel 2.5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆคือ 0, 0.5, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.8 นำมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จะใช้ 20 แคลลัสต่ออาหารแต่ละสูตร โดยเฉพาะเลี้ยง 1 แคลลัสต่อขวด วางแคลลัสในแนวนอนให้สัมผัสอาหาร กดเบาๆให้ชิ้นส่วนจมในอาหารเล็กน้อย นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่มีความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ (lux) สว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกจำนวนแคลลัสที่รอดชีวิตและสามารถพัฒนาเป็นยอดได้ในอาหารแต่ละสูตร

1.1.2 กลุ่มที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 30 เกรย์ นำแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีแล้วไปตั้งน้ำออกบางส่วนโดยนำแคลลัสไปวางพักไว้ในจานแก้ว (petridish) ที่มีฝาปิด วางไว้ในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ก่อนนำไปเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร MS เหมือนกับในกลุ่มควบคุม แต่จะใช้ 80 แคลลัสต่ออาหารแต่ละสูตร เพาะเลี้ยง 1 แคลลัสต่อขวด วางแคลลัสในแนวนอนให้สัมผัสอาหาร กดเบาๆให้ชิ้นส่วนจมในอาหารเล็กน้อย นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่มีแสงความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ (lux) สว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกจำนวนแคลลัสที่รอดชีวิตและสามารถพัฒนาเป็นยอดได้ในอาหารแต่ละสูตร

1.2 นำยอดของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อายุ 8 สัปดาห์ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น มาแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

1.2.1 กลุ่มควบคุม ซึ่งไม่ผ่านการฉายรังสี นำยอดไปเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร MS ที่เดิม สารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ yeast extract 1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร วุ้นผง 0.8 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นต่างๆคือ 0, 0.5, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จะใช้ 20 ยอดต่ออาหารแต่ละสูตร โดยเฉพาะเลี้ยง 1 ยอดต่อขวด วางยอดในแนวตั้งให้รากสัมผัสอาหาร กดเบาๆให้ขึ้นส่วนจมในอาหารเล็กน้อย นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่มีแสงความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ (lux) สว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกจำนวนยอดที่รอดชีวิตและสามารถพัฒนาเป็นยอดจำนวนมากได้ในอาหารแต่ละสูตร

1.2.2 กลุ่มที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 30 เกรย์ นำยอดที่ผ่านการฉายรังสีแล้วไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เหมือนกับในกลุ่มควบคุม แต่จะใช้ 80 ยอดต่ออาหารแต่ละสูตร โดยเฉพาะเลี้ยง 1 ยอดต่อขวด วางยอดในแนวตั้งให้รากสัมผัสอาหาร กดเบาๆให้ขึ้นส่วนจมในอาหารเล็กน้อย นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่มีแสงความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ (lux) สว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกจำนวนยอดที่รอดชีวิตและสามารถพัฒนาเป็นยอดจำนวนมากได้ในอาหารแต่ละสูตร

หลังจากได้ยอดที่รอดชีวิตจากการทดลองที่ 1.1 แล้วนำยอดมาเพิ่มจำนวน โดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ yeast extract 1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร วุ้นผง 0.8 เปอร์เซ็นต์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที โดยเฉพาะเลี้ยง 1 ยอดต่อขวด วางยอดในแนวตั้งให้รากสัมผัสอาหาร กดเบาๆให้ขึ้นส่วนจมในอาหารเล็กน้อย นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่มีแสงความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ (lux) สว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-8 สัปดาห์

การทดลองที่ 2 การศึกษาความแปรปรวนของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางเกษตรของยอดที่ไม่ผ่านและผ่านการฉายรังสี ปริมาณ 30 เกรย์

นำต้นข้าวที่รอดชีวิตจากการทดลองที่ 1 ทั้งจากกลุ่มควบคุมและจากกลุ่มที่ฉายรังสีแกมมาปริมาณ 30 เกรย์ ออกปลูกในสภาพธรรมชาติ โดยย้ายต้นข้าวออกจากขวดเพาะเลี้ยง ล้างอาหารออก

ผลที่ได้จากการทำ preselective amplification คือ ชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นส่วนของ *EcoRI* adaptor และปลายอีกด้านหนึ่งเป็นส่วนของ *MseI* adaptor ซึ่งในขั้นตอนนี้จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการคัดเลือกได้ถึง 16 เท่า ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ในขั้นตอนนี้จะป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ selective amplification ต่อไป

สารประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา preselective amplification

สารที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร (μl)
ดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อ	2.0
H ₂ O	15.15
dNTP mix (2 mM)	2.5
10x PCR buffer	2.5
MgCl ₂ (50 mM)	0.75
<i>EcoRI</i> - A primer (E-A)	1.0
<i>MseI</i> - C primer (M-C)	1.0
<i>Taq</i> polymerase (5 U/ μl)	0.1
รวม	25.0

ผสมสารประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา preselective amplification ให้เข้ากัน นำเข้าเครื่อง PCR โดยใช้โปรแกรมดังนี้

ขั้นที่ 1	อุณหภูมิ	94	องศาเซลเซียส	เวลา	30 วินาที	} 25 รอบ
ขั้นที่ 2	อุณหภูมิ	56	องศาเซลเซียส	เวลา	60 วินาที	
ขั้นที่ 3	อุณหภูมิ	72	องศาเซลเซียส	เวลา	60 วินาที	

แบ่งส่วนของสารละลายมาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้ 1.5% agarose gel และเจือจาง 20 เท่าด้วย TE buffer เพื่อเป็นต้นแบบในปฏิกิริยา PCR ขั้นต่อไป

2. Selective amplification

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในขั้นตอนนี้จะใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 ตัวที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์เพื่อให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วน กลุ่มสมของไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด มีชนิดละ 8 แบบดังนี้

ชนิด *EcoRI* ไพรเมอร์ 8 ชนิด

E1 primer+3 (E-AAC)	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'
E2 primer+3 (E-AAG)	5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'
E3 primer+3 (E-ACA)	5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3'
E4 primer+3 (E-ACC)	5'-GACTGCGTACCAATTCACC-3'
E5 primer+3 (E-ACG)	5'-GACTGCGTACCAATTCACG-3'
E6 primer+3 (E-ACT)	5'-GACTGCGTACCAATTCACT-3'
E7 primer+3 (E-AGC)	5'-GACTGCGTACCAATTCAGC-3'
E8 primer+3 (E-AGG)	5'-GACTGCGTACCAATTCAGG-3'

ชนิด *MseI* ไพรเมอร์ 8 ชนิด

M1 primer+3 (M-CAA)	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'
M2 primer+3 (M-CAC)	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
M3 primer+3 (M-CAG)	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'
M4 primer+3 (M-CAT)	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'
M5 primer+3 (M-CTA)	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTA-3'
M6 primer+3 (M-CTC)	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTC-3'
M7 primer+3 (M-CTG)	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTG-3'
M8 primer+3 (M-CTT)	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTT-3'

สารประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา selective amplification

สารที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร (μl)
ดีเอ็นเอที่ทำให้เจือจางแล้ว	5.0
H ₂ O	8.3
dNTP mix (2 mM)	2.0
10x PCR buffer	2.0
MgCl ₂ (50 mM)	0.6
<i>Eco</i> RI primer (E-ANN)	1.0
<i>Mse</i> I primer (M-CNN)	1.0
<i>Taq</i> polymerase (5 U/μl)	0.1
รวม	20.0

ผสมสารประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา selective amplification ให้เข้ากัน นำเข้าเครื่อง PCR โดยใช้โปรแกรม touch down

ขั้นที่ 1	อุณหภูมิ	94	องศาเซลเซียส	เวลา	30 วินาที	} 1 รอบ
ขั้นที่ 2	อุณหภูมิ	65	องศาเซลเซียส	เวลา	30 วินาที	
ขั้นที่ 3	อุณหภูมิ	72	องศาเซลเซียส	เวลา	60 วินาที	

ลดอุณหภูมิในขั้น annealing (65 องศาเซลเซียส) ลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียส จำนวน 12 รอบ และต่อด้วย

ขั้นที่ 1	อุณหภูมิ	94	องศาเซลเซียส	เวลา	30 วินาที	} 23 รอบ
ขั้นที่ 2	อุณหภูมิ	56	องศาเซลเซียส	เวลา	30 วินาที	
ขั้นที่ 3	อุณหภูมิ	72	องศาเซลเซียส	เวลา	60 วินาที	

ตรวจสอบผลผลิต PCR โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบน polyacrylamide ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท (ดูรายละเอียดในภาคผนวก 3)

สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
2. ศูนย์บริการยารังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
3. เรือนปลูกพืชทดลอง ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
4. ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จ. ปทุมธานี

ระยะเวลาทำการวิจัย

เริ่มทำการวิจัยเดือนตุลาคม พ.ศ. 2547 สิ้นสุดการวิจัยเดือนตุลาคม พ.ศ. 2550

ผลและวิจารณ์

การเตรียมแคลลัสและยอดจำนวนมากของข้าวขาวดอกมะลิ 105 สำหรับใช้ในการทดลอง

1. การเตรียมแคลลัสจากเมล็ดข้าว

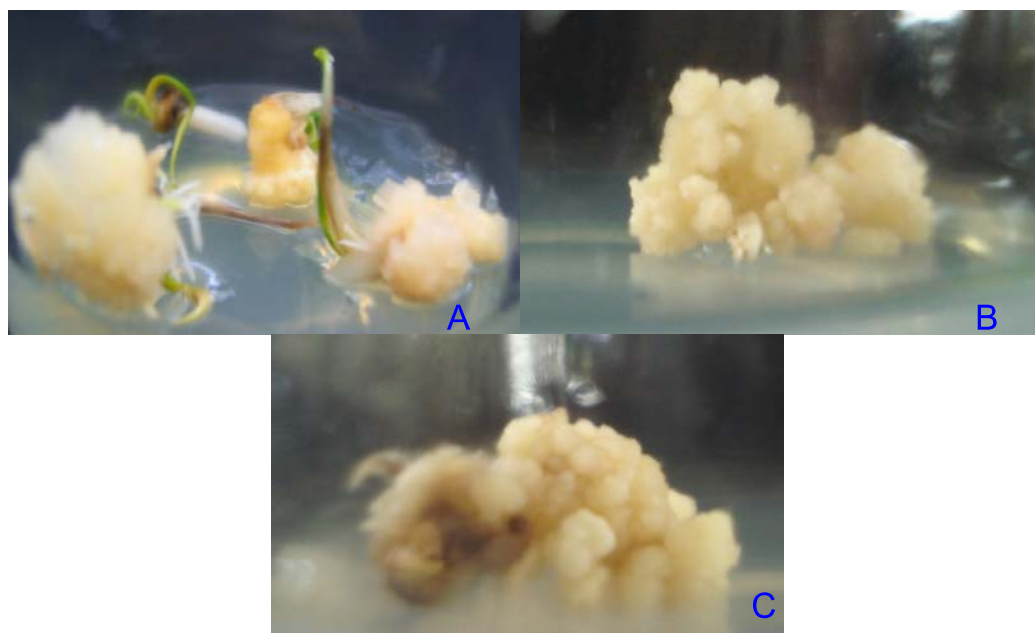
จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ casein hydrolysate 1 กรัมต่อลิตร L-proline 1 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเมล็ดที่เพาะเลี้ยงมีการตอบสนองต่อ 2,4-D โดย 2,4-D สามารถชักนำให้คัพเพาะข้าวสร้างแคลลัสในอัตราเฉลี่ย 72 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นแบ่งออกได้เป็น 3 แบบ คือ

