



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์

Mutation Induction of *Plumbago indica* L. and *P. zeylanica* L. by Tissue Culture and Mutagen

นามผู้วิจัย นางสาวสายใจ ชูรัตนา

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทน์เปรม, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทน์เปรม, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชูศักดิ์ จอมพุท, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว
โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์

Mutation Induction of *Plumbago indica* L. and *P. zeylanica* L.
by Tissue Culture and Mutagen

โดย

นางสาวสายใจ ชูรัตน

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
พ.ศ. 2551

สายใจ ชูรัตน์ 2551: การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูล
เพลิงขาว โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ ปริญญาวิทยาศาสตร
มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการ
สหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ประชานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์
สนธิชัย จันทน์เปรม, Ph.D. 95 หน้า

ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดง
และเจตมูลเพลิงขาว พบว่า กลุ่มเซลล์แขวนลอยสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเหลวสูตร
MS-B5 ที่เติม 2,4-D 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
และอาหารแข็งสูตร MS-B5 ที่เติม BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
สามารถชักนำต้นจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงได้มากที่สุด แต่ไม่
สามารถชักนำต้นจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงขาวได้ และเมื่อให้สาร
EMS ความเข้มข้น 0-2 % เป็นเวลา 60 และ 90 นาที พบว่า การเพิ่มปริมาณของแคลลัสและ
กลุ่มเซลล์แขวนลอยลดลงเมื่อความเข้มข้นของสาร EMS สูงขึ้นและระยะเวลาการให้สารนานขึ้น
และสามารถชักนำต้นใหม่จากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงที่ได้รับ
สาร EMS ได้จำนวนมาก และต้นใหม่บางต้นมีลักษณะแตกต่างกับต้นปกติ แต่ไม่สามารถชักนำ
ต้นจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงขาวที่ได้รับสาร EMS ได้

ศึกษาความแปรปรวนของปริมาณสาร plumbagin จากรากของต้นเจตมูลเพลิงแดง
ด้วยวิธี HPLC พบว่า ต้นเจตมูลเพลิงแดงที่ชักนำได้จากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ไม่ได้
รับสาร EMS มีปริมาณสาร plumbagin สูงกว่าต้นควบคุม เท่ากับ 25 และ 13 ต้น และต่ำกว่าต้น
ควบคุม เท่ากับ 5 และ 17 ต้น ตามลำดับ ต้นเจตมูลเพลิงแดงที่ชักนำได้จากแคลลัสและกลุ่มเซลล์
แขวนลอยที่ได้รับสาร EMS มีปริมาณสาร plumbagin สูงกว่าต้นควบคุม เท่ากับ 49 และ 59 ต้น
และต่ำกว่าต้นควบคุม เท่ากับ 11 และ 1 ต้น ตามลำดับ และตรวจสอบความแปรปรวนทาง
พันธุกรรมด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 8 คู่ไพรเมอร์ พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอ
ที่เป็นโพลิมอร์ฟิซึม แสดงว่าต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจากการใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
และการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น

Saijai Choorattana 2008: Mutation Induction of *Plumbago indica* L. and *P. zeylanica* L. by Tissue Culture and Mutagen. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Sontichai Chanprame, Ph.D. 95 pages.

The suitable medium for suspension culture of *Plumbago indica* L. and *P. zeylanica* L. was studied. It was found that cell suspension proliferated well in MS-B5 supplemented with 0.5 mg/l BA and 1 mg/l NAA. While MS-B5 supplemented with 4 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA could be used for plant regeneration from callus and cell suspension of *P. indica* L. It was not able to regenerate the plantlets from callus and cell suspension of *P. zeylanica* L. When 0-2% EMS were applied to callus and cell suspension for 60 and 90 min, it was found that the growth rate of them was decreased when the concentrations and the application time of EMS were increased. Many plantlets were regenerated from treated callus and cell suspension of *P. indica* L. and some of them were abnormal. There was no plantlets regenerated from treated callus and suspension of *P. zeylanica* L.

The variation of plumbagin content from root of *P. indica* L. using HPLC was studied. It was found that untreated callus or cell suspension derived plants had plumbagin content higher than that of the control were 25 and 13 plants and plumbagin content lower than that of the control were 5 and 17 plants, respectively. The treated callus or cell suspension derived plants had plumbagin content higher than that of the control were 49 and 59 plants and plumbagin content lower than that of the control were 11 and 1 plants, respectively. Genetic variation determination using AFLP technique with 8 pairs of primer indicated that *P. indica* L. plants derived from tissue culture and mutagen treatment were induced genetic variation.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สนธิชัย จันทน์เปรม ประธานที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เสริมศิริ จันทน์เปรม กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก และ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูศักดิ์ จอมพุก กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง ที่กรุณาให้คำปรึกษาเสมอมา
ทั้งในด้านการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และ
ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ข้าพเจ้าจนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และศูนย์ความเป็น
เลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ที่ให้การสนับสนุนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และ
ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ที่ให้ความช่วยเหลือ และให้คำปรึกษาแก่ข้าพเจ้าเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ น้องสาว และทุกคนในครอบครัว ที่คอยเป็น
กำลังใจ คอยช่วยเหลือ และสนับสนุนในด้านการศึกษา แก่ข้าพเจ้าด้วยดีเสมอมา

สายใจ ชูรัตน์

สิงหาคม 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	22
อุปกรณ์	22
วิธีการ	24
ผลและวิจารณ์	40
สรุปและข้อเสนอแนะ	82
สรุป	82
ข้อเสนอแนะ	83
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	84
ภาคผนวก	93
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	95

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สารประกอบทางเคมีของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว	9
2	คู่มือที่เพิ่มเบสคัดเลือกที่ปลาย 3' สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการทำพีซีอาร์ II	38
3	ผลการทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดง หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 3 เดือน	41
4	ผลการทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้แคลลัสของเจตมูลเพลิงแดงพัฒนาเป็นต้น หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 5 เดือน	44
5	การเพิ่มปริมาณโดยเฉลี่ยของแคลลัสเจตมูลเพลิงแดงที่ได้รับสาร EMS ความเข้มข้น 0-2% ร่วมกับระยะเวลาการให้สารนาน 60 และ 90 นาที	52
6	การเพิ่มปริมาณโดยเฉลี่ยของกลุ่มเซลล์แขวนลอยเจตมูลเพลิงแดงที่ได้รับสาร EMS ความเข้มข้น 0-2% ร่วมกับระยะเวลาการให้สารนาน 60 และ 90 นาที	52
7	การเพิ่มปริมาณโดยเฉลี่ยของแคลลัสเจตมูลเพลิงขาวที่ได้รับสาร EMS ความเข้มข้น 0-2% ร่วมกับระยะเวลาการให้สารนาน 60 และ 90 นาที	53
8	การเพิ่มปริมาณโดยเฉลี่ยของกลุ่มเซลล์แขวนลอยเจตมูลเพลิงขาวที่ได้รับสาร EMS ความเข้มข้น 0-2% ร่วมกับระยะเวลาการให้สารนาน 60 และ 90 นาที	53
9	จำนวนต้นใหม่ที่พัฒนาจากแคลลัสของเจตมูลเพลิงแดงที่ได้รับสาร EMS ความเข้มข้น 0-2% ระยะเวลาการให้สารนาน 60 และ 90 นาที	55
10	จำนวนต้นใหม่ที่พัฒนาจากกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงที่ได้รับสาร EMS ความเข้มข้น 0-2% ระยะเวลาการให้สารนาน 60 และ 90 นาที	55
11	ปริมาณสาร plumbagin จากรากของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาได้จากแคลลัส	64
12	ปริมาณสาร plumbagin จากรากของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาได้จากกลุ่มเซลล์แขวนลอย	66

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
13	ปริมาณสาร plumbagin จากรากของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจาก แคลลัสที่ได้รับสาร EMS	68
14	ปริมาณสาร plumbagin จากรากของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจาก กลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ได้รับสาร EMS	71
ตารางผนวกที่		
1	องค์ประกอบของอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) B5 (Gamborg <i>et al.</i> , 1968) และ MS-B5	94

สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะ ต้น ดอก และรากแห้งของเจตมูลเพลิงแดง (<i>Plumbago indica</i> L.)	5
2	ลักษณะ ต้น ดอก และรากแห้งของเจตมูลเพลิงขาว (<i>Plumbago zeylanica</i> L.)	7
3	โครงสร้างทางเคมีของสาร plumbagin	10
4	โครงสร้างทางเคมีของสาร ethyl methanesulfonate (EMS)	17
5	ลักษณะของแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนข้อที่มีตาข้างเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS-B5 ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 45 วัน และลักษณะของกลุ่มเซลล์แขวนลอยเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS-B5 ร่วมกับ 2,4-D 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 45 วัน	42
6	การพัฒนาของแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดง (<i>Plumbago indica</i> L.) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS-B5 ที่เติม BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	46
7	ลักษณะของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอย	47
8	ลักษณะของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอย ในสภาพออกปลูกในกระถาง เมื่ออายุ 6 เดือน	48
9	ลักษณะรากของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอย ในสภาพออกปลูกในกระถาง เมื่ออายุ 6 เดือน	49
10	การพัฒนาของแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงขาว (<i>Plumbago zeylanica</i> L.) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS-B5 ที่เติม BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	50

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11	ลักษณะของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอย ที่ได้รับสาร EMS ในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	56
12	ลักษณะของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอย ที่ได้รับสาร EMS ในสภาพออกปลูกในกระถาง เมื่ออายุ 6 เดือน	58
13	ลักษณะรากของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอย ที่ได้รับสาร EMS ในสภาพออกปลูกในกระถาง เมื่ออายุ 6 เดือน	59
14	calibration curve ของ plumbagin standard reference	61
15	Chromatogram ของ plumbagin standard reference	61
16	Chromatogram ของ plumbagin จากต้นเจตมูลเพลิงแดง	62
17	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัส โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี คุ้ไพร์เมอร์ E-GCA/M-GTA (M คือ Φ x174 DNA/ <i>Hinf</i> I marker, C คือ ชุดควบคุม)	75
18	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากกลุ่มเซลล์แขวนลอย โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี คุ้ไพร์เมอร์ E-GCA/M-GTA (M คือ Φ x174 DNA/ <i>Hinf</i> I marker, C คือ ชุดควบคุม)	76
19	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัส ที่ได้รับสาร EMS โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี คุ้ไพร์เมอร์ E-GCA/M-GTA (M คือ Φ x174 DNA/ <i>Hinf</i> I marker, C คือ ชุดควบคุม)	78
20	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากกลุ่มเซลล์แขวนลอย ที่ได้รับสาร EMS โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี คุ้ไพร์เมอร์ E-GCA/M-GTA (M คือ Φ x174 DNA/ <i>Hinf</i> I marker, C คือ ชุดควบคุม)	79

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว
โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์

**Mutation Induction of *Plumbago indica* L. and *P. zeylanica* L.
by Tissue Culture and Mutagen**

คำนำ

เจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* Linn.) และเจตมูลเพลิงขาว (*Plumbago zeylanica* Linn.) เป็นพืชสมุนไพรที่จัดอยู่ในวงศ์ Plumbaginaceae มีสารออกฤทธิ์ในกลุ่มของ naphthoquinone ชื่อ พลัมบาจิน (plumbagin) คุณสมบัติของสาร plumbagin ออกฤทธิ์คล้ายกับ สอร์โมนเอสโตรเจน มีการนำไปใช้ประโยชน์ด้านสมุนไพรเพื่อรักษาอาการต่าง ๆ ได้ โดยระบุนิยมนำมาใช้เป็นยาขับประจำเดือน ช่วยขับน้ำย่อย ระงับการปวดฟัน ลดอาการเหงือกอักเสบ และมีฤทธิ์ในการกระตุ้นและบีบมดลูก (บุษบา และ นิวัติ, 2519) ซึ่งสาร plumbagin มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการ เช่น ด้านเชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ (Paiva *et al.*, 2003) ยับยั้งเซลล์มะเร็ง และใช้ในการคุมกำเนิด (นันทวัน และ อรุณช, 2539) รวมทั้งมีผลต่อการยับยั้งการลอกคราบของแมลง (สุทธิชัย, 2543)

ในปัจจุบันมีผู้สนใจและนิยมใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติโดยเฉพาะพืชสมุนไพรในการป้องกันและรักษาสุขภาพ ส่งผลให้ความต้องการของตลาดสูงขึ้น ทำให้เกิดปัญหาการขาดแคลนวัตถุดิบซึ่งมีแหล่งที่มาจากธรรมชาติ สำหรับเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวก็มีการนำมาใช้ประโยชน์ทางยาเช่นกัน แต่เนื่องจากมีปริมาณสารสำคัญต่อต้นน้อยและต้องใช้เวลาในการปลูกเพื่อให้ได้รากที่สมบูรณ์และมีคุณภาพดี ทำให้มีการขุดรากออกมาจากป่าจำนวนมาก (วิทย์, 2538) และจากปัญหาการผสมติดยากและให้เมล็ดน้อยก็เป็นปัญหาสำคัญในการขยายพันธุ์ โดยอาจส่งผลให้เกิดการสูญพันธุ์ได้ในอนาคต จากปัญหาดังกล่าวทำให้การปรับปรุงพันธุ์เจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว โดยวิธี convention method ทำได้ยากและประสบผลสำเร็จน้อย เนื่องจากมีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อย ดังนั้นจึงควรใช้เทคโนโลยีชีวภาพโดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเข้ามาช่วยในการขยายพันธุ์ ซึ่งสามารถควบคุมได้ทั้งปริมาณและคุณภาพ

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และชิ้นส่วนของพืชในสภาพปลอดเชื้อ โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารและสภาพที่เหมาะสม ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ เซลล์มีการพัฒนาต่อไปเป็นเนื้อเยื่อ และเกิดเป็นต้นพืชได้ในที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะเลี้ยงแคลลัสและเซลล์แขวนลอย เมื่อชักนำให้เกิดต้นอาจได้ต้นพืชที่เกิดการผันแปรทางพันธุกรรม ที่เรียกว่า somaclonal variation และการใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับการใช้สารก่อกลายพันธุ์นั้น ก็เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมให้กับพืชได้

สารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต เป็นสารเคมีในกลุ่ม alkylating agent สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยปฏิกิริยา alkylation และ hydrolysis ส่งผลให้มีการเคลื่อนย้ายหมู่ alkyl group ระหว่างสารก่อกลายพันธุ์และส่วนประกอบภายในนิวคลีโอไทด์ของพืชที่ได้รับสาร ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเบส เกิดการกลายพันธุ์ที่เรียกว่า point mutation และการกลายพันธุ์จะเกิดขึ้นโดยสุ่ม ซึ่งทำให้ได้พืชพันธุ์ใหม่เร็วขึ้นและลักษณะที่กลายพันธุ์นั้นสามารถถ่ายทอดไปยังลูกในชั่วต่อไปได้ (สิรินุช, 2540) ลักษณะการกลายพันธุ์นี้มีความสำคัญกับเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว เนื่องจากเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวมีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยมาก จึงเป็นข้อจำกัดในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะที่ดีขึ้น เช่น ผลิตสาร plumbagin ได้มากขึ้น ด้านทานต่อโรคและแมลงบางชนิดได้ เป็นต้น

ดังนั้นในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาการชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการใช้สารก่อกลายพันธุ์ที่มีผลต่อความแปรปรวนทางพันธุกรรม เพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้กับเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นโดยการวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin โดยใช้ HPLC ร่วมกับการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค AFLP เพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์

การตรวจเอกสาร

1. เจตมูลเพลิงแดง

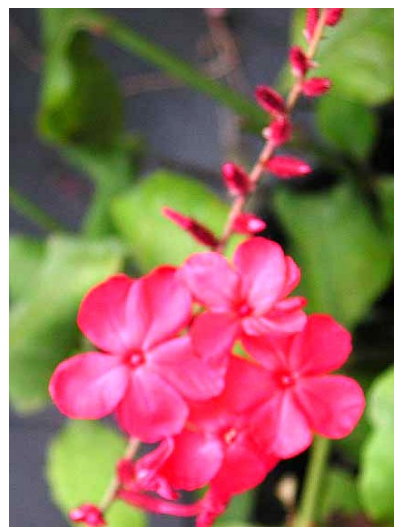
เจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* Linn. หรือ *Plumbago rosea* Linn.) มีชื่อสามัญ คือ rose coloured leadwort, indian leadwort, official leadwort, fire plant นอกจากนี้มีชื่อสามัญอื่น ๆ ในภาษาถิ่นของไทย เช่น ตั่งชู่วัว (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) ปิดปิวแดง (อีสาน) คู้ยวู้ (กะเหรี่ยง-กาญจนบุรี) ไฟใต้ดิน (ใต้) อุบะกูจ๊ะ (มาเลเซีย, ปัตตานี) เจตมูลเพลิงแดง (ภาคกลาง) (พะเยาว์, 2539) จัดอยู่ในวงศ์ Plumbaginaceae มีแหล่งกำเนิดในเขตร้อนของทวีปเอเชียและพบแพร่หลายในหลายประเทศ เช่น ไทย อินเดีย ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย เป็นต้น สำหรับประเทศไทยพบตามป่าดงดิบและป่าเบญจพรรณทั่วไป (สมสุข, 2542)

1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเจตมูลเพลิงแดง

เจตมูลเพลิงแดงเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก แตกกิ่งก้านสาขารอบ ๆ ต้น สูงประมาณ 2-3 เมตร ลำต้นสีเขียวออกแดงเข้ม ยอดอ่อนและยอดบริเวณข้อจะมีสีแดง ใบเดี่ยวเรียงสลับกันไปตามข้อต้น ใบมีลักษณะรูปไข่แกมวงรี ขอบใบหยักเป็นคลื่นเล็กน้อย ปลายใบแหลม โคนใบมนเว้า ดอกคล้ายกับใบมะลิแต่โตกว่าใบมะลิเล็กน้อย (ภูมิพิชญ์ และ ปรีชา, 2536; วุฒิ, 2540) ใบมีสีเขียวอมแดง ออกดอกเป็นช่อที่ปลายกิ่งหรือส่วนยอดของต้น ดอกบานจากด้านล่างขึ้นไปด้านบน กลีบดอกสีแดง มี 5 กลีบ กลีบเลี้ยงสีเขียว 5 กลีบ มีขนขึ้นปกคลุมอยู่ ซึ่งบริเวณขนจะมีต่อมสร้างสารเหนียวติดมือ โคนดอกเป็นหลอดเล็ก ๆ มีขนสั้น มีอับละอองเรณู 5 อัน ติดอยู่กับกลีบดอก มีรังไข่แบบ superior ovary ซึ่งมี 5 logules ผลเป็นฝักรูปกลม จะแตกออกเมื่อแก่ รากสีน้ำตาลดำ เป็นเส้น ๆ (วิทย์, 2542)



ต้นเจตมูลเพลิงแดง



ดอกเจตมูลเพลิงแดง



รากแห้งของเจตมูลเพลิงแดง

ภาพที่ 1 ลักษณะ ต้น ดอก และรากแห้งของเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* Linn.)

2. เจตมูลเพลิงขาว

เจตมูลเพลิงขาว (*Plumbago zeylanica* Linn.) มีชื่อสามัญ คือ white leadwort, ceylon leadwort นอกจากนี้มีชื่อสามัญอื่น ๆ ในภาษาถิ่นของไทย เช่น ปี่ปี่ขาว (อีสาน) ปิดปี่ขาว (เหนือ) ตอชวา ตั่งซู้ฮ่วย (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) แปะฮวยตั่ง (แต้จิ๋ว) ป้ายฮวดาน (จีนกลาง) (สุมิตรา, 2544) จัดอยู่ในวงศ์ Plumbaginaceae มีแหล่งกำเนิดในเขตร้อนของทวีปเอเชีย และพบแพร่หลายในหลายประเทศ เช่น ไทย อินเดีย ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย เป็นต้น สำหรับประเทศไทยพบตามป่าดงดิบและป่าเบญจพรรณทั่วไป (สมสุข, 2542)

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเจตมูลเพลิงขาว

ลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็กแต่มีขนาดสูงกว่าเจตมูลเพลิงแดง แตกกิ่งก้านสาขารอบ ๆ ต้น ซึ่งกิ่งอ่อนหรือกิ่งที่เล็กจะมีร่องเหลี่ยม ลำต้นสูงประมาณ 2-3 เมตร ลำต้นสีเขียว ใบเดี่ยวเรียงสลับกันไปตามข้อต้น ใบมีลักษณะรูปหอก ขอบใบหยักเป็นคลื่นเล็กน้อย ปลายใบแหลม โคนใบมน เว้า ใบมีสีเขียวเข้ม ลักษณะของใบคล้ายกับใบมะลิ แต่มีขนาดใหญ่กว่า กว้างประมาณ 1.5-2 นิ้ว ยาว 2-3.5 นิ้ว ออกดอกเป็นช่อที่ปลายกิ่งหรือส่วนยอดของต้น ช่อดอกยาวประมาณ 4-10 นิ้ว (นิรนาม, 2551ก) ดอกบานจากด้านล่างขึ้นไปด้านบน กลีบดอกสีขาวมี 5 กลีบ กลีบเลี้ยงสีเขียว 5 กลีบ มีขนขึ้นปกคลุมอยู่ซึ่งบริเวณขนจะมีต่อมสร้างสารเหนียวติดมือ โคนดอกเป็นหลอดเล็ก ๆ มีขนสั้น มีอับละอองเรณู 5 อัน ติดอยู่กับกลีบดอก มีรังไข่แบบ superior ovary ซึ่งมี 5 logules ผลเป็นฝักรูปกลมจะแตกออกเมื่อแก่ รากสีน้ำตาลดำ เป็นเส้น ๆ (วิทย์, 2542)



ต้นเจตมูลเพลิงขาว



ดอกเจตมูลเพลิงขาว



รากแห้งของเจตมูลเพลิงขาว

ภาพที่ 2 ลักษณะ ต้น ดอก และรากแห้งของเจตมูลเพลิงขาว (*Plumbago zeylanica* Linn.)

3. การขยายพันธุ์และการเก็บเกี่ยว

การขยายพันธุ์ด้วยวิธีทางธรรมชาติสามารถทำได้ 2 วิธี คือ การปักชำและการเพาะเมล็ด สำหรับการปักชำนั้นมักประสบปัญหาสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ที่ขับออกมาจากลำต้น ทำให้กิ่งปักชำตายได้ และการเพาะเมล็ดมีปัญหาการเจริญเติบโตช้าและอัตราการรอดชีวิตต่ำ (วิทย์, 2542; Chuakul *et al.*, 1994) การเก็บเกี่ยวเพื่อนำรากไปใช้ประโยชน์นั้นต้องใช้ระยะเวลาการปลูกนาน 3-4 ปี และเจตมูลเพลิงแดงจัดเป็นพืชสมุนไพรที่มีรสร้อน จึงพบว่าบริเวณพื้นที่ที่ปลูกเจตมูลเพลิงแดงมักจะไม่มีพืชอื่นขึ้น เนื่องจากรากเจตมูลเพลิงแดงจะปล่อยสารบางชนิดออกมาทำให้เมล็ดของพืชอื่นไม่สามารถงอกได้ (บุญบา และ นิวัติ, 2519)

4. สรรพคุณของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว

ทางการแพทย์แผนไทยระบุว่า เจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวเป็นสมุนไพรที่จัดอยู่ในกลุ่มที่มีฤทธิ์ร้อน แต่ฤทธิ์ของเจตมูลเพลิงขาวจะอ่อนกว่าเจตมูลเพลิงแดง (นิรนาม, 2551ก) ห้ามใช้ในหญิงท้องเนื่องจากมีฤทธิ์ร้อนและบีบมดลูก (สุนทรี, 2540) ในตำรายาไทยมีการใช้รากแห้งรักษาโรคผิวหนัง กระจายความอยากอาหาร (สมสุข, 2542) เป็นยาขับประจำเดือน แก้ปวดข้อ ระบายอาการปวดฟัน ขับพยาธิ แก้ไข้ แก้ท้องร่วง บำรุงร่างกาย บำรุงโลหิต ขับน้ำคาวปลา (ก่องกานดา, 2536; วิทย์, 2538) แก้โรคผิวหนัง กลากเกลื้อน แก้เกลื้อนช้าง แก้कुฑะราด แก้ขี้เรื้อนคาง ขี้เรื้อนน้ำเต้า แก้กึ่งแค (นันทวัน และ อรุณ, 2539; วุฒิ, 2540)

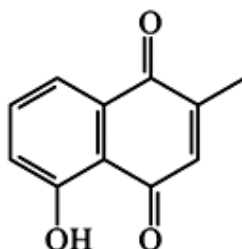
ทางการแพทย์แผนปัจจุบันมีรายงานว่า สาร plumbagin ที่พบในเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว มีประโยชน์ต่าง ๆ มากมาย และมีรายงานการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา เช่น *Candida albicans* (ภูมิพิชญ์ และ ปรีชา, 2536; สุปรานี และ สุพัตรา, 2542) และเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืช เช่น *Colletotrichum capsici* และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ เช่น *Staphylococcus aureus* (Paiva *et al.*, 2003) *Bacillus mycoides*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *Salmonella typhi*, *S. paratyphi*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus citreus*, *S. Albus* and *S. Dublin* (Mukharya and Dahia, 1977; Krishnaswamy and Purushothaman, 1980; Durga *et al.*, 1990; Didry *et al.*, 1994) *Helicobacter pylori* (Wang and Huang, 2005) ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (สุมิตรา, 2544; Nguyen *et al.*, 2004) ต้านมาลาเรีย (Paiva *et al.*, 2003) รวมทั้งมีผลต่อการยับยั้งการลอกคราบของแมลง (สุทธิชัย, 2543)

ตารางที่ 1 สารประกอบทางเคมีของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว (นิรันดาม, 2551ข)

ส่วนของพืช	กลุ่มของสารที่พบ	สารที่พบ
root	benzenoid	benzene, meta-dinitro
	carbohydrate	fructose , glucose
	flavonoid	leucodelphinidin
	quinoid	1,4-naphthoquinone
		plumbagin
root bark	alkane	arechidyl alcohol
	carbohydrate	glucose
	lipid	lignoceric acid, linoleic acid, oleic acid
	quinoid	plumbagin
	steroid	beta-sitosterol,
aerial parts	steroid	campesterol, stigmasterol
		beta-sitosterol
	quinoid	plumbagin
		6-hydroxyplumbagin
	flavonoid	plumbaginol
flower	flavonoid	cyanidin-3-0-alpha-L-rhamnoside
		delphinidine-3-0-alpha-L-rhamnoside
		kaempferol-3-0-alpha-L-rhamnoside
		pelargonidin-3-0-alpha-L-rhamnoside
petal	flovonoid	cyanidin-3-rhamnoside
		delphinidin-3-rhamnoside
		kaempferol-3-rhamnoside
		pelargonidin-3-rhamnoside
	benzenoid	digalloyl-glucose, galloyl-glucose

5. สูตรโครงสร้างทางเคมีของสาร plumbagin

สาร plumbagin มีสูตรโครงสร้าง คือ $C_{11}H_8O_3$ มีชื่อทางเคมีว่า 5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthalenedione หรือ 5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone มีน้ำหนักโมเลกุล 188.17 คาลตัน เป็นสารประกอบประเภท quinone จัดอยู่ในกลุ่ม naphthoquinone มีโครงสร้างประกอบด้วย 2-benzene ring พบได้เกือบทุกส่วนของพืช (Budavari, 1996) ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของสาร plumbagin (Paiva *et al.*, 2004)

สาร plumbagin มีลักษณะทางกายภาพเป็นผลึกรูปเข็ม มีสีเหลืองเข้ม สามารถระเหิดได้เมื่อได้รับความร้อน 78-79 องศาเซลเซียส สามารถละลายได้เล็กน้อยในน้ำร้อนและละลายได้ดีในตัวทำละลายชนิดที่มีขั้ว เช่น แอลกอฮอล์ อะซิโตน คลอโรฟอร์ม เบนซีน และอะซิติก แอซิด เป็นต้น (Budavari, 1996; Maryadele and Smith, 1996)

6. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคโนโลยีที่มีประโยชน์อย่างมาก ไม่ว่าจะเป็นการขยายพันธุ์พืชหรือปรับปรุงพันธุ์พืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ การเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช ไม่ว่าจะเป็นอวัยวะ เนื้อเยื่อ เซลล์หรือเซลล์ที่ไม่มีผนัง (protoplast) มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วย แร่ธาตุ น้ำตาล วิตามินและสารควบคุมการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และอยู่ในสภาวะควบคุมสิ่งแวดล้อม ส่วนของพืชเหล่านี้มีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้หลายรูปแบบ คือ เป็นต้นโดยตรง หรือเกิดเป็นกลุ่มของเซลล์ เรียกว่า แคลลัส (callus) หรือ เกิดเป็นคัพภะ เรียกว่า โซมาติกเอมบริโอ (somatic embryo) และเมื่อตัดเป็น ชิ้น ๆ แล้วเปลี่ยนอาหารก็สามารถเพิ่มปริมาณได้ไม่มีที่สิ้นสุด ผลสุดท้ายก็จะได้ต้นจำนวนมากที่มีลักษณะเหมือนกันทุกประการ (อรดี, 2539)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะประสบความสำเร็จมากน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างที่มิพบาทควบคุมการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืช (ไพบูลย์, 2524) สรุปได้ ดังนี้

1. ปัจจัยภายในพืช (endogenous factors)

1.1 ลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) คือ การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อไปเป็นยอดหรือรากนั้นขึ้นอยู่กับชนิดพืช พืชบางชนิดอาจเกิดเป็นยอดหรือรากได้ง่าย ในขณะที่พืชอีกชนิดหนึ่งเกิดได้ยาก แม้จะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของพันธุกรรม

1.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (phytohormone) ในชิ้นส่วนพืช ฮอร์โมนบางชนิดอาจช่วยส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช และฮอร์โมนบางชนิดก็สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้เช่นกัน

2. ปัจจัยภายนอก (exogenous factors)

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

2.2 อุณหภูมิ (temperature) โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อจะประมาณ 25 องศาเซลเซียส

2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators) การเกิดเป็นต้น รากหรือแคลลัสของพืชแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับความสมดุลของปริมาณออกซินและไซโตไคนินในอาหาร

3. ปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่ ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเลี้ยง สภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและส่วนประกอบของอาหาร

7. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว

อรสา (2543) ศึกษาการผลิตสาร plumbagin จากเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงขาว พบว่า จากการเพาะเลี้ยงส่วนของใบอ่อน ในอาหารสูตร LS ที่เติม NAA และ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงและเซลล์แขวนลอยได้ และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin พบว่า เซลล์แขวนลอยสามารถผลิตสาร plumbagin ได้มาก ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D หรือ BA

สุภาภรณ์ (2547) ทดลองเพาะเลี้ยง hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงที่ได้จากการปลูกเชื้อ *Rhizobium rhizogenes* สายพันธุ์ K599 และ ATCC13332 ในอาหารแข็งและเหลวสูตร MS, B5, ½ MS และ ½ B5 ในสภาพที่มีแสงและมีมืด เป็นเวลานาน 1 เดือน พบว่า hairy root ที่เกิดจากการปลูกเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหารสูตร B5 สภาพอาหารเหลวและที่มีมืด ให้ค่า Fresh Growth Index และ Dry Growth Index สูงสุด และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ด้วยวิธี HPLC พบว่า ราก hairy root ให้ปริมาณสารสูงกว่ารากปกติที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Komaraiah *et al.* (2002) เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดง ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ในการกระตุ้นการสร้าง plumbagin ด้วยตัวกระตุ้นที่แตกต่างกัน คือ เชื้อรา แบคทีเรีย ยีสต์ และสารโคโคซาน พบว่า การใช้โคโคซานที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นให้เซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงสร้างสาร plumbagin ได้สูงสุด เมื่อเทียบกับตัวกระตุ้นอื่น ๆ

Panichayupakaranant and Tewtrakul (2002) ทดลองชักนำรากจากชิ้นส่วนใบของเจตมูลเพลิงแดง ในอาหารเหลวสูตร B5 ที่เติม NAA และ kinetin ที่ความเข้มข้น 0.5-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากการเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์ พบว่า อาหารเหลวสูตร B5 ที่เติม NAA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ส่วนของใบเกิดรากได้ดีที่สุด

Chuntaratin (2006) ทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารที่สามารถกระตุ้นให้ hairy root แคลลัส และเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงสร้างสาร plumbagin มากขึ้น ผลการทดลองพบว่า อาหารเหลวสูตร ½ MS ที่เติมน้ำตาล 20 กรัม สามารถกระตุ้นให้ hairy root สร้างสาร plumbagin มากที่สุด และอาหารแข็งและเหลวสูตร MS-B5 ที่เติม NAA และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นให้แคลลัสและเซลล์แขวนลอยสร้างสาร plumbagin มากที่สุด จากนั้นทดลองกระตุ้นการสร้างสาร plumbagin จาก hairy root และเซลล์แขวนลอย ด้วยตัวกระตุ้นที่แตกต่างกัน ได้แก่ ไคติน ไคโตซาน เชื้อรา ยีสต์ และกรดอะซิติก จากผลการทดลองพบว่า ไคตินและไคโตซานสามารถกระตุ้นให้ hairy root และเซลล์แขวนลอยสร้างสาร plumbagin ได้มากที่สุด

Rout (2002) ทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพื่อชักนำยอดจากชิ้นส่วนใบของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว พบว่า อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ adenine sulfate ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดยอดได้ประมาณ 85% ภายในเวลา 4 สัปดาห์ และไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมเมื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นใหม่ที่ได้ด้วยเทคนิค RAPD

8. การกลายพันธุ์ของพืช

การกลายพันธุ์ คือ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมภายในเซลล์ การกลายพันธุ์อาจเกี่ยวข้องกับการสูญหายไปของส่วนของยีน หรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในยีน เรียกว่า การกลายพันธุ์ของยีน (gene mutation) ส่วนการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนส่วนของโครโมโซม การสูญหายไปหรือการเพิ่มเข้ามาของส่วนของโครโมโซมที่ครอบคลุมมากกว่าหนึ่งยีน เรียกว่า การกลายพันธุ์ของโครโมโซม (chromosome mutation) (สิรินุช, 2540)

8.1. การกลายพันธุ์ของยีน

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

8.1.1 การกลายพันธุ์แบบเฟรมชิฟต์ (frameshift mutation)

การเพิ่มหรือขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์จากโมเลกุลดีเอ็นเอเพียง 1 โมเลกุล สามารถทำให้กรอบการอ่านของรหัสที่ละ 3 โมเลกุล เปลี่ยนไปจากเดิม เป็นผลให้โปรตีนที่สร้างจาก ยีนดังกล่าวผิดไปจากเดิม ทำให้ไม่สามารถทำงานได้เหมือนเดิม หรือทำงานไม่ได้เลย

8.1.2 เบสซับสติวชัน (base substitution)

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากการแทนที่คู่เบส มีการเข้าแทนที่คู่ของเบสด้วยเบส อื่นในกลุ่มเดียวกัน เรียกว่า ทรานซิชัน (transition) ส่วนการเปลี่ยนแปลงแบบสลับคู่ของเบสที่ต่าง กลุ่มกัน เรียกว่า ทรานสเวอร์ชัน (transversion) การกลายพันธุ์ของยีนแบบเบสซับสติวชัน มีชื่อ เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า การกลายพันธุ์เฉพาะจุด (point mutation)

8.2. การกลายพันธุ์ของโครโมโซม

คือ การเปลี่ยนแปลงจำนวนหรือโครงสร้างของโครโมโซม

8.2.1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม (changes in the structure of chromosome)

การขาดหายไปของส่วนของโครโมโซม (deletion หรือ deficiency) ทำให้ ยีนจำนวนหนึ่งขาดหายไปด้วย หรือการที่มียีนหรือส่วนของโครโมโซมเพิ่มเข้ามามากกว่าปกติ (duplication) หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงกลับทิศทางของส่วนของโครโมโซม (inversion) หรือเกิดการ ย้ายสลับที่ระหว่างส่วนของโครโมโซมที่ต่างคู่กัน (translocation) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้มีผล มากน้อยต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของยีน และจำนวนยีนที่เกี่ยวข้อง

8.2.2 การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม (changes in the number of chromosomes)

เกิดจากความผิดปกติในกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) โดยที่โครโมโซมที่เป็นคู่กันคู่ใดคู่หนึ่งไม่แยกจากกัน เรียกว่า นอนดิสจังก์ชัน (nondisjunction) หรืออาจเกิดจากการยับยั้งการเคลื่อนที่ของโครโมโซมไปยังขั้วของเซลล์ในระยะแอนาเฟส (anaphase) ทำให้เซลล์สืบพันธุ์บางเซลล์มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น และบางเซลล์มีจำนวนโครโมโซมน้อยกว่าปกติ เมื่อมีการผสมพันธุ์ระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ปกติหรือผิดปกติด้วยกันก็ตาม ทำให้ได้ต้นลูกที่เกิดใหม่มีความผิดปกติในจำนวนโครโมโซม

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

1. การใช้ประโยชน์โดยตรง (direct use) พันธุ์กลายที่มีลักษณะดี สามารถนำมาขยายพันธุ์ส่งเสริมได้ทันที เหมาะสมกับพืชที่มีการปรับปรุงพันธุ์ยังไม่ได้ระดับสูงสุด ในการใช้รังสีหรือสารเคมีเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์สามารถเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมได้ง่าย ทำให้ได้จีโนไทป์ใหม่ ๆ ออกมาและนำไปใช้เป็นพันธุ์ใหม่ได้โดยตรง ในระยะเวลาก่อนข้างสั้น (สิรินุช, 2540)

2. การใช้ประโยชน์ทางอ้อม (indirect use) พันธุ์กลายที่มีลักษณะที่สนใจ แต่ยังไม่ดีพอที่จะนำมาขยายเป็นพันธุ์โดยตรง เนื่องจากยังมีลักษณะอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการอยู่ด้วย อาจนำพันธุ์กลายนี้ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมพันธุ์ (cross breeding) เพื่อถ่ายทอดลักษณะที่ต้องการเข้าไปยังพืชที่จะปรับปรุง เนื่องจากขาดลักษณะที่ดีบางอย่าง (สิรินุช, 2540)

ความผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์เมื่อได้รับการก่อกลายพันธุ์แล้ว จะส่งผลกระทบต่อโครงสร้างและหน้าที่ของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงจะเกิดขึ้นมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณของสารก่อกลายพันธุ์ที่ได้รับ และชนิดของเซลล์ เป็นต้น

9. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

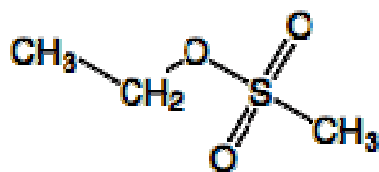
การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นเองของเซลล์ร่างกาย (somatic cells) หรือเนื้อเยื่อที่กำลังเพาะเลี้ยงก่อนการชักนำให้เกิดเป็นต้น เป็นสาเหตุสำคัญของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (อีโนไทป์) และส่งผลให้เกิดความแปรปรวนที่แสดงออกให้เห็นทางฟีโนไทป์ และเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม (genetic materials) นั่นก็คือยีนหรือดีเอ็นเอ และการเปลี่ยนแปลงกลไกการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม (mode of inheritance) ซึ่งลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปเหล่านี้สามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูก โดยการสืบพันธุ์แบบมีเพศ (sexual transmission) ผ่านกระบวนการไมโอซิส แต่ถ้าวการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์ของพืชนั้น ๆ ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม และไม่สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูก การเปลี่ยนแปลงนั้นเรียกว่า epigenetic change ซึ่งหมายถึงการเปลี่ยนแปลงที่มีกลไกบางอย่างทำให้เซลล์พืชที่เพาะเลี้ยงผิดปกติไป แต่มีลักษณะไม่คงที่เมื่อเทียบกับการกลายพันธุ์ ดังนั้นบางครั้งเมื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นแล้ว ลักษณะดังกล่าวจะสูญหายไปในที่สุด (นิรนาม, 2551ค)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงแคลลัสและเซลล์แขวนลอย เมื่อนำมาชักนำให้เกิดต้นใหม่ พบว่า พืชที่เกิดใหม่นี้จะมีลักษณะแตกต่างไปจากเดิม ซึ่งการแปรผันทางพันธุกรรมในเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง อาจเกิดมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับวิธีการเพาะเลี้ยง และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง โดยลักษณะความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เรียกว่า somaclonal variation ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นอาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกโดยรวมของคาริโอไทป์ (gross karyotypic changes) การจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซม (cryptic chromosomal rearrangements) การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครมาติด (sister chromatids exchange) อิทธิพลของชิ้นส่วนพันธุกรรมที่สามารถเคลื่อนย้ายได้ (transposable elements) การเพิ่มจำนวนตัวเอง (amplification) และการลดจำนวนตัวเอง (diminution) (สิรินุช, 2540)

10. การเหนี่ยวนำให้พืชกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีก่อกลายพันธุ์

สารก่อกลายพันธุ์ (mutagens) คือ สารเคมีที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตได้ สารเคมีที่มีประสิทธิภาพสูงในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มของพวก แอลคิลเลตติ้ง เอเจนต์ (alkylating agent) ซึ่งได้แก่ EMS (ethyl methanesulphonate) dES (Diethyl sulphate) EI (Ethyleneimine) เป็นต้น

สาร EMS (ethyl methanesulphonate) มีสูตรโครงสร้างทางเคมี คือ $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{OC}_2\text{H}_5$ เป็นของเหลวใส ไม่มีสี มีความหนาแน่น (g/ml) เท่ากับ 1.203 มีจุดเดือดเท่ากับ 85-86 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 10 มิลลิเมตรของปรอท มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 124 ละลายในน้ำได้ประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารเคมีที่นิยมใช้มากที่สุดในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืช มีประสิทธิภาพสูงในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ และใช้ได้ผลดีกับพืชทุกชนิด (สิรินุช, 2540) เช่น ป่าน (*Linum usitissimum* L.) (Tejklova, 2002) มะเขือเทศ (Watanabe *et al.*, 2007) sugar beet (Hohmann *et al.*, 2005) ถั่วเหลือง (Hofmann *et al.*, 2004) เป็นต้น



ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของสาร ethyl methanesulfonate (EMS) (Anonymous, 1983)

สาร EMS มีหมู่เอทิล คือ C_2H_5 ซึ่งจะถูกถ่ายให้กับโมเลกุลของดีเอ็นเอ ในปฏิกิริยาแอลคิเลชัน (alkylation) โดยสาร EMS สามารถเข้าทำปฏิกิริยาแอลคิเลชันกับเบสพิวรีนและไพริมิดีน รวมทั้งหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอด้วย และปฏิกิริยาแอลคิเลชันจะเกิดมากที่สุดในตำแหน่ง N-7 ของเบสกวานีน (G) หลังจากทำปฏิกิริยาแล้วกลายเป็น 7-เอทิลกวานีน (7-ethylguanine) หรือเรียกว่า แอลคิเลเตดกวานีน (alkylated guanine) การกลายพันธุ์ที่เกิดจากสาร EMS อาจเกิดจากการเข้าแทนที่คู่เบส (single base substitution) การหลุดหายไปของเบสพิวรีนจากสายดีเอ็นเอ (depurination) และการตัดขาดของเส้นเดี่ยวและเส้นคู่ของดีเอ็นเอ (single strand or double strand break) (สิรินุช, 2540)