1. เป็นแคลลัสที่เกาะกันแน่น (compact callus) แคลลัสมีสีขาวเหลือง ขนาดค่อนข้างใหญ่ (ภาพที่ 2A)
2. แคลลัสที่เกาะกันแบบหลวมๆ (friable callus) แคลลัสมีสีเหลืองอ่อนหรือสีน้ำตาลอมเหลือง ลักษณะอ่อนนุ่ม (ภาพที่ 2B)
3. แคลลัสที่มีลักษณะผสมระหว่าง compact callus และ friable callus (mix callus) เป็นแคลลัสที่เกาะกันแน่นมีสีเหลือง แต่มีบางส่วนหรือบางจุดของแคลลัสที่ดูโปร่ง และเกาะกันหลวมๆ (ภาพที่ 2C)

แคลลัสที่มีลักษณะผสมระหว่าง compact callus และ friable callus พบเกิดขึ้นมากที่สุด ส่วนแคลลัสแบบ compact callus และ แบบ friable callus พบได้ค่อนข้างน้อย (ตารางที่ 2) ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการทดลองของลาวัวล์ (2543) ที่รายงานว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เมล็ดสามารถสร้างแคลลัสได้ 86.5 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะผสมระหว่าง compact callus และ friable callus มากที่สุด ส่วนแคลลัสแบบ compact callus พบได้น้อยและ แบบ friable callus พบได้น้อยมาก

ตารางที่ 2 การเกิดแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 4 สัปดาห์

การทดลอง ชุดที่	จำนวน เมล็ดที่ เพาะเลี้ยง	เมล็ดที่ไม่ สร้าง แคลลัส	compact callus	friable callus	mix callus	จำนวน แคลลัส ทั้งหมด
1	200	52	20	12	116	148
2	200	68	31	24	77	132
3	200	44	43	20	93	156
4	200	60	15	18	107	140
รวม	800	224 (28%)	109 (13.63%)	74 (9.25%)	393 (49.13%)	576 (72%)



ภาพที่ 2 ลักษณะของแคลลัสที่เจริญมาจากเมล็ดที่เพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (A) compact callus (B) friable callus (C) mix callus

2 การชักนำให้เมล็ดข้าวสร้างยอดจำนวนมาก (multiple shoots)

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของข้าวขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดได้คือ 6.04 ยอดต่อเมล็ด ดังแสดงในตารางที่ 3

เนื่องจาก BAP เป็นสารสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์ของ 6-amino-purine ที่มีผลโดยตรงต่อการชักนำเนื้อเยื่อให้เกิดยอดโดยไปกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์และตา (Krishnamoorthy, 1981) และมีประสิทธิภาพสูงในการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอด (Vijaya and Satyanarayana, 1991) ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดยอดจำนวนมากในพืชหลายชนิด เช่น หน่อชากแนลอน (วิภาศิริ, 2546) สตรอเบอร์รี่ลูกผสม (Zebrowska and Hortynski, 2002) ถั่วลิสง (Venkatachalam and Jayabalan, 1999)

ตารางที่ 3 การเกิดยอดของเมล็ดข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์

การทดลอง ชุดที่	จำนวนเมล็ดที่ เพาะเลี้ยง	จำนวนเมล็ดที่ ไม่เกิดยอด	จำนวนเมล็ดที่ เกิดยอด	จำนวนยอด รวมทั้งหมด	จำนวนยอด/ เมล็ด
1	200	52	148	908	6.14
2	200	60	140	784	5.60
3	200	84	116	692	5.97
4	200	64	136	876	6.44
รวม	800	260	540	3260	6.04
		(32.5%)	(67.5%)		

จากการทดลองพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น นอกจากจะชักนำให้เกิดจำนวนยอดต่อเมล็ดสูงถึง 6.04 ยอดต่อเมล็ดแล้ว ยังให้ยอดที่มีลักษณะแข็งแรง สมบูรณ์ และไม่แคระแกร็น (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 การพัฒนาของเมล็ดข้าวเป็นยอดจำนวนมากเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม BAP (A) เปรียบเทียบกับต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 3 มิลลิกรัม ต่อลิตร(B)

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสและยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้นต่างๆ

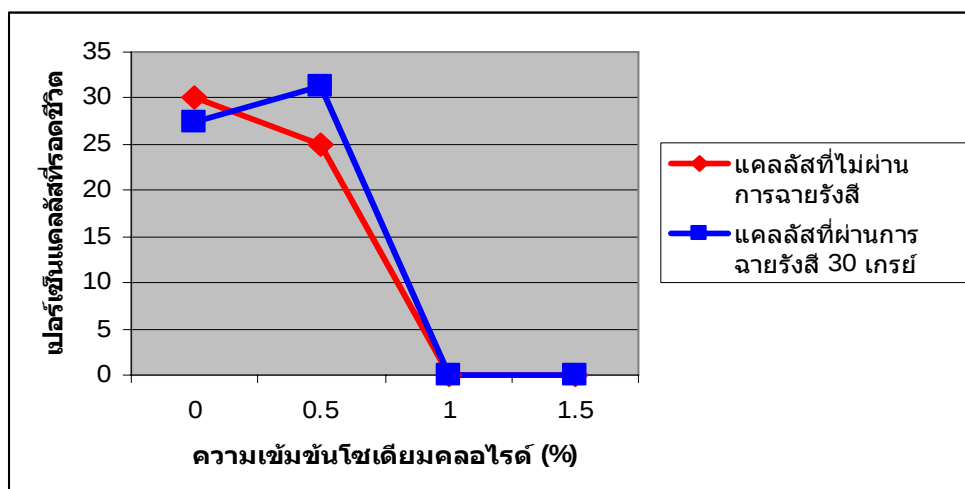
เมื่อนำแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์ที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการฉายรังสีและที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 30 เกรย์ มาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารที่ชักนำให้เกิดยอดคืออาหารสูตร MS ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 0.5, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสในกลุ่มที่ไม่ผ่านการฉายรังสีสามารถเจริญเป็นยอดได้บนอาหารที่เติมเกลือ 0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น (ภาพที่ 5) โดยมีแคลลัสที่รอดชีวิต 30 และ 25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ขณะที่แคลลัสที่ผ่านการฉายรังสี ปริมาณ 30 เกรย์ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมเกลือ 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสบางส่วนเกิดจุดเขียวและสามารถพัฒนาเป็นยอดอ่อนได้ แต่เมื่อเวลาผ่านไป 1-2 สัปดาห์ยอดอ่อนไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ แต่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะว่ารังสีแกมมาไปมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ โดยไปยับยั้ง

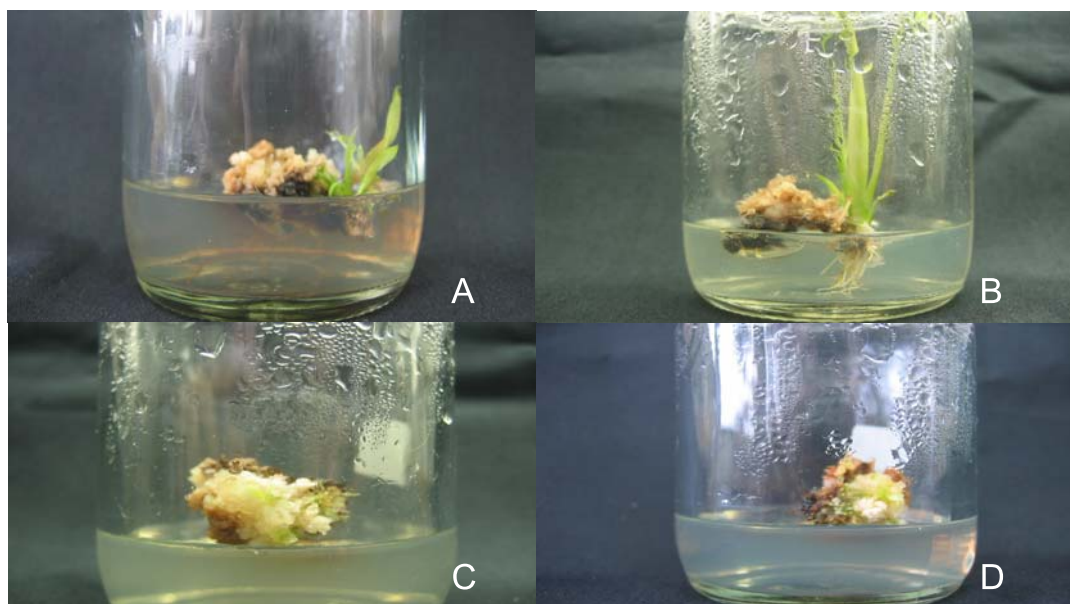
หรือกระตุ้นให้เกิดการสร้างคลอโรฟิลล์ หรือทำให้แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Bajaj *et al.* (1970) ที่พบว่าแคลลัสที่ได้รับการฉายรังสีในปริมาณที่สูง เซลล์จะหยุดการเจริญเติบโต การพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสจะลดลง สีของแคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีดำ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของพรณิ (2536) ที่รายงานว่าในแคลลัสของข้าวพันธุ์ปทุมมา 370 ที่ได้รับการฉายรังสีในปริมาณที่สูงกว่า 20 เกรย์ จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอย่างรวดเร็ว และตายมากกว่าที่ได้รับการฉายรังสีในปริมาณที่ต่ำกว่านี้

ตารางที่ 4 อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสที่ไม่ผ่านการฉายรังสี และผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 30 เกรย์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมเกลือ โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

	ความเข้มข้น โซเดียมคลอไรด์ (%)	จำนวนแคลลัสที่ เพาะเลี้ยง	จำนวนแคลลัสที่ รอดชีวิต	เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่รอด ชีวิต
แคลลัสที่ไม่ ฉายรังสี	0	20	6	30
	0.5	20	5	25
	1	20	0	0
	1.5	20	0	0
แคลลัสที่ฉาย รังสี 30 เกรย์	0	80	22	27.50
	0.5	80	25	31.25
	1	80	0	0
	1.5	80	0	0



ภาพที่ 4 เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่รอดชีวิตจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ไม่ผ่านการฉายรังสีและผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 30 เกรย์ บนอาหารสูตร MS ที่เติมไซโตไคนมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 6 สัปดาห์



ภาพที่ 5 แสดงแคลลัสที่ไม่ผ่านการฉายรังสี (5A, 5B) สามารถเกิดจุดเขียวและสามารถชักนำให้เป็นต้นได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมไคเนตินร่วมกับไซโตไคนมคลอไรด์ และแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 30 เกรย์ (5C, 5D) สามารถเกิดจุดเขียวได้แต่ไม่สามารถชักนำให้เป็นต้นได้