สมปอง และ รัชญาพร (2548) ทดลองให้สารละลาย EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ กับเมอริสเต็มมาดิคโนคลูตาแคลัสของหน้าวัวพันธุ์วาเลนติโน เป็นเวลา 90 นาที เพื่อตรวจหาความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นชักนำให้เกิดต้นใหม่แล้วนำไปปลูกตรวจสอบลักษณะการออกดอกในแปลงปลูกพบว่า EMS ความเข้มข้น 0.5 และ 0.75% ให้อัตราการรอดชีวิต 60 และ 34% ตามลำดับ ($LD_{50} = 0.62\%$) EMS เข้มข้น 0.75% ให้ดอกขนาดเล็กกว่าชุดควบคุม และให้ปลีดอกสีเหลือง 14.2% ส่วน EMS เข้มข้น 1.0% ให้ลักษณะดังกล่าว 60% ในขณะที่ชุดควบคุมมีปลีดอกสีชมพู

Wongsawad *et al.* (2005) ชักนำการกลายพันธุ์ในชวนชม โดยแช่เมล็ดในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.3% นาน 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า การแช่เมล็ดในสารละลาย EMS นาน 2 ชั่วโมง ทำให้เกิดลักษณะทางสัณฐานของใบผิดปกติ โดยมีรูปร่างผิดปกติและมีเส้นกลางใบสองเส้น เมื่อนำไปตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค HAT-RAPD ซึ่งใช้ไพรเมอร์ 10 ไพรเมอร์ ซึ่งมี 1 ไพรเมอร์ สามารถบ่งชี้ความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ศึกษาได้

Till *et al.* (2003) ชักนำการกลายพันธุ์ใน *Arabidopsis* โดยการแช่เมล็ดพันธุ์ ประมาณ 50 มิลลิกรัม ในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น 20 mM – 45 mM นาน 17 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค PCR พบว่า ประชากรรุ่น M1 เกิดการกลายพันธุ์มากกว่า 1,000 จุด ในส่วนของยีนมากกว่า 100 ยีน และเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี *Arabidopsis* TILLING Project (ATP) พบว่า 98% ของการกลายพันธุ์เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเบส แบบ transition จาก G/C เป็น A/T

Till *et al.* (2004) ชักนำการกลายพันธุ์ในข้าวโพด โดยการให้สาร EMS ผ่านทางละอองเกสร และเมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอ ในประชากรรุ่น M2 โดยใช้เทคนิค PCR พบว่า สามารถชักนำให้ข้าวโพดเกิดการกลายพันธุ์ได้ โดยเกิดการกลายพันธุ์หลายจุดในส่วนของยีนหลายยีน

Lyakh *et al.* (2005) ชักนำการกลายพันธุ์ในทานตะวัน โดยการให้สาร EMS กับ mature seeds 3 พันธุ์ และ immature seeds 2 พันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้นของสาร EMS เท่ากับ 0.01% 0.1% และ 0.5% นาน 60 และ 90 นาที และที่ระดับความเข้มข้นของสาร EMS เท่ากับ 0.01% และ 0.1% นาน 60 และ 90 นาที ตามลำดับ จากผลการทดลองสามารถคัดเลือกลักษณะการกลายพันธุ์ได้ทั้งหมด 18 ต้น คือ การสร้าง chlorophyll ลดลง 6 ต้น ลักษณะใบผิดปกติ 5 ต้น รูปร่างของต้นและดอกเปลี่ยนแปลง 4 ต้น และสีของดอกเปลี่ยนแปลง 3 ต้น

11. การสกัดและตรวจสอบปริมาณสาร plumbagin

การแยกและการวิเคราะห์สารด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง มีความไวสูง ง่ายต่อการวิเคราะห์หาปริมาณ ใช้เวลาน้อย ให้ผลถูกต้องและเที่ยงตรง อาศัยความแตกต่างของการกระจายตัวของสารตัวอย่างระหว่าง 2 เฟสที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน คือ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) กับอีกเฟสหนึ่งซึ่งเป็นเฟสที่อยู่กับที่ (stationary phase) ทำหน้าที่ในการแยกสารหรือองค์ประกอบของสารตัวอย่างออกจากกัน ขึ้นอยู่กับความจำเพาะเจาะจงของสารตัวอย่างที่มีต่อเฟสอยู่กับที่ โดยเฟสเคลื่อนที่ทำหน้าที่ในการชะล้างหรือพาสารเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ ขณะที่เฟสเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่องค์ประกอบในสารตัวอย่างจะมีการเคลื่อนที่ผ่านเข้าและออกระหว่างเฟสทั้งสองและมีการหน่วงเหนี่ยว (retention) ในเฟสอยู่กับที่ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของสารแต่ละชนิด จากความแตกต่างนี้ทำให้สารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ผ่านเฟสที่อยู่กับที่ในอัตราที่แตกต่างกัน ทำให้มีการแยกเกิดขึ้น ระยะเวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่จะแสดงออกมาในรูปของตำแหน่ง พีก (peak) บนโครมาโทแกรม (chromatogram) สามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้ (รัตนา, 2547) และตรวจสอบสารละลายที่ออกจากเฟสอยู่กับที่ทำได้โดยอาศัยการวัดการดูดแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ตหรืออินฟราเรด (refractive index) หรือการวัดฟลูออเรสเซนซ์ (อาภัสสร, 2537) ซึ่งปัจจุบันได้มีการนำเอาเครื่อง HPLC มาใช้วิเคราะห์สารอย่างกว้างขวาง เพราะมีประสิทธิภาพสูง สะดวก รวดเร็ว สามารถแยกสารได้ภายในเวลาน้อยกว่า 1 ชั่วโมง และตรวจสอบปริมาณสารที่น้อยกว่า picomole ได้ (สุรพจน์, 2538; อาภัสสร, 2537)

อรสา (2543) ศึกษาการผลิตสาร plumbagin ในเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงขาว โดยการสกัดสาร plumbagin จากเซลล์แขวนลอยและส่วนต่าง ๆ ของต้นเจตมูลเพลิงขาว แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร plumbagin โดยใช้เครื่อง HPLC คอลัมน์ของ Merk 50943 LiChroCART® 125-4 LiChroCART®100PR-18 (ไมโครเมตร) ตัวทำละลาย คือ เมทานอล 0.6% กับกรดอะซิติก 0.4% (60:40 v/v) ปริมาณที่ใช้ฉีด 10 มิลลิเมตร อัตราการไหล 1 มิลลิเมตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร พบว่า การสกัดสาร plumbagin จากส่วนต่าง ๆ ของต้นเจตมูลเพลิงขาว ในส่วนของรากให้ปริมาณสาร plumbagin มากกว่าส่วนอื่น ๆ ของต้น 0.226 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

Wang and Huang (2005) สกัดสาร plumbagin จากรากของเจตมูลเพลิงขาว และวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ด้วยวิธี HPLC โดยใช้สภาวะของเครื่องรุ่น Hewlett-Packard Model 1100 system (Darmstadt, Germany) คอลัมน์ของ LiChrospher® 100RP18e (4.0 x 250 นาโนเมตร : 5 ไมโครเมตร) สารละลายตัวพา คือ น้ำ กับ เมทานอล อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

Chuntaratin (2006) ศึกษาการสร้างสาร plumbagin จากราก hairy root แคลลัสและเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดง โดยวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ด้วยวิธี HPLC คอลัมน์ของ Agilent Zorbex SB-C18 (4.6 x 250 นาโนเมตร : 5 ไมโครเมตร) สารละลายตัวพา คือ เมทานอล กับ 0.4% กรดอะซิติก (60:40 v/v) ปริมาณที่ใช้ฉีด 10 มิลลิลิตร อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร พบว่า ราก hairy root ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่เติมน้ำตาล 20 กรัม สามารถสร้างสาร plumbagin มากที่สุด คือ 78.71 มิลลิกรัมต่อลิตร และ อาหารแข็งและเหลวสูตร MS-B5 ที่เติม NAA และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นให้แคลลัสและเซลล์แขวนลอย สร้างสาร plumbagin มากที่สุด

12. การตรวจสอบสายพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี

การตรวจสอบสิ่งมีชีวิตในระดับดีเอ็นเอต้องอาศัยเทคนิคการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ซึ่งเป็นวิธีการที่ทำให้เกิดลายพิมพ์หรือแบบแผนของดีเอ็นเอที่จำเพาะ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด นอกจากนี้ดีเอ็นเอที่อยู่บนโครโมโซมที่ใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอนั้น มีการถ่ายทอดตามกฎของเมนเดล จึงสามารถประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ (สุรินทร์, 2545)

เทคนิค amplified fragment length polymorphism (AFLP) เป็นเทคนิคของเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบหนึ่ง พื้นฐานของเอเอฟแอลพี คือ การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนั้นจึงรวมเอาความน่าเชื่อถือของเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (restriction fragment length polymorphism) และประสิทธิภาพของเทคนิคพีซีอาร์เข้าด้วยกัน (สุรินทร์, 2545) ซึ่งคิดค้นโดย Zabeau และ Vos นักวิจัยประเทศเนเธอร์แลนด์ในปี ค.ศ.1993 เทคนิคเอเอฟแอลพีนี้ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส (*EcoRI*) ร่วมกับเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส (*MseI*) ทำให้ได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอพอเหมาะแล้วเชื่อมต่อกับ adapter เพื่อเป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยพีซีอาร์ 2 ครั้ง โดยครั้ง

แรกใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสเพียง 1-2 เบส และครั้งที่สอง ใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสต่อจากไพรเมอร์แรกอีก 1-2 เบส เพื่อให้การคัดเลือกเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพและถูกต้องมากยิ่งขึ้น

เทคนิคเอฟแอลพีเป็นเทคนิคหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ มีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม (random fingerprint) ซึ่งใช้กับดีเอ็นเอใด ๆ ก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องรู้ลำดับเบสของดีเอ็นเอนั้น นอกจากนี้ยังไม่ขึ้นกับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม สามารถทำได้รวดเร็วและทำซ้ำได้ผลคงเดิม (reproducible) มีคุณสมบัติของไพรเมอร์หลายแบบทำให้เกิดลายพิมพ์ที่แตกต่างกันจำนวนมาก และในการทำปฏิกิริยารั้งหนึ่งสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอ ได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน คือ multiplex ratio สูง มีโพลีเมอร์ฟิซึมสูง (Nicola and Valeria, 2002) ในบางกรณีพบว่าเทคนิคเอฟแอลพีไม่เหมาะสมสำหรับใช้เปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่างกันมาก ๆ เพราะจะมีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (common band) จำนวนน้อยทำให้การหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการผิดพลาดได้ ขณะเดียวกันเทคนิคเอฟแอลพีก็ไม่เหมาะสมสำหรับสิ่งมีชีวิตที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกันมากเพราะจะพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวนน้อย (วิภา, 2544)

เทคนิคเอฟแอลพีสามารถบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่เป็นชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กันได้ เช่น ศึกษาในถั่ว cowpea พันธุ์พื้นเมือง (*Vigna unguiculata* spp. *unguiculata*) (Nicola and Valeria, 2002) รวมถึงสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในสกุลเดียวกันแต่ต่างชนิดกัน เช่น ในการศึกษาความสัมพันธ์ของพืชในสกุล *Berberis* ที่พบใน Patagonia และ Argentina มะละกอที่พบในฮาวายและออสเตรเลีย และสามารถบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในวงศ์เดียวกันได้ เช่น Aggarwal *et al.* (1999) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชต่างชนิดในสกุล *Oryza* รวมทั้ง ข้าวโพด อ้อย และถั่วเหลือง โดยสามารถอธิบายวิวัฒนาการของพืชในสกุลนี้ว่ามีบรรพบุรุษร่วมกันหรือมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเทคนิคเอฟแอลพีสามารถที่จะจำแนกลักษณะที่เกิดจากการกลายพันธุ์ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ต้นเจตมูลเพลิงแดงและต้นเจตมูลเพลิงขาว จากแปลงทดลองภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

2. วัสดุและอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและให้สารสกัดกลายพันธุ์

2.1 เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น ขวดแก้วขนาด 4 ออนซ์ บีกเกอร์ กระจกบด

2.2 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

2.3 ตู้อบ (hot air oven)

2.4 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

2.5 เครื่องชั่งน้ำหนัก

2.6 เตาไมโครเวฟ (microwave oven)

2.7 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar air flow cabinet)

2.8 มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว (Petri dish) และตะเกียงแอลกอฮอล์

2.9 ชั้นวางขวดเนื้อเยื่อพืช และเครื่องเขย่า

3. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์สารด้วย HPLC

3.1 เครื่อง sonicator

3.2 เครื่อง evaporator

3.3 เครื่อง HPLC รุ่น HP 1100 ของบริษัท Agilent Technologies

3.4 ตู้ดูดควัน (fume hood)

4. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์เอเอฟแอลพี

- 4.1 โกร่งบดตัวอย่าง
- 4.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centifuge) และเครื่อง vortex
- 4.3 เครื่อง Thermal Cycler สำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์
- 4.4 เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis)
- 4.5 อุปกรณ์เตรียมเจล (gel caster)
- 4.6 เครื่องถ่ายภาพเจล (gel document)
- 4.7 เครื่อง denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

5. สารเคมี

5.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) (ตารางภาคผนวกที่ 1) และสูตร B5 (Gamborg *et al.*, 1968) (ตารางภาคผนวกที่ 1)

5.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ α -naphthalene acetic acid (NAA), 6-benzyladenine (BA) และ 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)

5.3 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ Haiter[®] และ Tween 20

5.4 สารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methanesulfonate)

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

5.6 สารเคมีที่ใช้ในการทำ AFLP

5.6.1 สารเคมีในปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการต่อด้วย adapter เช่น เอนไซม์ *EcoRI*, *MseI*, *T₄* ligase, *EcoRI* adapter, *MseI* adapter และ ATP เป็นต้น

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

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

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

5.7 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ด้วยวิธี HPLC เช่น methanol, petroleum ether, acetic acid และ น้ำ 18 โอห์ม เป็นต้น

6. ไพรเมอร์สำหรับการทำเอเอฟแอลพี ดังตารางที่ 2

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

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว

ฟอกฆ่าเชื้อส่วนยอดที่มีตาข้างของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว ด้วยการแช่ แอลกอฮอล์ เข้มข้น 70% เป็นเวลา 1 นาที และฟอกฆ่าเชื้อด้วย สารละลาย Haiter® 20% ที่เติม Tween 20 จำนวน 2-3 หยด เขย่านาน 20 นาที ย้ายลงสารละลาย Haiter® 15% ที่เติม Tween 20 จำนวน 2-3 หยด แช่ 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำ ชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (ตารางผนวกที่ 1) ที่ปรับค่าความเป็นกรด เป็นด่าง เป็น 5.6-5.8 และนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไป เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีความเข้มแสง 55 ไมโคร โมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วัน เพื่อให้ได้ต้นที่สมบูรณ์

2. การชักนำให้เกิดแคลลัสในเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว

นำส่วนข้อที่มีตาข้างของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวในสภาพปลอดเชื้อ โดยคัดเลือกเอาเฉพาะเนื้อเยื่อส่วนข้อที่ยังอ่อน เนื่องจากมีส่วนของเนื้อเยื่อเจริญที่สามารถเจริญและตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตได้ดีกว่าเนื้อเยื่อส่วนที่แก่แล้ว นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัส ซึ่งประกอบด้วย อาหารแข็งสูตร MS-B5 ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร รุน 7 กรัมต่อลิตร และปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง เป็น 5.6-5.8 และนั่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไป เพาะเลี้ยงในสภาพมืด อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์

3. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว

3.1 การเตรียมเนื้อเยื่อ

เตรียมแคลลัสโดยการเพาะเลี้ยงส่วนข้อที่มีตาข้างของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัสเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2

3.2 การเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์แขวนลอย

ย้ายแคลลัส หน้าประมาณ 0.5 กรัม มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS-B5 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเป็น 5.7-5.8 เพาะเลี้ยงในสภาพมืด เขย่า 100 รอบต่อนาที และเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 3 เดือน

ทำการทดลองโดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มีทั้งหมด 7 ทรีทเมนต์ ทำการทดลองทรีทเมนต์ละ 4 ซ้ำ โดยใช้แคลลัสหนัก 0.5 กรัมต่อซ้ำ

บันทึกผลโดยการวัดปริมาณกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่เพิ่มขึ้นและลักษณะกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่แตกต่างกันในแต่ละสูตร โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่สามารถเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์แขวนลอยได้ดีที่สุดสำหรับใช้เป็นสูตรเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์แขวนลอยในการทดลองต่อไป

4. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่จากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว

4.1 การเตรียมเนื้อเยื่อ

เตรียมแคลลัสโดยการเพาะเลี้ยงข้อที่มีตาข้างของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัสเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 และเตรียมกลุ่มเซลล์แขวนลอยโดยเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลวสูตรที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3

4.2 การชักนำให้เกิดต้นใหม่จากแคลลัสของเจตมูลเพลิงแดง

ทดลองสูตรอาหารโดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็งสูตรชักนำให้เกิดต้น ซึ่งประกอบด้วย อาหารแข็งสูตร MS-B5 ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร วน 7 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเป็น 5.7-5.8 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส นานประมาณ 5 เดือน โดยเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 1 เดือน

ทำการทดลองโดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มีทั้งหมด 5 ทริทเมนต์ ทำการทดลองทริทเมนต์ละ 4 ซ้ำ โดยใช้แคลลัสหนัก 0.5 กรัมต่อซ้ำ

บันทึกผลโดยการนับจำนวนต้นใหม่ จากนั้นนำผลการชักนำต้นของแต่ละสูตรมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่สามารถชักนำต้นได้สูงสุดสำหรับใช้เป็นสูตรชักนำต้นจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของทั้งเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวในการทดลองต่อไป

4.3 การชักนำให้ต้นใหม่เกิดราก

ย้ายต้นใหม่ที่ได้จากการทดลองที่ 4.2 และ 4.3 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เดิมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร วุ้น 7 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเป็น 5.7-5.8 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เพื่อชักนำให้เกิดรากนานประมาณ 6 สัปดาห์

4.4 การนำต้นใหม่ออกปลูกในกระถาง

นำต้นเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวที่ชักนำต้นใหม่ได้จากการทดลองที่ 4.2 และ 4.3 ที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อและผ่านการชักนำให้เกิดรากแล้ว ที่อายุ 6 สัปดาห์ มาปรับสภาพที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน แล้วย้ายต้นที่สมบูรณ์ออกปลูกในถาดหลุม โดยใช้ทรายผสมขุยมะพร้าวในสัดส่วน 1 : 1 เป็นวัสดุปลูก รดน้ำและคลุมด้วยถุงพลาสติกเพื่อรักษาความชื้น เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเปิดปากถุงเล็กน้อยเพื่อเพิ่มการถ่ายเทอากาศ เป็นเวลา 5 วัน และหลังจากนั้นย้ายต้นเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวไปปลูกในกระถางขนาด 8 นิ้ว โดยใช้ ดิน : แกลบเผา : แกลบ : ปุ๋ยคอก ในสัดส่วน 1 : 1 : 1 : 1 เป็นวัสดุปลูก ปลูกนานประมาณ 6 เดือน เก็บรากไปสกัดสาร plumbagin เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารจากต้นที่ได้จากการทดลองเปรียบเทียบกับต้นควบคุม

5. ศึกษาผลของสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนตที่มีผลต่อแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว

5.1 การเตรียมเนื้อเยื่อ

เตรียมแคลลัสโดยการเพาะเลี้ยงข้อที่มีตาข้างของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัสเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 และเตรียมกลุ่มเซลล์แขวนลอย โดยเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลวสูตรที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3

5.2 เตรียมสารละลายเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS)

กรองสาร EMS (ความเข้มข้น 100%) ด้วยแผ่นกรองแบคทีเรีย ขนาด 0.22 ไมครอน จากนั้นเตรียมสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0-2% (โดยปริมาตร) ละลายในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS-B5 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

5.3 การให้สารก่อกลายพันธุ์

เพื่อศึกษาผลของสาร EMS ที่มีต่อความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว โดยนำแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว มาแช่ในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0-2% ในสัดส่วน แคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอย หนักประมาณ 0.5 กรัม ต่อ สารละลาย EMS ปริมาตร 5 มิลลิตร จากนั้นนำไปวางบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ระยะเวลา 60 และ 90 นาที ในสภาพมืด หลังจากนั้นย้ายแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยออกจากสารละลาย EMS และล้างแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยด้วยอาหารเหลวสูตร MS-B5 ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และนำไปวางบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที นาน 20 นาที โดยล้างซ้ำ 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรชักนำให้เกิดต้น บันทึกรูปผล โดยใช้น้ำหนักแคลลัสหรือกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ระยะเวลา 20 วันหลังจากการเพาะเลี้ยง และนับจำนวนต้นใหม่ที่ได้ในแต่ละระดับความเข้มข้นของสาร EMS โดยเปรียบเทียบผลกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสาร EMS

ทำการทดลองโดยวางแผนการทดลองแบบ 11 x 2 factorial in CRD
มีปัจจัยที่ศึกษา 3 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 คือ ระดับความเข้มข้นของสาร EMS 11 ระดับ

ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาการให้สาร 60 และ 90 นาที

ทำการทดลองทริทเมนต์ละ 4 ซ้ำ โดยใช้แคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยหนัก 0.5 กรัมต่อซ้ำ

5.4 การชักนำให้ต้นใหม่เกิดราก

ย้ายต้นใหม่ที่ได้จากการทดลองที่ 5.3 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร รุน 7 กรัมต่อลิตร และปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเป็น 5.7-5.8 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เพื่อชักนำให้เกิดราก นานประมาณ 6 สัปดาห์