เนื่องจากแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีเกมมาปริมาณ 30 เกรย์ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ ดังนั้นการทดลองในขั้นตอนนี้จึงใช้เฉพาะยอดของข้าวขาวดอกมะลิ 105 อายุ 8 สัปดาห์ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดมาแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการฉายรังสีและที่ผ่านการฉายรังสีเกมมาปริมาณ 30 เกรย์ นำยอดทั้ง 2 กลุ่มมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารที่ชักนำให้เกิดยอดหลายยอดซึ่งเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 0.5, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่ายอดที่ไม่ฉายรังสีสามารถเจริญบนอาหารที่เติมเกลือความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น โดยมียอดที่รอดชีวิตเท่ากับ 19, 20 และ 1 ยอด ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 95, 100 และ 5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับยอดที่ได้รับการฉายรังสีเกมมาปริมาณ 30 เกรย์ สามารถเจริญบนอาหารที่เติมเกลือความเข้มข้น 0, 0.5, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยมียอดที่รอดชีวิตเท่ากับ 35, 34, 8 และ 3 ยอด ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 43.75, 42.50, 10 และ 3.75 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 5 และภาพที่ 6) ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงขึ้น อัตราการรอดชีวิตของยอดจะน้อยลงซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของวิภาศิริ (2546) ในหญ้าชิกแนลอนและการทดลองของสุมล (2546) ในหญ้ากินนีสีม่วง

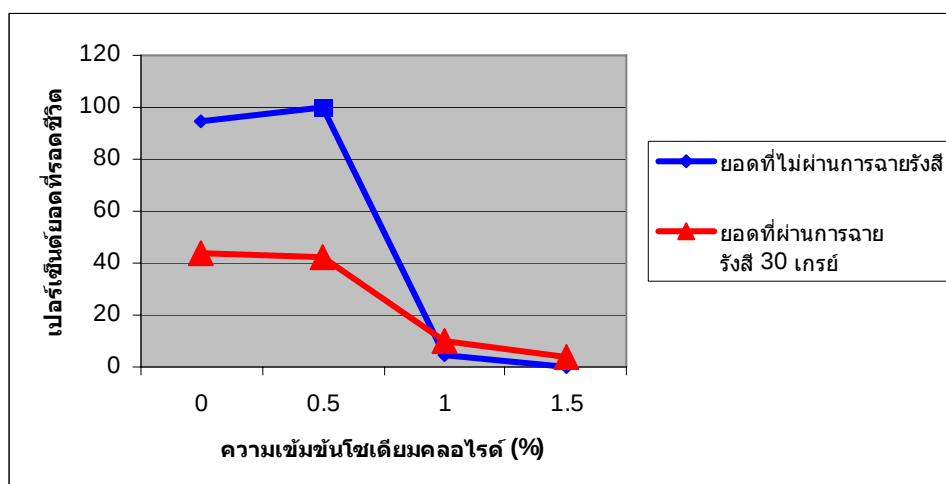
นอกจากนี้ผลการทดลองยังชี้ให้เห็นว่ายอดข้าวที่ผ่านการฉายรังสีมีความสามารถในการทนแล้งได้มากกว่ายอดข้าวที่ไม่ผ่านการฉายรังสี คือ สามารถรอดชีวิตได้บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่ายอดข้าวที่ผ่านการฉายรังสีเกมมาปริมาณ 30 เกรย์ เกิดการกลายขึ้น ทำให้ข้าวขาวดอกมะลิ 105 สามารถทนแล้งได้สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับยอดข้าวปกติที่ไม่ผ่านการฉายรังสี ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่มีมาก่อนหน้านี้แล้วว่ารังสีเกมมาในปริมาณที่เหมาะสม สามารถชักนำให้เกิดการกลายได้ในพืชหลายชนิด เช่น การทดลองของสุภัทรา (2533) ในกล้วยหอม และ การทดลองของจันทกานต์ (2544) ในหญ้าเนเปียร์แคระ

สำหรับยอดที่ไม่ผ่านการฉายรังสีแต่สามารถเติบโตบนอาหารที่เติมเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ได้นั้นมีเพียง 1 ต้น เท่านั้น ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่าในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นอาจทำให้พืชมีลักษณะใหม่ที่แตกต่างกันไปกว่าเดิมเนื่องมาจากการแปรผันที่เกิดในเนื้อเยื่อขณะเพาะเลี้ยงที่เรียกว่า somaclonal variation ซึ่งทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมลักษณะคุณภาพและปริมาณ ทำให้เกิดความแตกต่างของสรีระ ความเปลี่ยนแปลงอาจเกิดในเซลล์ใดเซลล์หนึ่งหรือต้นใดต้นหนึ่ง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้เป็นผลเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม โครงสร้างของโครโมโซม การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของดีเอ็นเอและยีน หรือการ

เปลี่ยนแปลงของไซโทพลาซึม (สิรินุช, 2540) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้เองที่อาจเป็นสิ่งที่ทำให้ข้าวที่ไม่ผ่านการฉายรังสีสามารถทนเค็มและเค็มโตบนอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้

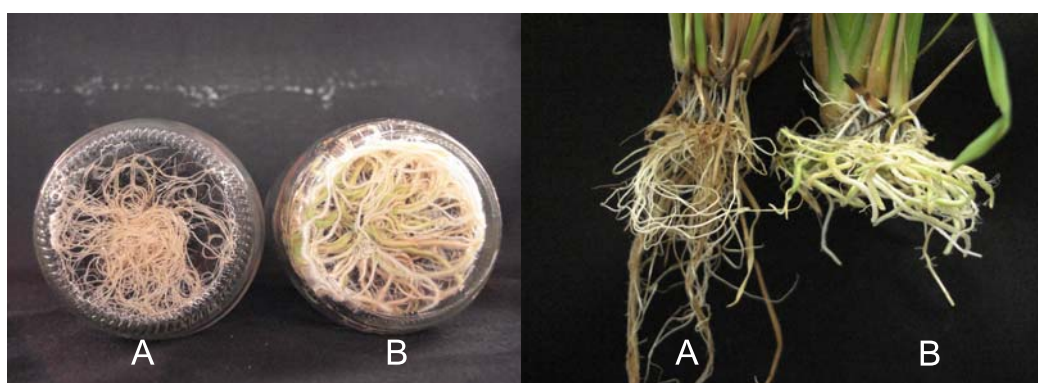
ตารางที่ 5 อัตราการรอดชีวิตของยอดที่ไม่ฉายรังสีและฉายรังสีแกมมาปริมาณ 30 เกรย์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 8 สัปดาห์

	อาหารสูตรMSที่เติม BAP3 มก./ล. และ โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น(%)	จำนวนยอดที่ เพาะเลี้ยง	จำนวนยอดที่รอด ชีวิต	เปอร์เซ็นต์ยอดที่ รอดชีวิต
ยอดที่ไม่ฉายรังสี	0	20	19	95
	0.5	20	20	100
	1	20	1	5
	1.5	20	0	0
ยอดที่ฉายรังสี 30 เกรย์	0	80	35	43.75
	0.5	80	34	42.50
	1	80	8	10
	1.5	80	3	3.75



ภาพที่ 6 เปอร์เซนต์ยอดที่รอดชีวิตจากการเพาะเลี้ยงยอดที่ไม่ผ่านการฉายรังสีและผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 30 เกรย์ บนอาหารสูตร MS ที่เติมไซโตไคนนคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 8 สัปดาห์

ยอดที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 30 เกรย์และเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดยอดหลายยอดและเดิมเกิดจากความเข้มข้นต่างๆสามารถพบลักษณะที่ผิดปกติได้ในบางต้น เช่นรากจะมีขนาดใหญ่และสั้นซึ่งแตกต่างจากยอดที่ไม่ผ่านการฉายรังสีแกมมา (ภาพที่7) ลักษณะที่ปรากฏนี้อาจเนื่องมาจากพืชมีกลไกการทนเค็มในลักษณะการขนย้ายธาตุไซโตไคนนคลอไรด์ไปสะสมไว้ที่ราก ทำให้รากมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าปกติ (สมศรี, 2542)



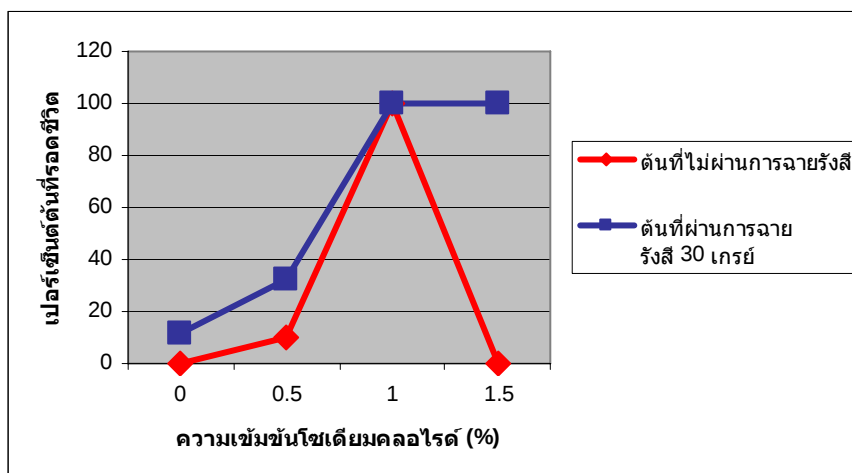
ภาพที่ 7 ลักษณะรากของต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 30 เกรย์ บนอาหารสูตรชักนำให้เกิดยอดหลายยอดที่ไม่เติมเกลือ (A) และเติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (B)

การทดลองที่ 2 การศึกษาความแปรปรวนในลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางเกษตรของยอดที่ไม่ผ่านและผ่านการฉายรังสีปริมาณ 30 เกรย์

เมื่อนำต้นที่รอดชีวิตจากการเพาะเลี้ยงยอดในอาหารสูตร MS ที่เติมเกลือความเข้มข้นต่างๆ ออกปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้ว ซึ่งบรรจุดินเหนียวเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อให้ต้นกล้าแข็งแรง แล้วย้ายต้นกล้าปลูกลงในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 นิ้ว ซึ่งบรรจุทรายล้าง 3 ครั้ง นำไปวางในอ่างพลาสติกที่บรรจุสารละลายของธาตุอาหารตามสูตรของ Yoshida *et al.* (1972) และเติมเกลือแกงความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 ลิตร และวางไว้ในสภาพแวดล้อมธรรมชาติ โดยเปลี่ยนสารละลายธาตุอาหารพืชทุกสัปดาห์ เมื่อครบ 4 สัปดาห์ พบว่ายอดที่ไม่ฉายรังสีที่ผ่านการคัดเลือกทั้งหมด 40 ต้น เมื่อย้ายออกปลูกในสภาพธรรมชาติที่มีเกลือแกงความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนต้นที่รอดชีวิตเพียง 3 ต้น และยอดที่ฉายรังสีปริมาณ 30 เกรย์ ที่ผ่านการคัดเลือกทั้งหมด 80 ต้น เมื่อย้ายออกปลูกในสภาพธรรมชาติที่มีเกลือแกงความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนต้นที่รอดชีวิต 26 ต้น (ตารางที่ 6 และภาพที่ 9) รวมต้นที่รอดชีวิตทั้งหมด 29 ต้น ซึ่งคาดว่าต้นเหล่านี้จะทนเค็มซึ่งควรจะนำไปปลูกขยายจำนวนเมล็ดและนำไปทดลองในสภาพดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือต่อไป

ตารางที่ 6 อัตราการรอดชีวิตของต้นข้าวที่ผ่านการคัดเลือก และย้ายออกปลูกในกระถางที่เติมเกลือแกงความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

	ความเข้มข้น เกลือโซเดียม คลอไรด์(%)	จำนวนต้นที่รอด ชีวิตจากการ เพาะเลี้ยง	จำนวนต้นที่รอด ชีวิตหลังจากย้าย ออกปลูกใน สภาพธรรมชาติ	เปอร์เซ็นต์ต้นที่ รอดชีวิต
ยอดที่ไม่ ฉายรังสี	0	19	0	0
	0.5	20	2	10
	1	1	1	100
	1.5	0	0	0
ยอดที่ฉาย รังสี 30 เกรย์	0	35	4	11.43
	0.5	34	11	32.35
	1	8	8	100
	1.5	3	3	100



ภาพที่ 8 เปอร์เซ็นต์ต้นที่รอดชีวิตเมื่อปลูกในกระถางที่ใส่สารละลายอาหารพืชที่เดิมเกลือแคง
1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

จากตารางและกราฟข้างต้นจะเห็นได้ว่าในจำนวนต้นที่รอดชีวิตทั้งหมด 29 ต้นนั้นเป็นต้นที่ได้มาจากต้นที่รอดชีวิตจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 0.5, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 4, 13, 9 และ 3 ต้น ตามลำดับ แต่เมื่อดูต้นที่รอดชีวิตเปรียบเทียบกับจำนวนต้นที่ออกปลูกจะเห็นว่า ต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีอัตราการตายสูงเนื่องจากเมื่อย้ายออกปลูกในกระถางที่ใส่สารละลายอาหารพืชที่เดิมเกลือแคงความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์นั้นจะเห็นว่ามี ความเข้มข้นของเกลือมากกว่าที่เพาะเลี้ยงในขวดทดลองจึงทำให้ต้นข้าวไม่สามารถปรับตัวได้ เมื่อเลี้ยงไปได้ 2 สัปดาห์ จึงเกิดอาหารเหี่ยวบริเวณปลายใบ และแห้งตายไปในที่สุด

ส่วนต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์พบว่าไม่มีการตายเกิดขึ้น เนื่องจากเมื่อย้ายออกปลูกในกระถางที่ใส่สารละลายอาหารพืชที่เดิมเกลือแคงความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์นั้นเป็นเปอร์เซ็นต์ซึ่งไม่ได้สูงกว่าที่เพาะเลี้ยงมาแล้วจากในขวดเพาะเลี้ยงจึงรอดชีวิตทั้งหมด เมื่อรวมต้นที่รอดชีวิตจากทุกสูตรอาหารพบว่ารอดชีวิตทั้งหมด 29 ต้นซึ่งเป็นไปได้สูงกว่าต้นที่รอดชีวิตเหล่านั้นเป็นต้นที่เกิดการกลายพันธุ์ขึ้นจึงสามารถเติบโตในสารละลายอาหารที่เดิมเกลือแคง 1 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากหากไม่เกิดการกลายพันธุ์ขึ้นก็อาจจะตายไปเช่นเดียวกับต้นควบคุมและต้นที่ไม่ทนแก้มันอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับการ

ทดลองของจันทกานต์ (2544) ที่พบว่าหญ้าเนเปียร์แคะที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยสามารถทนต่อการปลูกในดินเค็มได้สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ผ่านการฉายรังสีแกมมา



ภาพที่ 9 ต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ไม่ผ่านการฉายรังสี (A) และผ่านการฉายรังสีปริมาณ 30 เกรย์ (B) เมื่อออกปลูกในกระถางที่ได้สารละลายอาหารพืชที่เติมเกลือแคง ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ขวา) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยปลูกเปรียบเทียบกับกระถางที่ได้สารละลายอาหารพืชที่ไม่เติมเกลือแคง (ซ้าย)

ต่อมาเมื่อนำต้นข้าวที่รอดชีวิตทั้งหมด 29 ต้น ไปปลูกที่ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี จังหวัดปทุมธานี เพื่อขยายเมล็ด พบว่าต้นข้าวทั้ง 29 ต้นสามารถให้เมล็ดได้จำนวนหนึ่งแต่ในปริมาณที่ไม่สูงนัก และการปลูกข้าวครั้งนี้ยังพบลักษณะที่ผิดปกติของต้นข้าวที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 30 เกรย์ และคัดเลือกในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ต้น โดยพบว่ามีลักษณะลำต้นที่เตี้ยกว่าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ปกติ คือ 106 และ 122 เซนติเมตรตามลำดับ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก 4)

เมื่อทดลองเก็บเมล็ดของต้นข้าวทั้ง 2 ต้นนี้ไปปลูกต่ออีกครั้งพบว่า ต้นข้าวที่ได้มีลักษณะเตี้ยกว่าต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105 ปกติ แต่ไม่แตกต่างกับการปลูกก่อนหน้านี้ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าในการปลูกครั้งแรกที่ศูนย์ข้าวปทุมธานีนั้น เป็นการปลูกในช่วงเดือนเมษายน ซึ่งไม่ใช่ฤดูปลูกที่เหมาะสมของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ดังนั้นในการชักนำให้ข้าวออกดอก และตรวจรังจึงต้องนำข้าวเข้าห้องมืดในช่วงเย็นและค่ำ เพื่อชักนำให้ข้าวออกดอก จึงอาจทำให้ข้าว 2 ต้นนั้นเตี้ยกว่าปกติ



ภาพที่ 10 ต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่มีลักษณะต้นเตี้ย เมื่อเปรียบเทียบกับต้นข้าวปกติ

การทดลองที่ 3 การตรวจสอบดีเอ็นเอของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ต้นที่ผ่านการคัดเลือกในการทดลองที่ 2

เมื่อนำดีเอ็นเอจากข้าวที่รอดชีวิตจากการทดลองที่ 2 ทั้งหมด 29 ต้น มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างข้าวขาวดอกมะลิ 105 ปกติ กับ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่คาดว่าจะสามารถทนทานต่อดินเค็ม พบว่าจากไพรเมอร์ที่ทดลองใช้จำนวน 64 คู่ มีไพรเมอร์ 7 คู่ (ตารางที่ 7) ที่สามารถแสดงความแตกต่างอย่างชัดเจนของแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างต้นปกติกับต้นพันธุ์กลายที่คาดว่าจะสามารถทนทานต่อดินเค็ม

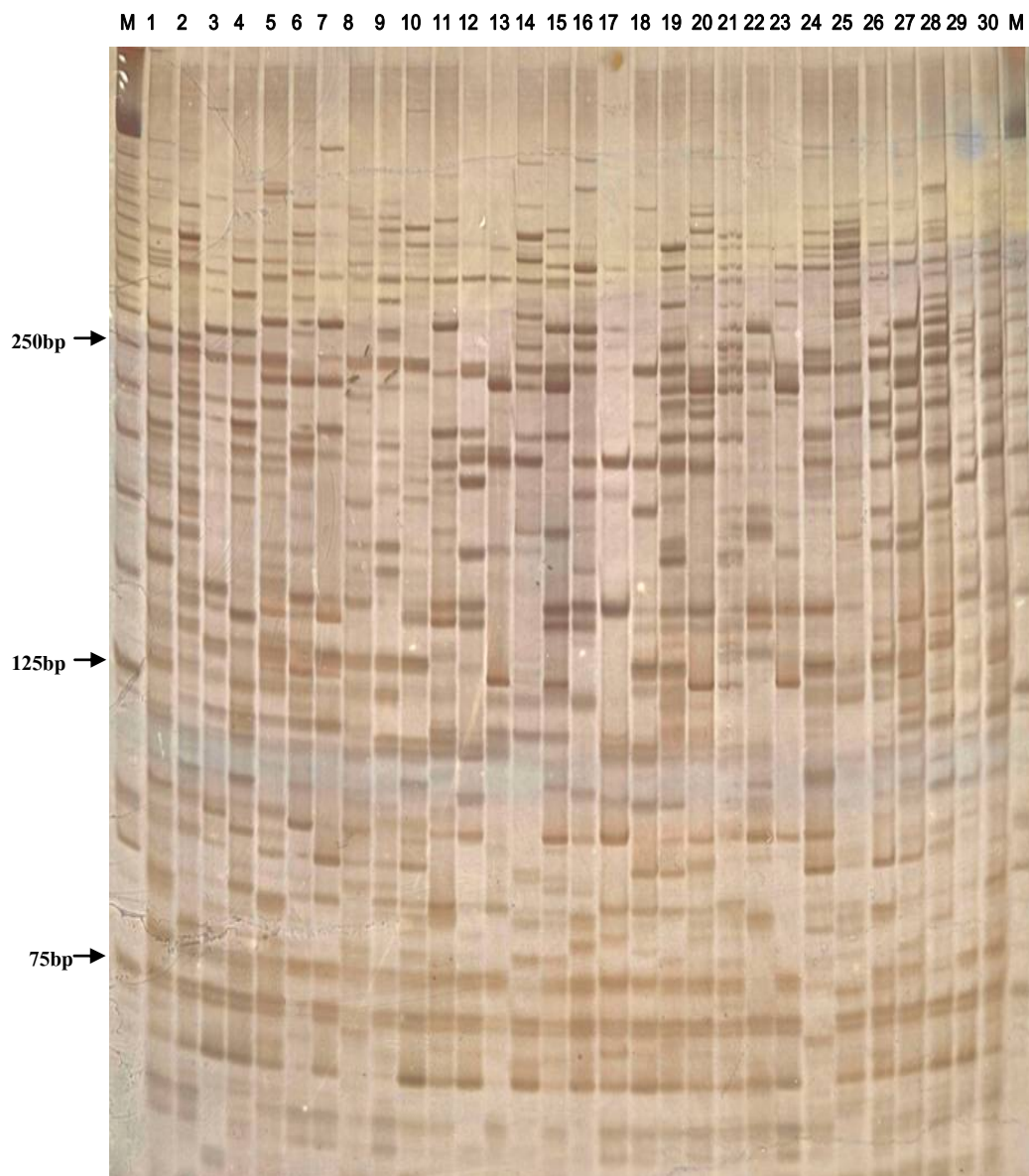
ตารางที่ 7 คู่ไพรเมอร์ต่างๆที่ใช้ในการตรวจสอบ AFLP