5.5 การนำต้นใหม่ออกปลูกในกระถาง

นำต้นใหม่ที่ชักนำได้จากการทดลองที่ 5.3 ออกปลูกในกระถาง โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 4.5 และหลังจากปลูกลานประมาณ 6 เดือน เก็บรากไปสกัดสาร plumbagin เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารจากต้นที่ได้จากการทดลองเปรียบเทียบกับต้นควบคุม

6. การวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin จากรากของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

6.1 การสกัดแยกสาร plumbagin (ดัดแปลงจาก Chuntaratin, 2006)

6.1.1 สุ่มเก็บตัวอย่างรากของต้นเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว ที่ได้จากการทดลองที่ 4.2 4.3 และ 5.3 ที่ปลูกในสภาพกระถางจนมีอายุ 6 เดือน และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.2-0.3 เซนติเมตร โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น

6.1.1.1 รากจากต้นเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงข้อ โดยไม่ผ่านแคลลัส กำหนดให้เป็นชุดควบคุม

6.1.1.2 รากจากต้นเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวที่พัฒนาจากแคลลัส

6.1.1.3 รากจากต้นเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวที่พัฒนาจากกลุ่มเซลล์แขวนลอย

6.1.1.4 รากจากคั้นเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวที่พัฒนาจากแคลลัสที่ได้รับสาร EMS

6.1.1.5 รากจากคั้นเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวที่พัฒนาจากกลุ่มเซลล์แขวนลอย ที่ได้รับสาร EMS

6.1.2 อบรากให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน เพื่อระงับบทบาทของเอนไซม์ที่มีอยู่ในส่วนของพืชทำให้สารสำคัญในพืชไม่สลายตัว

6.1.3 บดตัวอย่างให้ละเอียดและชั่งตัวอย่างรากหนัก 100 มิลลิกรัม ใส่ในพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร เติมนีโทานอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วปิดพลาสติกให้สนิท นำไป sonicate ด้วยเครื่อง sonicator เป็นเวลานาน 10 นาที

6.1.4 นำสารแขวนลอยในข้อ 6.1.3 มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เพื่อขจัดเอาส่วนกากออก ได้สารละลายสีเหลืองอ่อนถึงเข้มตามระดับความเข้มข้นของสาร plumbagin จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปกลั่นแยกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนสารละลายแห้ง

6.1.5 ละลายตะกอน ด้วยเมทานอล 2-3 มิลลิลิตร แล้วย้ายสารละลายที่ได้ใส่ขวดสีชา และนำไปวางในตู้ดูดควันจนกระทั่งเมทานอลที่เหลือระเหยหมดได้ตะกอนที่เหนียวข้น (crude extract)

6.1.6 ละลายตะกอนสาร plumbagin ของแต่ละตัวอย่างด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านแผ่นกรอง cellulose acetate ที่มีช่องขนาด 0.45 ไมครอน ใส่ลงใน insert vial ประมาณ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ด้วยเครื่อง HPLC รุ่น HP 1100 ของบริษัท Agilent Technologies

6.2 การวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ด้วยวิธี HPLC

6.2.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีการของ Chuntaratin (2006) คือ

คอลัมน์ : Agilent Zorbex SB-C18 (4.6 x 250 นาโนเมตร : ไมโครเมตร)
 สารละลายตัวพา : 0.4 เปอร์เซ็นต์ของกรดอะซิติก : 0.6 เปอร์เซ็นต์ของเมทานอล
 (40 : 60 โดยปริมาตร)
 อัตราการไหลของตัวพา : 1 มิลลิลิตรต่อนาที
 ตรวจวิเคราะห์ด้วยแสง UV : 270 ไมโครเมตร
 ปริมาตรที่ใช้ในการวิเคราะห์ : 10 ไมโครเมตร
 ความดัน : 230-260 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

6.2.2 การเตรียมสารที่เป็นของเหลวซึ่งจะเข้าสู่ระบบส่งตัวทำละลายของเครื่อง HPLC ต้องผ่านการกรอง ซึ่งทำได้โดย

6.2.2.1 น้ำกลั่นและกรดอะซิติก 0.4 เปอร์เซ็นต์ กรองโดยใช้แผ่นกรอง cellulose ที่มีขนาดช่อง 0.45 ไมโครเมตร

6.2.2.2 เมทานอล กรองโดยใช้แผ่นกรอง Teflon ที่มีขนาดช่อง 0.45 ไมโครเมตร

6.2.3 บันทึกผลและคำนวณหาปริมาณสาร plumbagin จากความเข้มข้นของสาร plumbagin ที่ใช้เป็นมาตรฐาน (Sigma : catalog number P7262 a.i. 98 เปอร์เซ็นต์) โดยคำนวณได้จากสมการ linear regression และหาค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Agilent Chemstation (Agilent Technologies, 2001)

7. ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว โดยวิธีเอแฟลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)

7.1 สกัดดีเอ็นเอจากใบของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวที่คัดเลือกมาจากแต่ละ
การทดลองที่ออกปลูกในกระถาง โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น

7.1.1 ต้นเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงข้อ โดยไม่ผ่าน
แคลลัส กำหนดให้เป็นชุดควบคุม

7.1.2 ต้นเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวที่พัฒนาจากแคลลัส

7.1.3 ต้นเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวที่พัฒนาจากกลุ่มเซลล์แขวนลอย

7.1.4 ต้นเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวที่พัฒนาจากแคลลัสที่ได้รับสาร EMS

7.1.5 ต้นเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวที่พัฒนาจากกลุ่มเซลล์แขวนลอย
ที่ได้รับสาร EMS

การเก็บตัวอย่างพืชเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและความเข้มข้น
สูงนั้นขึ้นอยู่กับคุณภาพของเนื้อเยื่อที่ใช้ ดังนั้นจึงควรนำเอาเนื้อเยื่อสดมาสกัดโดยทันที แต่ถ้า
จำเป็นต้องเก็บตัวอย่างไว้เป็นเวลานาน ก็ควรเก็บรักษาอย่างถูกต้อง ซึ่งถ้าเก็บตัวอย่างของพืช
มาแล้วยังไม่ได้นำมาสกัดดีเอ็นเอโดยทันที ควรเก็บในถุงพลาสติกแล้วนำไปแช่ตู้เย็นหรือถ่วง
น้ำแข็ง ส่วนของพืชที่นิยมนำมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ คือ ใบอ่อน

7.2 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี CTAB ซึ่งดัดแปลงมาจาก Aldrich and Cullis (1993)

7.2.1 นำใบอ่อนของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวที่ได้จากแต่ละการทดลอง
จำนวน 2-3 ใบ บดในโกร่งที่เย็น โดยเติมไนโตรเจนเหลวแล้วบดให้ละเอียดจนเป็นผง

7.2.2 ย้ายตัวอย่างที่บดแล้วใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
เติม CTAB extraction buffer (2% CTAB, 2% PVP, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0,

100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2% (v/v) α -mercaptoethanol) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที โดยกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง ทุก 15 นาที

7.2.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
 คูดสารละลายใส่ย้ายใส่หลอดใหม่ เดิมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมา ประมาณ 5-6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10-15 นาที

7.2.4 คูดสารละลายใส่ชั้นบนย้ายใส่หลอดใหม่ เดิม Rnase (DNase-free) (US Biological, USA) 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที

7.2.5 เดิมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10-15 นาที

7.2.6 คูดสารละลายใส่หลอดใหม่ เดิม 3M sodium acetate (NaOAc pH 5.2) ปริมาตร 0.1 เท่าของส่วนใส และเดิม isopropanol ซึ่งผ่านการแช่เย็น ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายใส ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่า บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10-15 นาที

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

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

7.3 การตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ทำโดยนำดีเอ็นเอตัวอย่างที่เตรียมไว้มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ซึ่งโมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์จะเข้าไปแทรกในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ และเมื่อนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจะเกิดการเรืองแสง โดยที่ความเข้มของแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นจะสามารถบอกปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างโดยประมาณได้ ซึ่งปริมาณที่ตรวจสอบได้เป็นระดับนาโนกรัม นอกจากนี้ยังสามารถบอกคุณภาพดีเอ็นเอได้ด้วยว่ามีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอหรือไม่ ถ้าหากมีอาร์เอ็นเอปนอยู่จะเห็นเป็นแถบเคลื่อนที่ไปเร็วกว่าดีเอ็นเอ โดยมีขั้นตอนการตรวจสอบดังนี้

7.3.1 เตรียมอะกาโรสเจล เข้มข้น 1% ในบัฟเฟอร์ 1x TBE จากนั้นหลอมอะกาโรส เจลจนละลายหมด ตั้งไว้ให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เทลงในถาดที่เตรียมไว้ให้เจลมีความหนา ประมาณ 5 มิลลิเมตร และรอให้เจลแข็งที่อุณหภูมิห้อง

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

7.3.4 ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส ปรับกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลานาน 30 นาที

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

7.3.6 นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ด้วยเครื่อง Gel document ถ่ายรูปบันทึกผล และประมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน

	core base	enzyme base	extension base
<i>Eco</i> RI primer	5'-GACTGCGTACC	AATTC	NNN-3'
<i>Mse</i> I primer	5'-GATGAGTCCTGAG	TAA	NNN-3'

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

7.4.3 การทำพีซีอาร์ II หรือ selective amplification

นำผลผลิตที่ได้จากการทำพีซีอาร์ I มาเจือจางลง 30 เท่า ด้วยน้ำ deionize เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา โดยใช้ดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วปริมาตร 2 ไมโครลิตร เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ทำปฏิกิริยากับ *Eco*RI ไพรมเมอร์ และ *Mse*I ไพรมเมอร์ ที่เพิ่มเบสคัดเลือกที่ปลาย 3' จำนวน 3 เบส (ตารางที่ 2) เพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอ ชนิดละ 0.5 ไมโครลิตร (5 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร) พร้อมกับ 10x บัฟเฟอร์ (10 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM KCl) 1 ไมโครลิตร 1.5 mM MgCl₂ 0.6 ไมโครลิตร dNTP 2 ไมโครลิตร (1 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร) และเอนไซม์ *Taq* polymerase 0.2 ไมโครลิตร (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปรับปริมาตรสุทธิเป็น 20 ไมโครลิตร ด้วยน้ำ deionize แล้วนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง Thermal Cycler โดยกำหนดโปรแกรมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ II ดังนี้

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

ตารางที่ 2 คู่ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกลำปลาย 3' สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในการทำ
พีซีอาร์ II

คู่ที่	<i>Eco</i> RI primer	<i>Mse</i> I primer
1	E-GCA	M-GTC
2	E-GCA	M-GCC
3	E-GCA	M-GTA
4	E-GTC	M-GCC
5	E-GCC	M-GCC
6	E-GA	M-GCC
7	E-GA	M-GTC
8	E-GA	M-GTA

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

7.4.4 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยอิเล็กโตรโฟรีซิส

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

7.4.4.2 ตรวจสอบผลโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบน denaturing polyacrylamide gel ความเข้มข้น 4.5% ในบัฟเฟอร์ 0.5x TBE แยกขนาดดีเอ็นเอ โดยใช้กำลังไฟฟ้า คงที่ 95 วัตต์ เป็นเวลา 100 นาที หรือจนกว่าสีของ xylene cyanal (สีที่อยู่ด้านบน) เคลื่อนที่ลงมา ประมาณ 2 ใน 3 ของเจล

7.4.4.3 ย้อมเจลด้วยวิธี silver staining โดยนำแผ่นกระจกเจลมาแช่ใน สารละลายอะซิติก เข้มข้น 10% เป็นเวลา 20 นาที และล้างด้วยน้ำ deionize 2 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที

7.4.4.4 นำแผ่นกระจกเจลไปย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (1% silver nitrate, 0.56% formaldehyde) บนเครื่องเขี่ยนาน 30 นาที ย้ายแผ่นกระจกไปล้างด้วยน้ำ deionize อย่างรวดเร็วเพื่อล้างซิลเวอร์ไนเตรทส่วนเกินออก

7.4.4.5 นำแผ่นกระจกเจลไปแช่ในสารละลาย develop (30% sodium carbonate, 0.1% sodium thiosulfate, 0.56% formaldehyde) ที่แช่เย็น เขย่าอย่างสม่ำเสมอ นานประมาณ 5-10 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบของดีเอ็นเอปรากฏขึ้นอย่างชัดเจน

7.4.4.6 หยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นกระจกเจลไปแช่ในสารละลายอะซิติกเข้มข้น 10% เป็นเวลา 3-5 นาที และล้างด้วยน้ำ deionize นาน 10 นาที นำไปผึ่งให้แห้งในตู้ดูดควัน

7.4.5 การอ่านผลจากการทำเอเอฟแอลพี

เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันของทุกตัวอย่าง แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏให้สัญลักษณ์ “1” และแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏให้สัญลักษณ์ “0” แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบหาความเหมือนและความแตกต่างทางพันธุกรรม

8. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและถ่ายยีน และห้องปฏิบัติการชีววิทยาโมเลกุล ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

9. ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง

เดือนมิถุนายน 2548 ถึง เดือน กันยายน 2551

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดง และเจตมูลเพลิงขาว

ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดง และเจตมูลเพลิงขาว ในขั้นตอนแรกได้ทำการทดลองเฉพาะการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดง เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการทดลองต่อไป จากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อที่มีตาข้างของเจตมูลเพลิงแดงบนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัส นาน 6 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิด compact callus มีลักษณะกลม ผิวเรียบ แข็ง สีเทา (ภาพที่ 5A) และเมื่อนำแคลลัสประมาณ 0.5 กรัม มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS-B5 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า การเจริญเติบโตของกลุ่มเซลล์แขวนลอยให้ผลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) (ตารางที่ 3) ซึ่งอาหารเหลวสูตร MS-B5 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 0.5 และ NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้กลุ่มเซลล์แขวนลอยเพิ่มปริมาณได้มากที่สุด เท่ากับ 10.95 กรัม หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน ซึ่งกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ได้นั้น ประกอบด้วยเซลล์ 2 ลักษณะ คือ แบบที่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ และแบบที่มีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ชนิด compact callus และมีสีขาว (ภาพที่ 5C) แต่ที่ระดับความเข้มข้นของ BA และ NAA ที่ระดับอื่น ๆ พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณกลุ่มเซลล์แขวนลอยได้ปริมาณน้อยกว่า และกลุ่มเซลล์แขวนลอยมีสีเทาปนขาว ในขณะที่ชุดควบคุม คือ อาหารเหลวสูตร MS-B5 ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณการเพิ่มของกลุ่มเซลล์แขวนลอยน้อยที่สุด เท่ากับ 7.8 กรัม

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์แขวนลอยของ
เจตมูลเพลิงแดง หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 3 เดือน

สูตรอาหาร	น้ำหนักของกลุ่มเซลล์แขวนลอย (กรัม)				
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย
MS-B5 + 0.2 mg/l 2,4-D	7.8	8	7.8	7.6	7.8d ^{1/}
MS-B5 + 0.2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA	8.4	9.3	8.9	10.25	9.2c
MS-B5 + 0.2 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA	9.2	8.5	8.7	10.3	8.85c
MS-B5 + 0.2 mg/l 2,4-D + 1.5 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA	8.6	10.2	10	9	10.15b
MS-B5 + 0.2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA	11.7	9.5	9	9.1	10.95a
MS-B5 + 0.2 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA	9.5	9.7	10.2	10.3	9.93b
MS-B5 + 0.2 mg/l 2,4-D + 1.5 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA	10.1	10.2	10.8	11.1	9.05c

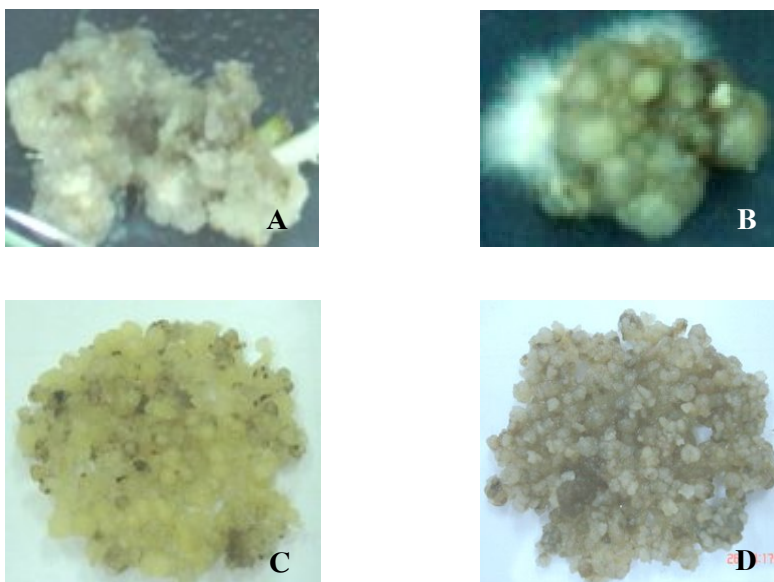
CV(%) = 4.79

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยอักษรเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ตามวิธีการวิเคราะห์
แบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

จากนั้นจึงได้เพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงขาว ในอาหารเหลวสังเคราะห์
สูตร MS-B5 ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม
ต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่สามารถเพาะเลี้ยงกลุ่ม
เซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงได้ดีที่สุด ผลการทดลองพบว่า กลุ่มเซลล์แขวนลอยของ
เจตมูลเพลิงขาวสามารถเจริญและเพิ่มปริมาณได้ดี แต่ลักษณะของกลุ่มเซลล์แขวนลอยมีขนาดไม่
สม่ำเสมอ คือ บางกลุ่มมีขนาดใหญ่และมีสีเทาปนสีขาว (ภาพที่ 5D)

จากผลการทดลองที่ระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกันมีผลทำ
ให้ความสามารถและประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณกลุ่มเซลล์แขวนลอยได้แตกต่างกัน มีรายงานว่า
NAA ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซินจะไปกระตุ้นทำให้เซลล์ของพืช
ขยายตัวและช่วยให้เกิดการแบ่งเซลล์ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมักใช้ ออกซินร่วมกับ
ไซโตไคนิน เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสและเซลล์แขวนลอย (Minocha, 1987) ซึ่ง Skoog and Miller
(1967) กล่าวว่า การพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชขึ้นขึ้นอยู่กับความสมดุลของออกซินและไซโตไคนิน
โดยพบว่าถ้าอัตราส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูงกว่าอัตราสมดุล เนื้อเยื่อพืชจะเจริญและพัฒนา

เป็นแคลลัสและสามารถเพิ่มปริมาณได้ ซึ่งการเติมออกซินและไซโตไคนินในสัดส่วนที่เหมาะสมกับพืชจะทำให้การเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณดีกว่าการใช้ ออกซินหรือไซโตไคนินอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว



ภาพที่ 5 ลักษณะของแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนข้อที่มีตาข้างเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS-B5 และเติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น เวลา 45 วัน และลักษณะของกลุ่มเซลล์แขวนลอยเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS-B5 ที่เติม 2,4-D 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น เวลา 45 วัน

A : ลักษณะแคลลัสของเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.)

B : ลักษณะแคลลัสของเจตมูลเพลิงขาว (*P. zeylanica* L.)

C : ลักษณะกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดง

D : ลักษณะกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงขาว

2. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่จากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว

2.1 การศึกษาการชักนำให้เกิดต้นใหม่จากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดง

การทดลองศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำต้นใหม่จากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวนั้น ในขั้นตอนแรกได้ทำการทดลองเฉพาะในส่วนของแคลลัสของเจตมูลเพลิงแดง เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการทดลองต่อไป จากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อที่มีตาข้างของเจตมูลเพลิงแดงบนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัส นาน 6 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิด compact callus มีลักษณะกลม ผิวเรียบ แข็ง สีเทา แล้วย้ายแคลลัส ประมาณ 0.5 กรัม มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS-B5 ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติของการพัฒนาของแคลลัสเจตมูลเพลิงแดงเป็นต้นใหม่ พบว่าแต่ละสูตรอาหารให้ผลการเกิดต้นใหม่ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) (ตารางที่ 4) โดยที่ระดับความเข้มข้นของ BA ที่ 2, 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสจะเริ่มเกิดต้นใหม่หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 3 เดือน โดยแคลลัสจะเปลี่ยนจากสีเทาเป็นสีเขียว หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 1 เดือน (ภาพที่ 6A) จากนั้นพัฒนาเป็นตายอดสีแดง หลังจากเพาะเลี้ยง นาน 2 เดือน (ภาพที่ 6B) ตายอดจะเริ่มพัฒนาเป็นต้นใหม่ ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 3 เดือน (ภาพที่ 6C) และหลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 5 เดือน สามารถชักนำต้นใหม่เฉลี่ยเท่ากับ 0.25, 10 และ 14.75 ต้นตามลำดับ (ตารางที่ 4) ดังนั้นในการทดลองต่อไป จึงใช้ระดับความเข้มข้นของ BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารสำหรับการชักนำต้นใหม่ ส่วนที่ระดับความเข้มข้นของ BA 0 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้แต่แคลลัสมีการพัฒนาเกิดเป็นราก

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้แคลลัสของเจตมูลเพลิงแดง
พัฒนาเป็นต้น หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 5 เดือน

สูตรอาหาร	จำนวนต้นใหม่ของเจตมูลเพลิงแดง (ต้น)				
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย
MS-B5 + 0 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA	0	0	0	0	0c ^{1/}
MS-B5 + 1.0 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA	0	0	0	0	0c
MS-B5 + 2.0 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA	1	0	0	0	0.25c
MS-B5 + 3.0 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA	10	9	10	11	10b
MS-B5 + 4.0 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA	16	14	13	16	14.75a

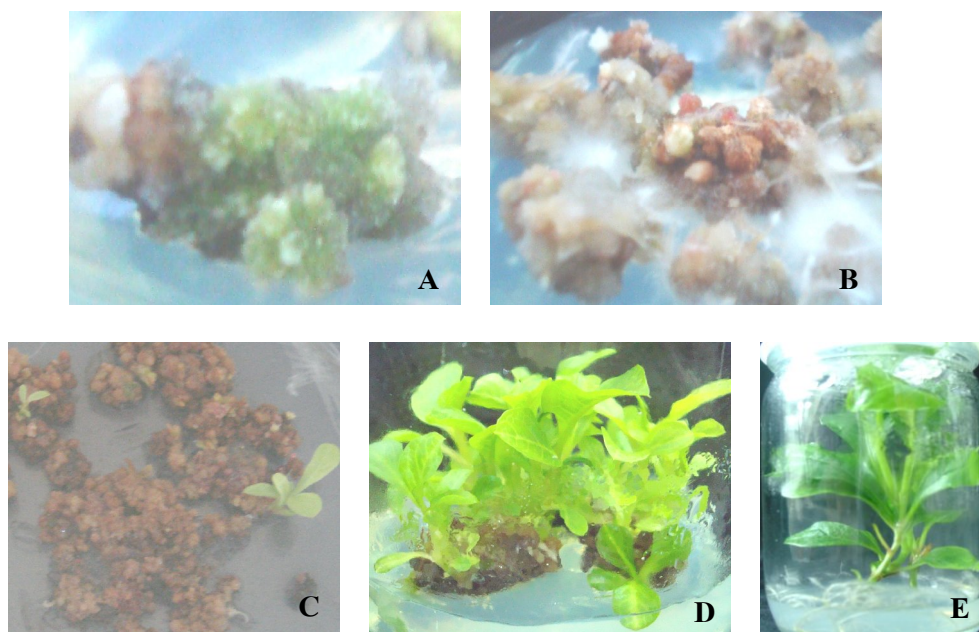
CV(%) = 15.91

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ตามวิธีการวิเคราะห์
แบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

แคลลัสจัดเป็นเซลล์ที่เป็น non-differentiated และเป็น non-organized เมื่อมีการปรับเปลี่ยน
สมดุลและสัดส่วนในอาหารเพาะเลี้ยงให้เหมาะสม ทำให้แคลลัสกลับสภาพไปเป็นโครงสร้างหรือ
ส่วนต่าง ๆ ของพืชได้ และพบว่าต้นใหม่ที่ได้ไม่มีรากจึงต้องย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร
MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อให้เกิดรากและพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 6E)
เนื่องจากการพัฒนาของเซลล์ไปเป็นต้นนั้นเป็นไปในแบบออร์แกโนเจเนซิส (organogenesis) ซึ่ง
เป็นการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อไปในทิศทางเดียว (unipolar) (สิรินุช, 2540) การใช้ระดับความ
เข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโตไคนินในระดับที่สูงขึ้นจะกระตุ้นการ
เจริญเติบโตของพืชในส่วนของกระบวนการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง กระตุ้นการเกิดยอดและ
แตกตาข้างแต่จะมีผลยับยั้งการเกิดราก (Hu and Wang, 1983) เช่นเดียวกับการทดลองอื่น ๆ เช่น
การชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว (Kumar and
Bhavanandan, 1988; Rout, 2002; Sivanesan, 2007) และการชักนำให้เกิดต้นจากใบของเจตมูลเพลิง
แดงและเจตมูลเพลิงขาว (Das and Rout, 2002) พืชที่ได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของ
ไซโตไคนินในปริมาณที่สูงอาจมีผลกระตุ้นสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ส่งต่อไปใน
อาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งจะสัมพันธ์กับปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตภายในเนื้อเยื่อ โดยเนื้อเยื่อที่
มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดหนึ่งสูงก็มีความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด
นั้นต่ำ เพื่อให้เกิดความสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตภายในชิ้นของเนื้อเยื่อ (ไพบูลย์,

2524) และการใช้ NAA ร่วมกับ BA มีผลต่อการเกิดยอดดีกว่าการใช้ NAA หรือ BA เพียงอย่างเดียว Miller and Skoog (1953) กล่าวว่า การพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชเป็นต้นหรือรากนั้นขึ้นอยู่กับความสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 กลุ่ม คือ ออกซินและไซโตไคนิน โดยพบว่าถ้าอัตราส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูงกว่าอัตราสมดุลเนื้อเยื่อพืชจะเจริญและพัฒนาเป็นแคลลัส แต่ถ้าอัตราส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินต่ำกว่าอัตราสมดุลเนื้อเยื่อพืชจะพัฒนาเป็นยอด แต่ถ้าอัตราส่วนของออกซินและไซโตไคนินสมดุลกันเนื้อเยื่อพืชจะเจริญและพัฒนาเป็นยอดและราก

การชักนำให้เกิดต้นใหม่จากกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดง ทำโดยการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์แขวนลอยบนอาหารแข็งสูตรชักนำต้น ที่ประกอบด้วยอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS-B5 ที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่สามารถชักนำต้นใหม่จากแคลลัสของเจตมูลเพลิงแดงได้ดีที่สุด ผลการทดลองพบว่า กลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้จำนวนมาก โดยการเจริญและพัฒนาของกลุ่มเซลล์แขวนลอยไปเป็นต้นใหม่นั้น มีการเจริญและพัฒนาเช่นเดียวกับการทดลองในส่วน of แคลลัส



ภาพที่ 6 การพัฒนาของแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS-B5 ที่เติม BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

A : แคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยเปลี่ยนจากสีเทาเป็นสีเขียว หลังเพาะเลี้ยงนาน 1 เดือน

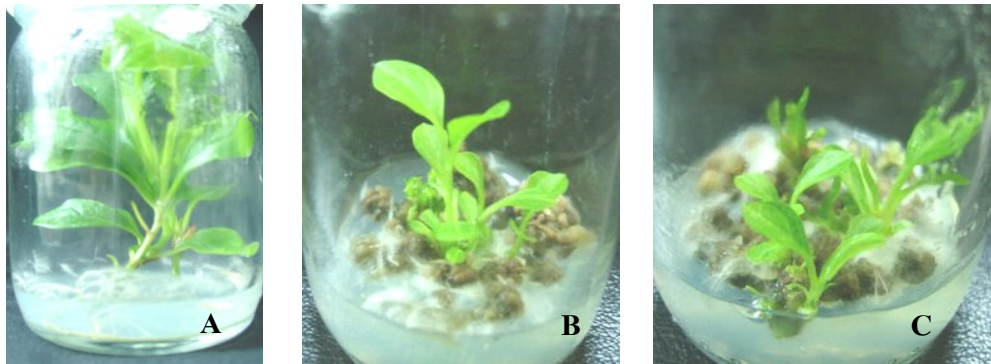
B : แคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยพัฒนาเป็นตายอดสีแดง หลังเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน

C : ตายอดจะเริ่มพัฒนาเป็นต้นใหม่ หลังเพาะเลี้ยงนาน 3 เดือน

D : ต้นใหม่ของเจตมูลเพลิงแดง หลังเพาะเลี้ยงนาน 5 เดือน

E : ต้นเจตมูลเพลิงแดงที่เพาะเลี้ยงบนสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต นาน 45 วัน เพื่อชักนำให้เกิดราก

จากการศึกษาลักษณะของต้นใหม่ที่พัฒนาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของ
 เจตมูลเพลิงแดงที่อยู่ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 7) พบว่า ต้นที่พัฒนาจากแคลลัสและกลุ่ม
 เซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงมีลักษณะของรูปร่างใบ สีใบ และลำต้น ไม่แตกต่างจากต้น
 ปกติที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อโดยไม่ผ่านแคลลัส



ภาพที่ 7 ลักษณะของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอย

A : ต้นควบคุม

B : ต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจากแคลลัส

C : ต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจากกลุ่มเซลล์แขวนลอย

จากการศึกษาลักษณะของต้นใหม่ที่พัฒนาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของ
 เจตมูลเพลิงแดงที่ออกปลูกในกระถางนาน 6 เดือน (ภาพที่ 8) พบว่า ต้นที่พัฒนาจากแคลลัสและ
 กลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงมีลักษณะของรูปร่างใบ ขนาดใบ สีใบ ลักษณะลำต้น และ
 การแตกกอ ไม่แตกต่างจากต้นปกติที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อโดยไม่ผ่านแคลลัส



ภาพที่ 8 ลักษณะของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอย
 ในสภาพออกปลูกในกระถาง เมื่ออายุ 6 เดือน
 A : ต้นควบคุม
 B : ต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจากแคลลัส
 C : ต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจากกลุ่มเซลล์แขวนลอย

จากการศึกษาลักษณะของรากจากต้นใหม่ที่พัฒนาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของ
 เจตมูลเพลิงแดงที่ออกปลูกในกระถางนาน 6 เดือน (ภาพที่ 9) พบว่า รากจากต้นที่พัฒนาจากแคลลัส
 และกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงมีลักษณะของรากเป็นสีน้ำตาล ขนาดของรากหลักมี
 เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.2-0.3 เซนติเมตร และจำนวนของรากหลักมากกว่ารากฝอย ซึ่งมี
 ลักษณะไม่แตกต่างจากต้นปกติที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อโดยไม่ผ่านแคลลัส



ภาพที่ 9 ลักษณะของรากของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอย
 ในสภาพออกปลูกในกระถาง เมื่ออายุ 6 เดือน

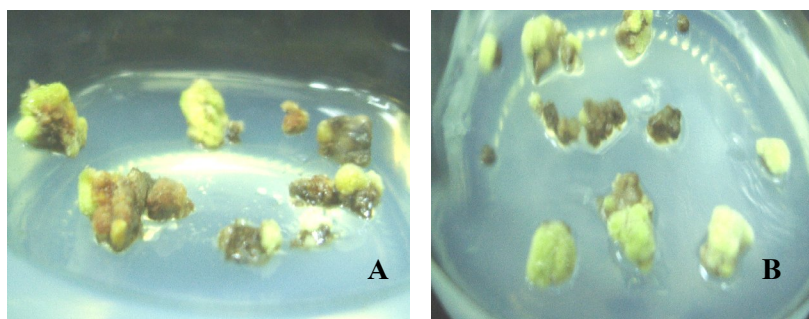
A : รากของต้นควบคุม

B : รากของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจากแคลลัส

C : รากของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจากกลุ่มเซลล์แขวนลอย

2.2 การศึกษาการชักนำให้เกิดต้นใหม่จากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของ เจตมูลเพลิงขาว

การชักนำให้เกิดต้นใหม่จากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงขาว ทำโดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยบนอาหารแข็งสูตรชักนำต้น ที่ประกอบด้วยอาหารแข็งสูตร MS-B5 ที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่สามารถชักนำต้นใหม่จากแคลลัสของเจตมูลเพลิงแดงได้มากที่สุด ผลการทดลองพบว่า แคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงขาวไม่สามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ แต่แคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยมีการพัฒนาเปลี่ยนจากสีเทาเป็นสีเขียว หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 1 เดือน (ภาพที่ 10) และไม่สามารถพัฒนาต่อเป็นกลุ่มของตายอดได้ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่างชนิดกันอาจมีการตอบสนองต่อชนิดและระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน (สิวพงศ์, 2546) ส่งผลให้แคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยมีการพัฒนาที่ต่างกัน ดังนั้นจึงไม่สามารถทำการศึกษาปริมาณสาร plumbagin และการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคเอฟแอลพีของเจตมูลเพลิงขาวในการทดลองต่อไปได้



ภาพที่ 10 การพัฒนาของแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงขาว

(*Plumbago zeylanica* L.) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS-B5 ที่เติม BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

A : แคลลัสเปลี่ยนจากสีเทาเป็นสีเขียว หลังเพาะเลี้ยงนาน 1 เดือน

B : กลุ่มเซลล์แขวนลอยเปลี่ยนจากสีเทาเป็นสีเขียว หลังเพาะเลี้ยงนาน 1 เดือน

3. ศึกษาผลของสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) ที่มีผลต่อแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของ เจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว

3.1 ศึกษาผลของสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) ที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของแคลลัส และกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว

จากการทดลองให้สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0-2% (โดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ต่อแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอย 0.5 กรัม จากนั้นเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำต้นใหม่เป็นเวลา 20 วัน วัดการเพิ่มปริมาณโดยการชั่งน้ำหนักของแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยในแต่ละหน่วยทดลองเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ระดับความเข้มข้นของสาร EMS และระยะเวลาการให้สาร มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของทั้งเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว โดยให้ผลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) (ตารางที่ 5-8) ซึ่งแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของทั้งเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว มีการเพิ่มปริมาณที่ลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นของสาร EMS และระยะเวลาการให้สารนานขึ้น ซึ่งการให้สารละลาย EMS กับส่วนของแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยในสภาพเขย่าส่งผลให้แคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยสามารถดูดซึมสารละลาย EMS ได้ทั่วทั้งผิวเซลล์

สมปอง และวิทยา (2542) รายงานว่าภายในก้อนโนดูลาแคลลัสของมังคุดประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญที่ยังมีกิจกรรมการแบ่งเซลล์ที่สูง ดังนั้นเมื่อผ่านการให้สารละลาย EMS จึงทำให้โนดูลาทำลายเป็นจำนวนมาก สอดคล้องกับการทดลองให้สารละลาย EMS กับเมอร์สเต็มมาติกโนดูลาแคลลัสของหน้ว้ว พบว่าที่ความเข้มข้นของสาร EMS 1.0% และ 0.75% ทำให้ก้อนแคลลัสโนดูลาทำลายและมีลักษณะสีขาวมากกว่าที่ความเข้มข้น 0.5% และ 0.25% ดังนั้นเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงจึงมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ (สมปอง และธัญญาพร, 2548) และระยะเวลาในการให้สารก็มีส่วนสำคัญต่อการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อทดลองเช่นกัน ดังรายงานของ Lee and Lee (2002) ที่ชักนำการกลายพันธุ์ของข้าวโพด โดยใช้แคลลัสที่ชักนำจากกลองเฮอร์ และให้สาร EMS ที่ความเข้มข้น 0.5% นาน 10 และ 20 วัน พบว่ามีอาการ chlorosis ที่รุนแรงและได้แคลลัสที่มีลักษณะเหี่ยวมากขึ้น เช่นเดียวกับ Luan *et al.* (2007) ที่ได้ทดลองให้สาร EMS กับแคลลัสของมันเทศ (sweet potato) ที่ระดับความเข้มข้น 0.5% นาน 0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 ชั่วโมง พบว่า ที่ระยะเวลานาน 3.0 ชั่วโมง สาร EMS แสดงความเป็นพิษกับเซลล์มากที่สุด

ตารางที่ 5 การเพิ่มปริมาณโดยเฉลี่ยของแคลลัสเจมมูลเพลิงแดงที่ได้รับสาร EMS
ความเข้มข้น 0-2% ร่วมกับระยะเวลาการให้สารนาน 60 และ 90 นาที

ความเข้มข้น EMS (%)	น้ำหนักแคลลัส (กรัม)		ความเข้มข้น EMS (%)	น้ำหนักแคลลัส (กรัม)	
	60 นาที	90 นาที		60 นาที	90 นาที
0	0.78a ^{1/}	0.78a	1.2	0.65de	0.58g
0.2	0.73bf	0.73bf	1.4	0.53i	0.63e
0.4	0.85c	0.68df	1.6	0.75ab	0.70df
0.6	0.63de	0.73bf	1.8	0.70df	0.63e
0.8	0.63e	0.70f	2.0	0.65de	0.43j
1.0	0.58g	0.48h			

CV (%) = 4.65

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ตามวิธีการวิเคราะห์แบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 6 การเพิ่มปริมาณโดยเฉลี่ยของกลุ่มเซลล์แขวนลอยเจมมูลเพลิงแดงที่ได้รับสาร
EMS ความเข้มข้น 0-2% ร่วมกับระยะเวลาการให้สารนาน 60 และ 90 นาที

ความเข้มข้น EMS (%)	น้ำหนักกลุ่มเซลล์แขวนลอย (กรัม)		ความเข้มข้น EMS (%)	น้ำหนักกลุ่มเซลล์แขวนลอย (กรัม)	
	60 นาที	90 นาที		60 นาที	90 นาที
0	0.70af ^{1/}	0.50b	1.2	0.63d	0.58g
0.2	0.78c	0.60dg	1.4	0.63d	0.40h
0.4	0.85e	0.78c	1.6	0.43h	0.50b
0.6	0.70a	0.50b	1.8	0.40h	0.30i
0.8	0.78c	0.78c	2.0	0.40h	0.30i
1.0	0.68a	0.73f			

CV (%) = 4.52

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ตามวิธีการวิเคราะห์แบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 7 การเพิ่มปริมาณโดยเฉลี่ยของแคลลัสเจมมูลเพลิงขาวที่ได้รับสาร EMS
ความเข้มข้น 0-2% ร่วมกับระยะเวลาการให้สารนาน 60 และ 90 นาที

ความเข้มข้น EMS (%)	น้ำหนักแคลลัส (กรัม)		ความเข้มข้น EMS (%)	น้ำหนักแคลลัส (กรัม)	
	60 นาที	90 นาที		60 นาที	90 นาที
0	0.70af ^{1/}	0.50b	1.2	0.63d	0.58g
0.2	0.78c	0.60dg	1.4	0.63d	0.40h
0.4	0.85e	0.78c	1.6	0.43h	0.50b
0.6	0.70af	0.50b	1.8	0.40h	0.30i
0.8	0.78c	0.78c	2.0	0.40h	0.30i
1.0	0.68a	0.73f			

CV (%) = 3.63

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ตามวิธีการวิเคราะห์แบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 8 การเพิ่มปริมาณโดยเฉลี่ยของกลุ่มเซลล์แขวนลอยเจมมูลเพลิงขาวที่ได้รับสาร
EMS ความเข้มข้น 0-2% ร่วมกับระยะเวลาการให้สารนาน 60 และ 90 นาที

ความเข้มข้น EMS (%)	น้ำหนักกลุ่มเซลล์แขวนลอย (กรัม)		ความเข้มข้น EMS (%)	น้ำหนักกลุ่มเซลล์แขวนลอย (กรัม)	
	60 นาที	90 นาที		60 นาที	90 นาที
0	0.68ac ^{1/}	0.60b	1.2	0.60b	0.56bf
0.2	0.70ae	0.67ac	1.4	0.58bf	0.55f
0.4	0.75de	0.70ae	1.6	0.50gh	0.50gh
0.6	0.76de	0.65ce	1.8	0.48hj	0.43ik
0.8	0.68ac	0.60b	2.0	0.45ij	0.40k
1.0	0.73de	0.70ae			

CV (%) = 4.77

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ตามวิธีการวิเคราะห์แบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

3.3 ศึกษาผลของสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) ที่มีผลต่อการเกิดต้นใหม่จากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว

การศึกษาผลของสาร (EMS) ที่มีต่อการเกิดต้นใหม่จากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว จากการให้สารละลาย EMS เข้มข้น 0-2% (โดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอย หนักประมาณ 0.5 กรัม เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรชักนำต้น ที่ประกอบด้วยอาหารแข็งสูตร MS-B5 ที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่สามารถชักนำต้นใหม่จากแคลลัสของเจตมูลเพลิงแดงได้มากที่สุด

ผลการทดลองพบว่า สามารถชักนำต้นใหม่จากแคลลัสของเจตมูลเพลิงแดงที่ได้รับสาร EMS จำนวนทั้งหมด 95 ต้น (ตารางที่ 9) และจากกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดง จำนวนทั้งหมด 99 ต้น (ตารางที่ 10) แต่ไม่สามารถชักนำต้นใหม่จากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงขาวได้ ซึ่งอาจเป็นผลต่อเนื่องมาจากการทดลองชักนำต้นจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ไม่ได้รับสาร EMS และมีบางหน่วยทดลองของเจตมูลเพลิงแดงไม่สามารถชักนำต้นใหม่ได้ อาจเกิดจากการสุ่มตัวอย่างเนื้อเยื่อมาทำการทดลองซึ่งได้ส่วนของ friable callus มากกว่า compact callus ทำให้ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ โดย Liu *et al.* (1998) กล่าวว่า ขนาดของกลุ่มเซลล์ส่งผลต่อการชักนำให้เกิดต้น โดยกลุ่มเซลล์เมื่อมีขนาดเล็กจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการเกิด somatic embryo ลดลง และการให้สาร EMS กับแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ระดับความเข้มข้นหนึ่งนั้น ผลของสาร EMS อาจกระตุ้นให้แคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยมีการพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดีขึ้น เช่นเดียวกับผลของสาร 2,4-D ซึ่งทางการเกษตรใช้เป็นสารปราบวัชพืช แต่ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชใช้เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซิน ซึ่งเมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมกับพืชชนิดนั้นก็สามารถกระตุ้นให้มีการเพิ่มปริมาณของเซลล์หรือถ้าใช้ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโตไคนินก็สามารถกระตุ้นให้มีการพัฒนาเป็นต้นหรือรากได้

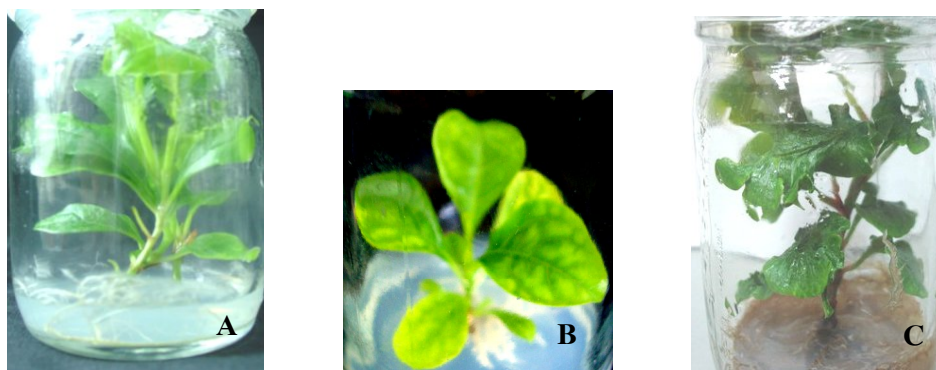
ตารางที่ 9 จำนวนต้นใหม่ที่พัฒนาจากแคลิซของเจตมูลเพลิงแดงที่ได้รับสาร EMS
ความเข้มข้น 0-2% ระยะเวลาการให้สารนาน 60 และ 90 นาที