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								

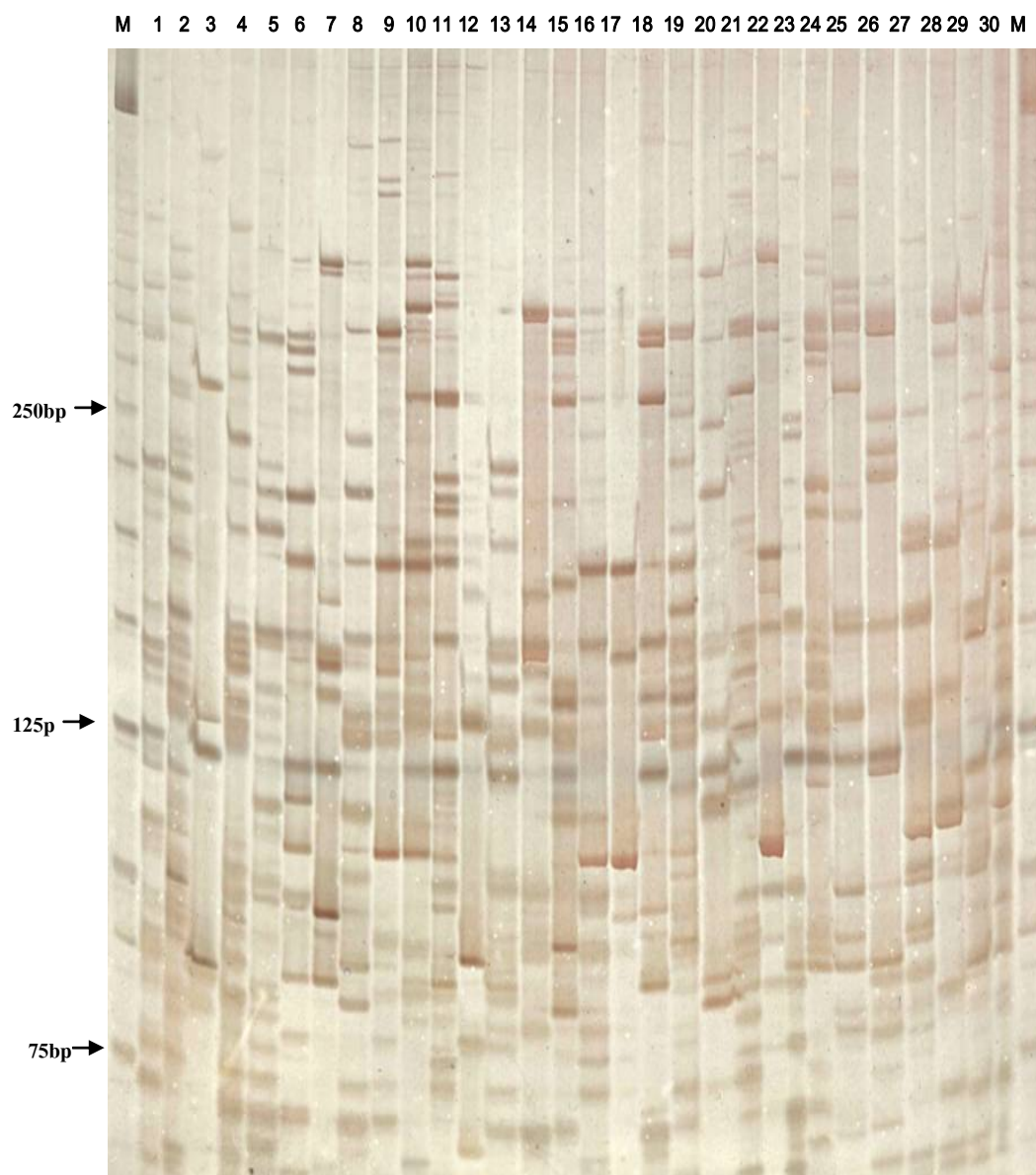
จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ AFLP ด้วยไพรเมอร์ 7 คู่ ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนสามารถตรวจนับได้ทั้งหมดจำนวน 300 แถบ ประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน 292 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 8 แถบ โดยคู่ไพรเมอร์ที่ให้โพลิมอร์ฟิซึมเรียงลำดับจากมากไปน้อยคือ E-AAG/M-CAT, E-ACT/M-CAA, E-ACA/M-CTA , E-AGG/M-CAA, E-ACA/M-CTT, E-AAG/M-CTA, E-AAC/M-CAA ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าเกิดแถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 43 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ โดยมีแถบที่ให้โพลิมอร์ฟิซึมถึง 97.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8) แสดงว่าข้าวที่ผ่านการฉายรังสีร่วมกับการคัดเลือกบนอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไป ตัวอย่างลายพิมพ์ AFLP ของข้าวที่ได้จากไพรเมอร์บางคู่ได้แสดงไว้ในภาพที่ 11 และ 12

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ AFLP ที่ได้จากไพรเมอร์ 7 คู่

คู่ไพรเมอร์	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอที่แตกต่าง	จำนวนแถบดีเอ็นเอ ที่เหมือนกัน	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ Polymorphism
E-AAC/M-CAA	38	5	43	88.37
E-AAG/M-CAT	56	0	56	100
E-AAG/M-CTA	45	2	47	95.74
E-ACA/M-CTA	39	0	39	100
E-ACA/M-CTT	29	1	30	96.67
E-ACT/M-CAA	47	0	47	100
E-AGG/M-CAA	38	0	38	100
รวม	292	8	300	97.33



ภาพที่ 11 ทรายพิมพ์ AFLP ของข้าวที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-AAG/M-CAT
 ตัวอย่างที่ 1 เป็นดีเอ็นเอจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ปกติ
 ตัวอย่างที่ 2-30 เป็นดีเอ็นเอจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 พันธุ์กลาย ที่คาดว่าจะสามารถ
 ทนทานต่อดินเค็ม



ภาพที่ 12 ลายพิมพ์ AFLP ของข้าวที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-ACA/M-CTA

ตัวอย่างที่ 1 เป็นดีเอ็นเอจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ปกติ

ตัวอย่างที่ 2-30 เป็นดีเอ็นเอจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 พันธุ์กลายที่คาดว่าจะสามารถ
ทนทานต่อดินเค็ม

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.20k

จากแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 300 แถบ หรือ 300 AFLP markers ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 30 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ปกติ 1 ตัวอย่าง และเป็นข้าวขาวดอกมะลิ พันธุ์กลายที่คาดว่าจะทนเค็มจำนวน 29 ตัวอย่าง นำข้อมูลดังกล่าวมาวิเคราะห์และจัดกลุ่มโดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc version 2.20k โดยใช้สูตรของ Nei and Li คำนวณหาดัชนีความเหมือนและความแตกต่างของตัวอย่างที่ละคู่สลับกัน (similarity index) จนครบทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 9) จากนั้นนำค่าที่ได้ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ phylogenetic tree โดยวิธี UPGMA (ภาพที่ 13)

ผลจากการวิเคราะห์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ทั้งหมด 30 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างข้าวขาวดอกมะลิ 105 ปกติ (control) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่ไม่ผ่านการฉายรังสีแยกตัวออกจากกลุ่มตัวอย่างอื่นๆ ที่ผ่านการฉายรังสี ยกเว้นตัวอย่างที่ 2, 4 และ 27 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับตัวอย่างที่ 1 ซึ่งเป็น control เมื่อดูจากค่า similarity index พบว่าตัวอย่างที่ 22 และตัวอย่างที่ 23 มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด คือมีค่า similarity index เท่ากับ 0.7400 และตัวอย่างที่ 11 และตัวอย่างที่ 13 มีความแตกต่างกันมากที่สุดคือมีค่า similarity index เท่ากับ 0.3125 เมื่อเปรียบเทียบค่า similarity index ระหว่างตัวอย่างที่ 1 ซึ่งเป็น control กับตัวอย่างอื่น พบว่ามีค่าตั้งแต่ 0.5533-0.6733 แสดงว่ามีการกลายพันธุ์โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอมากกว่า 32 เบสคู่เบส และจากภาพการจัดกลุ่มภาพที่ 13 จะเห็นได้ว่าสามารถจัดกลุ่มข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้เป็นกลุ่มย่อยๆ ได้ และไม่มีตัวอย่างใดเลยที่มีพันธุกรรมเหมือนกับ control ผลที่เกิดขึ้นแสดงให้เห็นว่าการฉายรังสีทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่ม จึงทำให้ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ผ่านการฉายรังสีแอมมาเกิดการกลายพันธุ์ มีการเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอ ทำให้แตกต่างไปจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ปกติ ที่ไม่ผ่านการฉายรังสี ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของกฤษณา (2546) ซึ่งรายงานว่ารังสีแอมมาก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าเนเปียร์แคระและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการตรวจพบว่า control ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่ไม่ผ่านการฉายรังสีแยกตัวออกจากกลุ่มตัวอย่างอื่นๆ ที่ผ่านการฉายรังสีอย่างชัดเจน

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค AFLP สามารถใช้ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีได้ ซึ่งการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นทำให้เกิดลักษณะที่ดี คือ สามารถปลูกในพื้นที่ดินเค็มได้ และลายพิมพ์ดีเอ็นเอยังเป็นหลักฐานที่สำคัญที่ใช้อ้างอิงลักษณะพันธุกรรมที่มีความเฉพาะเจาะจง สามารถ

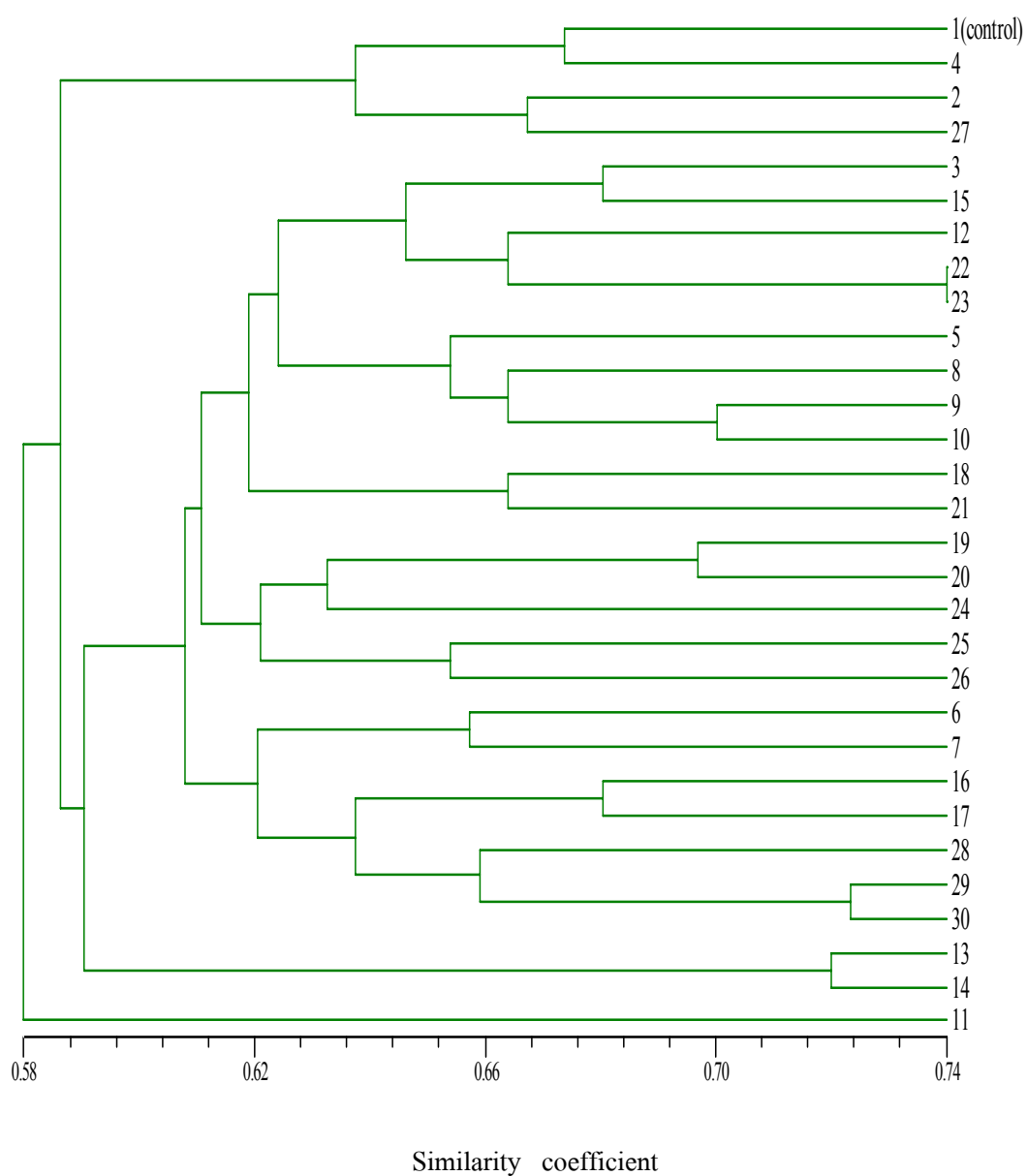
ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดเลือกฐานพันธุ์กรรมเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์พืช การ
รับรองและจดทะเบียนพันธุ์ เลือกพันธุ์ที่มีลักษณะเหมาะสมกับพื้นที่ของเกษตรกรไปขยายพันธุ์
ต่อไป