ความเข้มข้น EMS (%)	จำนวนต้นใหม่ (ต้น)		ความเข้มข้น EMS (%)	จำนวนต้นใหม่ (ต้น)	
	60 นาที	90 นาที		60 นาที	90 นาที
0	0	0	1.2	4	0
0.2	0	0	1.4	0	31
0.4	2	4	1.6	9	13
0.6	0	0	1.8	7	7
0.8	0	0	2.0	19	11
1.0	0	0			

ตารางที่ 10 จำนวนต้นใหม่ที่พัฒนาจากกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงที่ได้รับสาร EMS
ความเข้มข้น 0-2% ระยะเวลาการให้สารนาน 60 และ 90 นาที

ความเข้มข้น EMS (%)	จำนวนต้นใหม่ (ต้น)		ความเข้มข้น EMS (%)	จำนวนต้นใหม่ (ต้น)	
	60 นาที	90 นาที		60 นาที	90 นาที
0	0	0	1.2	0	0
0.2	0	4	1.4	0	0
0.4	23	0	1.6	3	2
0.6	0	14	1.8	3	8
0.8	2	28	2.0	12	0
1.0	0	0			

จากการศึกษาลักษณะของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ได้รับสาร EMS พบว่าต้นใหม่ที่อยู่ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีลักษณะใบด่างเหลืองจำนวนมาก (ภาพที่ 11B) และมีลักษณะใบหงิกจำนวน 1 ต้น พัฒนามาจากแคลลัสที่ได้รับสาร EMS (ภาพที่ 11C) ซึ่งเป็นลักษณะที่แตกต่างจากต้นปกติ (ภาพที่ 11A) ลักษณะเหล่านี้ อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงในระดับเบส โดยเบสตัวใดตัวหนึ่งอาจเปลี่ยนแปลงไปในรูปแบบที่เรียกว่า point mutation และเบสดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้างกรดอะมิโนหรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างรงควัตถุ ซึ่งเป็นลักษณะคุณภาพ ควบคุมด้วยยีนน้อยคู่ และไม่มี ความซับซ้อนในการแสดงออก (สมปอง และ รัชญาพร, 2548) หรืออาจเกิดจากความเสียหายอันเป็นผลมาจากพิษของสาร EMS ที่เรียกว่า physiological damage ก็ได้



ภาพที่ 11 ลักษณะของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ได้รับสาร EMS ในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

A : ต้นควบคุม

B และ C : ต้นที่พัฒนามาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ได้รับสาร EMS แสดงลักษณะใบด่างเหลือง และใบหงิก ตามลำดับ

จากการศึกษาลักษณะของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ได้รับสาร EMS จำนวน 60 ต้น ที่ออกปลูกในกระถาง พบลักษณะใบหจิก 1 ต้น พัฒนามาจากแคลลัสที่ได้รับสาร EMS (ภาพที่ 12B) ใบม้วนเป็นกรวย 1 ต้น พัฒนามาจากกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ได้รับสาร EMS (ภาพที่ 12C) ใบขนาดใหญ่และไม่แตกกอ 5 ต้น พัฒนามาจากกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ได้รับสาร EMS (ภาพที่ 12D) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนั้นคล้ายกับการทดลองอื่น ๆ ซึ่งมีรายงานว่า ต้นมะเขือเทศที่พัฒนามาจากเมล็ดที่ผ่านการให้สาร EMS มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น ดอกมีสีเหลืองเข้ม แตกกิ่งก้านมาก ผลมีขนาดเล็ก ลักษณะผลยาว ใบมีสีเขียวเข้มหรืออ่อนกว่าปกติ และได้ต้นเผือก (Watanabe *et al.*, 2007) การพบลักษณะใบของต้นชวนชมที่พัฒนามาจากเมล็ดที่ได้รับสาร EMS มีรูปร่างผิดปกติ และมีเส้นกลางใบสองเส้น (Wongsawad *et al.*, 2005) หรือพบลักษณะใบต่าง ทั้งที่ต่างเป็นบางส่วน ต่างทั้งใบ ต่างกระจายทั่วใบ ใบติดกันเป็นจีบและบิดเบี้ยว ของต้นหน้าวัวพันธุ์โซเนตในรุ่นที่ 1 ซึ่งลักษณะผิดปกติเหล่านี้เกิดขึ้นเพียงรุ่นเดียว (ธัญญาพร และ สมปอง, 2547)



ภาพที่ 12 ลักษณะของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ได้รับสาร EMS ในสภาพออกปลูกในกระถาง เมื่ออายุ 6 เดือน

A : ต้นควบคุม

B : ต้นที่พัฒนามาจากแคลลัสที่ได้รับสาร EMS แสดงลักษณะใบหงิก

C และ D : ต้นที่พัฒนามาจากกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ได้รับสาร EMS แสดงลักษณะใบม้วนเป็นกรวยและใบใหญ่ ไม่แตกกอ ตามลำดับ

จากการศึกษาลักษณะของรากจากต้นใหม่ของเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ได้รับสาร EMS ที่ออกปลูกในกระถางนาน 6 เดือน (ภาพที่ 13) พบว่า รากจากต้นที่พัฒนาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงที่ได้รับสาร EMS มีลักษณะของรากเป็นสีน้ำตาล ขนาดของรากหลักมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.2-0.3 เซนติเมตร และจำนวนของรากหลักมากกว่ารากฝอย ซึ่งมีลักษณะไม่แตกต่างจากต้นปกติที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อโดยไม่ผ่านแคลลัส



ภาพที่ 13 ลักษณะรากของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ได้รับสาร EMS ในสภาพออกปลูกในกระถาง เมื่ออายุ 6 เดือน

A : รากของต้นควบคุม

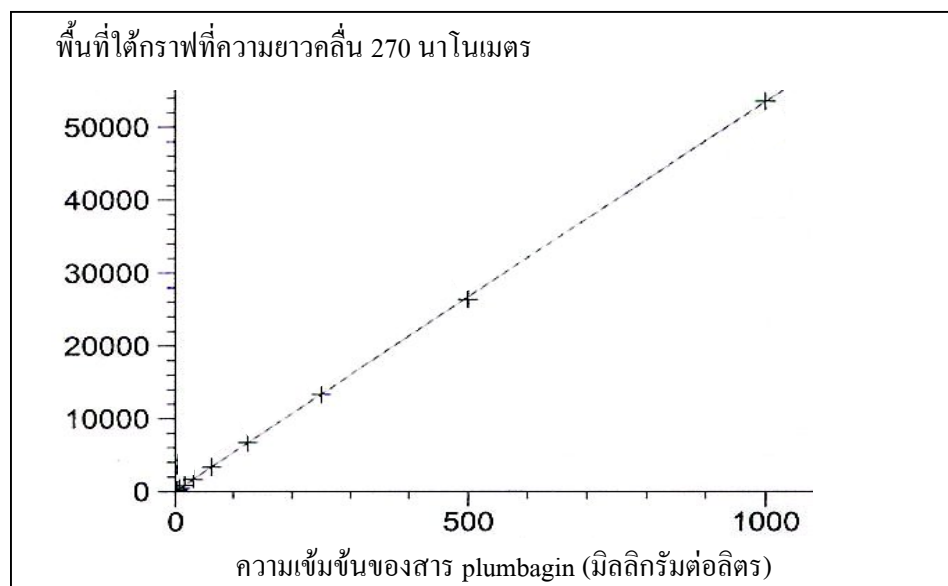
B : รากของต้นที่พัฒนามาจากแคลลัสที่ได้รับสาร EMS

C : รากของต้นที่พัฒนามาจากกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ได้รับสาร EMS

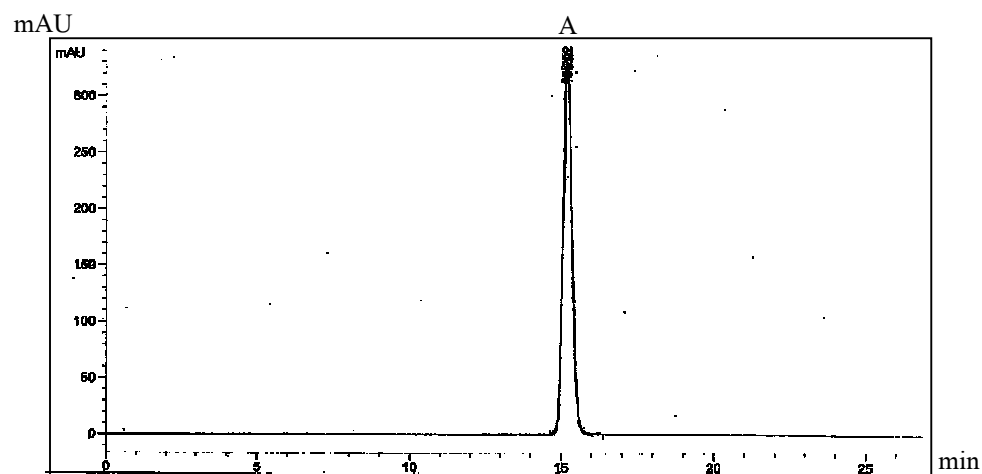
4. ศึกษาปริมาณสาร plumbagin จากรากของเจตมูลเพลิงแดงที่ชักนำได้จากแคลลัส

4.1 การทำ calibration curve ของ standard reference

การทำ calibration curve ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณ นับว่ามีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากจะทำให้สามารถแปลผลของพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ HPLC มาเป็นปริมาณสาร plumbagin ได้ในที่สุด โดยใช้สาร plumbagin มาตรฐาน (Sigma : catalog number P7262 a.i. 98 เปอร์เซนต์) ความเข้มข้น 0.5 1 2 4 8 16 32 64 125 250 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าพื้นที่ใต้กราฟ ซึ่งใช้เป็น calibration curve ของ plumbagin standard reference โดยมีสมการ linear regression คือ $y = mx + b$ โดย y คือ ค่าพื้นที่ใต้กราฟ (ตารางหน่วย) และ x คือ ค่าความเข้มข้นของสาร plumbagin (มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่เวลา plumbagin standard reference เลื่อยประมาณ 15 นาที ตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร ซึ่งจากการทดลองสามารถแทนค่าในสมการ linear regression ได้ดังนี้ $y = 53.2855x + (-18.87717)$ (correlation coefficient = 0.99997) ดังนั้นเมื่อทราบพื้นที่ใต้กราฟและเวลาของสารที่ได้จากการวิเคราะห์ HPLC ก็จะสามารถทราบถึงปริมาณสาร plumbagin จากการทดลองได้ (ภาพที่ 14 และ 15)



ภาพที่ 14 calibration curve ของ plumbagin standard reference (Sigma catalog number P7262 a.i. 98%)

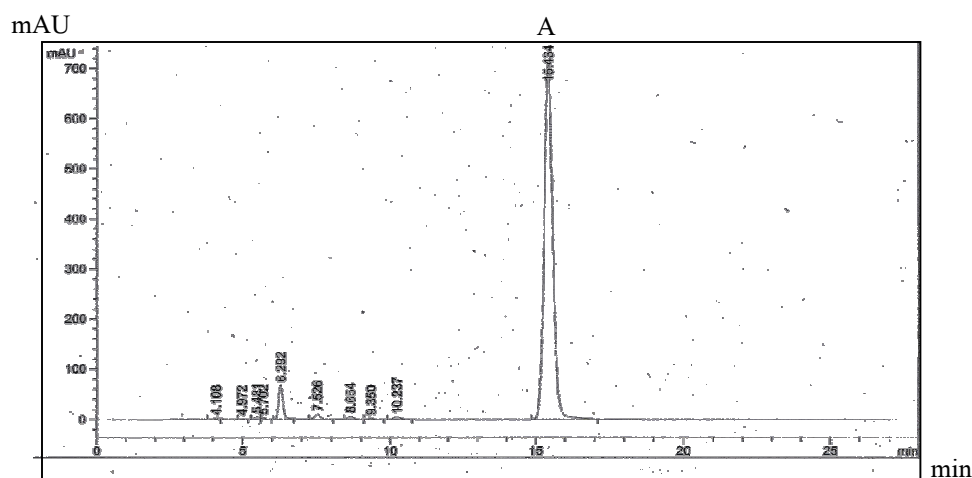


ภาพที่ 15 Chromatogram ของ plumbagin standard reference

A คือ peak ของสาร plumbagin

mAU คือ milli absorbent unit

min คือ นาที



ภาพที่ 16 Chromatogram ของ plumbagin จากต้นเจตมูลเพลิงแดง

A คือ peak ของสาร plumbagin

mAU คือ milli absorbent unit

min คือ นาที

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ด้วยวิธี HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ได้นำเสนอผลเฉพาะส่วนการทดลองของเจตมูลเพลิงแดงเท่านั้น เพราะเจตมูลเพลิงขาวไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ และได้ทำการทดลองเปรียบเทียบผลกับชุดควบคุม 2 ชุด เนื่องจากในขั้นตอนของการออกปลูกในกระถางได้ทำการทดลองต่างช่วงเวลา ซึ่งสามารถแบ่งการทดลอง ได้ดังนี้

ต้นเจตมูลเพลิงแดงที่ชักนำได้จากแคลลัส เปรียบเทียบกับชุดควบคุมชุด A ออกปลูกในกระถาง ตั้งแต่วันที่ 15 เดือนเมษายน – 15 เดือนตุลาคม 2550

ต้นเจตมูลเพลิงแดงที่ชักนำได้จากกลุ่มเซลล์แขวนลอย แคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอย ที่ได้รับสาร EMS เปรียบเทียบกับชุดควบคุมชุด B ออกปลูกในกระถาง ตั้งแต่วันที่ 15 เดือนมกราคม – 15 เดือนกรกฎาคม 2551

4.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin จากรากของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัส ด้วยวิธี HPLC

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ของต้นที่ชักนำได้จากแคลลัส ทั้งหมด 30 ต้น เปรียบเทียบผลกับชุดควบคุมชุด A ซึ่งเป็นต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อโดยไม่ผ่านแคลลัส ผลการทดลองพบว่า ปริมาณสาร plumbagin มีปริมาณแตกต่างกัน (ตารางที่ 11) โดยต้นที่ชักนำได้จากแคลลัสมีปริมาณสาร plumbagin สูงกว่าต้นควบคุม (control) ทั้งหมด 25 ต้น และต้นที่มีปริมาณสาร plumbagin ต่ำกว่าต้นควบคุม (control) ทั้งหมด 5 ต้น ต้นหมายเลข 8 มีปริมาณสารสูงสุด เท่ากับ 10.47 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และต้นหมายเลข 56 มีปริมาณสารต่ำสุด เท่ากับ 0.028 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ต้นควบคุมมีปริมาณสาร เท่ากับ 2.71 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

ตารางที่ 11 ปริมาณสาร plumbagin จากรากของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัส

ต้นที่	ปริมาณสาร plumbagin		ต้นที่	ปริมาณสาร plumbagin		ต้นที่	ปริมาณสาร plumbagin	
	มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	(%) ^{1/}		มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	(%)		มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	(%)
control	2.712	100	C18	6.374	235.03	C55	2.634	97.12
C2	6.419	236.69	C20	6.467	238.46	C56	0.028	1.03
C4	7.273	268.18	C21	3.299	121.64	C57	2.82	103.98
C6	9.202	339.31	C39	4.145	152.84	C59	3.184	117.40
C8	10.465	385.88	C42	7.349	270.98	C62	3.083	113.68
C11	8.568	315.93	C43	7.652	282.15	C68	1.517	55.94
C12	6.739	248.49	C45	3.624	133.63	C70	1.427	52.62
C13	7.278	268.36	C47	4.281	157.85	C79	5.216	192.33
C14	6.231	229.76	C48	7.245	267.15	C82	1.593	58.734
C15	3.674	135.47	C49	3.693	136.17			
C17	3.966	146.24	C52	3.02	111.36			

^{1/} ปริมาณสาร plumbagin เมื่อเทียบกับต้นควบคุม (control) โดยให้ต้นควบคุมเป็น 100%

4.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin จากรากของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาได้จากกลุ่มเซลล์แขวนลอย ด้วยวิธี HPLC

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ของต้นที่ชักนำได้จากกลุ่มเซลล์แขวนลอย ทั้งหมด 30 ต้น เปรียบเทียบผลกับชุดควบคุมชุด B ซึ่งเป็นต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อ ผลการทดลองพบว่า ปริมาณสาร plumbagin มีปริมาณแตกต่างกัน (ตารางที่ 12) โดยต้นที่ชักนำได้จากกลุ่มเซลล์แขวนลอยมีปริมาณสาร plumbagin สูงกว่าต้นควบคุม (control) ทั้งหมด 13 ต้น และต้นที่มีปริมาณสาร plumbagin ต่ำกว่าต้นควบคุม (control) ทั้งหมด 17 ต้น ซึ่งต้นหมายเลข 15 มีปริมาณสารสูงสุด เท่ากับ 1.044 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และต้นหมายเลข 47 มีปริมาณสารต่ำสุด เท่ากับ 0.31 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ต้นควบคุมมีปริมาณสาร เท่ากับ 0.493 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

ตารางที่ 12 ปริมาณสาร plumbagin จากรากของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากกลุ่มเซลล์แขวนลอย

ต้นที่	ปริมาณสาร plumbagin		ต้นที่	ปริมาณสาร plumbagin		ต้นที่	ปริมาณสาร plumbagin	
	มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	(%) ^{1/}		มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	(%)		มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	(%)
control	0.493	100	S19	0.533	108.11	S35	0.368	74.65
S4	0.661	134.08	S21	0.385	78.09	S36	0.453	91.89
S5	0.368	74.65	S24	0.32	64.91	S38	0.631	127.99
S8	0.47	95.33	S25	0.429	87.02	S39	0.875	177.48
S9	0.535	108.52	S26	0.539	109.33	S40	1.04	210.95
S10	0.461	93.51	S27	0.419	84.99	S41	0.31	62.880
S11	0.492	99.80	S28	0.466	94.52	S42	0.455	92.29
S12	0.321	65.11	S29	0.457	92.70	S45	0.595	120.69
S14	0.551	111.769	S30	0.512	103.85	S46	0.479	97.16
S15	1.044	211.76	S31	0.372	75.46			
S16	0.568	115.21	S32	0.323	65.52			

^{1/} ปริมาณสาร plumbagin เมื่อเทียบกับต้นควบคุม (control) โดยให้ต้นควบคุมเป็น 100%

4.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin จากรากของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัสที่ได้รับสาร EMS ด้วยวิธี HPLC

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ของต้นที่ชักนำได้จากแคลลัสที่ได้รับสาร EMS ทั้งหมด 60 ต้น เปรียบเทียบผลกับชุดควบคุมชุด B ซึ่งเป็นต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อ ผลการทดลองพบว่า ปริมาณสาร plumbagin มีปริมาณแตกต่างกัน (ตารางที่ 13) โดยต้นที่ชักนำได้จากแคลลัสมีปริมาณสาร plumbagin สูงกว่าต้นควบคุม (control) ทั้งหมด 49 ต้น และต้นที่มีปริมาณสาร plumbagin ต่ำกว่าต้นควบคุม (control) ทั้งหมด 11 ต้น ซึ่งต้นหมายเลข 69 มีปริมาณสารสูงสุด เท่ากับ 3.155 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และต้นหมายเลข 29 มีปริมาณสารต่ำสุด เท่ากับ 0.136 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ต้นควบคุมมีปริมาณสาร เท่ากับ 0.493 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

ตารางที่ 13 ปริมาณสาร plumbagin จากรากของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากเซลล์ที่ได้รับสาร EMS

ต้นที่	ปริมาณสาร plumbagin		ต้นที่	ปริมาณสาร plumbagin		ต้นที่	ปริมาณสาร plumbagin	
	มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	(%) ^{1/}		มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	(%)		มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	(%)
control	0.493	100	MC20	0.584	118.46	MC49	0.341	69.17
MC1	2.784	564.71	MC22	0.363	73.63	MC50	1.71	346.86
MC2	2.924	593.10	MC26	0.569	115.42	MC51	0.472	95.74
MC3	1.472	298.58	MC28	0.245	MC28	MC52	1.953	396.15
MC4	0.542	109.94	MC29	0.136	MC29	MC53	0.412	83.57
MC5	0.264	53.55	MC31	1.089	MC31	MC54	0.698	141.58
MC6	0.957	194.12	MC33	1.171	MC33	MC56	1.344	272.62
MC7	1.782	361.46	MC34	0.405	MC34	MC57	0.603	122.31
MC8	0.697	141.38	MC35	0.651	MC35	MC58	1.215	246.45
MC10	1.294	262.47	MC36	0.382	MC36	MC59	0.651	132.05
MC11	0.654	132.66	MC38	1.027	MC38	MC60	0.824	167.14
MC12	0.842	170.79	MC40	0.721	MC40	MC61	1.313	266.33
MC13	2.012	408.11	MC41	1.993	MC41	MC62	0.844	171.20
MC14	0.588	119.27	MC42	1.037	MC42	MC64	3.108	630.43
MC15	0.904	183.37	MC43	1.953	MC43	MC65	0.492	99.80
MC16	0.463	93.91	MC44	0.731	MC44	MC66	2.298	466.13
MC18	0.285	57.81	MC45	0.695	MC45	MC69	3.155	639.96
MC19	0.663	134.48	MC47	1.199	MC47	MC70	2.466	500.20