ตารางที่ 9 ค่า similarity index ที่ได้จากการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์กลายรวมจำนวน 30 ตัวอย่าง

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1.0000														
2	0.6600	1.0000													
3	0.6167	0.5700	1.0000												
4	0.6733	0.6533	0.6167	1.0000											
5	0.6567	0.5900	0.6133	0.6167	1.0000										
6	0.6300	0.5500	0.5600	0.6167	0.6000										
7	0.5800	0.5067	0.6567	0.5667	0.6167	0.6567	1.0000								
8	0.6100	0.5967	0.6067	0.6167	0.6533	0.6333	0.6167	1.0000							
9	0.5967	0.5567	0.6133	0.5767	0.6533	0.6400	0.6233	0.6733	1.0000						
10	0.6233	0.5567	0.6333	0.5833	0.6533	0.6000	0.6300	0.6533	0.7000	1.0000					
11	0.5733	0.5467	0.5567	0.5733	0.5567	0.6233	0.5333	0.5767	0.6100	0.6433	1.0000				
12	0.5833	0.5833	0.6667	0.6167	0.5800	0.5800	0.6167	0.6333	0.6133	0.6133	0.6433	1.0000			
13	0.5967	0.5367	0.6200	0.5900	0.6200	0.6000	0.6833	0.5800	0.3794	0.4072	0.3125	0.5116	1.0000		
14	0.5567	0.5700	0.5933	0.5700	0.5733	0.5600	0.6033	0.6000	0.5200	0.5867	0.4900	0.6000	0.7200	1.0000	
15	0.6100	0.5633	0.6800	0.5833	0.6067	0.6600	0.6300	0.6200	0.5733	0.6867	0.5633	0.6200	0.6267	0.6467	1.0000
16	0.6567	0.5433	0.5667	0.5967	0.5867	0.6333	0.5767	0.5667	0.5933	0.6067	0.6167	0.6267	0.6067	0.5667	0.6733
17	0.5700	0.4767	0.5667	0.5567	0.5667	0.6333	0.6300	0.5800	0.5733	0.6133	0.5633	0.6467	0.6200	0.5467	0.6000
18	0.6067	0.5533	0.6433	0.5733	0.5767	0.5767	0.6133	0.5767	0.6233	0.6433	0.5800	0.6500	0.5700	0.5233	0.5833
19	0.5900	0.5567	0.5933	0.5500	0.6133	0.5733	0.5700	0.5933	0.5933	0.5867	0.5833	0.5733	0.5733	0.5367	0.6000
20	0.6000	0.5600	0.6300	0.5933	0.6033	0.5833	0.6333	0.6100	0.5767	0.5967	0.5733	0.6700	0.6367	0.5633	0.6233
21	0.5900	0.6167	0.6000	0.5900	0.6067	0.5867	0.5767	0.6000	0.6400	0.6400	0.6233	0.6267	0.5733	0.5400	0.6067
22	0.5700	0.5500	0.6400	0.5567	0.6133	0.5800	0.6100	0.6600	0.6200	0.6733	0.5767	0.6467	0.6000	0.5867	0.6467
23	0.5633	0.5633	0.6733	0.5633	0.6200	0.5600	0.6233	0.6133	0.6533	0.6200	0.5967	0.6800	0.6667	0.5133	0.6267
24	0.5533	0.5333	0.5833	0.6200	0.6233	0.5833	0.5867	0.6300	0.6167	0.6167	0.5467	0.6233	0.5967	0.5167	0.5700
25	0.5733	0.5467	0.5967	0.5800	0.5833	0.5167	0.5733	0.5833	0.5967	0.5900	0.5867	0.5767	0.5967	0.5767	0.5700
26	0.6133	0.5600	0.6367	0.6000	0.6433	0.5900	0.6133	0.6567	0.6433	0.5900	0.5733	0.6433	0.6367	0.5567	0.5833
27	0.5933	0.6667	0.5700	0.6400	0.5633	0.6233	0.5600	0.6233	0.5833	0.6167	0.5400	0.5833	0.5833	0.6167	0.6167
28	0.6000	0.5000	0.5833	0.5533	0.6033	0.6433	0.6333	0.6167	0.6100	0.6433	0.5867	0.5900	0.5833	0.5900	0.6167
29	0.5867	0.5733	0.6033	0.5933	0.6167	0.5900	0.6000	0.5833	0.6100	0.5833	0.6200	0.6100	0.6300	0.5833	0.583
30	0.6100	0.6033	0.6000	0.6033	0.6467	0.6267	0.6300	0.5933	0.6467	0.6467	0.5833	0.6067	0.5933	0.5733	0.6067

ตารางที่ 9 (ต่อ)

No.	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1															
2															
3															
4															
5															
6															
7															
8															
9															
10															
11															
12															
13															
14															
15															
16	1.0000														
17	0.6800	1.0000													
18	0.6233	0.6233	1.0000												
19	0.5933	0.5833	0.5433	1.0000											
20	0.5767	0.6100	0.5867	0.6967	1.0000										
21	0.6267	0.5733	0.6633	0.6133	0.6300	1.0000									
22	0.6600	0.6467	0.6433	0.6200	0.6567	0.6333	1.0000								
23	0.5933	0.6400	0.6300	0.5933	0.6500	0.6000	0.7400	1.0000							
24	0.5900	0.5767	0.5600	0.6233	0.6400	0.6300	0.6100	0.6233	1.0000						
25	0.5767	0.5767	0.5933	0.6033	0.6400	0.5900	0.6167	0.6367	0.6200	1.0000					
26	0.5567	0.6167	0.6333	0.5967	0.6733	0.6300	0.6367	0.6567	0.5867	0.6533	1.0000				
27	0.6167	0.5967	0.5667	0.5700	0.5867	0.6100	0.6500	0.5767	0.5933	0.5600	0.6533	1.0000			
28	0.6433	0.6367	0.5933	0.6367	0.6333	0.5767	0.6367	0.6167	0.6067	0.6133	0.6467	0.6200	1.0000		
29	0.5967	0.6500	0.6267	0.6233	0.6333	0.6233	0.5900	0.6767	0.5800	0.5867	0.6600	0.6067	0.6267	1.0000	
30	0.6600	0.6333	0.6367	0.6267	0.6100	0.6467	0.6067	0.6267	0.6367	0.6233	0.6433	0.6167	0.6900	0.7233	1.000



ภาพที่ 13 การจัดกลุ่มของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเชื่อมร่วมกับการฉายรังสีในลักษณะ phylogenetic tree โดยการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.20k

สรุปผลการทดลอง

1. เมื่อนำยอดที่ไม่ฉายรังสีและฉายรังสี 30 เกรย์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ยอดที่ไม่ฉายรังสีสามารถรอดชีวิตได้ 19, 20, 1 และ 0 ยอดตามลำดับ และยอดที่ฉายรังสี 30 เกรย์ สามารถรอดชีวิตได้ 35, 34, 8 และ 3 ยอด

2. เมื่อนำต้นที่รอดชีวิตจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆเหล่านี้ ออกปลูกในสภาพธรรมชาติโดยปลูกในกระถางที่เติมเกลือแคง 1 เปอร์เซ็นต์ ยอดที่ไม่ฉายรังสีที่รอดชีวิตทั้งหมด 39 ต้น เมื่อออกปลูกในสภาพธรรมชาติ รอดชีวิตเพียง 3 ต้น สำหรับยอดที่ฉายรังสี 30 เกรย์ ที่รอดชีวิตทั้งหมด 80 ต้น เมื่อออกปลูกในสภาพธรรมชาติ รอดชีวิต 26 ต้น

3. ผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างข้าวขาวดอกมะลิ 105 ปกติ กับ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 พันธุ์กลาย ที่คาดว่าจะสามารถทนทานต่อดินเค็ม จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 30 ตัวอย่างด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ 7 คู่ ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนสามารถตรวจนับได้ทั้งหมดจำนวน 300 แถบ ให้แถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน 292 แถบ และให้แถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 8 แถบ โดยเกิดแถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 43 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ เกิดโพลิมอร์ฟิซึมถึง 97.33 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม NTSYS pc version 2.20k เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้าวขาวดอกมะลิ 105 ปกติ (control) กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 พันธุ์กลาย ที่คาดว่าจะทนเค็มทั้ง 29 ตัวอย่างพบว่ามีค่าความคล้ายคลึง (similarity index) อยู่ในช่วง 0.5533-0.6733 แสดงว่ามีพันธุกรรมแตกต่างกันเป็นเปอร์เซ็นต์ค่อนข้างสูง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กมลพรรณ นามวงศ์พรหม. 2537. **หญ้าพริกพราณ**. การขยายท่อนพันธุ์หญ้าพริกพราณบางชนิดใน
หลอดทดลอง. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

กรมพัฒนาที่ดิน. 2539. **เอกสารคู่มือเจ้าหน้าที่ของรัฐเรื่องดินเค็ม**. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์,
กรุงเทพฯ.

กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2546. **เอกสารวิชาการข้าวและธัญพืชเมือง
หนาวพันธุ์ดี 30 ปี**, กรุงเทพฯ.

กลอยตา แก้วเกษ. 2550. การตรวจสอบพันธุ์กลายของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 โดยใช้วิธี
AFLP. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กฤษณา โกวิทวณิช. 2546. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชอาหารสัตว์บางชนิด
และตรวจสอบพันธุ์กลายที่เกิดจากการเหนี่ยวนำ ด้วยรังสีโดยเทคนิค AFLP. วิทยานิพนธ์
ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กาญจนา กล้าแข็ง. 2544. การตรวจหาเครื่องหมายเชิงโมเลกุลที่ใช้บ่งชี้ลักษณะต้านทาน
โรคขอบใบแห้งของข้าวด้วยวิธีเอเอฟแอลพี (AFLP) ของพันธุ์ Near Isogenic Line. .
วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โกศล พวงจิตร. 2533. **ผลของรังสีแกมมาที่มีต่อทานตะวัน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

คณาจารย์ภาควิชาปฐพี. 2535. **ปฐพีวิทยาเบื้องต้น**. พิมพ์ครั้งที่ 2. คณะเกษตร มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

คำณูณ กาญจนภูมิ. 2542. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

จตุพร กุลอึ้ง. 2540. การชักนำให้เกิดแคลลัส การชักนำให้เกิดต้น และการแยกโปรโตพลาสต์จาก
แคลลัสของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จันทกานต์ อรณันท์. 2544. การชักนำให้เกิดการกลายในหญ้าเนเปียร์แคระโดยรังสีแกมมา
ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธิดารัตน์ ศรีคัมปนพรม. 2533. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโปรตีนสูงโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยง
เนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์. 2525. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของถั่วเขียวโดยใช้รังสีแกมมา.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุญมี เลิศรัตน์เดชากุล. 2518. การศึกษาอิทธิพลของรังสีแกมมาที่มีต่อการเปลี่ยนแปลง
ลักษณะ การเจริญเติบโตของหน้าวัวพันธุ์จักรพรรดิ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุญยืน กิจวิจารณ์. 2544. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์คลัง
นานาวิทยา, ขอนแก่น.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, กาญจนา กล้าแข็ง, เพลิม ระติสุนทร, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, สุรินทร์ ปิยะ
โชคณากุล, นิตยศรี แสงเดือน, ชัยฤกษ์ มณีพงษ์ และ หทัยรัตน์ อุไรรงค์. 2536. การ
เพาะเลี้ยงกัพพะอ่อนของข้าวลูกผสม. วิทยาศาสตร์เกษตร 27: 15-19

ประภัศร สุรวฒนาวรรณ. การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอในพืช. แหล่งที่มา;
<http://www.gpo.or.th/rdi/htmls/index.html>, 26 กันยายน 2548.

ประภา ศรีพิจิตร และ พรทิพย์ ชีวะเศรษฐกรรม. 2537. การพัฒนาไปป็นต้นของแคลลัสที่เจริญมา
จากกัพพะของข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105. วิทยาศาสตร์
28: 27-37

ประสิทธิ์ เพียรอรุณรักษ์. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพันธุ์ไม้ชิงชัน. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม 5-7 กุมภาพันธ์ 2544, กรุงเทพฯ.

ปรีชา สุวรรณพินิจ และ นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2536. ชีววิทยา2. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ

ปัญหาข้าวในพื้นที่ดินเค็ม. แหล่งที่มา; <http://www.pathumthani.ricethailand.org/stress1.html>, 30 ม.ค. 2548.

ปิตชัย พรสรายุทธ. 2547. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะกอกโอลีฟ (*Olea europaea* L.) ที่ปลูกในประเทศไทยโดยใช้ AFLP markers. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรรณณี รอดแรงบุญ. 2536. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในข้าวพันธุ์บาสมати ๓๗๐ โดยรังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไพบุลย์ วิวัฒนวงศ์นา. 2546. เคมิดิน. เชียงใหม่พิมพ์สวย, เชียงใหม่.

รังสฤษฎ์ กาวิต๊ะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลาวัลย์ ชัยวิรัตน์กุล. 2543. การถ่ายฝากยีน Chymotrypsin Inhibitor จากถั่วพูเข้าไปในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิภาสรี ทิวสมบุญ, 2546. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าชิกแนลอนโดยรังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิรัตน์ พิพัฒน์พงศ์ภิญโญ. 2548. การประยุกต์ใช้เทคนิค AFLP เพื่อการตรวจสอบยีนที่ตอบสนองต่อช่วงแสงโดยการเติมหมู่เมธิลในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริพล ยอดเมืองเจริญ. 2537. กลยุทธ์ในการแข่งขันกับตลาดโลก, น.33-34. ใน รายงานการประชุมวิชาการข้าวและผลิตภัณฑ์ข้าวแห่งชาติ ครั้งที่ 1: ข้าวใหม่ของข้าวไทย. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยข้าว, กรุงเทพฯ.

สมศรี อรุณินท์. 2542. พืชทนเค็ม, น.269-277. ใน ดินเค็ม. กลุ่มปรับปรุงดินเค็ม, กรมพัฒนาที่ดิน, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สถาบันวิจัยข้าว สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ กรมวิชาการเกษตร. 2544. ฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์พืชข้าว. สถาบันวิจัยข้าว. กรมวิชาการเกษตร.

สิรินุช ลามศรีจันทร์. 2540. การกลายพันธุ์ของพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุธิดา ฉันทานุรักษ์. 2534. การเลี้ยงเนื้อเยื่อไข่: ผลของ 2,4-D, NAA และ BAP ต่อการเกิดแคลลัสและยอด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุภัทรา สุขเมธี. 2533. การชักนำให้กลายเกิดการกลายและคัดพันธุ์เพื่อทนเค็ม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุมด นิลรัตน์นิสากร. 2546. ผลของรังสีแกมมา ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีต่อการเจริญเติบโตของหญ่กีนีสีม่วง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2543. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2539. สถิติการค้าสินค้าเกษตรกรรมไทยกับต่างประเทศปี 2538. กรุงเทพฯ.

อมรา คัมภีรานนท์. 2542. พันธุศาสตร์มนุษย์. เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น, กรุงเทพฯ.

อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์. 2539. เอกสารคำสอนวิชาการใช้รังสีและไอโซโทปในการเกษตร เรื่องการใช้รังสีในการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อุไรวรรณ หมุนเวียน. 2547. การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุล AFLP ที่ใช้บ่งชี้ลักษณะตอบสนองต่อช่วงแสงของถั่วขึ้นนางแดง (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสวงน ชูวิสิฐกุล. 2544. เทคโนโลยีการผลิตข้าวพันธุ์ดี. สถาบันวิจัยข้าว, กรมวิชาการเกษตร.

อำพร ชุมดินพิทักษ์, อติสร กระแสชัย และธีรพล พรสวัสดิ์ชัย. 2547. การขยายพันธุ์หม้อข้าวหม้อแกงลิงในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารเกษตร 20: 1-9.

Agrawal, 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.

Agrawal, R.K., R.N. Pandey and V. P. Agrawal. 1992. Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris* leaves. **Biotech. Biodiv. Lett.** 2: 19-24.

Ahmad, I., F. Larher and G.R. Stewart. 1979. Sorbitol a compatible osmotic solute in *Plantago maritime*. **New Phytol.** 82: 671-678.

- Avise, J.C. 1994. **Molecular Markers Natural History and Evolution**. Chapman and Hall, London.
- Ayad, W.G., T. Hodgkin, A. Jaradat and V.R. Rao. 1997. **Molecular Genetic Technique for Plant Genetic Resources**: Report of an IPGRI workshop, 9-10 October 1995, Rome, Italy. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Baek, M.H., J.H. Kim, B.Y. Chung, J.S. Kim and I.S. Lee. 2004. Alleviation of salt stress by low dose γ irradiation in rice. **Biologia Plant.** 49: 273-276.
- Bajaj, Y.P.S., A.W. Saettler and M.W. Adams. 1970. Gamma irradiation studies on seeds, seedling and callus tissue cultures of *Phaseolus vulgaris* L. **Rad. Bot.** 10: 119-124.
- Baloch, A.W., A.M. Soomro, M.A. Javed, H.M. Alam, M.S. Bughio, T. Mohammed and N.N. Mastoi. 2003. Induction of salt tolerance in rice through mutation breeding. **Asian J. Plant Sci.** 2: 273-276.
- Bhat, K. V., Y. Amaravathi, P.L. Gautam and K.C. Velayudhan. 2004. AFLP characterization and genetic diversity analysis of Indian banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). **Plant Genetic Resources** 2: 121-130.
- Brettschneider, R. 1998. RFLP Analysis, pp. 85-86. In A. Karp, P.G. Isaac and D.S. Ingram, eds. **Molecular Tools for Screening Biodiversity**. Chapman and Hall, London.
- Brown, S.M., A.K. Szewc-McFaddend and S. Kresovich. 1996. Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis, In Jauhar P.P., ed. **Methods of Genome Analysis in Plants**. CRC Press, USA.
- Caetano-Anolles, G. and P.M. Gresshoff. 1997. **DNA Marker : Protocols, Application, and Overviews**. Wiley-VCK, NewYork.

- Demiral, T. and I. Turkan. 2004. Does exogenous glycinebetaine affect antioxidative system of rice seedlings under NaCl treatment. **J. Plant Physiol.** 161: 1089–1100.
- Edwards K.J. 1998. Randomly Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs), pp. 171-173. *In* A. Karp, P.G. Isaac and D.S. Ingram, eds. **Molecular Tools for Screening Biodiversity**. Chapman and Hall, London.
- Flowers, T.J., D.E. Troke and A.R. Yeo. 1977. The mechanisms of salt tolerance in halophytes. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 28: 89 -121.
- Flowers, T.J. and S.A. Flowers. 2005. Why does salinity pose such a difficult problem for plant breeders. **Agr. Water Manage.** 78:15-24.
- Glenn, E.P., J.J. Brown and E.J. Blumwald. 1999. Salt tolerance and crop potential of halophytes critical reviews. **Plant Sci.** 18:227- 255.
- Greenway, H. and R. Munns. 1980. Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 31: 149-190.
- Henke, R.R., M.A. Mansur and M.J. Constantin. 1978. Organogenesis and plantlet formation from organ and seedling-derived calli of rice (*Oryza sativa*). **Physiol. Plant.** 44:11-14.
- Hussain, N., A. Ali, A.G. Khan, O.U. Rehman and M. Tahir. 2003. Selectivity of ions absorption as mechanism of salt tolerance in rice (Variety Shaheen Basmati). **Asian J. Plant Sci.** 2: 445-448.
- Krishnamoorthy, H.N. 1981. **Plant Growth Substances**. Tata McGraw-Hill Publishing Co., Ltd., New Delhi.

- Lee, I.S., D.S. Kim, D.Y. Hyun, S.J. Lee, H.S. Song, Y.P. Lim and Y.I. Lee. 2003. Isolation of gamma-induced rice mutants with increased tolerance to salt by anther Culture. **J. Plant Biotech.** 5: 51-57.
- Lin, J.J. and J. Kuo. 1995. AFLP: A novel PCR-base assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. **Focus** 17: 66-70.
- Lutts, S., J.M. Kinet and J. Bouharmon. 1999. Improvement of rice callus regeneration in the presence of NaCl. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 57: 3–11
- Mackill, D.J., W.R. Coffman and D.P. Garrity. 1996. **Rainfed Lowland Rice Improvement.** IRRI, Manila.
- Mahmood, F.R. and F. Raziuddin. 2002. *In vitro* effect of salt on the vigor of potato (*Solanum tuberosm* L.) Plantlets. **Biotechnology** 1: 73-77.
- Matthes, M.C., A. Daly and K.J. Edwards. 1998. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), pp. 183-184. In A. Karp, P.G. Isaac and D.S. Ingram, eds. **Molecular Tools for Screening Biodiversity.** Chapman and Hall, London.
- Massawe, F.J., M. Dickinson, J.A. Roberts and S.N. Azam-Ali. 2002. Genetic diversity in bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc) landraces revealed by AFLP markers. **Genome** 45: 1175-1180.
- Pakniyat, H., W. Powell, E. Baird, L.L. Handley, D. Robinson, C.M. Scrimgeour, E. Nevo, C.A. Hackett, P.D.S. Caligari and B.P. Forster. 1997. AFLP variation in wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch) with reference to salt tolerance and associated ecogeography. **Genome** 40: 332-341.

Rohlf, H.J. 1993. **NTSYSpc : Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**.
Applied Biostatistics Inc., New York.

Tsukahara, M., and T. Hirosawa. 1992. Simple dehydration treatment promotes plantlet
regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus. **Plant Cell Rep.** 11: 550-553.

Ude, G., E. Ogundiwin and A. Tenkouano. 2003. Genetic diversity in an African plantain core
collection using AFLP and RAPD markers. **Theor. Appl. Genet.** 107: 248-255.

Vijaya, N. and G. Satyanarayana. 1991. Effect of culture media and growth
regulators on *in vitro* propagation of rose. Horticulture - New technologies and
applications. pp 209-214. **In Proceedings of the International Seminar on New
Frontiers in Horticulture, organized by Indo-American Hybrid Seeds**, November 25-
28, 1990.

Venkatachalam, P. and N. Jayabalan. 1999. Indirect somatic embryogenesis and plantlet
regeneration in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) through cell culture. **J. Trop. Agr.**
37: 5-11.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T.V.D. Lee, M. Hornes, 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.

Vos, P. and M. Kuiper. 1997. AFLP Analysis. pp. 115-131. *In* Caetano-Anolles and Gresshoff
(eds) **DNA Markers. Protocols, Applications, and Overviews**. Wiley-Liss, Inc.
New York.

Vrieling, K., J. Peters and H. Sandbrink. 1997. Amplified fragment length polymorphisms
(AFLP) detected with non-radioactive digoxigenine labelled primers in three plant
species. **Plant Mol. Biol. Rep.** 15: 252-262.

Wu, L., Z. Fan., L. Guo., Y. Li., Z.L. Chen and L.J. Qu. 2004. Over expression of the bacterial *nhaA* gene in rice enhances salt and drought tolerance. **Plant Sci.** 168: 297–302.

Yoshida, S., D.A. Forno, J.H. Cock and K.A. Gomez. 1972. **Laboratory Manual for Physiology Studies of Rice.** The International Rice Research Institute, Los Banos, Laguna Philippines. 69p.

Zebrowska, J.I. and J. Hortynski. 2002. Plant regeneration from leaf explants in strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). **Acta Hort.** 1: 313-315.

ภาคผนวก

1. ตาราง สูตรของสารละลายธาตุอาหารพืช (Yoshida *et al.*,1972)

stock	ธาตุ	สารเคมี	ปริมาณสาร (กรัมต่อน้ำกลั่น 10 ลิตร)
1	N	NH_4NO_3	914
2	P	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	403
3	K	K_2SO_4	714
4	Ca	CaCl_2	886
5	Mg	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,240
6	Mn	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	15*
	Mo	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.74*
	B	H_3BO_3	9.34*
	Zn	ZnSO_4	0.35*
	Cu	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.31*
	Fe	$\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	77*
		Citric acid (monohydrate)	119*

หมายเหตุ* = สารละลายเคมีแต่ละชนิดแยกกัน แล้วนำมาผสมกับ H_2SO_4 เข้มข้น จำนวน 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 10 ลิตร

วิธีเตรียม

ดูดสารละลายจากขวด stock solution ทั้ง 6 ขวด ขวดละ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำ 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 4 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด ด่างของสารละลายธาตุอาหารพืช (pH) ให้เท่ากับ 5 โดยใช้ HCl และ NaOH

2. การสกัดแยกดีเอ็นเอจากข้าว (Agrawal *et al.*,1992)

- 2.1. นำใบข้าวประมาณ 3 กรัม มาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว
- 2.2. นำตัวอย่างที่บดแล้วใส่หลอดเซนตริฟิวซ์ ที่มี 2X CTAB buffer ปริมาตร 6 มิลลิลิตร และ 2-mercaptoethanol ปริมาตร 13 ไมโครลิตร ที่บ่มไว้ที่ 65 องศาเซลเซียส
- 2.3. บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ผสมโดยกลับหลอดไปมาเป็นครั้งคราว หลังจากนั้นนำหลอดมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เพื่อลดอุณหภูมิ
- 2.4. เติม chloroform:isoamylalcohol (24:1) 10 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ
- 2.5. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกชั้นสารละลายและคลอโรฟอร์มออกจากกัน ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่ เติม linear polyacrylamide 140 ไมโครลิตร แล้วใส่ isopropanol ปริมาณ 2 ใน 3 เท่าของปริมาณของเหลวที่มีอยู่ ผสมให้เข้ากันเบาๆ เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- 2.6. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- 2.7. เทส่วนน้ำทิ้ง เติม washing buffer 500 ไมโครลิตร เคาะหลอดเบาๆ เพื่อละลายเกลือออกจากดีเอ็นเอ
- 2.8. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- 2.9. เทสารละลายทิ้งปล่อยให้ตะกอนแห้ง ในอากาศที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)
- 2.10. ละลายตะกอนด้วย RNase buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 15 mM NaCl) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ให้ตะกอนละลายหมด (65 องศาเซลเซียส)
- 2.11. กำจัดอาร์เอ็นเอออก โดยเติม RNase A (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

- 2.12. สกัดเอนไซม์ RNase A และโปรตีนออกด้วย phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมา
- 2.13.ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
- 2.14.ดูดสารละลายใส่ส่วนบนใสหลอดใหม่ แล้วเติม chloroform : isoamylalcohol (24:1) 500 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมา
- 2.15.ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
- 2.16.ดูดสารละลายใส่ส่วนบนใสหลอดใหม่ แล้วเติมโซเดียมอะซิเตท เข้มข้น 3 โมลาร์ pH 5.2 ลงไป 0.1 เท่า และเติม absolute ethanol ลงไป 2 เท่าของปริมาตรสารละลายที่ดูมา เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ
- 2.17.เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- 2.18.ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
- 2.19.เทส่วนน้ำทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
- 2.20.ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- 2.21.เทสารละลายทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. การทำอิเล็กโทรโฟริซิสบนโพลีอะครีลาไมด์เจล (Vos *et al.*, 1995)

3.1. การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

- 3.1.1. ล้างกระจกให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์
- 3.1.2. เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 1 ไมโครลิตร glacial acetic acid 2.5 ไมโครลิตร และเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร) เพื่อให้เจลเกาะติดกับกระจก
- 3.1.3. เช็ดกระจกแผ่นหน้าด้วย repel silane เพื่อไม่ให้เจลเกาะติดกระจก
- 3.1.4. ประกบกระจกทั้ง 2 แผ่นเข้าด้วยกัน โดยวาง spacer ไว้ทั้ง 2 ข้าง เพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจก ใช้เทปกาวยึดขอบกระจกทั้ง 3 ด้านเพื่อไม่ให้เจลรั่วซึมออกมา จากนั้นยึดด้วยคลิปหนีบ

3.2. การเตรียมโพลีอะครีลาไมด์เจล

- 3.2.1. ชั่งยูเรีย 6.75 กรัม เติมน้ำกลั่น 3.75 มิลลิลิตร และ 5X TBE 3 มิลลิลิตร อุ่นที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จนยูเรียละลายหมด รอจนอุณหภูมิลดลงประมาณอุณหภูมิห้อง
- 3.2.2. เติมอะครีลาไมด์ (acrylamide:bisacrylamide = 19:1) ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ammonium persulfate ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และ TEMED ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้เกิดฟอง
- 3.2.3. เทเจลใส่ลงในช่องระหว่างกระจกจนเต็ม ใส่หัวลิ้งไป วางกระจกในแนวระดับ แล้วปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2-3 ชั่วโมง

3.3. การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

- 3.3.1. เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว ล้างกระจกด้านนอกให้สะอาด แกะเทปกาว ดึงหัวออก และประกอบกระจกเข้ากับชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส เดิม 1X TBE ลงในช่องทั้งด้านบนและด้านล่าง
- 3.3.2. ต่อเครื่องเข้ากับกระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์ 300 โวลต์ เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที
- 3.3.3. ปิดเครื่อง แล้วใช้เข็มฉีดยาคูบ์เฟอร์ล้างยูเรียที่อยู่ในช่องหัวแต่ละช่องให้หมด
- 3.3.4. หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ 3-6 ไมโครลิตร ที่ผสมกับ loading buffer (98% formamide, 10 mM EDTA, 0.1% bromphenol blue และ 0.1% xylene cyanol) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (ผ่านการอุ่นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที) ลงในหัวแต่ละช่อง
- 3.3.5. เปิดเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์เท่าเดิม เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับขนาดของผลิตภัณฑ์ซีอาร์
- 3.3.6. ปิดเครื่อง แล้วนำกระจกออกมา แยกกระจกทั้ง 2 แผ่นออกจากกัน แล้วนำเจลไปย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

3.4. การย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

- 3.4.1. นำแผ่นกระจกด้านที่มีเจลติดอยู่มาล้างในน้ำกลั่น โดยเขย่านาน 3-5 นาที
- 3.4.2. แช่แผ่นเจลในสารละลาย CTAB ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เขย่านาน 30 นาที
- 3.4.3. นำแผ่นเจลใส่ในสารละลายแอมโมเนีย ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เขย่านาน 15 นาที
- 3.4.4. ย้ายแผ่นเจลมาย้อมในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทที่เตรียมใหม่ๆ เขย่าเป็นเวลา 20 นาที

- 3.4.5. จุ่มแผ่นเจลในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แล้วแช่ในสารละลาย developer (2% sodium carbonate, 0.02% formaldehyde) ที่มีอุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส เขย่าเบาๆ จนเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน
- 3.4.6. นำแผ่นเจลมาจุ่มน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในสารละลายกลีเซอรอล ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที แล้วผึ่งให้แห้ง

ตารางผนวกที่ 4 อายุการออกดอก และความสูงของลำต้น ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 พันธุ์กลาย
ที่คาดว่าจะทนทานต่อดินเค็มจำนวน 29 ต้น

ต้นที่	อายุการออกดอก (วัน)	ความสูง (ซม.)
1	105	106
2	105	122
3	101	149
4	102	133
5	105	152
6	100	151
7	104	158
8	109	126
9	101	171
10	107	153
11	106	135
12	104	151
13	105	155
14	102	133
15	103	139
16	106	140
17	100	157
18	103	148
19	105	156
20	103	139
21	104	132
22	107	125
23	105	143
24	107	153
25	104	116
26	104	153
27	105	150
28	102	147
29	103	156

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล

นางสาวจิรพรรณ ทองสร้อย

วัน เดือน ปี ที่เกิด

7 เมษายน 2525

สถานที่เกิด

นครศรีธรรมราช

ประวัติการศึกษา

วท.บ. (ชีววิทยา) สาขาพฤกษศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน

สถานที่ทำงานปัจจุบัน

ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ

ทุนการศึกษาที่ได้รับ