ตารางที่ 13 (ต่อ)

ต้นที่	ปริมาณสาร plumbagin		ต้นที่	ปริมาณสาร plumbagin		ต้นที่	ปริมาณสาร plumbagin	
	มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	(%) ^{1/}		มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	(%)		มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	(%)
MC72	2.146	435.29	MC76	2.736	554.97	MC79	0.746	151.32
MC73	0.763	154.77	MC77	3.1	628.80			
MC75	0.759	153.96	MC78	1.292	262.07			

^{1/} ปริมาณสาร plumbagin เมื่อเทียบกับต้นควบคุม (control) โดยให้ต้นควบคุมเป็น 100%

4.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin จากรากของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาได้จากกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ได้รับสาร EMS ด้วยวิธี HPLC

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ของต้นที่ชักนำได้จากกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ได้รับสาร EMS ทั้งหมด 60 ต้น เปรียบเทียบผลกับชุดควบคุมชุด B ซึ่งเป็นต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อ ผลการทดลองพบว่า ปริมาณสาร plumbagin มีปริมาณแตกต่างกัน (ตารางที่ 14) โดยต้นที่ชักนำได้จากกลุ่มเซลล์แขวนลอยมีปริมาณสาร plumbagin สูงกว่าต้นควบคุม (control) ทั้งหมด 59 ต้น และต้นที่มีปริมาณสาร plumbagin ต่ำกว่าต้นควบคุม (control) ทั้งหมด 1 ต้น ซึ่งต้นหมายเลข 25 มีปริมาณสารสูงสุด เท่ากับ 5.057 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และต้นหมายเลข 53 มีปริมาณสารต่ำสุด เท่ากับ 0.466 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ต้นควบคุม มีปริมาณสาร เท่ากับ 0.493 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

ตารางที่ 14 ปริมาณสาร plumbagin จากรากของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ได้รับสาร EMS

ต้นที่	ปริมาณสาร plumbagin		ต้นที่	ปริมาณสาร plumbagin		ต้นที่	ปริมาณสาร plumbagin	
	มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	(%) ^{1/}		มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	(%)		มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	(%)
control	0.493	100	MS24	1.466	297.36	MS44	1.513	306.9
MS3	4.22	855.98	MS25	5.057	1025.76	MS45	1.616	327.8
MS4	2.714	550.51	MS26	0.704	142.8	MS47	0.672	136.31
MS5	1.695	343.81	MS27	0.786	159.43	MS48	0.886	179.72
MS6	2.802	568.36	MS28	1.355	274.85	MS49	1.44	292.09
MS7	1.071	217.24	MS29	2.997	607.91	MS50	0.772	156.59
MS8	3.078	624.34	MS30	2.19	444.22	MS51	1.419	287.83
MS9	1.432	290.467	MS31	1.2	243.41	MS53	0.466	94.52
MS10	1.165	236.31	MS32	2.256	457.61	MS54	2.069	419.68
MS11	3.609	732.05	MS35	0.957	194.12	MS55	1.64	332.66
MS12	1.34	271.818	MS36	1.154	234.08	MS57	0.75	152.13
MS13	1.322	268.15	MS37	0.657	133.27	MS58	0.751	152.33
MS14	2.343	475.25	MS38	1.518	307.91	MS59	2.009	407.51
MS16	1.12	227.18	MS39	0.918	186.21	MS62	0.954	193.51
MS18	0.959	194.52	MS40	1.813	367.72	MS63	1.696	344.02
MS19	0.662	134.28	MS41	1.759	356.8	MS64	1.314	266.53
MS22	1.237	250.91	MS42	1.952	395.94	MS65	1.156	234.48
MS23	1.434	290.87	MS43	4.25	862.07	MS66	4.248	861.66

ตารางที่ 14 (ต่อ)

ต้นที่	ปริมาณสาร plumbagin		ต้นที่	ปริมาณสาร plumbagin		ต้นที่	ปริมาณสาร plumbagin	
	มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	(%) ^{1/}		มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	(%)		มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	(%)
MS67	0.683	138.54	MS70	1.65	334.69	MS73	1.328	269.37
MS68	1.38	279.92	MS71	1.7	344.83			
MS69	1.327	269.17	MS72	1.81	367.14			

^{1/} ปริมาณสาร plumbagin เมื่อเทียบกับต้นควบคุม (control) โดยให้ต้นควบคุมเป็น 100%

จากการทดลอง พบว่า ต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจากแคลัสขณะที่ออกปลูกในกระถางได้เกิดการระบาดของโรคแอนแทรคโนส ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Collectotricum* sp. ทำให้ต้นเจตมูลเพลิงแดงทุกต้นรวมทั้งต้นควบคุมแสดงอาการเป็นโรค และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin พบว่ามีสาร plumbagin สูงกว่าต้นเจตมูลเพลิงแดงที่ได้จากการทดลองอื่น ๆ ซึ่งเป็นไปได้ว่าเชื้อโรคที่เข้าทำลายพืชมีผลต่อกระบวนการสร้างและสะสมสาร plumbagin ของต้นเจตมูลเพลิงแดง รัตนา (2547) กล่าวว่า สารสำคัญในพืชส่วนใหญ่เป็นสารทุติยภูมิ โดยมีสารปฐมภูมิซึ่งเป็นผลผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์แสงเป็นสารตั้งต้น และสารทุติยภูมิในพืชชนิดต่าง ๆ ซึ่งเกิดจากกระบวนการ biosynthesis ที่มีเอนไซม์เข้ารวมนั้นไม่มีหน้าที่ที่แน่นอน และอาจจะไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช แต่พืชอาจสร้างขึ้นมาเพื่อตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นต่าง ๆ เช่น สภาพ stress ต่าง ๆ และเชื้อโรคต่าง ๆ ที่เข้าทำลายพืช และปริมาณของสารสำคัญที่พบในพืชสมุนไพรขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ เช่น สภาพแวดล้อมในการปลูก ฤดูกาลเก็บเกี่ยว ระยะเวลาที่เก็บพืช สภาพดิน สภาพอากาศ ปริมาณน้ำ ชนิดและปริมาณสัดส่วนของปุ๋ยและธาตุอาหารเสริม เป็นต้น ซึ่งมีรายงานที่เกี่ยวข้องกับการใช้เชื้อราและสารกระตุ้นต่าง ๆ เพื่อให้สร้างสาร plumbagin ได้มากขึ้น เช่น Komaraiah *et al.* (2002) ทดลองใช้ตัวกระตุ้นชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เชื้อรา 2 สายพันธุ์ คือ *Aspergillus niger* และ *Rhizopus oryzae* แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* ยีสต์ และไคโตซาน เพื่อกระตุ้นให้เซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงสร้างสาร plumbagin จากผลการทดลองพบว่า ไคโตซานสามารถกระตุ้นให้เซลล์แขวนลอยสร้างสาร plumbagin ได้สูงสุด ในขณะที่เชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ ก็สามารถกระตุ้นให้เซลล์แขวนลอยสร้างสาร plumbagin ได้เพิ่มขึ้นเช่นกัน

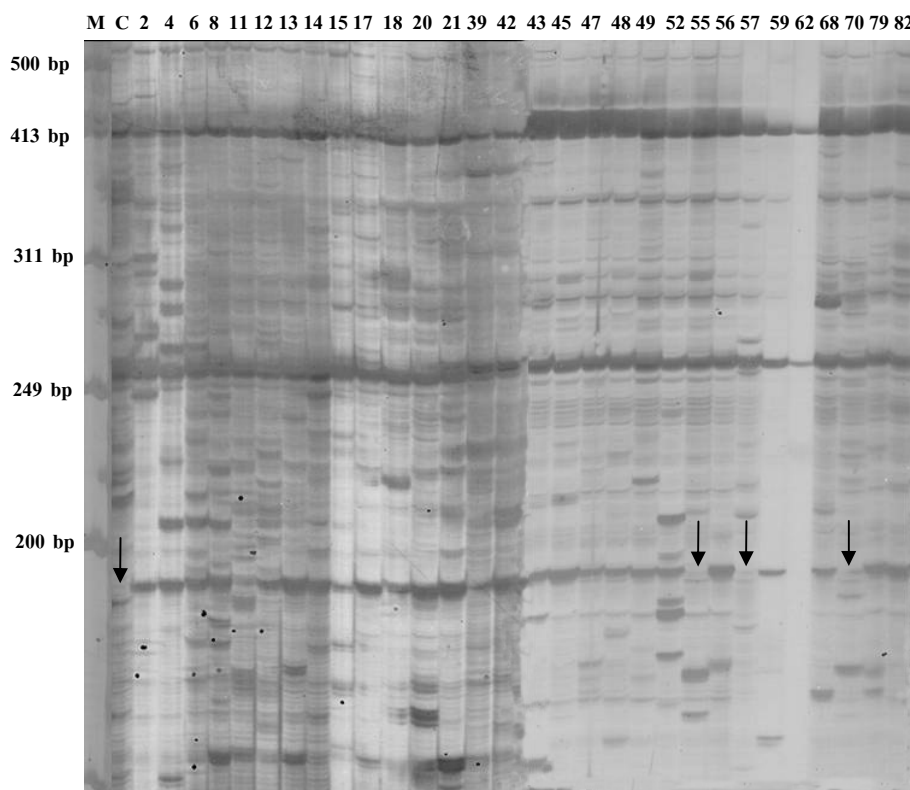
อีกสาเหตุหนึ่งที่ต้นเจตมูลเพลิงแดงในแต่ละการทดลองมีปริมาณสาร plumbagin แตกต่างกัน อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างและสังเคราะห์สาร plumbagin ทำให้การสังเคราะห์สารดังกล่าวในแต่ละต้นมีความแตกต่างกัน ซึ่งดีเอ็นเอเป็นรหัสหรือแบบพิมพ์ในการสร้าง และดีเอ็นเอเป็นรหัสเฉพาะตัวจะมีความแตกต่างกันมากหรือน้อยแล้วแต่สายพันธุ์ จากความจำเพาะที่มีอยู่ในชุดดีเอ็นเอแต่ละหน่วย เรียกว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) (สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, 2551)

5. ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่ชักนำได้จากแคลลัส และกลุ่มเซลล์แขวนลอยทั้งที่ได้รับและไม่ได้รับสาร EMS

เพื่อตรวจสอบความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่อาจเกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการพัฒนาเป็นต้น โดยผ่านแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอย หรืออาจเกิดจากการให้สาร EMS กับแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอย จึงตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคเอฟแอลพี โดยใช้คู่มือไพรเมอร์ทั้งหมด 8 คู่มือไพรเมอร์ (ตารางที่ 2) เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณจากขั้นตอน selective amplification มาแยกขนาดด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel แล้วย้อมเจลด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท จนปรากฏเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยแยกดังนี้

5.1 ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัส

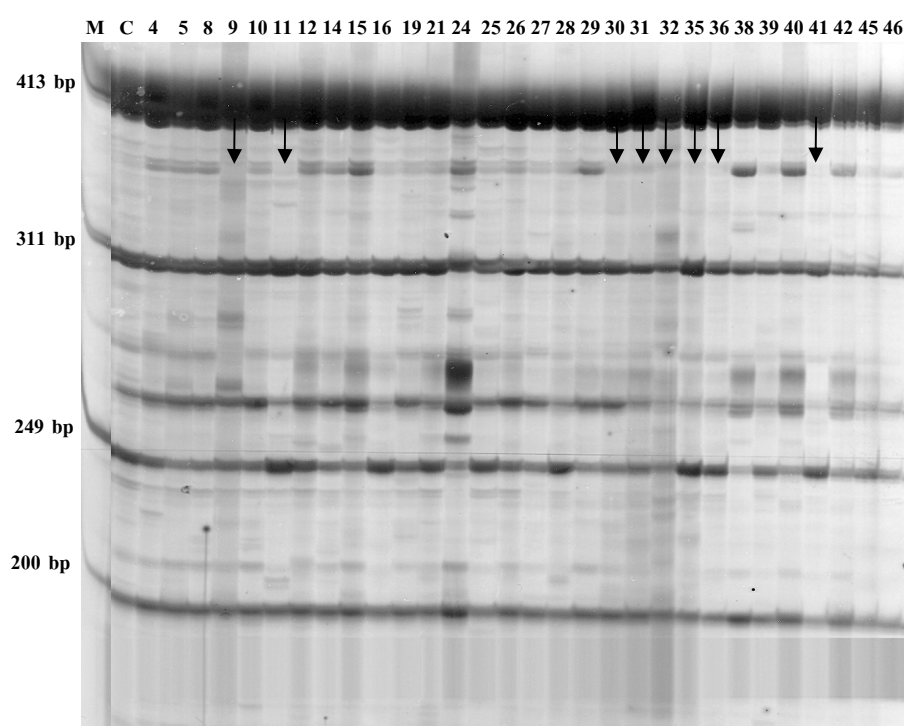
เมื่อพิจารณาแถบดีเอ็นเอที่เกิดจาก 8 คู่ไพรเมอร์ พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอที่เป็นแถบหลักทั้งหมด 44 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 38 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลิมอร์ฟิซึมจำนวน 6 แถบ คิดเป็น 13.64 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าต้นเจตมูลเพลิงแดงที่ชักนำได้จากแคลลัสนั้นมีการเปลี่ยนแปลงชนิดหรือลำดับของนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้น (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัส โดยใช้เทคนิคเอเฟลเจลฟี คู่ไพรเมอร์ E-GCA/M-GTA (M คือ Φ x174 DNA/*Hinf*I marker, C คือ ชุดควบคุม)

5.2 ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากกลุ่มเซลล์แขวนลอย

เมื่อพิจารณาแถบดีเอ็นเอที่เกิดจาก 8 คู่ไพรเมอร์ พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอที่เป็นแถบหลักทั้งหมด 129 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 109 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลิมอร์ฟิซึมจำนวน 20 แถบ คิดเป็น 15.50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าต้นเจตมูลเพลิงแดงที่ชักนำได้จากกลุ่มเซลล์แขวนลอยนั้นมีการเปลี่ยนแปลงชนิดหรือลำดับของนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้น (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากกลุ่มเซลล์แขวนลอย โดยใช้เทคนิคเอเฟลเจลที่ คู่ไพรเมอร์ E-GCA/M-GTA (M คือ *Ox174* DNA/*Hinf*I marker, C คือ ชุดควบคุม)

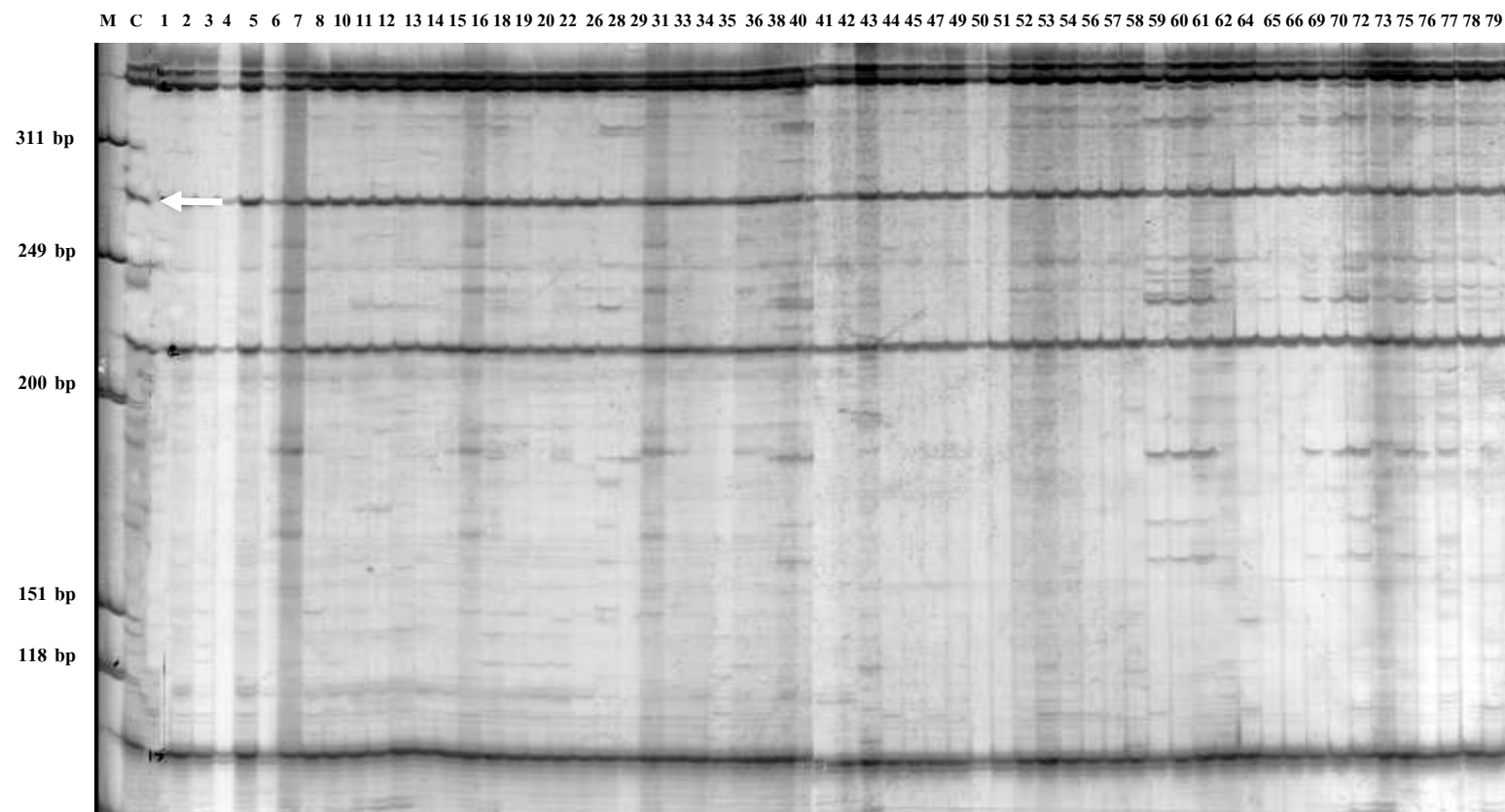
จากผลการทดลองศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอย พบว่าการใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถชักนำให้ได้ต้นพืชต้นใหม่ที่มีลักษณะของ somaclonal variation หรืออาจเกิดการกลายพันธุ์ได้ เช่นเดียวกับการตรวจสอบ somaclonal variation ในต้นมะเขือเทศที่พัฒนาได้จากแคลลัสด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ ทั้งหมด 20 คู่ ซึ่งมีไพรเมอร์ 10 คู่ ที่สามารถแยกความแตกต่างได้ (Soniya *et al.*, 2001)

5.3 ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัสที่ได้รับสาร EMS

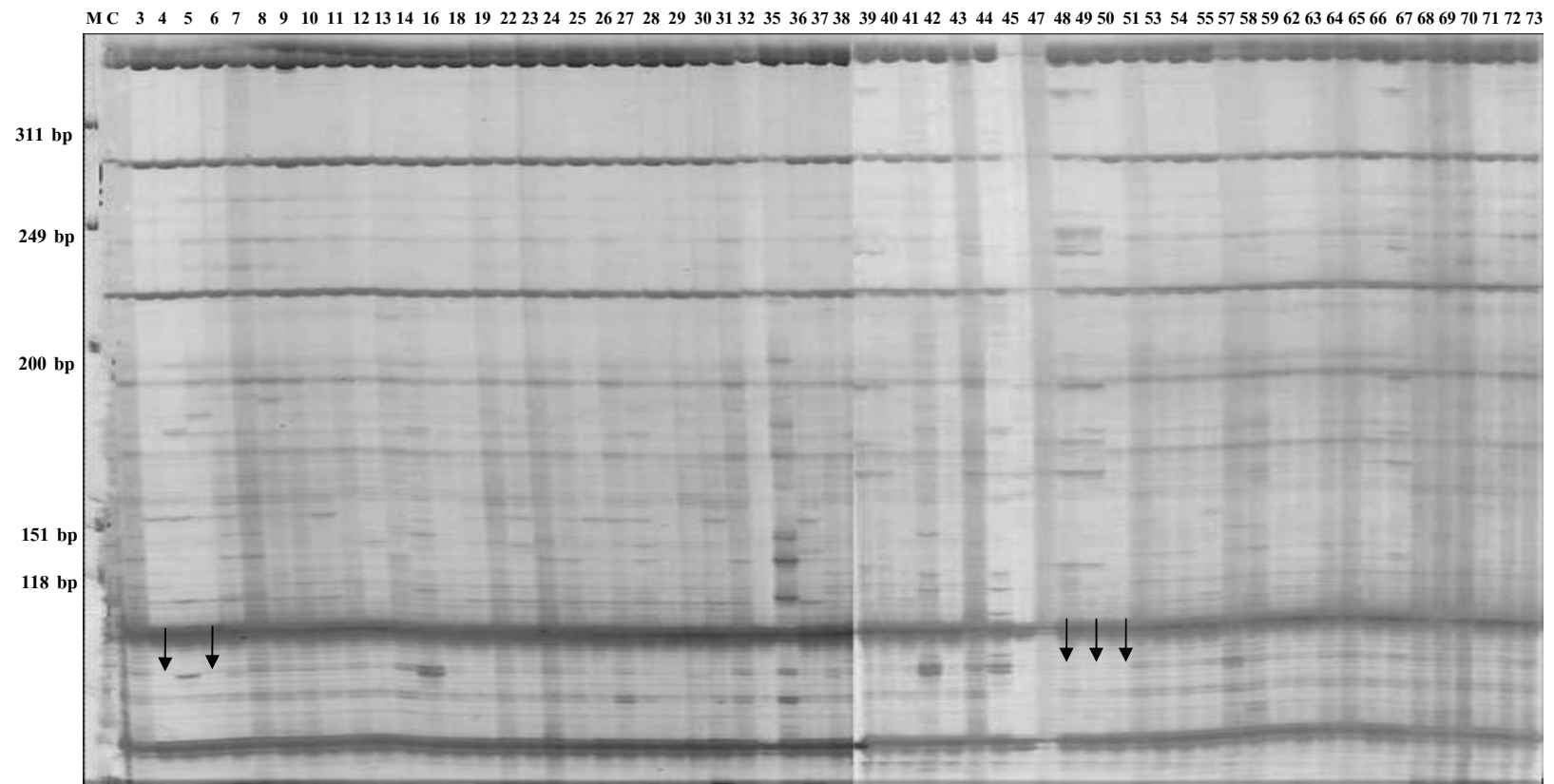
เมื่อพิจารณาแถบดีเอ็นเอที่เกิดจาก 8 คู่ไพรเมอร์ พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอที่เป็นแถบหลักทั้งหมด 64 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 55 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลิมอร์ฟิซึมจำนวน 9 แถบ คิดเป็น 14.06 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าต้นเจตมูลเพลิงแดงที่ชักนำได้จากแคลลัสที่ได้รับสาร EMS นั้นมีการเปลี่ยนแปลงชนิดหรือลำดับของนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้น (ภาพที่ 19)

5.4 ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ได้รับสาร EMS

เมื่อพิจารณาแถบดีเอ็นเอที่เกิดจาก 8 คู่ไพรเมอร์ พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอที่เป็นแถบหลักทั้งหมด 49 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 41 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่เป็น โพลิมอร์ฟิซึมจำนวน 8 แถบ คิดเป็น 16.33 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าต้นเจตมูลเพลิงแดงที่ชักนำได้จากกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ได้รับสาร EMS นั้นมีการเปลี่ยนแปลงชนิดหรือลำดับของนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้น (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 19 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัสที่ได้รับสาร EMS โดยใช้เทคนิคเอฟแอลพี คู่ไพรเมอร์ E-GCA/M-GTA (M คือ ϕ x174 DNA/*Hinf*I marker, C คือ ชุดควบคุม)



ภาพที่ 20 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ได้รับสาร EMS โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี
 ฏูไพรเมอร์ E-GCA/M-GTA (M คือ ϕ x174 DNA/*Hinf*I marker, C คือ ชุดควบคุม)

จากผลการทดลองพบว่า ต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนามาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยที่ได้รับสาร EMS นั้นมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างสูงกว่าต้นที่พัฒนามาจากแคลลัส ซึ่งเป็นผลจากปัจจัยร่วมระหว่างการเกิด somaclonal variation และผลของสาร EMS ที่เป็นสารก่อกลายพันธุ์ ซึ่ง Wongsawad (2005) ได้ทำการทดลองให้สาร EMS กับเมล็ดของชวนชม และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วย เทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 ชนิด พบว่า มี 1 ไพรเมอร์ที่สามารถบ่งชี้ความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอที่ศึกษาได้ และ Hofmann, *et al.* (2004) ทดลองให้สาร EMS แก่เซลล์แขวนลอยของถั่วเหลืองและตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้น ด้วยเทคนิค RAPD ซึ่งไพรเมอร์ OPO-01/1150 สามารถแยกความแตกต่างของเนื้อเยื่อที่ได้รับสาร EMS ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และไพรเมอร์ OPO-05/1200 สามารถแยกความแตกต่างของเนื้อเยื่อที่ได้รับสาร EMS ความเข้มข้น 1 และ 30 มิลลิโมลาร์ ได้

ผลของสาร EMS สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเบสแบบ transition จาก G/C เป็น A/T ได้สูงถึง 98% (Till *et al.*, 2003) ซึ่งเอนไซม์ *EcoRI* มีตำแหน่งจดจำ คือ 5'-G[↓]AATTC-3' และ 3'-CTTAA[↑]G-5' ดังนั้นเมื่อเกิดการกลายพันธุ์กับ เบส G ก็มีผลทำให้ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *EcoRI* เปลี่ยนแปลงไปด้วย และผลจากการเปลี่ยนแปลงของเบสจาก G/C เป็น A/T มีผลทำให้เกิดเบส T เพิ่มขึ้น ซึ่งเบส T ก็เป็นตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *MseI* ซึ่งเอนไซม์ *MseI* มีตำแหน่งจดจำ คือ 5'-T[↓]TAA-3' และ 3'-AAT[↑]T-5' ทำให้เกิดตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *MseI* เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ต้นเจตมูลเพลิงแดงที่ได้จากการทดลองเกิดแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคเอฟแอลพี

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำเอฟแอลพีมีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม แบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างเป็น โพลิมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นมาจากการเปลี่ยนแปลงของเบส (point mutation) ที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ ทำให้ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์หายไป เกิดขึ้นใหม่ มีการจัดเรียงตัวใหม่ภายในตำแหน่งจดจำหรือเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งติดกับตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตรงส่วนที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกในไพรเมอร์ที่ใช้ ทำให้สามารถหรือไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ มีผลทำให้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้เปลี่ยนแปลงไป (สุรินทร์, 2545 ; Kokovic *et al.*, 1999)

การใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี เป็นวิธีการที่ใช้หาความแตกต่างระหว่างชนิด สายพันธุ์ หรือ พันธุ์ได้ (Rogowsky *et al.*, 1993) จากผลการทดลองสามารถยืนยันได้ว่าต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนา มาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยทั้งที่ได้รับและไม่ได้รับสาร EMS มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น จริง และการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นอาจจะเกี่ยวข้องกับส่วนของยีนที่ควบคุมกระบวนการสร้างสาร plumbagin ด้วย

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดง และเจตมูลเพลิงขาว คือ อาหารเหลวสูตร MS-B5 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำต้นใหม่จากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดง คือ อาหารแข็งสูตร MS-B5 ที่เติม BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และต้นใหม่ที่พัฒนามาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงมีลักษณะไม่แตกต่างจากต้นปกติที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยไม่ผ่านแคลลัส แต่ไม่สามารถชักนำต้นใหม่จากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงขาวได้
3. แคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวที่ได้รับสาร EMS มีแนวโน้มอัตราการเจริญเติบโตลดลง เมื่อระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการให้สารนานขึ้น และต้นใหม่บางต้นที่พัฒนามาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงแดงที่ได้รับสาร EMS มีลักษณะแตกต่างจากต้นปกติที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยไม่ผ่านแคลลัส เช่น ใบด่างเหลือง ใบหงิก ใบม้วนเป็นกรวย และใบมีขนาดใหญ่และไม่แตกกอ เป็นต้น แต่ไม่สามารถชักนำต้นใหม่จากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงขาวได้
4. ต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยทั้งที่ได้รับและไม่ได้รับสาร EMS มีความแปรปรวนในการสร้างและสะสมสาร plumbagin เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และเปรียบเทียบกับต้นปกติที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อโดยไม่ผ่านแคลลัส
5. ต้นเจตมูลเพลิงแดงที่พัฒนาจากแคลลัสและกลุ่มเซลล์แขวนลอยทั้งที่ได้รับและไม่ได้รับสาร EMS มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค AFLP ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้ได้ผลการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้นควรเพิ่มจำนวนคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาให้มากขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่มความถูกต้องของข้อมูลในระดับดีเอ็นเอให้สูงขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ก่องกานดา ชยามฤต. 2536. **ไม้ดอกและไม้ประดับ**. ด้านสุทธาการพิมพ์จำกัด, กรุงเทพฯ. 300 น.

ธัญญาพร สุสานนท์ และ สมปอง เตชะโต. 2547. การชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้เอทิลมีเทนซัลโฟเนตในหน้าวัวพันธุ์โชเนต. **ว. วิทย. กษ.** 35: 37-41.

นันทวัน บุญยะประภัศร และ อรุณช โขชัยเจริญพร. 2539. **สมุนไพรไม้พื้นบ้าน**. สำนักพิมพ์ประชาชนจำกัด, กรุงเทพฯ. 895 น.

นิรนาม. 2551ก. เอกสารสมุนไพรไทย. สำนักวิทยบริการ สถาบันราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา. แหล่งที่มา: <http://arcbs.bsru.ac.h/local/spthai/5jmpk.pdf>, 25 สิงหาคม 2551.

นิรนาม. 2551ข. เจตมูลเพลิงแดง. ศูนย์สมุนไพรทักษิณ. แหล่งที่มา: <http://herbal.pharmacy.psu.ac.th/home.asp>, 25 สิงหาคม 2551.

นิรนาม. 2551ค. ความรู้ทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล. แหล่งที่มา: <http://lartc.rmutl.ac.th/ptclab/Tissue%20Culture/factor%20tissue%20culture.html>, 20 กันยายน 2551.

บุษบา จินดาวิจักขณ์ และ นิวัติ ชื่นคุณากร. 2519. การศึกษาวิธีการแยก ทดสอบหาประเภทสารและการออกฤทธิ์ต่อสัตว์ทดลองของรากเจตมูลเพลิงแดง. โครงการพิเศษเภสัชศาสตร์บัณฑิต, มหาวิทยาลัยมหิดล.

พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ. 2539. **สมุนไพร : แก้ไขปรับปรุงใหม่จากตำราวิทยาศาสตร์สมุนไพร**. บริษัท ที. พี. พรินท์, กรุงเทพฯ.

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

ภูมิพิชญ์ สุขาวรรณ และ ปรีชา กาบแก้ว. 2536. **สมุนไพรใช้เป็นยา**. อักษราพิพัฒน์, กรุงเทพฯ. 63 น.

รัตนา อิทธานุปกรณ์. 2547. **การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร**. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 215 น.

วิทย์ เทียงบุญธรรม. 2538. **พจนานุกรมโรคและสมุนไพรไทย**. พิมพ์ครั้งที่ 2. บริษัทรวมสาส์น (1977), กรุงเทพฯ. 300 น.

_____. 2542. **พจนานุกรมสมุนไพรไทย**. สำนักพิมพ์ อักษรพิทยา, กรุงเทพฯ. ๓

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

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2540. **สารานุกรมสมุนไพร รวมหลักการเภสัชกรรมไทย**. โอ.เอส.พรีนติ้ง, กรุงเทพฯ. 618 น.

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2546. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏอุดรธานี. 187 น.

สมปอง เตชะโต และ ธัญญาพร สุสานนท์. 2548. การกลายพันธุ์ของดอกหน้าวัวพันธุ์ว่าเลนดิโนที่ผ่านการชักนำด้วยเอทิลมีเทนซัลโฟเนต. **ว. สงขลานครินทร์ วทท.** 27 (ฉบับพิเศษ 3): 675-682.

สมปอง เตชะโต และ วิทยา พรหมมี. 2542. การชักนำการกลายพันธุ์มั่งคุด : การตอบสนองของชิ้นส่วนพืชต่อสิ่งก่อกลายพันธุ์. **ว. สงขลานครินทร์ วทท.** 21: 25-31.

สมสุข มัจฉาชีพ. 2542. **พืชสมุนไพร**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์แพร่พิทยา, กรุงเทพฯ. 317 น.

- สิรินุช ลามศรีจันทร์. 2540. การกลายพันธุ์ของพืช. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 205 น.
- สุทธิชัย ปทุมล่องทอง. 2543. เคล็ดลับสมุนไพรไทย 1. สำนักพิมพ์ธารบัวแก้ว, นนทบุรี. 179 น.
- สุนทรี สิงหนุตตรา. 2540. สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด. พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์ดอกเบญจ, กรุงเทพฯ. 260 น.
- สุปราณี บิลยะหิมา และ สุพัตรา แสงทอง. 2542. การศึกษาการสร้างสาร **plumbagin** โดยราก เพาะเลี้ยงของต้นเจตมูลเพลิงแดง. โครงการงานนักศึกษา, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุภาภรณ์ ชาติโรจน์. 2547. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ **hairy root** ของเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) เพื่อผลิตสาร **plumbagin**. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 81 น.
- สุมิตรา ยิ่งเจริญ. 2544. สมุนไพรสำหรับครอบครัว. บริษัทไพลินบุ๊กเน็ต จำกัด, กรุงเทพฯ. 128 น.
- สุรพจน์ วงศ์ใหญ่. 2538. HPLC ปัญหาและวิธีแก้ไข. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต, กรุงเทพฯ.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและ เอเอฟแอลพี. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 116 น.
- สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 2551. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ‘ส้มโอไทย’ เอกลักษณ์แห่ง พันธุกรรมของผลไม้ขึ้นชื่อ. แหล่งที่มา : <http://www.trf.or.th/News/Content>, 10 มีนาคม 2551.

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

อรสา ชูสกุล. 2543. **การผลิตปลัมบาจินในเซลล์แขวนลอยของเจตมูลเพลิงขาว**
Plumbago zeylanica L. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

อภัสสร ฆมิคที. 2537. **คู่มือทางชีวเคมี**. ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์รวีเจียว, กรุงเทพฯ. 153 น.

Anonymous. 1983. Ethyl methanesulfonate CAS No. 62-50-0. **Third Annual Report on Carcinogens**.

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

Agilent Technologies. 2001. **Agilent Chemstation (Computer Program)**. Agilent Technologies, U.S.A.

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

Budavari, S. 1996. **Merck Index Twelfth Index**. Merck research laboratories direction of merck and Co., Inc Whitehouse Station. New York. 695 p.

Chuakul, W., P. Saralamp and P. Supatarawanich. 1994. Pharmacognostic characters of *Plumbago Indica* Linn. **Mahidol J. Pharm. Sci.** 21: 126-132.

Chuntaratin, P. 2006. **Production of Plumbagin by Hairy Root, Callus and Cell Suspension Cultures of *Plumbago indica* L.** Ph.D. Thesis. Kasetsart University, Thailand.

- Das, G. and G.R. Rout. 2002. Direct plant regeneration from leaf explants of *Plumbago* species. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 68: 311-314.
- Didry, N., L. Dubrevil and M. Pinkas. 1994. Activity of anthraquinonic and naphthoquinonic compounds on oral bacteria. **Pharmazie.** 49: 681-683.
- Durga, R., P. Sridhar and H. Polara. 1990. Effects of plumbagin on antibiotic resistance in bacteria. **Indian. J. Med. Res.** 91: 18-20.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Exp. Cell Res.** 50: 151-158.
- Hofmann, N.E., R. Raja, R.L. Nelson and S.S. Korban. 2004. Mutagenesis of embryogenic cultures of soybean and detecting polymorphisms using RAPD markers. **Biologia Plant.** 48: 173-177.
- Hohmann, U., G. Jacobs and C. Jung. 2005. An EMS mutagenesis protocol for sugar beet and isolation of non-bolting mutants. **Plant Breed.** 124: 317-321.
- Hu, C.Y. and P.J. Wang. 1983. Meristem, shoot tip and bud culture, pp. 177-277. In D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada, eds. **Handbook of Plant Cell Culture, Vol. I : Techniques for Propagation and Breeding.** MacMillan Publishing Company, New York.
- Kokotovic, B., N.F. Friis, J.S. Jensen and P. Ahrens. 1999. Amplified fragment length polymorphism fingerprint of Mycoplasma species. **J. Clin. Microbiol.** 37: 3300-3307.
- Komaraiah, P., R.N. Amrutha, P.B. Kavi Kishor and S.V. Ramakrishma. 2002. Elicitor enhanced production of plumbagin in suspension cultures of *Plumbago rosea* L. **Enz. Microb. Tech.** 31: 634-639.

- Krishnaswamy, M. and K.K. Purushothaman. 1980. Plumbagin: a study of its anticancer, antibacterial and antifungal properties. **Indian J. Exp. Bio.** 18: 876-877.
- Kumar, K.S. and K.V. Bhavanandan. 1988. Micropropagation of *Plumbago rosea* Linn.. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 15: 275-278.
- Lee, J.H. and S.Y. Lee. 2002. Selection of stable mutants cultured rice anthers treated with ethylmethanesulfonic acid. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 71: 165-171.
- Liu, Q.C., H. Zhai, D.H. Lu, Y. Wang and D.P. Zhang. 1998. An efficient system of embryogenic suspension cultures and plant regeneration in sweet potato. **CIP Program Report.** 1997-1998: 265-270.
- Luan, Y.S., J. Zhang and X.R. Gao. 2007. Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS) *in vitro* screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 88: 77-81.
- Lyakh, V., A. Soroka and V. Vasin. 2005. Influence of mature and immature sunflower seed treatment with ethylmethanesulphonate on mutation spectrum and frequency. **HELIA.** 28: 87-98.
- Maryadele, J. and A. Smith. 1996. **The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drug and Biologicals.** N. J. press. Whitehouse Station.
- Miller, C.O. and F. Skoog. 1953. Chemical control of bud formation in tobacco stem segment. **Amer. J. Bot.** 40: 768-773.
- Minocha, S.C. 1987. Plant growth regulators and morphogenesis in cell and tissue culture of forest tree, pp. 50-66. In J.M. Bonga and D.J.Durzan, eds. **Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol.1.** Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.

- Mukharya, D. and M.S. Dahia. 1977. Antimicrobial activity of some plant extracts. **Indian Drugs** 14: 160.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15: 473-497.
- Nguyen, A.T., H. Malonne, P. Duez, R. Vanhaelen-Fastre, M. Vanhaelen and J. Fontaine. Cytotoxic constituents from *Plumbago zeylanica*. **Fitoterapia.** 75: 500-504.
- Nicola, T. and N. Valeria. 2002. Efficiency of three PCR-based markers in assessing genetic variation among cowpea (*Vigna unguiculata* subsp. *unguiculata*) landraces. **Genome** 45: 268-27.
- Paiva, S.R. de, M.R. Figueiredo, T.V. Aragao and M.A.C. Kaplan. 2003. Antimicrobial activity *in vitro* of plumbagin isolated from *Plumbago* species. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.** 98: 959-961.
- Paiva, S.R. de, S.da S. Marques, M.R. Figueiredo, and M.A.C. Kaplan. 2003. Plumbaginales: A Pharmacological Approach. **Floresta e Ambiente.** 10: 98-105.
- Paiva, S.R. de, L.A.Lima, M.R. Figueiredo and M.A. Coelho Kaplan. 2004. Plumbagin quantification in root of *Plumbago scandens* L. obtained by different extraction techniques. **An. Acad. Bras. Cienc.** 76: 499-504.
- Panichayupakaranant, P. and S. Tewtrakul. 2002. Plumbagin production by root cultures of *Plumbago rosea*. **J. Biotech.** 5: 228-232.
- Rogowsky, P.M., M.E. Sorrels, K.W. Shepherd and P. Langride. 1993. Characterization of wheat-rye recombinants with RFLP and PCR probes. **Theor. Appl. Genet.** 85: 1023-1028.

- Rout, G.R. 2002. Direct plant regeneration from leaf explants of *Plumbago* species and its genetic fidelity through RAPD markers. **Ann. Appl. Biol.** 140: 305-313.
- Sivanesan, I. 2007. Shoot regeneration and somaclonal variation from leaf callus cultures of *Plumbago zeylanica* Linn. **Asian J. Plant Sci.** 6: 83-86.
- Skoog, F. and C.O. Miller. 1967. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symp. Soc. Exp. Biol.** 11: 118-130.
- Soniya, E.V., N.S. Banerjee and M.R. Das. 2001. Genetic analysis among callus-derived plants of tomato. **Curr. Sci.** 80: 1213-1215.
- Tejklova Eva. 2002. Curly stem-an induced mutation in flax (*Linum usitatissimum* L.). **Czech J. Genet. Plant Breed.** 38: 125-128.
- Till, B.J., S.H. Reynolds, E.A. Greene, C.A. Codomo, L.C. Enns, J.E. Johnson, C. Burtner, A.R. Odden, K. Young, N.E. Taylor, J.G. Henikoff, L. Comai and S. Henikoff. 2003. Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. **Genome Res.** 13: 524-530.
- _____. 2004. Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING. **BMC Plant Biology.** 4:12. Available Source : <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/4/12>, September 5, 2006.
- Wang, Y.C. and T.L. Huang. 2005. High-performance liquid chromatography for quantification of plumbagin, an anti-*Helicobacter pylori* compound of *Plumbago zeylanica* L. **J. Chromatogr. A.** 1094: 99-104.
- Watanabe, S., T. Mizoguchi, K. Aoki, Y. Kubo, H. Mori, S. Imanish, Y. Yamazaki, D. Shibata and H. Ezura. 2007. Ethylmethanesulfonate (EMS) mutagenesis of *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom for large-scale mutant screens. **Plant Biotech.** 24: 33-38.

Wongsawad, P., S. Mahadtanapuk, S. Kantawong, P. Chariyavidhayawat and T. Paratasilpin.

2005. Induced mutation in *Adenium obesum* Balf. using ethyl methanesulphonate. **31st**

Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of

Technology, 18-20 October 2005.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)
B5 (Gamborg *et al.*, 1968) และ MS-B5

สารเคมี	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	MS	B5	MS-B5
Macroelements			
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	134	-
NH_4NO_3	1,650	-	1,650
KNO_3	1,900	2,500	1,900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	150	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	250	370
KH_2PO_4	170	-	170
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	150	-
Microelements			
H_3BO_3	6.2	3	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6.9	10	6.9
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6.14	2	6.14
KI	0.83	0.75	0.83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.25	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	0.025
Na_2EDTA	37.25	37.25	37.25
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85	27.85	27.85
Organic Compounds			
Glycine	2	-	-
Myo-inositol	100	100	100
Nicotinic acid	0.5	1	1
Pyridoxine.HCl	0.5	1	1
Thiamine.HCl	0.1	10	10
Sucrose	30,000	30,000	30,000

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล

นางสาวสายใจ ชูรัตน

วัน เดือน ปี ที่เกิด

19 พฤศจิกายน 2523

สถานที่เกิด

อำเภอท่าชนะ จังหวัดสุราษฎร์ธานี

ประวัติการศึกษา

วท.บ.เกษตรศาสตร์ (พืชศาสตร์) 2545

คณะเกษตรศาสตร์นครศรีธรรมราช

สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล

ทุนการศึกษาที่ได้รับ

ทุนบัณฑิตผู้ช่วยวิจัย ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร