การชักนำให้เกิดการกลายของหนอนตายหยากดอกสั้น (*Stemona collinsiae* Craib) ด้วยเอทิลมีเทนซัลโฟเนตในหลอดทดลอง

IN VITRO INDUCED MUTATION OF *STEMONA COLLINSIAE* CRAIB USING ETHYL METHANESULFONATE

เสาวลักษณ์ เพชรคง

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2566

การชักนำให้เกิดการกลายของหนอนตายหยากดอกสั้น (*Stemona collinsiae* Craib) ด้วยเอทิลมีเทนซัลโฟเนตในหลอดทดลอง

เสาวลักษณ์ เพชรคง

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
การศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2566
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

IN VITRO INDUCED MUTATION OF *STEMONA COLLINSIAE* CRAIB USING ETHYL METHANESULFONATE

SAOWALAK PETKONG

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of MASTER OF EDUCATION

(Biology)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2023

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การชักนำให้เกิดการกลายของหนอนตายหยากดอกสั้น (*Stemona collinsiae* Craib)

ด้วยเอทิลมีเทนซัลโฟเนตในหลอดทดลอง

ของ

เสาวลักษณ์ เพชรคง

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

.....

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รักชนก โคโต)

..... ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชลี ใจดี)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รังษิรุจิ)

ชื่อเรื่อง	การชักนำให้เกิดการกลายของหนอนตายหยากดอกสั้น (*Stemona collinsiae* Craib) ด้วยเอทิลมีเทนซัลโฟเนตในหลอดทดลอง
ผู้วิจัย	เสาวลักษณ์ เพชรคง
ปริญญา	การศึกษามหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รักชนก โคโต

สารสกัดจากรากของหนอนตายหยากดอกสั้น (*Stemona collinsiae* Craib) มีคุณสมบัติในการรักษาโรคและกำจัดแมลงศัตรูพืชจึงมีการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ผลผลิตตามความต้องการอย่างต่อเนื่อง แต่กลับพบว่าสารสกัดที่ได้ไม่เสถียร และมีโครงสร้างเปลี่ยนแปลงได้ง่าย งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ คือ 1) ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดและรากของหนอนตายหยากดอกสั้นในหลอดทดลอง 2) ศึกษาความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สาร EMS ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ และ 3) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมระหว่างยอดกลายพันธุ์กับต้นแม่ของหนอนตายหยากดอกสั้นโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ผลการศึกษาพบว่าการชักนำการเกิดยอดโดยใช้อาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 6-benzyadenine (BA) ความเข้มข้น 0, 1, 3, 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในทุกระดับความเข้มข้นให้จำนวนยอดเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และการชักนำการเกิดรากโดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต indole-3- butyric acid (IBA)1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุดคือ 0.90±0.44 ราก และเมื่อนำยอดมาแช่ในสารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ได้แก่ 0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 และ 90 นาที พบว่าที่ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที ให้อัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC50) หลังจากเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์พบว่ายอดที่แช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนสูงสุด คือ 5 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะที่ยอดที่ไม่แช่สารละลาย EMS ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดต่ำสุด คือ 47.37 เมื่อประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากยอดที่แช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ (LC50) เทียบกับต้นควบคุมโดยใช้เครื่องหมาย RAPD 2 ไพรเมอร์ คือ OPA-11 และ OPA-13 และเครื่องหมาย SCoT 6 ไพรเมอร์ คือ S6, S17, S26, S32, S34 และ S35 พบว่าทุกไพรเมอร์แสดงความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอจำนวน 47 แถบจากทั้งหมด 52 แถบ คิดเป็น 90.40 เปอร์เซ็นต์ และผลการวิเคราะห์จากข้อมูลเดนโดรแกรมสามารถแบ่งกลุ่มหนอนตายหยากดอกสั้นได้เป็น 2 กลุ่ม สามารถใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากการใช้สาร EMS ของหนอนตายหยากดอกสั้นได้

คำสำคัญ : หนอนตายหยากดอกสั้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การกลาย เอธิลมีเทนซัลโฟเนต

Title	*IN VITRO* INDUCED MUTATION OF *STEMONA COLLINSIAE* CRAIB USING ETHYL METHANESULFONATE
Author	SAOWALAK PETKONG
Degree	MASTER OF EDUCATION
Academic Year	2023
Thesis Advisor	Assistant Professor Dr. Rakchanok Koto

The root extracts of *Stemona collinsiae* Craib can be used in the treatment of various diseases and can also be effective in eliminating pests. Therefore, this species has been developed and selected to improve yields. However, it was found that the improved forms were unstable. The purposes of this research are as follows: (1) to optimize the shoot and root induction medium (2) to determine the concentration of ethyl methanesulphonate (EMS), as well as the length of time it took, for this to be lethal to 50% of shoots; and (3) to analyze the genetic variation between mutated plants and the mother plant of *S. collinsiae* Craib using molecular markers. The results revealed that adventitious shoots developed on MS medium supplemented with 0, 1, 3, 5 and 7 mg/l BA, and that all concentrations showed significant differences ($P<0.05$). MS supplemented with 1 mg/l IBA gave the highest average number of roots 0.90±1.44. When shoots were immersed in EMS at concentrations of 0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1% for 60 and 90 min., the results revealed that the lethal concentration of EMS for 50 percent of shoots (LC50) is 0.90%, when treated for 60 minutes. After culturing for eight weeks, the highest shoot formation was obtained with EMS at a concentration of 0.75 (5 shoots/explant), while shoots in EMS-free medium gave the lowest shoot formation percentage (47.37). Analysis of the genetic variation in EMS induced shoots treated at LC50 concentration compared with control plants using two RAPD primers (OPA-11 and OPA-13) and six SCoT markers (S6, S17, S26, S32, S34 and S35) showed that mutation could induce high polymorphism. From a total score of 52 bands, 47 were polymorphic (90.40%). Analysis of the polymorphic bands using MeGA11 yielded a dendrogram with two groups of samples which revealed distinctive genetic variation of *S. collinsiae* after treated with EMS.

Keyword : Stemona collinsiae Plant tissue culture mutation Ethyl methanesulfonate

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความเมตตากรุณาช่วยเหลือและความเอาใจใส่อย่างดียิ่งตลอดจนการให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการปรับแก้ไขข้อบกพร่องจากคณะกรรมการผู้ควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รักชนก โคโต ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษาและให้ความช่วยเหลือชี้แนะแนวทางในสิ่งที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาและการทำปริญญานิพนธ์นี้ด้วยความเอาใจใส่ตลอดมา ทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์และกรรมการบริหารหลักสูตรการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่าน ที่ได้กรุณาประสิทธิ์ประสาทความรู้ต่าง ๆ ให้แก่ผู้วิจัย ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ เพื่อนร่วมงาน ที่บัณฑิตวิทยาลัย สำหรับข้อมูลตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ รวมถึงความช่วยเหลือและกำลังใจให้กับผู้วิจัยตลอดมา

ขอขอบคุณพี่ ๆ และเพื่อน ๆ หลักสูตรการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา รวมถึงบุคคลอีกหลายท่านที่ไม่ได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้กับผู้วิจัยมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอน้อมรำลึกถึงคุณของบิดามารดาและครูอาจารย์ที่อบรมสั่งสอนให้ความรู้เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา

เสาวลักษณ์ เพชรคง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูปภาพ ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

ภูมิหลัง 1

ความมุ่งหมายของการวิจัย 3

ขอบเขตของการวิจัย 3

สถานที่ทำการวิจัย 3

ระยะเวลาที่ศึกษา 3

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม 4

1. ลักษณะพฤกษศาสตร์และการนำไปใช้ประโยชน์ของหนอนตายหยาก 4

2. สารสำคัญในหนอนตายหยาก 9

3. การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการก่อกลายพันธุ์ 12

3.1 การกลายที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) 13

3.2 การกลายที่เกิดจากการชักนำ (induced mutation) 13

3.3 ผลการกลายที่ส่งผลต่อพันธุกรรมพืช 15

3.4 การนำพันธุ์กลายจากการชักนำไปใช้ประโยชน์ 17

4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 17

4.1 สูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหนอนตายหยาก 18
5. การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการชักนำให้กลายด้วย EMS 19
5.1 คุณลักษณะของ EMS 19
5.2 การใช้ EMS เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช 20
5.3 การตรวจสอบการกลายของพืชที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายโดย EMS 23
6. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 28
6.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหนอนตายหยาก 28
6.2 การชักนำการกลายโดยใช้สารเคมีในหลอดทดลอง 29
6.3 การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชที่ได้รับการกลาย 31
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 34
1. พืชที่ใช้ในการวิจัย 34
2. วัสดุและอุปกรณ์ 34
3. สารเคมี 35
4. ขั้นตอนการดำเนินการ 36
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย 44
1. ภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดและราก 44
2. การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการชักนำให้เกิดการกลายด้วย EMS 47
3. การตรวจสอบลักษณะความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเทคนิค Random Ampified Poiymorphic Rapid (RAPD) และ Start Codon Targeted (SCoT) 49
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 58
ข้อเสนอแนะ 62
บรรณานุกรม 63
ภาคผนวก 74

ประวัติผู้เขียน..... 93

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ชนิดของพืชในสกุล *Stemona* ที่พบในประเทศไทย 6

ตาราง 2 Stemona alkaloids ในพืชสกุลหนอนตายหยากบางชนิด 11

ตาราง 3 ผลของ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีต่อการเกิดจำนวนยอด และความยาวยอด ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ 46

ตาราง 4 ผลของ IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีต่อการเกิดจำนวนราก และความยาวราก ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ 46

ตาราง 5 อัตราการตายของ *S. collinsiae* Craib หลังจากแช่สารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 47

ตาราง 6 การสร้างยอดและจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนของ *S. collinsiae* หลังจากแช่สารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 48

ตาราง 7 จำนวน amplicons ที่สร้างโดยเครื่องหมายโมเลกุล 55

ตาราง 8 ผลการตรวจความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหนอนตายหยากดอกสั้น โดยใช้ไพรเมอร์ RAPD 2 ไพรเมอร์ และ SCoT 6 ไพรเมอร์ โดยแสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนและแตกต่างกัน 55

ตาราง 9 Pairwise distances แสดงค่าความห่างทางพันธุกรรมของหนอนตายหยากดอกสั้นต้นแม่ (M0) และหนอนตายหยากดอกสั้นที่ผ่านการแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.90 เปอร์เซ็นต์ (C1A, C1B, C2, C3, C4, C5A, C5B และ C6) 56

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 ลักษณะดอกของหนอนตายหยากชนิดต่าง ๆ 5

ภาพประกอบ 2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของหนอนตายหยาก 5

ภาพประกอบ 3 ต้นหนอนตายหยากชนิด *S. collinsiae* Craib 8

ภาพประกอบ 4 *Stemona* alkaloid groups. 10

ภาพประกอบ 5 โครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ที่ตรวจพบในต้นหนอนตายหยาก 12

ภาพประกอบ 6 แผนผังการดำเนินการ 43

ภาพประกอบ 7 ลักษณะการเกิดยอดของหนอนตายหยากดอกสั้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS โดยเติม BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ระยะเวลา 8 สัปดาห์ 45

ภาพประกอบ 8 ลักษณะการเกิดรากของหนอนตายหยากดอกสั้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS โดยเติม IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ระยะเวลา 8 สัปดาห์ 45

ภาพประกอบ 9 อัตราการตาย (Mortality) ของ *S. collinsiae* หลังจากจากแช่สารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยลูกศรชี้ตำแหน่งอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (แกน Y) และความเข้มข้นของสารละลาย EMS ที่ได้ (แกน X) 48

ภาพประกอบ 10 ลักษณะการเกิดยอดและราก หลังเพาะเลี้ยงระยะเวลา 8 สัปดาห์ ก) MS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ข) MS ที่เติม IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ค) ยอดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุดหลังจากแช่สารละลาย EMS 49

ภาพประกอบ 11 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบไพรเมอร์ของเครื่องหมาย RAPD 7 ชนิด (บน) และ SCoT 22 ชนิด (ล่าง) 51

ภาพประกอบ 12 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-11 ... 52

ภาพประกอบ 13 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-13 ... 52

ภาพประกอบ 14 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ S6 52

ภาพประกอบ 15 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ S17 53

ภาพประกอบ 16 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ S26 53

ภาพประกอบ 17 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ S32 53

ภาพประกอบ 18 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ S34 54

ภาพประกอบ 19 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ S35 54

ภาพประกอบ 20 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหนอนตายหยากดอกสั้นต้นแม่ (M0) และหนอนตายหยากดอกสั้นที่ผ่านการแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.90 เปอร์เซ็นต์ (C1A, C1B, C2, C3, C4, C5A, C5B และ C6) 57

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

พืชสกุล *Stemona* หรือหนอนตายหยาก อยู่ในวงศ์ Stemonaceae กระจายพันธุ์อยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีจำนวน 25 ชนิด ในประเทศไทยสำรวจพบจำนวน 14 ชนิด (Bob and chayamarit, 2011; Inthachub, 2008) สำหรับประเทศไทยพบหนอนตายหยากได้ทั่วทุกภาค และมีชื่อเรียกแตกต่างกันตามท้องถิ่น เช่น พญาร้อยหัว กระเพียดหนู ต้นสามสิบกลีบ โป่งมดง่าม สลอดเชียงคำ เป็นต้น หนอนตายหยากเป็นพืชสมุนไพรที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคได้หลากหลาย เช่น โรคผิวหนัง น้ำเหลืองเสีย ผื่นคันตามร่างกาย ฆ่าเชื้อโรค มะเร็งตับ ลดระดับน้ำตาลสำหรับโรคเบาหวาน รวมทั้งโรคริดสีดวง ปวดฟัน ปวดเมื่อย นอกจากนี้ในประเทศจีนมีการนำรากสะสมอาหารมาใช้รักษาอาการไอและวัณโรค โดยใช้ร่วมกับสมุนไพรชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากราก *Stemona* มีสารออกฤทธิ์ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิในกลุ่มอัลคาลอยด์ที่เรียกว่า *Stemona* alkaloids ซึ่งมีมากกว่า 80 ชนิด มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงศัตรูพืชและจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืชได้หลายชนิด เช่น หนอนกัดกินใบ และเพลี้ยอ่อน รวมทั้งกำจัดลูกน้ำยุง (Burkil, 1935; Pilli and de, 2000; มณฑา วงศ์มณีโรจน์, สุรัตน์วดี จิวะจินดา, ริวรรณ บุรีคำ, และ รงรอง หอมหวล, 2548) ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับให้เกษตรกรใช้ในการกำจัดศัตรูพืชทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ นอกจากนี้ยังพบสาร 1′,2′-didehydrostemofoline และสาร stemofoline ซึ่งเป็นสารที่น่าสนใจและมีความสำคัญทางการแพทย์ ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้มีฤทธิ์ป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ (Sastraruji, 2011) โดยมีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของโรคอัลไซเมอร์ได้ (Baird and Morwenna, 2009) แต่มีปัญหาที่พบได้คือ สารสกัดที่ได้จาก Stemona ไม่เสถียร มีโครงสร้างเปลี่ยนแปลงได้ง่าย โดยเฉพาะเมื่อพืชเกิดบาดแผลจากการเก็บในธรรมชาติและมีเชื้อโรคเข้าทำลาย (สรัญญา วัชโรทัย, 2551)

การชักนำให้เกิดการกลายเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช หากลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นคงอยู่และสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานรุ่นต่อ ๆ ไปได้ โดยกระบวนการชักนำให้เกิดการกลายโดยวิธีการเหนี่ยวนำมีอยู่ 2 วิธีคือ (1) physical mutation ซึ่งประกอบด้วยหลายวิธีเช่น insertional mutagenesis, x-rays และ gamma rays และ (2) chemical mutation เช่น di-(2-chroloethyl) sulfide, ethyl methane sulfonate (EMS), ethyl ethane sulfonate (EES)

และ colchicine ซึ่งทั้งสองวิธีการนี้จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่เกิดการกลายในระดับยีนและทำให้เกิดความผิดปกติในโครโมโซม (Bashir, 2013)

สารเคมีที่ใช้ในการก่อกลายที่นิยมใช้มากที่สุดในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายในพืช คือ เอธิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methane sulfonate, EMS) ซึ่งเป็นสารเคมีในกลุ่ม alkylating มีประสิทธิภาพสูงในการเหนี่ยวนำให้เกิดกลาย และใช้ได้ผลดีกับพืชหลายชนิดทั้งสภาพในหลอดทดลองและนอกหลอดทดลอง และมีผลกระทบต่อความความเปลี่ยนแปลงระดับยีนของการกลายที่เกิดจากสาร EMS จะก่อให้เกิดการกลายของกลุ่มเบสพิวรีนและไพริมิดีน ซึ่งจะเติมหมู่ alkyl ให้แก่เบสทำให้การจับคู่เบสผิดปกติไป โดยมักทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแบบ transition คือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เบสกัวนีนและไทมีน โดยเปลี่ยนให้เบส G จับกับ T (ชานนท์ ลาภจิตร และ เมิง-เจียว เจิง, 2560) ซึ่งเป็นกรณีที่พบบ่อยในการใช้สารกลุ่มนี้ ตัวอย่างการใช้ EMS ในการชักนำการกลาย เช่น ในมันสำปะหลัง (วิลาวรรณ ทิมทอง, 2562) และในเบญจมาศ (อนันต์ เลิศสุทธิชวาล, 2563)

การนำเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชซึ่งเป็นวิธีที่จะสามารถขยายพันธุ์ได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้นและคุณภาพของพืชที่ได้จะมีความสม่ำเสมอ มาใช้ร่วมกับการชักนำให้เกิดการกลายจะเป็นวิธีที่สามารถช่วยสร้างพันธุ์ใหม่ ๆ แตกต่างจากลักษณะเดิมในระยะเวลาอันสั้น (ศิริญญา ม่วงสอน และ สมปอง เตชะโต, 2551) เช่น ลักษณะทางสัณฐาน และความหลากหลายพันธุกรรม เพื่อส่งเสริมการแปรผันทางพันธุกรรมในพืช เป็นการเพิ่มความสำเร็จในการคัดเลือกพืชให้ได้ลักษณะตามต้องการ ช่วยให้สามารถปรับปรุงพันธุ์ได้สะดวกและรวดเร็วยิ่งขึ้น โดยการตรวจสอบการกลายของพืชที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายโดยใช้สาร EMS สามารถตรวจสอบได้จากลักษณะทางสัณฐานและการใช้เทคนิคทางโมเลกุล

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดและรากของหนอนตายหยากดอกสั้นในหลอดทดลอง หาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่สาร EMS ที่ชักนำให้เกิดการการกลาย และตรวจสอบผลการกลายจากลักษณะทางสัณฐานและความแปรปรวนทางพันธุกรรมในหนอนตายหยากดอกสั้น (*S. collinsiae*) เพื่อเป็นแนวทางการใช้ประโยชน์ในการพัฒนาและประยุกต์ใช้การปรับปรุงพันธุ์หนอนตายหยากและสมุนไพรไทยชนิดอื่นต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

1) หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการชักนำยอดและรากของหนอนตายหยากดอกสั้นในหลอดทดลอง

2) หาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่สาร EMS ที่ชักนำให้เกิดการการกลายในหนอนตายหยากดอกสั้น

3) ตรวจสอบหลังจากชักนำให้เกิดการกลายจากความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหนอนตายหยากดอกสั้น

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการชักนำยอด โดยนำชิ้นส่วนยอดและตาข้างหนอนตายหยากดอกสั้นมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร BA ที่ความเข้มข้น 0, 1, 3, 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร และการชักนำรากบนอาหารสูตร IBA ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 2 เดือนในหลอดทดลอง และศึกษาความเข้มข้นของสาร EMS ตั้งแต่ 0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 และ 90 นาที ที่มีผลต่อการชักนำการตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์เพื่อชักนำการกลายในต้นหนอนตายหยากดอกสั้นในหลอดทดลอง รวมทั้งตรวจสอบผลการกลาย ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานและความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมาย Random Ampified Poiymorphic Rapid (RAPD) และ Start Codon Targeted (SCoT)

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ตึก 10 ชั้น 5 และห้องปฏิบัติการชีววิทยา ตึก 19 ชั้น 11 คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒ

ระยะเวลาที่ศึกษา

เริ่มทำการวิจัยและศึกษาตั้งแต่เดือนกันยายน พ.ศ. 2565 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2567 เป็นระยะเวลา 6 เดือน

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

1. ลักษณะพฤกษศาสตร์และการนำไปใช้ประโยชน์ของหนอนตายหยาก

Division Embryophyta

Subdivision Angiospermae

Class Monocotyledoneae

Order Liliales

Family Stemonaceae

Genus *Stemona*

พืชสกุล *Stemona* หรือหนอนตายหยาก อยู่ในวงศ์ Stemonaceae รากมีลักษณะเด่นและมีความคล้ายคลึงกันในแต่ละชนิดภายในสกุลเดียวกัน หรือแม้แต่ในพืชสกุลอื่นที่พบในท้องตลาด มีการนำรากของพืชชนิดอื่นที่มีลักษณะคล้ายกับรากของหนอนตายหยากมาขาย แล้วเรียกชื่อเป็นหนอนตายหยาก เช่น รากสามสิบ (*Asparagas recemosus* Willd.) ในสกุลหนอนตายหยากจึงได้มีการใช้ลักษณะของดอก ที่มีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดนำมาใช้จัดจำแนกหนอนตายหยากแต่ละชนิด (ภาพประกอบที่ 1) หนอนตายหยากเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว มีลักษณะเป็นไม้เถาเนื้อแข็ง ใบเดี่ยวรูปหัวใจ ปลายแหลม เส้นใบตามตามยาวมีหลายเส้นเห็นชัดเจนในแนวขนานกับขอบใบ ระหว่างเส้นใบจะมีเส้นใบย่อยออกตามแนวขวางกลีบดอก มีสีขาว ข้างในสีม่วงแดง ฝักเล็กปลายแหลมสีน้ำตาล ลำต้นใต้ดินมีรากเป็นพวงสีขาวรูปกระสวย (เต็ม สมิตินันทน์, 2523; นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร, 2543; พยอม ตันติวัฒน์, 2521) (ภาพประกอบที่ 2)

ภาพประกอบ 1 ลักษณะดอกของหนอนตายหยากชนิดต่าง ๆ

ที่มา: สรัญญา วัชโรทัย (2551)

ภาพประกอบ 2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของหนอนตายหยาก

(ก) ลำต้นและราก (ข) ใบ และ (ค) ดอก

ที่มา: นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร (2543)

สกุลหนอนตายหยาก (*Stemona*) มีการกระจายพันธุ์อยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีจำนวน 25 ชนิด ในประเทศไทยที่สำรวจพบมีจำนวน 14 ชนิด (Bob and Chayamarit, 2011;

Inthachub, 2008) สำหรับประเทศไทยพบหนอนตายหยากได้ทั่วทุกภาคและมีชื่อเรียกแตกต่างกันตามท้องถิ่น (ตารางที่ 1)

ตาราง 1 ชนิดของพืชในสกุล *Stemona* ที่พบในประเทศไทย

ชนิด	ชื่อท้องถิ่น	จังหวัดที่พบ
S. aphylly Craib	เครือปุง	แพร่, ลำปาง
S. asperula J.J.Sm	ไม่มีรายงานชื่อไทย	ไม่ระบุจังหวัด
S. burkillii Prain.	ปงมดง่าม	เชียงใหม่
S. collinsiae Craib	หนอนตายหยากดอกสั้น	เชียงใหม่ และจังหวัดในภาคกลาง
S. curtisii Hook. f.	รากลิง	พัทลุง จันทบุรี
S. griffithiana Kurz.	ไม่มีรายงานชื่อไทย	แพร่
S. kerrii Craib	เครือปุงขน	เชียงใหม่
S. hutanguriana W.sp.nov.	ไม่มีรายงานชื่อไทย	อุบลราชธานี
S. phyllantha Gagnep.	สามสิบกีบ	เพชรบุรี ภูเก็ต
S. tuberosa Lour.	หนอนตายหยากเล็ก	แม่ฮ่องสอน นครสวรรค์ ประจวบคีรีขันธ์
S. cochichinensis Gagnep.	สามสิบกีบ สลอดเชียงคำ	ภาคเหนือและภาคอีสาน

พืชในสกุล *Stemona* มีสรรพคุณที่นำมาใช้ประโยชน์ในทางพฤษศาสตร์เป็นสารกำจัดแมลงศัตรูพืชจากธรรมชาติและใช้รักษาบรรเทาอาการโรคต่าง ๆ ได้อย่างหลากหลาย ดังตัวอย่างพืชในสกุล *Stemona* 4 ชนิดต่อไปนี้

1.1 รากลิง (*S. curtisii* Hook. f.)

1.1.1 ลักษณะพฤกษศาสตร์

ต้นเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นเลื้อยพันได้ถึง 5 เมตร รากออกเป็นกระจุกยาว 10-60 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-1.5 เซนติเมตร ใบเดี่ยวแบบเรียงสลับ ดอกออกตามซอกใบ ก้านใบยาว 4-12 เซนติเมตร ช่อดอกออกตามซอกใบมี 1 ถึงหลายดอก ก้านช่อดอกยาว 1-11

เซนติเมตร ดอกมีกลีบรวม 4 กลีบ เกสรเพศผู้ 4 อัน สีน้ำตาลแดง ส่วนปลายสีเหลือง รังไข่เหนือวงกลีบ มี 5 - 11 เมล็ด (นิจศิริ เรืองรังสี, 2547)

1.1.2 สรรพคุณในการนำไปใช้

ควบคุมทั้งแมลงและเชื้อโรคศัตรูพืช และมีรายงานการนำสารสกัดจาก S. *curtisii* มาใช้ยับยั้งเชื้อรา *Collectotrichhum musae* บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) พบว่าที่ความเข้มข้น 800 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (นิติยา สุขวรรณา และ สุภาพร ภัสสร, 2559)

1.2 ปงมดง่าม (*S. burkillii* Prain.)

1.2.1 ลักษณะพฤกษศาสตร์

ต้นเป็นไม้เถาล้มลุก ลำต้นเลื้อยพันได้ยาวประมาณ 1 เมตร รากออกเป็นกระจุก ยาว 10-30 เซนติเมตร ใบเดี่ยวเรียงสลับแบบรูปไข่กว้าง 5-11 เซนติเมตร ยาว 9-17 เซนติเมตร ปลายใบแหลมโคนรูปหัวใจ ก้านใบยาว 4-17 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อมี 1-4 ดอก ออกที่ซอกใบ กลีบรวม 4 กลีบ สีขมพูหรือสีชมพูแกมเหลือง เกสรเพศผู้ 4 อันสีชมพู รังไข่รูปคนโทขนาดเล็ก มี 3-5 เมล็ด (เต็ม สมิตินันทน์, 2523; ส่งศรี พิพิธกุล, 2551)

1.2.2 สรรพคุณในการนำไปใช้

รากสด บดละเอียดใช้ฆ่าแมลง

1.3 หนอนตายหยากดอกสั้น (*S. collinsiae* Craib)

1.3.1 ลักษณะพฤกษศาสตร์

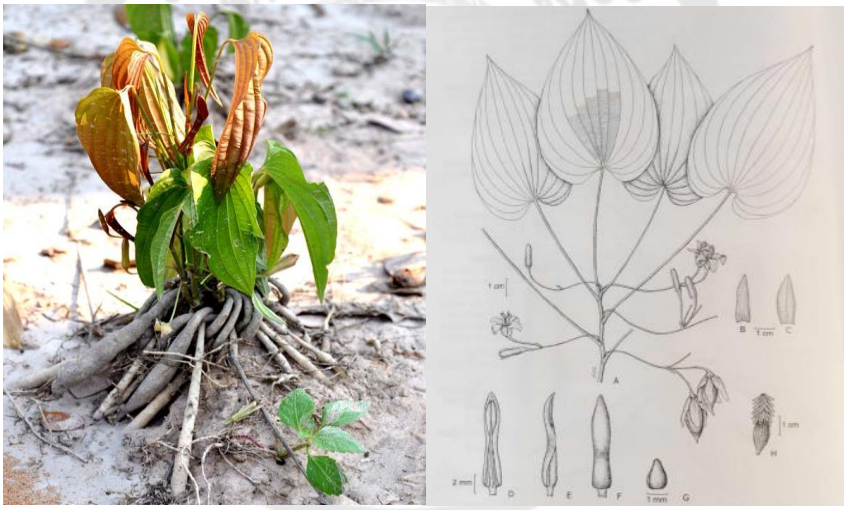
เป็นพืชล้มลุกที่มีอายุหลายปี ลักษณะลำต้นตั้งตรงสูง 20-40 เซนติเมตร แตกกิ่งก้านจำนวนมาก มีรากใต้ดินจำนวนมากยาว 10-30 เซนติเมตร ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงแบบสลับรูปหัวใจ ยาว 9-15 เซนติเมตร กว้าง 6-10 เซนติเมตรปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ ผิวใบเกลี้ยงทั้งด้านบนและล่าง เส้นใบมี 10-15 เส้นขนานกัน ดอกช่อออกที่ซอกใบ ก้านดอกย่อยยาว 2-3 เซนติเมตร กลีบรวมมี 4 กลีบ สีเหลืองแกมชมพู ขนาดไม่เท่ากันเรียง 2 ชั้น เกสรเพศผู้มี 4 อัน ขนาดเท่ากัน เกสรเพศเมียมีรังไข่เหนือวงกลีบ ผลค่อนข้างแข็งสีน้ำตาลขนาดเล็ก พบตามป่าดิบแล้ง เมื่อถึงฤดูแล้งต้นเหนือดินจะโทรมหมดเหลือแต่รากใต้ดิน เมื่อเข้าสู่ฤดูฝนใหม่ใบจึงจะงอกออกมาพร้อมทั้งออกดอก ลักษณะสำคัญคือพบว่ารากมีพิษ รับประทานเข้าไปทำให้มึนเมาและถึงตายได้ (ภาพประกอบที่ 3) (นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร, 2543; พยอม ตันติวัฒนน์, 2521; ส่งศรี พิพิธกุล, 2551)

1.3.2 สรรพคุณในการนำไปใช้ประโยชน์

1.3.2.1 รากตำผสมน้ำฆ่าแมลงหนอนและศัตรูพืชหรือใช้รากประมาณ 1 กิโลกรัม ตำละเอียดแล้วแช่ในน้ำมันมะพร้าวหรือน้ำ 1 ปี๊บ ทิ้งไว้ 1 คืน นำน้ำหมักมาฉีดพ่นเพื่อฆ่าแมลงและหนอนต่าง ๆ ได้ดี

1.3.2.2 รากต้มน้ำดื่ม ถ่ายพยาธิตัวจี๊ด นำรากผสมกับหวายนาและชะอมต้มน้ำดื่มจะถ่ายพยาธิตัวจี๊ด และคั้นน้ำพอกแก้หิดเหา หรือนำรากมาโขลกบีบเอาน้ำหยอดแผลวัวควายซึ่งมีหนอนไช หนอนจะตายหมด

1.3.2.3 รากปรุงยารับประทาน แก้โรคผิวหนังผื่นคันน้ำเหลืองเสีย หัวริดสีดวงให้ฝ่อแห้งไป พอกทาแก้โรคผิวหนัง ฆ่าหิดเหา ฆ่าเชื้อพยาธิภายในมะเร็งตับ (สุดารัตน์ หอมหวล, 2553)



ภาพประกอบ 3 ต้นหนอนตายหยากชนิด *S. collinsiae* Craib

ที่มา*:* Bob and Chayamarit, (2011)

1.4 หนอนตายหยากเล็ก (*S. tuberosa* Lour.)

1.4.1 ลักษณะพฤกษศาสตร์

ลำต้นเป็นไม้เถาเลื้อยล้มลุก มีรากออกเป็นพวงหลายสิบราก ลักษณะเป็นรูปกระสวยออกเป็นกระจุกคล้ายรากกระชาย ยาวได้ถึง 10-30 เซนติเมตร ใบเป็นใบเดี่ยว ดอกเป็นดอกเดี่ยวออกที่ซอกใบ กลีบดอก 4 กลีบ เกสรเพศผู้มี 4 อัน อับเรณูสีแดง เกสรเพศเมียมีรังไข่

เหนือวงกลีบ ผลเป็นผลแห้งแตกได้ พบขึ้นใต้ร่มเงาในป่าเบญจพรรณและป่าดิบแล้งทั่วไป บนพื้นที่ใกล้ระดับน้ำทะเลจนถึงระดับสูงประมาณ 1,200 เมตร ออกดอกราวเดือนมีนาคมถึงพฤษภาคม (วาสนา สอนเพ็ง, สภาณี พิมพ์สมาน, และ ฉันทนา อารมณ์ดี, 2552; ส่งศรี พิพิธกุล, 2551)

1.4.2 สรรพคุณในการนำไปใช้ประโยชน์

รักษาริดสีดวงทวารหนัก รากแห้งใช้เป็นยาแก้ไอ ขับเสมหะ รักษาวัณโรค แก้โรคผิวหนัง ยาขับเบื่อพยาธิ และรากสดใช้รักษาพยาธิจี๊ด หิด เหา แก้ปวดฟัน

พืชที่ใช้สำหรับการวิจัยคือหนอนตายหยากดอกสั้น (S. *collinsiae* Craib) เนื่องจากมีสรรพคุณในการนำมาใช้ประโยชน์ในทางพฤกษศาสตร์พื้นบ้านและจำหน่ายในท้องตลาด ใช้เป็นสารกำจัดแมลงศัตรูพืชจากธรรมชาติและใช้รักษาบรรเทาอาการโรคต่าง ๆ เช่น โรคผิวหนัง น้ำเหลืองเสีย ผื่นคันตามร่างกาย ฆ่าเชื้อโรค มะเร็งตับ ลดระดับน้ำตาลสำหรับโรคเบาหวาน รวมทั้งโรคริดสีดวง ปวดฟัน ปวดเมื่อย นอกจากนี้ในประเทศจีนมีการนำรากสะสมอาหารที่มีการแตกออกเป็นเหง้าเป็นกระจุกของหนอนตายหยากมาใช้รักษาอาการไอและวัณโรค (antitussive) โดยใช้ร่วมกับสมุนไพรชนิดอื่น ๆ ในประเทศไทยมีรายงานว่ามีการใช้รากหนอนตายหยากดอกสั้น (S. *collinsiae* Craib) เป็นสารกำจัดแมลง ยาทาภายนอกสำหรับแผลที่เกิดจากหนอนหรือตัวอ่อนของแมลงบางชนิด ทำยาต้มรับประทานแก้โรคผื่นคันหรือใช้รากสดทุบใส่ไหปลาร้าทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อฆ่าหนอน (Burkill, 1935; วีรพล จันทร์สวรรค์, สถาพร จิตตปาลพงศ์, และ นงนุช จันทรราช, 2536) ใช้รากแห้งของหนอนตายหยากต้มกับน้ำดื่มเพื่อแก้ไอและขับเสมหะ นอกจากนี้ยังพบสารพฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบที่มีความสำคัญต่อการนำไปใช้ประโยชน์ได้

2. สารสำคัญในหนอนตายหยาก

สารสำคัญในหนอนตายหยากพบว่าอยู่ในกลุ่ม polycyclic alkaloids ที่มีโครงสร้างซับซ้อน อัลคาลอยด์ (alkaloids) เป็นสารอินทรีย์ที่เป็นด่าง และมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ มีรสขม ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) เป็นสารที่พบมากในพืชสมุนไพร แต่ปริมาณสารจะต่างกันไปตามฤดูกาล อัลคาลอยด์มีประโยชน์อย่างมากในการรักษาโรคต่าง ๆ เช่น ใช้เป็นยาระงับความปวด ยาชาเฉพาะที่ แก้หอบหืด ยารักษาแผลในกระเพาะและลำไส้ ยาลดความดัน นอกจากประโยชน์ในการรักษาแล้ว อัลคาลอยด์จำนวนไม่น้อยที่เป็นพิษต่อร่างกาย ใช้เป็นยาพิษและใช้ในการล่าสัตว์ (สาโรช เจริญศักดิ์, กาญจนา ชินสำราญ, และ ดวงสุรีย์ แสนสีระ, 2560)

อัลคาลอยด์แบ่งได้เป็น 6 กลุ่ม คือ stenine, stemoamide, tuberostemospironine, stemonamine, tuberostemonamide (Kaltenegger et al., 2003; Pilli, 2000) (ภาพประกอบที่ 4) และกลุ่มอื่น ๆ (ตารางที่ 2)

2.1.1 stenine alkaloids สารสำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ stenine, tuberostemonine, tuberstemonine A, tuberostemonol, tuberostemospironine, bisdehydroneo tuberostemospironine, neotuberostemonine และ oxotuberostemospironine

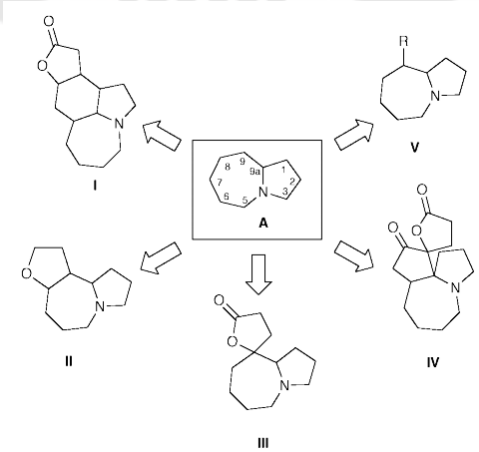
2.1.2 stemoamide alkaloids สารสำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ stemoamide, stemonine, neostemonine, bisdehydroneostemonine, protostemonine, didehydroprotostemonine, isoprotostemonine, tuberostemonamide, stemoninine และ neostemodiol

2.1.3 tuberostemospirnonine alkaloids สารสำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ tuberostemospironine croomine, stemospironine, stemotinine, isostemtinine, stemonidine และ didehydrocroomine

2.1.4 stemonamine alkaloids มีโครงสร้างหลักเป็น pyrrolo [1,2-a] azepine และ pyrido [1,2-a] azepine สารสำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ stemonamine, isostemonamine, stemonamide, isostemonamide, maistemonine และ oxymaistemonine

2.1.5 parvistemoline alkaloids สารสำคัญได้แก่ parvistemoline, parvistemonine และ didehydroparvistemonine

2.1.6 กลุ่มอื่น ๆ ได้แก่ stemofoline, oxystemofoline, methoxymofoline, parvistemoninine และ parvistemonamide



ภาพประกอบ 4 *Stemona* alkaloid groups.

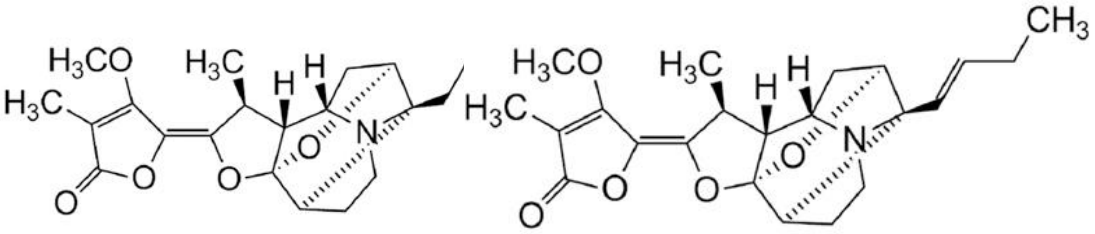
ที่มา: Kaltenegger et al. (2003)

ตาราง 2 Stemona alkaloids ในพืชสกุลหนอนตายหยากบางชนิด

Stemona species	*Stemona* alkaloids
S. tuberosa	stemofoline
	tuberostemonol
	didehydrotuberostemonine
	bisdehydrotuberostemonine
	1′,2′-didehydrostemofoline
	tuberodtemonone
S. japonica	stemonine
	neostemonine
S. sessilifolia	tuberostemonine
	stemoninine
	protostemotinine
S. mairei	protostemonine
S. collinsiae	1′,2′-didehydrostemofoline
	stemofoline
	16,17-didehydro-16(E)-stemofoline

สารสกัดจากราก *Stemona* มีสารออกฤทธิ์ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิในกลุ่มอัลคาลอยด์ที่เรียกว่า *Stemona* alkaloids โดยสารเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงศัตรูพืชและจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืชได้หลายชนิด เช่น หนอนกัดกินใบ และเพลี้ยอ่อน รวมทั้งกำจัดลูกน้ำยุง (Burikam, Jiwajinda, Wongmaneeroj, and Homhaul, 2005; Pilli and de, 2000; มณฑา วงศ์มณีโรจน์ และคณะ, 2548) ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับเกษตรกรในการกำจัดศัตรูพืชทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ จากการศึกษาตัวอย่างหนอนตายหยากที่เก็บได้จากแหล่งต่าง ๆ มาตรวจวิเคราะห์พบว่ามีสาร stemofoline และ 1′,2′-didehydrostemofoline (ภาพประกอบที่ 5) ซึ่งพบปริมาณสารนี้มากในหนอนตายหยาก โดยเฉพาะในหนอนตายหยากชนิด *S. collinsiae* Craib นอกจากนี้ยังพบสาร 1′,2′-didehydrostemofoline และสาร stemofoline ในรากของ

หนอนตายหยากเป็นสารที่น่าสนใจและมีความสำคัญทางการแพทย์ (Sastraruji, Chaiyong, Jatisatienr, Pyne, and Ung, 2011) โดยพบสารทั้งสองชนิดนี้มีฤทธิ์ป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ โดยมีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคอัลไซเมอร์ (Baird and Morwenna, 2009)



S = stemofoline DS = 1′,2′-didehydrostemofoline

ภาพประกอบ 5 โครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ที่ตรวจพบในต้นหนอนตายหยาก

ที่มา: Kaltenegger et al. (2003)

สารสกัดที่ได้จาก *Stemona* พบว่าไม่เสถียร มีโครงสร้างเปลี่ยนแปลงได้ง่าย โดยเฉพาะเมื่อพืชเกิดบาดแผลจากการเก็บในธรรมชาติและมีเชื้อโรคเข้าทำลาย เช่น เชื้อรา แม้แต่สารอัลคาลอยด์ที่เป็นสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จาก *Stemona* เมื่อเก็บไว้ชั่วขณะหนึ่งในรูปผลึก เมื่อนำมาวิเคราะห์ซ้ำด้วยเทคนิค thin layer chromatography ผลที่ได้พบว่าเกิดเป็นสารอื่นเพิ่มขึ้นจากเดิม ปัญหาดังกล่าวจึงมีความสำคัญในแง่การนำสารสกัดจาก *Stemona* มาใช้ในระดับอุตสาหกรรม (สรัญญา วัชโรทัย, 2551)

3. การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการก่อกลายพันธุ์

การกลายคือการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของยีนจากสภาพหนึ่งไปอีกสภาพหนึ่งหรือการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมในลักษณะต่าง ๆ (สิรนุช ลามศรีจันทร, 2540) และยังสามารถถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงไปยังเซลล์ลูกได้ด้วยกระบวนการแบ่งเซลล์ การกลายมี 2 ระดับคือการกลายระดับยีน เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในยีน เป็นการสูญหายหรือเพิ่มเข้ามาของส่วนของยีน หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงในส่วนโครงสร้างของยีน และการกลายระดับโครโมโซมเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดในโครงสร้างโครโมโซม

อาจเกิดจากการขาดหายไปของส่วนโครโมโซม ทำให้ยีนจำนวนหนึ่งขาดหายไปหรือเกิดจากการที่ส่วนของโครโมโซมเพิ่มมากกว่าปกติ หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต อาจมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสิ่งมีชีวิตที่เป็นลักษณะใหม่ ๆ แตกต่างจากลักษณะเดิม ซึ่งเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต มีประโยชน์ในการช่วยเพิ่มความแปรปรวนในพืช เป็นการเพิ่มความสำเร็จในการคัดเลือกพืชให้ได้ลักษณะตามที่ต้องการ การกลายที่เกิดขึ้นในพืชแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ

3.1 การกลายที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (spontaneous mutation)

มีบทบาทต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งมีชีวิต พืชที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเวลายาวนานเช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เป็นปัจจัยหลักที่ช่วยให้พืชสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงตลอดเวลาได้คือ ความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นและสะสมอยู่ในพืช พืชได้รับความแปรปรวนทางพันธุกรรมส่วนหนึ่งมาจากการกลายตามธรรมชาติ และสามารถมีโอกาสกลายได้ตลอดเวลา ได้ทุกเซลล์และทุกระยะของการเจริญเติบโต (อรุณี วงศ์ปิยะสถิต, 2554) นอกจากนี้พืชยังได้รับความแปรปรวนทางพันธุกรรมเพิ่มมาจากการอพยพของพืชชนิดใหม่เข้ามาในกลุ่มของประชากรเดิม หรือการผสมพันธุ์ระหว่างพืชที่กลายทำให้เกิดลักษณะใหม่ ๆ ขึ้นมาจากการรวมกันของยีนที่ต่างชนิดกัน ความแปรปรวนทางพันธุกรรมและการสะสมอยู่ในประชากรของพืชมีประโยชน์อย่างมากต่อวิธีที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อสร้างพืชพันธุ์ใหม่ที่มีคุณลักษณะตามต้องการ

3.2 การกลายที่เกิดจากการชักนำ (induced mutation)

การกลายโดยการชักนำ เป็นการกลายที่เกิดขึ้นจากการกระทำของมนุษย์ซึ่งมีอัตราการการกลายสูงกว่าการกลายตามธรรมชาติ สิ่งที่ใช้ในการชักนำเรียกว่า สิ่งก่อการกลาย (mutagen) ซึ่งมี 2 ประเภท

3.2.1 สิ่งก่อกลายทางกายภาพ (physical mutagen) ได้แก่ รังสีต่าง ๆ ซึ่งแบ่งตามความสามารถในการทำให้ตัวกลางแตกตัวเป็นไอออน ได้เป็น 2 ประเภท คือ

3.2.1.1 รังสีไม่ก่อให้เกิดไอออน (non-ionizing radiation) หมายถึง รังสีที่มีพลังงานต่ำ เมื่อผ่านเข้าไปในตัวกลางใด ๆ จะไม่สามารถทำให้ตัวกลางนั้นแตกเป็นไอออน เนื่องจากมีพลังงานไม่มากพอที่จะผลักอิเล็กตรอนให้หลุดออกจากอะตอมได้ รังสีประเภทนี้มีพลังงานอยู่ในช่วง 10^{-2} – 10^{2} eV เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต (ultraviolet, UV) อินฟราเรด (infrared) และแสงสว่าง (visible light) (อรุณี ม่วงแก้วงาม, 2561)

3.2.1.2 รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) หมายถึงรังสีที่มีพลังงานสูง โดยรังสีชนิดนี้เมื่อผ่านเข้าไปในตัวกลางใด ๆ ส่งผลให้อะตอมของตัวกลางเกิดการแตกตัวเป็นไอออน โดยที่พลังงานจากรังสีจะผลักให้อิเล็กตรอนในอะตอมตัวกลางหลุดออก เกิดเป็นคู่ไอออนสองชนิด คือ อิเล็กตรอนอิสระที่มีประจุลบ และไอออนบวกที่มีอะตอมขาดอิเล็กตรอน เช่น รังสีเอ็กซ์ (X-rays) รังสีแกมมา (gamma rays) อนุภาคแอลฟา (alpha particle) อนุภาคบีตา (beta particle) (อรุณี ม่วงแก้วงาม, 2561)

รังสีที่ได้ผลดีสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการเหนี่ยวนำพืชให้เกิดการกลาย คือ รังสีไอออน ได้แก่ รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา รังสีนิวตรอน และไอออนบีม

3.2.2 สิ่งก่อกลายทางเคมี (chemical mutagen) แบ่งเป็น 4 กลุ่ม คือ

3.2.2.1 แอลคิเลติงเอเจนต์ (alkylating agent) เป็นกลุ่มสำคัญที่สุดในการชักนำให้พืชเกิดการกลาย สารเคมีในกลุ่มนี้มีหมู่แอลคิล 1 หมู่หรือมากกว่า ซึ่งไวต่อการทำปฏิกริยากับโมเลกุลดีเอ็นเอ โดยจะเข้าทำปฏิกริยากับดีเอ็นเอที่เบสพิวรีนและเบสไพริมิดีน เกิดเป็นปฏิกริยาแอลคิเลชันซึ่งจะเกิดมากที่สุดบริเวณ N-7 ของเบสกัวนีน โดยสารเคมีที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ประกอบด้วย ethyl methanesulfonate (EMS), methyl methanesulfonate (MMS), ethyl ethanesulfonate (EES), diethyl sulfate (dES) และ dimethyl sulfate (dMS) สามารถชักนำการกลายในพืชได้ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และ ปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550)

3.2.2.2 เบสแอนาลอก (base analogue) เป็นกลุ่มของสารเคมีและโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบสต่าง ๆ ของดีเอ็นเอ ดังนั้นเบสแอนาลอกจึงเข้าไปแทนที่เบสจริงในดีเอ็นเอได้ และยังสามารถทำหน้าที่เป็นแม่แบบของการจำลองดีเอ็นเอ ตัวอย่างของเบสแอนาลอก เช่น 5-bromo-uracil (BU) และ 5-bromo-deoxy uridine (BUdR) (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และ ปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550)

3.2.2.3 แอนติไบโอติก (antibiotic) เป็นสารปฏิชีวนะ ยกตัวอย่างเช่น azaserine, mitomycin C, streptonigrin และ actinomycin D สามารถชักนำให้โครโมโซมเกิดการแตกหัก (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และ ปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550)

3.2.2.4 อื่น ๆ ที่นอกจาก 3 กลุ่มดังกล่าวซึ่งไม่จัดเข้าในกลุ่มใด ได้แก่

1) อะคริดีน (acridine) สารที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ proflavine, acriflavine, acridine orange, ICR-170, ethydium bromide (EB) และ 9-aminoacridine มีสมบัติทำให้โครโมโซมแตกหัก โดยทำให้เบสในดีเอ็นเอเกิดการขาดหายหรือเพิ่มขึ้นมา ส่งผลให้เกิดการกลายแบบเฟรมชิพท์ (frameshift mutation)

2) เอไซด์ (azide) จัดอยู่ในรูปของโซเดียมเอไซด์ (sodium azide : NaN_3) หรือโปแทสเซียมเอไซด์ (potassium azide : KN_3) มีคุณสมบัติในการชักนำให้เกิดการกลายในระดับยีนและใช้ได้อย่างปลอดภัยเพราะไม่มีสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง รวมทั้งราคาถูก แต่พบว่าใช้ได้ผลดีกับพืชบางชนิดเท่านั้น เช่น ข้าวบาร์เลย์ และถั่วเขียว โดยจากการศึกษาพบว่าเกิดรูปแบบการกลายโดยการแทนที่เบส (base substitution)

3) ไฮดรอกซิลามีน (hydroxylamine, NH_2OH) มีคุณสมบัติทำให้โครโมโซมเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยเกิดจากไฮดรอกซิลามีนเข้าจะทำปฏิกริยากับเบสไซโทซีนและกัวนีนภายในดีเอ็นเอ

4) กรดไนตรัส (nitrous acid, HNO_2) จะเกิดการเคลื่อนย้ายหมู่อะมิโนจากเบสไพริมิดีนและพิวรีน ส่งผลให้เกิดการจับคู่ของเบสผิดปกติ นอกจากนี้พบว่าสามารถชักนำให้เกิดการกลายได้ดีกับไวรัสและจุลินทรีย์ (อารักษ์ ธีรอำพน, 2557)

3.3 ผลการกลายที่ส่งผลต่อพันธุกรรมพืช

การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมที่เกิดขึ้นกับโมเลกุลของดีเอนเอ ซึ่งไม่ได้เกิดจากการรวมตัว (recombination) หรือการแยกตัว (segregation) ของสารพันธุกรรมตามปกติและสามารถถ่ายทอดลักษณะการเปลี่ยนแปลงนั้นจากเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปยังเซลล์ลูกได้ด้วยกระบวนการแบ่งเซลล์ (วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, 2554) การกลายแบ่งได้เป็น 2 ระดับคือ

3.3.1 การกลายระดับยีน (gene mutation หรือ point mutation) เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในยีน เกี่ยวข้องกับการสูญหายไปหรือเพิ่มเข้ามาของส่วนของยีนหรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในยีน การเปลี่ยนแปลงของยีนแบ่งตามลักษณะการเกิดได้ 2 ชนิด คือ

3.3.1.1 การกลายแบบเฟรมชิพท์ (frameshift mutation) รูปแบบการกลายที่เกิดเนื่องจากการเพิ่มหรือหลุดของเบสจากดีเอ็นเอของพืช พบว่าลำดับของเบสบน mRNA เปลี่ยนแปลงโดยเบสมีการเพิ่มหรือหลุดเพียง 1 เบส ก็สามารถทำให้การอ่านรหัสพันธุกรรมทีละ 3 เบส (triplet code) เปลี่ยนแปลงได้ ส่งผลให้ลำดับของกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไป (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, และ สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช, 2554) ทำให้โปรตีนที่สร้างขึ้นมาจากยีนไม่สามารถทำงานได้เหมือนเดิมหรือมีประสิทธิภาพไม่เหมือนเดิม หรือทำงานไม่ได้เลย

3.3.1.2 การกลายเนื่องจากการเข้าแทนที่ของคู่เบส (base substitution) คือการ เปลี่ยนแปลงในสารพันธุกรรมเนื่องจากการเข้าแทนที่ของคู่เบส การกลายแบบนี้เกิดขึ้นได้ 2 ลักษณะ คือ

1) ทรานซิชัน (transition) เป็นการแทนที่ของคู่เบสในกลุ่มเดียวกัน เช่น เบสอะดินีน (adenine, A) ซึ่งเป็นเบสในกลุ่มพิวรีน (purine) เข้าแทนที่เบสกัวนีน (guanine, G) ซึ่งเป็นเบสกลุ่มพิวรีนเช่นเดียวกัน หรือเบสไซโตซีน (cytosine, C) เข้าแทนที่เบสไทมีน (thymine, T) ซึ่งทั้งสองต่างเป็นกลุ่มเบสไพริมิดีน (pyrimidine)

2) ทรานสเวอร์ชัน (transversion) เป็นการเปลี่ยนแปลงแบบสลับคู่ของเบส คือ เบสพิวรีน (A หรือ G) เข้าไปแทนที่เบสไพริมิดีน (C หรือ T) หรือในทางตรงข้ามเบสไพริมิดีน (C หรือ T) เข้าไปแทนที่เบสพิวรีน (A หรือ G)

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการแทนที่คู่เบสใดคู่เบสหนึ่ง ทำให้เกิดการสร้างกรดอะมิโนตัวอื่นขึ้นแทนที่โดยสร้างกรดอะมิโนตัวใหม่ที่ต่างไปจากเดิม เกิดเป็นโปรตีนตัวใหม่ที่อาจทำหน้าที่ไม่เหมือนเดิม หรือมีประสิทธิภาพในการทำงานน้อยกว่าเดิม หรือไม่สามารถทำหน้าที่ใด ๆ ได้เลย การกลายเนื่องจากการเข้าแทนที่คู่เบสเป็นการเปลี่ยนแปลงเฉพาะเบสตัวใดตัวหนึ่ง จึงมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า การกลายเฉพาะจุด (point mutation) (วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, 2554)

3.3.2 การกลายระดับโครโมโซม (chromosome mutation) การกลายของโครโมโซมเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดในโครงสร้างหรือจำนวนโครโมโซม ซึ่งเกี่ยวข้องกับยีนหลายยีน การกลายของโครโมโซมเกิดได้ใน 2 ลักษณะ คือ

3.3.2.1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโครโมโซม อาจเกิดจากการขาดหายไปของส่วนของโครโมโซม (deletion) ทำให้ยีนจำนวนหนึ่งขาดหายไป หรือเกิดจากการที่ยีนหรือส่วนของโครโมโซมเพิ่มเข้ามามากกว่าปกติ (duplication) หรือเกิดจากการเปลี่ยนแปลงกลับทิศทางของส่วนของโครโมโซม (inversion) หรือเกิดการย้ายสลับที่ระหว่างส่วนของโครโมโซม 2 โครโมโซม (translocation) หรือชิ้นส่วนของโครโมโซมย้ายไปอยู่ตำแหน่งใหม่ภายในโครโมโซมเดียวกัน หรือต่างโครโมโซมโดยไม่มีการแลกเปลี่ยนส่วนกันเกิดขึ้น (transposition) (อนรรฆอร วรรณจินดาพร, 2558)

3.3.2.2 การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม ได้แก่ การเพิ่มหรือลดจำนวนโครโมโซมลงจากปกติ โดยทั่วไปสิ่งมีชีวิตอยู่จะมีจำนวนโครโมโซมแบบโซมาติกเซลล์เป็นดิพพลอยด์ คือ 2n แต่อาจมีการเพิ่มหรือลดจำนวนในบางโครโมโซม เรียกว่า แอนนิวพลอยด์ (aneuploidy) เช่น เป็น 2n+1 หรือ 2n-1 เป็นต้น หรือมีการเพิ่มหรือลดของโครโมโซมเป็นชุด เรียกว่า โพลีพลอยด์ (polyploidy) เช่น 3n หรือ 4n (อนรรฆอร วรรณจินดาพร, 2558)

การกลายที่เกิดขึ้นในระดับยีนหรือโครโมโซม หากต้องการทราบว่ามีการกลายเกิดขึ้นแล้วต้องเกิดการเปลี่ยนแปลงทางฟีโนไทป์ โดยพบว่าบางลักษณะที่เปลี่ยนแปลงอาจชัดเจนจนสามารถแยกได้ด้วยตาเปล่า เช่น มีการเปลี่ยนแปลงในรูปทรงของต้น สีดอก จำนวนหรือขนาดของผล ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ดี แต่พบว่าการกลายบางรูปแบบเกิดการเปลี่ยนแปลงทางฟีโนไทป์เล็กน้อยเท่านั้นจนไม่ปรากฏเห็นได้ชัด ต้องใช้วิธีการเฉพาะในการแยกพันธุ์กลาย ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงเชิงปริมาณ เช่น องค์ประกอบทางเคมีต่าง ๆ ของพืช ปริมาณโปรตีน ไขมัน น้ำตาล กรดอะมิโน ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสง การเก็บสะสมอาหารของพืช เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิคทางโมเลกุล (molecular techniques) มาช่วยในการตรวจสอบพันธุ์กลายที่เกิดขึ้น

3.4 การนำพันธุ์กลายจากการชักนำไปใช้ประโยชน์

3.4.1 การใช้ประโยชน์พันธุ์กลายโดยตรง (direct use) พันธุ์กลายที่เกิดขึ้นและมีลักษณะตามความต้องการของการปรับปรุงพันธุ์ รวมถึงลักษณะเดิมสามารถคงอยู่ได้ สามารถนำไปใช้เป็นพันธุ์ใหม่ได้โดยตรง คือนำมาขยายพันธุ์และปรับปรุงให้เป็นพันธุ์ปลูกสำหรับเกษตรกรได้ทันที หลังจากผ่านการทดสอบพันธุ์และรับรองพันธุ์ของหน่วยงานที่เกี่ยวข้องแล้ว เช่น ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 และ กข 10 ข้าวเจ้าพันธุ์ กข 15 เป็นต้น (อารักษ์ ธีรอำพน, 2557)

3.4.2 การใช้ประโยชน์พันธุ์กลายทางอ้อม (indirect use) เนื่องจากพันธุ์กลายที่ได้มีลักษณะที่น่าสนใจแต่พบว่ายังไม่ดีพอจนสามารถนำมาขยายพันธุ์และส่งเสริมเป็นพันธุ์ใหม่ได้โดยตรง เนื่องจากยังมีลักษณะที่ไม่ต้องการร่วมอยู่ด้วย โดยจะนำพันธุ์กลายลักษณะเช่นนี้ไปใช้ในการผสมเพื่อถ่ายทอดลักษณะที่ต้องการจากพันธุ์กลายเข้าไปยังพืชที่ต้องการปรับปรุง ซึ่งยังขาดลักษณะนี้อยู่ เทคนิคนี้ได้มีการนำเอาไปใช้ในธัญพืช เช่น ข้าวบาร์เลย์ ทำให้ได้พันธุ์ใหม่ ๆ ออกมาหลายพันธุ์ (อรุณี วงศ์ปิยะสถิต, 2554; อารักษ์ ธีรอำพน, 2557)

4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคนิคที่นำมาใช้ในการขยายพันธุ์พืชเพื่อให้ได้ต้นพันธุ์จำนวนมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว และได้สายพันธุ์ที่มีความสม่ำเสมอตามความต้องการ ซึ่งสามารถขยายพันธุ์ได้ในทุกฤดูกาลโดยไม่ขึ้นกับสภาวะแวดล้อม โดยการนำชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ยอด ลำต้น ตาข้าง กลีบดอก มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ภายใต้สภาวะควบคุมและปลอดเชื้อ จากนั้นชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงจะมีการเจริญพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์จนนำไปออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้ (กรมส่งเสริมเกษตร, 2559) ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถทำได้ตั้งแต่การเพาะเลี้ยงเซลล์เดียวที่ไม่มีผนัง เรียกว่า โพรโตพลาสต์ (protoplast) หรือเนื้อเยื่อพืชชิ้นเล็ก ๆ การชักนำให้มีการพัฒนาเกิดเป็นอวัยวะส่วนต่าง ๆ เช่น เกิดเป็นยอด ราก เอมบริโอ หรือ

กลุ่มเซลล์ที่ เรียกว่า แคลลัส (callus) จนกระทั่งพัฒนากลายเป็นต้นที่สมบูรณ์ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับงานต่าง ๆ ให้เกิดประโยชน์มากมาย เช่น การปรับปรุงพันธุ์พืชร่วมกับ เทคโนโลยีทางพันธุศาสตร์โมเลกุลเพื่อการตัดต่อยีนให้ได้ต้นพืชที่มีลักษณะที่ต้องการ การเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ การเพาะเลี้ยงเพื่อสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรม การเพาะเลี้ยงเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลาย (รงรอง, 2542; สมพร, 2552; สิริภัทร์, 2558) โดยอาหารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายสูตร จะเลือกใช้สูตรใดขึ้นอยู่กับพันธุ์พืช ชนิดและสภาพของชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยง รวมทั้งวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น สำหรับอาหารที่นิยมใช้มากที่สุดคือ อาหารดัดแปลงที่ประกอบด้วยเกลือของธาตุ อาหารที่ต้องการครบถ้วน คือ สารประกอบอนินทรีย์ และสารประกอบอินทรีย์ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง คือ ต้องการทั้งธาตุอาหารหลัก (macroelements/nutrients) และธาตุอาหารรอง (micro-elements/nutrients นอกจากนี้ยังต้องการธาตุอาหารอื่น ๆ เช่น แหล่งของธาตุคาร์บอน และวิตามินอย่างมาก โดยสูตรอาหารที่นิยมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลากหลายชนิด เช่น สูตร VW (Vacin and Went, 1949) ใช้กับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ สูตร MS (Murashige and Skoog) สามารถใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้เกือบทุกชนิด (ตารางภาคผนวก 1) สูตร Hidebrandt (1962) ใช้เพาะเลี้ยงแคลลัสยาสูบ สูตร White (1963) ใช้เพาะเลี้ยงส่วนราก สูตร Miller (1963) ใช้เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าว สูตร Y 3 (Eeuwens; 1967) ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตระกูลปาล์ม เช่น มะพร้าวกะทิ อินทผาลัม ปาล์มน้ำมัน สูตร B5 (Gamborg; 1970) ใช้เพาะเลี้ยงพืชสำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ถั่วเหลือง เป็นต้น โดยมีการใส่ควบคู่กับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) (ณัฏฐากร, 2552)

4.1 สูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหนอนตายหยาก

การขยายพันธุ์ต้นหนอนตายหยากโดยทั่วไปใช้วิธีการแยกเหง้าและเพาะเมล็ด โดยต้นหนึ่งจะมีผลประมาณ 2-5 ผล ภายในผลจะมีเมล็ดประมาณ 2-7 เมล็ด ซึ่งไม่เพียงต่อการขยายพันธุ์เป็นจำนวนมากเพื่อทดแทนส่วนที่ถูกขุดออกมาจากป่าและการปลูกในเชิงการค้ายังมีน้อย ดังนั้นการนำหนอนตายหยากมาใช้ประโยชน์ อย่างการใช้เป็นยาสมุนไพรหรือสารควบคุมแมลงศัตรูพืช วัตถุดิบที่ได้ส่วนใหญ่มีที่มาจากป่าทั้งสิ้น ประกอบกับสภาพอากาศในปัจจุบันที่มีความแปรปรวนอย่างรุนแรงทั้งแห้งแล้งและน้ำท่วมทำให้เริ่มหายากมากขึ้น และยังเป็นที่ต้องการของตลาดสูง ทำให้มีการเก็บมาขายโดยไม่ได้ปลูกทดแทน นอกจากนี้การขุดรากจำนวนมากยังส่งผลต่อระบบนิเวศวิทยาของป่า จึงสมควรที่จะหาทางอนุรักษ์พืชเหล่านี้ไว้โดยวิธีการขยายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงคือ การ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (รังสฤษดิ์, 2540; อารีย์, 2541)

หนอนตายหยากที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์คือหนอนตายหยากชนิด *S. collinsae* โดยมีรายงานการศึกษาการขยายพันธุ์หนอนตายหยาก เช่น ศิริวรรณ และคณะ (2547) พบว่าการเพิ่มปริมาณต้นใหม่ให้มีจำนวนมากด้วยการนำเอาเนื้อเยื่อตายอดและตาข้างมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ซึ่ง เติมฮอร์โมน BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณต้นได้มากกว่าเดิม 2-3 เท่า ยุพาและคณะ (2543) ชักนำยอดหนอนตายหยากในอาหาร MS ที่เติมสาร BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และชักนำรากในอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำรากจากยอดได้เพียง 55 เปอร์เซ็นต์ Montri et al. (2006) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหนอนตายหยากชนิด *S. curtisii* พบว่าสามารชักนำการเกิดยอดหลายยอดจากตาข้างในอาหาร MS ที่เติมสาร BAP ความเข้มข้น 20 ไมโครลิตร และการชักนำรากจากยอดพบว่าอาหาร MS ที่เติมสาร IAA ความเข้มข้น 10 ไมโครลิตร สามารถชักนำรากได้ดีที่สุด กาญจนา และอริยาภรณ์ (2551) ทดลองขยายพันธุ์หนอนตายหยาก (*S. collinsae* Craib) ในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำยอดหนอนตายหยากมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ความเข้มข้น 1.2 1.8 และ 2.4 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 2.5 5.0 7.5 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นจึงนำไปชักนำให้เกิดรากโดยใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0 1 2 3 5 7 และ 9 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีทำให้ยอดมีการเจริญเติบโตและมีการพัฒนาได้ ถึง 83.3 เปอร์เซ็นต์ สูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดีที่สุด 7 ยอดต่อชิ้น ส่วนการชักนำให้เกิดรากในอาหารสังเคราะห์ที่เติม IBA ระดับต่าง ๆ พบว่า ที่ ระดับความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์

5. การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการชักนำให้กลายด้วย EMS

5.1 คุณลักษณะของ EMS

EMS จัดเป็นสารเคมีอยู่ในกลุ่ม alkylating agent นิยมใช้มากในการชักนำให้เกิดการกลายในพืช เพราะมีประสิทธิภาพสูงในการทำให้เกิดการกลาย สามารถใช้ได้ผลดีกับพืชหลายชนิด โดยมีคุณสมบัติดังนี้

สูตรทางเคมี	$CH_3SO_2OC_2H_5$ เป็นของเหลวใส ไม่มีสี
มวลโมเลกุล	124
ความหนาแน่น	1.203 กรัมต่อมิลลิลิตรที่ 25 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	85-86 องศาเซลเซียส 10 มิลลิเมตรปรอท

การละลายน้ำ ประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์

EMS ประกอบด้วยหมู่เอทิล (C_2H_5: ethyl group) 1 หมู่ โดยจะเกิดการเติมหมู่เอทิลเข้าที่เบสกัวนีน ได้เป็น 7- ethyguanine ซึ่งจะจับกับเบสไทมีน (T) ส่งผลให้เกิดการจับคู่เบสที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งจะนำไปสู่การกลายรูปแบบ transition และเกิดการหลุดของเบสพิวรีนจากดีเอ็นเอเพราะมีหมู่เอทิลเข้าไปจับในตำแหน่งต่าง ๆ ในเบสพิวรีน ส่งผลให้เกิดการตัดขาดของพันธะที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลกับเบสและเกิดช่องว่างขึ้น ต่อมาเมื่อเซลล์มีกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเออาจเกิดความผิดพลาดได้ และนอกจากนี้การตัดขาดของหมู่ฟอสเฟตและน้ำตาลอาจทำให้เกิดดีเอ็นเอสายเดี่ยวและสายคู่ขาดจากกันได้ นำไปสู่การหลุดหายไปของชิ้นส่วนดีเอ็นเอและเกิดการกลายในต่อมา (ชญานีย์ สังวาลย์, 2557; ชานนท์ ลาภจิตร และ เมิง-เจียว เจิง, 2560)

5.2 การใช้ EMS เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช

การใช้ EMS ในการชักนำให้เกิดการกลายในพืช มีรายละเอียดแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดและส่วนของพืชที่นำมาใช้ ส่วนของพืชที่นิยมใช้มากที่สุดคือ เมล็ด เนื่องจากสามารถทำได้ในปริมาณมาก ง่าย สะดวก ให้ผลดี และสามารถควบคุมความปลอดภัยได้ง่าย และพบในชิ้นส่วนอื่น ๆ ของพืชก็สามารถนำมาให้สาร EMS ได้เหมือนกัน เช่น พืชทั้งต้น บริเวณใดบริเวณหนึ่งของต้น ละอองเรณู หรือราก

5.2.1 การให้ EMS กับเมล็ดพืช (seed plant)

เมล็ดที่จะนำมาทำทรีตเมนต์ควรเป็นเมล็ดที่สะอาดปราศจากสิ่งเจือปน เมล็ดสมบูรณ์ มีความงอกดี สำหรับการเตรียมเมล็ดและการแช่เมล็ดก่อนให้สาร EMS (pre-soaking) โดยการเตรียมเมล็ดจะเริ่มจากการนำเมล็ดที่คัดเลือกใส่ในถุงผ้า เปิดน้ำประปาให้ไหลเข้าออกตลอดเวลาเพื่อชะล้างสารต่าง ๆ จากเมล็ด เช่น สารในกระบวนการสร้างและสลาย (free metabolites) หรือสารที่ยับยั้งการงอกของเมล็ด ทำให้ผนังเซลล์เปิดให้ให้สารเคมีต่าง ๆ เข้าและออกได้ และเพื่อแยกเมล็ดดีออกจากเมล็ดเสียโดยอาศัยขนาดการพองตัวของเมล็ด ตามระยะเวลาที่แช่แล้วนำถุงบรรจุเมล็ด ซับเพื่อซับน้ำส่วนเกินออกโดยกระดาษ (วิลาวรรณ ทิมทอง, 2562; อรุณี ม่วงแก้วงาม, 2561) ซึ่งวิธีการนี้จะทำคล้ายกันทั้งในลำต้นและรากพืช

5.2.2 การใช้ EMS กับพืชทั้งต้น (whole plant) สามารถให้ EMS ได้ 2 วิธีการ คือ

5.2.2.1 สามารถให้สารละลาย EMS ซึมเข้าไปในต้นพืชโดยผ่านทางแผล โดยการทำรอยบากตื้น ๆ ที่ลำต้นของพืช ใช้สำลีจุ่มสารละลาย EMS แล้วจึงนำไปวางไว้ตรงรอยบาก

5.2.2.2 ใช้เข็มฉีดยาฉีดสารละลาย EMS เข้าไปยังส่วนของพืชที่ต้องการได้โดยตรง

5.2.3 การให้ EMS ทางรากของพืช

ใส่สารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อให้พืชดูดสารละลาย EMS เข้าไปทางราก ตามระยะเวลาที่ทำการศึกษาในพืชแต่ละชนิด

5.2.4 การให้ EMS ต่อพืชในหลอดทดลอง

สาร EMS สามารถก่อกลายกับพืชหลายชนิดทั้งสภาพในหลอดทดลองและนอกหลอดทดลอง โดยความถี่ของการกลายที่ถูกชักนำด้วยการใช้สาร EMS มีค่าสูงกว่าการกลายตามธรรมชาติหลายเท่า ดังนั้นจึงมีการนำเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ร่วมกับการชักนำให้เกิดการกลาย เพื่อส่งเสริมการแปรผันทางพันธุกรรมและการผลิตพืชให้ได้ลักษณะตามต้องการ ช่วยให้สามารถปรับปรุงพันธุ์ได้สะดวกและรวดเร็วยิ่งขึ้น (ชานนท์ ลาภจิตร และ เมิง-เจียว เจิง, 2560) ชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้ในการศึกษามีได้หลากหลาย ได้แก่

5.2.4.1 Kumar, Gill, Kaur, Choudhary, and Gosal (2010) ศึกษาการนำแคลลัสของลัฟเลมอน (*Citrus limon*) มาแช่ EMS เข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์

5.2.4.2 Qin (2011) นำคัพภะของ loquat แช่ในสารละลาย EMS เข้มข้น 0.1 - 0.9 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 0.5, 1 และ 2 ชั่วโมง

5.2.4.3 Menendez (1973) นำเมล็ดกล้วย (*Musa acuminata* subsp. *malaccensis*) แช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.20 โมลาร์ และ George และ Rao (1980) นำเมล็ด *Brassica juncea* แช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที 1 และ 2 ชั่วโมง

5.2.4.4 มนสุรีย์ ก่องตาวงศ์ และ ทิพย์มณี ภะระตะศิลปินส์ (2527) ได้ทดลองแช่อับเรณูของยาสูบพันธุ์ Coker 347 ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.002, 0.004, 0.01 และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 และ 18 ชั่วโมง

5.2.4.5 Kang and Kameya (1993) ได้ทดลองแช่ฝักข้าวโพดพันธุ์ Danggin หลังจากการที่มีการผสมเกสร 3, 6 และ 9 ชั่วโมง ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที

1) รูปแบบในการให้ EMS

การให้ EMS กับพืชหรือชิ้นส่วนของพืช สามารถทำได้ 2 วิธีการ คือ

- การให้ EMS แบบเฉียบพลัน (acute or short - term) เป็นรูปแบบของการให้ EMS ในปริมาณสูง ๆ และสิ้นสุดในระยะเวลาไม่นาน เพื่อไม่ให้ชิ้นส่วนพืชมีโอกาสซ่อมแซมความผิดปกติในช่วงที่ได้รับ EMS โดยสามารถใช้ได้กับการให้ EMS กับเมล็ด ส่วนของ

พืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเนื้อเยื่อ รวมถึงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการ โดยรูปแบบการให้ EMS จะเป็นการให้เฉพาะตำแหน่งของพืชส่วนใดก็ได้ ไม่กำหนดระยะของการพัฒนา นอกจากนี้พบว่าอัตราการกลายที่ได้ค่อนข้างสูง ขนาดของส่วนที่เกิดการกลายใหญ่ ทำให้ง่ายต่อการคัดลักษณะที่ต้องการออกมาได้ ข้อเสียที่พบได้ คือ จะมีความผิดปกติของโครโมโซมสูง เกิดความเสียหายต่อชิ้นส่วนพืชค่อนข้างมาก ส่งผลให้เกิดการลดความสมบูรณ์เพศลง นอกจากนี้พืชแต่ละชนิดจะมีความไวต่อ EMS ที่แตกต่างกันซึ่งจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการที่ต่างกัน ดังนั้นการหาปริมาณ EMS ที่เหมาะสมของแต่ละพืชจึงเป็นสิ่งสำคัญและจำเป็น โดยสามารถค้นคว้าจากผลงานของผู้อื่นหรือจัดทำการขึ้นมาเพื่อหาค่า LC50 (50% lethality) หรือ GR_{50} (50% growth reduction) ที่ได้

- การให้ EMS แบบสะสมหรือเรื้อรัง (chronic or long - term) เป็นการเพิ่มระยะเวลาที่ ให้ EMS ระยะนาน เช่น หลายสัปดาห์ หลายเดือน หรือเป็นปี โดยเป็นรูปแบบการให้ปริมาณ EMS ต่อหน่วยเวลาต่าง ๆ ทำให้ทุกระยะของการเจริญเติบโต และการแบ่งเซลล์ได้รับสาร EMS ส่วนของพืชที่เหมาะในการนำมาให้สาร EMS รูปแบบนี้ คือ พืชทั้งต้นที่กำลังเจริญเติบโต หรือพืชที่อยู่ในสภาพเพาะเลี้ยง (*in vitro* culture) การได้รับ EMS รูปแบบนี้พบว่าพืชจะเสียหายน้อยกว่าการได้รับแบบเฉียบพลันหากเทียบในกรณีที่ได้รับ EMS เป็นปริมาณที่เท่ากัน การกลายที่เกิดขึ้นจะเกิดการกลายในยีนมากกว่าการกลายในโครโมโซม ทำให้เกิดความเสียหายต่อชิ้นส่วนพืชไม่รุนแรงมากนัก แต่มีข้อเสียของการให้ EMS รูปแบบนี้คือ ส่วนกลายที่พบได้จะมีขนาดเล็ก จึงยากต่อการค้นหาและแยกส่วนที่เกิดการกลายออกมาใช้ (อรุณี วงศ์ปิยะสถิต, 2554)

2) ปัจจัยในการให้ EMS ของพืชในหลอดทดลอง

- ชิ้นส่วนพืช

ชนิดและส่วนของพืชที่นำมาใช้เพื่อชักนำให้เกิดการกลายในพืช จะมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนของพืช โดยชิ้นส่วนที่นิยมใช้มากที่สุดคือ เมล็ด เนื่องจากสามารถทำได้ในปริมาณมาก ง่าย สะดวก ให้ผลดี และปลอดภัย ซึ่งส่วนอื่น ๆ ของพืชยังสามารถนำมาให้สาร EMS ได้เช่นเดียวกัน เช่น พืชทั้งต้น บริเวณใดบริเวณหนึ่งของต้น ละอองเรณูหรือราก และควรเป็นชิ้นส่วนของพืชผ่านการทำความสะอาด ปราศจากสิ่งเจือปน และมีความสมบูรณ์สามารถงอกได้ดี (พีรนุช จอมพุก, 2553)

- ความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้

ขึ้นขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และระยะเวลาที่ให้ EMS โดยความเข้มข้นที่ใช้ศึกษาโดยทั่วไป คือ 0.05 – 0.30 โมลาร์ หรือ 0.3 – 1.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) โดยจะต้องมี

การทดลองเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมเบื้องต้นก่อน คือหาค่า LC_{50} (ความเข้มข้นของสารเคมีที่ทำให้พืชตาย 50 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม) หรือ GR_{50} (ความเข้มข้นของสารเคมีที่ไปลดการเติบโตของพืชลง 50 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม) โดยทดลองแช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ที่ส่งผลทำให้ต้นกล้าตายหรือลดการเจริญเติบโตของต้นกล้าลง 50 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม เป็นค่า LC_{50} หรือความเข้มข้นที่ลดการเติบโตของต้นกล้าลง 50 เปอร์เซ็นต์เป็นค่า GR_{50} (พีรนุช จอมพุก, 2553)

- ปริมาตรของสารละลายที่ใช้

ปริมาตรของสารละลาย EMS ต่อชิ้นส่วนพืชมีผลสำคัญต่ออัตราการกลายที่เกิดขึ้น สำหรับการเตรียมสารละลาย EMS จึงต้องเตรียมให้ได้ปริมาณที่เหมาะสม เช่น ถ้าเมล็ดพืชมีขนาดเล็ก เช่น เมล็ดถั่วเขียว ข้าว ข้าวฟ่าง ปริมาตรที่แนะนำคือใช้สารละลาย 1 มิลลิลิตรต่อเมล็ดพืช 1 เมล็ด ถ้าต้องการให้ EMS กับเมล็ดข้าวจำนวน 1,000 เมล็ด ควรเตรียมสารละลาย EMS จำนวน 1,000 มิลลิลิตร ส่วนเมล็ดที่มีขนาดใหญ่ เช่น เมล็ดถั่วแดงหลวง ปริมาตรของสารละลายที่แนะนำคือ 2.0 – 2.5 มิลลิลิตรต่อ 1 เมล็ด (พีรนุช จอมพุก, 2553)

- ระยะเวลาในการแช่สารเคมี

ระยะเวลาในการแช่ชิ้นส่วนพืชควรนานพอที่สาร EMS จะแทรกซึมเข้าไปถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย ระยะเวลาที่ใช้แช่จึงขึ้นอยู่กับ ขนาด ความหนาของชิ้นส่วนพืช องค์ประกอบของเซลล์ที่เฉพาะกันในแต่ละชนิดของพืช โดยสำหรับชิ้นส่วนพืชที่มีขนาดเล็ก เช่น ข้าว ข้าวโพด ถั่วเขียว ควรใช้เวลาในการแช่ประมาณ 3-5 ชั่วโมง แล้วเพิ่มระยะให้นานขึ้นเมื่อพืชมีขนาดใหญ่กว่า ข้อแนะนำในการเตรียมสารละลาย EMS และการแช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลายควรทำในตู้ควันเพื่อความปลอดภัย (พีรนุช จอมพุก, 2553)

5.3 การตรวจสอบการกลายของพืชที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายโดย EMS

การตรวจสอบการกลายของพืชที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายโดยการใช้ EMS สามารถตรวจสอบได้จากลักษณะทางสัณฐาน และการใช้เทคนิคทางโมเลกุล

5.3.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐาน

ความแปรปรวนจากการกลายสามารถตรวจสอบได้จากลักษณะทางสัณฐาน ซึ่งเป็นลักษณะที่สามารถตรวจสอบได้ง่ายจากการสังเกตลักษณะที่เกิดขึ้น โดยลักษณะที่ปรากฏเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงจีโนไทป์และลักษณะสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลให้ลักษณะต่าง ๆ แสดงออกมาก เช่น ลักษณะของการเจริญเติบโตทางลำต้น ใบ ดอก ขนาดคลอโรฟิลล์ รวมถึงลักษณะของผลหรือเมล็ด ตัวอย่างการตรวจสอบการชักนำการกลายของพืชจากการให้ EMS ด้วยลักษณะทาง

สัณฐาน เช่น ปวีณา (2541) ได้ศึกษาความแปรปรวนจากของคำฝอยที่ผ่านการชักนำด้วยสาร EMS ในช่วงความเข้มข้น 0.2 – 1 เปอร์เซ็นต์ ผลที่ได้คือต้นคำฝอยที่พัฒนาจากแคลลัสที่ผ่านการให้สาร EMS มีลักษณะทางสัณฐานที่แตกต่างจากต้นควบคุม คือ ปริมาณยอดเพิ่มขึ้น แสดงลักษณะการยืดยาวของลำต้น การอวบน้ำของใบ รูปร่างใบ ที่แตกต่างจากต้นที่ไม่ผ่านการแช่สาร EMS Bidabadi และคณะ (2012) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานของยอดกล้วยที่ผ่านการแช่สาร EMS พบว่าชิ้นส่วนที่ผ่านการจุ่มแช่สาร EMS เข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ส่งผลให้ชิ้นส่วนที่มีความผิดปกติมากที่สุด คือ สีของใบที่เปลี่ยนไป ระยะห่างของใบสั้นลง ใบแกระเกร็น และชิ้นส่วนมีอาการฉ่ำน้ำ

ลักษณะทางสัณฐานที่ปรากฏออกมานอกจากเป็นผลของจีโนไทป์ บางลักษณะที่แสดงออกมาอาจเป็นผลร่วมกันระหว่างจีโนไทป์กับสภาพแวดล้อมด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าพืชบางชนิดพันธุ์มีลักษณะต่าง ๆ ใกล้เคียงกันมากจนไม่สามารถแยกความแตกต่างได้โดยสายตา บางลักษณะอาจต้องรอระยะออกดอกหรือติดผลจึงสามารถตรวจสอบได้ ดังนั้นจึงมีการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยวิธีอื่นควบคู่ไปด้วยเพื่อเป็นการยืนยัน และร่นระยะเวลาการตรวจสอบความแปรผันให้สั้นลง

5.3.2 การตรวจสอบความแปรปรวนโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่ได้นั้น ทำได้โดยการสังเกตจากลักษณะภายนอกหรือลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งลักษณะที่ปรากฏออกมานั้นมักผันแปรไปตามสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปอีกทั้งพืชบางชนิดมีลักษณะต่าง ๆ ใกล้เคียงกันมาก จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางโมเลกุลมาใช้เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืช หรืออาจใช้เพื่อจำแนกและตรวจสอบพันธุ์พืช ซึ่งถือเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำและมีประสิทธิภาพสูง สามารถบอกถึงลักษณะหรือตัวบ่งชี้ที่มีความเฉพาะเจาะจงที่นำมาใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ อีกทั้งเป็นวิธีที่สามารถลดอิทธิพลที่เกิดมาจากสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย (ธีราพร ทองดีนอก, 2559)

ชนิดของเครื่องหมายโมเลกุลแบ่งออกเป็น 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีนและระดับดีเอ็นเอ ซึ่งการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอมีข้อดีกว่าการตรวจสอบระดับโปรตีน เนื่องจากโมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกจัดเก็บไว้เป็นเวลานานได้ และดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในทุกเซลล์ สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้ทุกระยะเวลาการเจริญเติบโตของพืช โดยไม่ถูกควบคุมการแสดงออกโดยสภาพแวดล้อม เครื่องหมายโมเลกุลใน

ระดับดีเอ็นเออาจทำได้หลายวิธี เช่น simple sequence repeat (SSR), random amplified polymorphic DNA (RAPD) และ start codon targeted (SCoT) เป็นต้น

5.3.2.1 simple sequence repeat (SSR) เป็นกลุ่มดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำกัน (repetitive DNA) เรียงต่อเนื่องกันที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ ในจีโนม พบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตขั้นสูง ความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่เกิดขึ้นเป็นผลเนื่องมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์ในโลกัสหนึ่ง ๆ โดยทั่วไปไมโครแซทเทลไลท์ประกอบด้วยเบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeat) ตั้งแต่ 1-6 เบส เช่น เบสซ้ำหนึ่งเบส เรียกว่า mono-nucleotide repeat เช่น (A)n เบสซ้ำสองเบส เรียกว่า di- nucleotide repeat เช่น (CA) เบสซ้ำสามเบส เรียกว่า Tri- nucleotide repeat ซึ่ง SSR เป็นเทคนิคที่อาศัยความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) เนื่องจากจำนวนชุดซ้ำที่มีในไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่งเดียวกันในตัวอย่างแต่ละตัวอย่างที่ไม่เท่ากัน สามารถตรวจสอบได้โดยแยกขนาดโดยใช้วิธีการ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis และการแสดงจำนวนเบสซ้ำที่ไม่เท่ากัน เป็นคุณสมบัติที่นำมาบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ โดยจะพบภายในยีนหรือระหว่างยีน โดยไพร์เมอร์ (primer) ที่สร้างขึ้นมานั้นจะมีความจำเพาะเจาะจงสำหรับในแต่ละชนิดของพืช จึงทำให้มีเป็นหนึ่งในวิธรที่นิยมนำมาใช้ในการคัดเลือกและการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมพืช และสามารถประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ได้อีกมากมาย (สุรีพร เกตุงาม, 2003)

ชญานีย์ สังวาลย์ (2557) ได้ชักนำการกลายโซมาติกเอมบริโอปาล์มน้ำมันโดย EMS ความเข้มข้น 0 - 1 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SSR โดยใช้ไพรเมอร์ 9 คู่ คือ คือ EgCIR0008 EgCIR0243 EgCIR0337 EgCIR0409 EgCIR0446 EgCIR0465 EgCIR0781 EgCIR0905 และ EgCIR1772 พบว่ามีเพียงไพรเมอร์ EgCIR0465 ที่ให้แถบดีเอ็นเอลักษณะพอลีมอร์ฟิก ของต้นควบคุมและต้นที่ผ่านแช่สารละลาย EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และสำหรับไพรเมอร์อื่น ๆ ให้รูปแบบดีเอ็นเอที่เหมือนกันในทุกตัวอย่าง จึงสรุปได้ว่า EMS ที่ความเข้มข้นสูงส่งผลต่อการทำให้รูปแบบของดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไปเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค SSR

5.3.2.2 random amplified polymorphic DNA (RAPD) เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยใช้ไพรเมอร์สายสั้น ความยาวประมาณ 8-10 นิวคลีโอไทด์ คุณสมบัติสำคัญคือสะดวก รวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องใช้ข้อมูลจากลำดับเบส และใช้ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น แต่ดีเอ็นเอเครื่องหมายจากเทคนิคนี้จะเป็นแบบ dominant marker คืออาจสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้เฉพาะบางอัลลีลเท่านั้น แสดงผลในรูปของการเกิดหรือไม่เกิดแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งหนึ่ง ๆ

หลักการของ RAPD โดยทั่วไปเป็นการทำปฏิกริยา PCR (polymerase chain reaction) คือ การทำให้เส้นดีเอ็นเอเป้าหมายแยกเป็นสายเดี่ยว แล้วให้ไพรเมอร์เข้าจับบริเวณที่เป็นคู่สมกัน (complementary) และเอนไซม์ DNA polymerase จะนำ nucleotide ที่เป็นคู่สมกับเส้นแม่พิมพ์ (template) มาต่อจากไพรเมอร์จนเป็นเส้นยาว เกิดเป็นเส้นดีเอ็นเอเส้นใหม่ขึ้นมา ต่อจากนั้นก็จะเกิดปฏิกริยาเหมือนขั้นตอนแรกเป็นปฏิกริยาซ้ำหลาย ๆ รอบ เป็นการจำลองดีเอ็นเอเส้นใหม่ขึ้นมาในปริมาณมาก แต่ RAPD ใช้ไพรเมอร์เพียงข้างเดียวที่มีขนาดสั้นที่เข้าไปจับในบริเวณที่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกันเท่านั้น โดยไม่คำนึงถึงทิศทางของไพรเมอร์ที่จับกับเส้นแม่พิมพ์ ขณะที่เกิดการแยกเส้นเป็นเส้นเดียว ดังนั้นในขั้นตอน annealing ของปฏิกริยา RAPD จึงต้องใช้อุณหภูมิต่ำ เพื่อให้เส้นไพรเมอร์สามารถจับแบบสุ่มได้มากที่สุดและสามารถเพิ่มขยายชิ้นสวนดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ต้องการที่เกิดขึ้นในขั้นตอน extension แต่เนื่องจากทิศทางการจับของไพรเมอร์ไม่แน่นอน แต่รูปแบบของเอนไซม์ที่นำเบสมาต่อกับไพรเมอร์ให้ได้ดีเอ็นเอเส้นใหม่ จะทำได้เฉพาะในทิศทางบริเวณปลาย 3’ ของไพรเมอร์เท่านั้น ดังนั้นทิศทางที่ไพรเมอร์จับกับเส้นแม่พิมพ์แต่ละเส้นจึงอยู่ในลักษณะตรงกันข้ามแบบสวนทางกันแล้วได้เป็นเส้นดีเอ็นเอเส้นใหม่ และเนื่องจากไพรเมอร์มีขนาดสั้นทำให้จับได้หลายตำแหน่งและหลายทิศทาง ส่งผลให้ RAPD สามารถสร้างดีเอ็นเอผลผลิตได้หลายชิ้น (Welsh และ McClean, 1990; William et al., 1990)

ข้อดีของการใช้วิธี RAPD ในการจำแนกพันธุ์พืช คือ สะดวก รวดเร็ว และใช้ตัวอย่างที่จะนำมาตรวจสอบในปริมาณที่น้อยมาก โดยเฉพาะพืชผสมตัวเองซึ่งถ้าพืชนั้นมีความสม่ำเสมออยู่แล้ว ใช้ใบอ่อนเพียง 2-3 ใบ ก็เพียงพอที่จะนำมาสกัดดีเอ็นเอ รวมถึงผลการตรวจสอบสามารถทราบผลได้ทันที โดยไม่ต้องเสียเวลารอถึงขั้นตอนที่พืชเจริญเต็มที่ และสภาพแวดล้อมไม่มีอิทธิพลต่อดีเอ็นเอของพืช การวิเคราะห์ผลพิจารณาจากการปรากฏหรือไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอเป็นวิธีที่สามารถทำการตรวจสอบได้อย่างไม่จำกัด โดยเพียงแค่ต้องเปลี่ยนไพรเมอร์ที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังเป็นวิธีการทางที่ไม่ใช้สารกัมมันตภาพรังสีซึ่งปลอดภัยสำหรับผู้ทดลอง (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545)

Wahyudi, Hapsari, และ Sundari (2020) ตรวจสอบการกลายของถั่วเหลืองจากการได้รับ EMS ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 4 6 และ 8 ชั่วโมง และตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD พบว่า EMS 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 6 ชั่วโมง ได้ชักนำให้ถั่วเหลืองกลายแสดงความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม การศึกษานี้จึงเป็นแนวทางใหม่ในการชักนำความแปรปรวนทางพันธุกรรมในถั่วเหลืองและช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองต่อไป

Chauhan, Patel, Rajkumar, Parmar, and Patel (2018) ชักนำการกลายของฝ้าย 2 สายพันธุ์ คือ *Gossypium hirsutum* (GSHV-01/1338) และ *G. arboreum* (G.27) ที่ชักนำด้วย EMS ความเข้มข้น 0.75, 1.50 และ 2.25 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ EMS เพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์การงอก ความยาวราก และความยาวยอดลดลง เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD แสดงว่า EMS ชักนำการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม 2 เปอร์เซ็นต์ในฝ้าย G.27 และ 1 เปอร์เซ็นต์ในฝ้าย GSHV-01/1338 เมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม

5.3.2.3 เครื่องหมายสก๊อต (SCoT, start codon targeted) เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลแบบหนึ่งพัฒนาขึ้นโดย Collard และ Mackill (2009) โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 18 นิวคลีโอไทด์เพียงชนิดเดียวที่มีลำดับเบส ATG เริ่มต้นในสายนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ใช้อุณหภูมิสำหรับ annealing 50 องศาเซลเซียส แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส เครื่องหมายสก๊อตสามารถใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ หลักการของเครื่องหมายสก๊อตคือ ใช้ไพรเมอร์ขนาด 18 นิวคลีโอไทด์เพียงชนิดเดียวที่มีลำดับเบส ATG เริ่มต้นในสายนิวคลีโอไทด์ ไพรเมอร์สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอบริเวณที่มีเบสเป็นคู่สมกันตรวจสอบหลายตำแหน่งพร้อมกัน หากการเข้าคู่นั้นเกิดขึ้นในทิศทางที่เหมาะสมจะทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนั้นถ้าตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบมีความแตกต่างของสารพันธุกรรม ความสามารถในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะได้จำนวนและชิ้นของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน คุณสมบัติของเครื่องหมายสก๊อตเป็นเครื่องหมายที่ทำได้ง่าย ค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนักผลการตรวจสอบมีความน่าเชื่อถือและมีประสิทธิภาพต่อการระบุความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชได้ (จุฑามาศ เจียมเจือจันทร์, 2016)

Paliwal และคณะ (2013) ศึกษาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชกลุ่มบอระเพ็ดจำนวน 21 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายสก๊อต พบไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมจำนวน 19 ไพรเมอร์จาก 35 ไพรเมอร์ สามารถให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 102 แถบ มีค่าเฉลี่ย 5.3 แถบต่อไพรเมอร์ พบว่าค่า polymorphic information content มีค่าเท่ากับ 87.2

6. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

6.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหนอนตายหยาก

กาญจนา รุ่งรัชกานนท และ อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์ (2551) ทดลองขยายพันธุ์หนอนตายหยาก (*S. collinsiae* Craib) เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปชักนำให้เกิดรากโดยใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 5, 7 และ 9 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดีที่สุด 7 ยอดต่อชิ้น แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้น 2.5 และ 7.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ให้จำนวนยอดต่อชิ้นเท่ากับ 6 และ 5 ยอด ตามลำดับ) ส่วนการชักนำให้เกิดรากในอาหารสังเคราะห์ที่เติม IBA ระดับต่าง ๆ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์

มณฑา วงศ์มณีโรจน์ และคณะ (2551) ศึกษาการชักนำรากหนอนตายหยาก (*S. colinsae* Craib) ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าการเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำรากโดยการลด NH_4NO_3 ให้เหลือเพียง 412.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่ม KNO_3 เป็น 2,375 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มน้ำตาล 60 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสูตรอาหารพื้นฐาน MS สามารถชักนำหนอนตายหยากให้ออกรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และทำให้มีอัตราการรอดชีวิตหลังการย้ายปลูกสูงโดยการใช้กลไกการลดไนโตรเจน เพิ่มโพแทสเซียมและน้ำตาล เติม IBA ในสูตรอาหารพื้นฐาน MS ควบคู่กับการใช้วิธีการปรับสภาพและวัสดุปลูกที่เหมาะสม

ยุพา มงคลสุข และคณะ (2543) นำชิ้นส่วนยอดหนอนตายหยากมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 1, 3, 5, 7 และ 9 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 45 วัน พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยอดหนอนตายหยากคือ สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 17.5 ยอด มีความยาวยอดเฉลี่ยเป็น 0.44 เซนติเมตร และเมื่อนำยอดหนอนตายหยากมาชักนำให้เกิดรากบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0, 1, 2, 4 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 90 วัน พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้ยอดหนอนตายหยากมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากสูงสุด 55 เปอร์เซ็นต์ คือ สูตร MS ที่ไม่เติม IBA มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 3.3 รากต่อยอด รากมีความยาวเฉลี่ย 5.7 เซนติเมตร สำหรับการย้ายปลูกต้นหนอนตายหยากในวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของ ขุยมะพร้าว : ทราย : แกลบ อัตราส่วน 1:1:1 มีการควบคุมความชื้น 7 วัน มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออายุ 30 วัน

Animesh และคณะ (2011) ทดลองการชักนำส่วนข้อต้นหนอนตายหยาก (*Stemona tuberosa* Lour.) ที่มีตาข้างติดอยู่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพมืดเป็นเวลา 20 วัน แล้วจึงย้ายออกมาเพาะเลี้ยงไว้ภายใต้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน สลับกับสภาพมืด 8 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดยอดใหม่ได้จำนวนมากถึง 12.7 ยอดต่อชิ้น จากนั้นจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP (0.1-1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ IBA (0.1- 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพื่อกระตุ้นให้ยอดที่เกิดยืดยาวเพิ่มขึ้น แล้วจึงชักนำให้เกิดรากบนอาหารสูตร half strength MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต้นหนอนตายหยากที่สมบูรณ์สามารถย้ายออกปลูกในกระถางได้สำเร็จ

Montri และคณะ (2009) ศึกษาการขยายพันธุ์หนอนตายหยาก (*S. tuberosa* Lour.) ในสภาพหลอดทดลองโดยนำปลายยอดและข้อ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 20 µM กระตุ้นให้เกิดยอดใหม่ จากนั้นจึงนำมาทดสอบความเหมาะสมของสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงในสภาพหลอดทดลองระหว่าง สูตร B5 เปรียบเทียบกับสูตร MS โดยใช้ความเข้มข้นของธาตุอาหารที่แตกต่างกัน พบว่า สูตร full-strength MS เป็นสูตรที่เหมาะสมมากที่สุด ในขั้นตอนการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากเลือกใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS โดยเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP (0-20 µM) ร่วมกับ IBA (0-5 µM) พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 20 µM ให้จำนวนยอดสูงที่สุด

Singlaw, Kongbangkerd, Promthep, และ Saenpote (2008) พบว่าการเลี้ยงปลายยอดหนอนตายหยากในอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่ เติมฮอร์โมน 2iP, BA, Kinetin, Zeatin และ TDZ ความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 15 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 30 วัน พบว่าการเติม TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ปลายยอดหนอนตายหยาก เกิดยอดใหม่ได้สูงสุด 3.1±0.52 ยอดรองลงมาคือการใช้ BA 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ 2.62±0.12 และ 2.6±0.76 ยอดต่อชิ้นส่วนตามลำดับ

6.2 การชักนำการกลายโดยใช้สารเคมีในหลอดทดลอง

George และ Rao (1980) นำเมล็ด *Brassica juncea* แช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที 1 และ 2 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของต้นกล้า แต่ต้นกล้าที่ได้รับการแช่เมล็ดด้วยสารละลาย EMS นาน 30 นาที พบใบเลี้ยงมีลักษณะเหลืองซีด (chlorosis) ส่วนการแช่นาน 2 ชั่วโมง ให้ต้นกล้าที่งอกหลังการเพาะ 2 สัปดาห์ มีลักษณะสีเหลืองซีด และใบแรกมีลักษณะผิดปกติ เมื่อตัดใบเลี้ยงจากต้นกล้าในหลอดทดลองซึ่ง

ได้จากการแช่เมล็ดในสารละลาย EMS เป็นเวลา 30 นาที มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชักนำการสร้างยอดได้เพียง 28 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดเปรียบเทียบซึ่งให้การสร้างยอดได้ถึง 96 เปอร์เซ็นต์

Qin และคณะ (2011) ได้ใช้ใช้คัพภะของ loquat แช่ในสารละลาย EMS เข้มข้น 0.1- 0.9 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 0.5, 1 และ 2 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ นาน 0.5 ชั่วโมง คัพภะมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 48.8 เปอร์เซ็นต์ และสามารถสร้างเอ็มบริโอใหม่ได้สูงสุด 46.2 เปอร์เซ็นต์

Menendez (1973) พบว่าหลังจากการนำเมล็ดกล้วย (*Musa acuminata* subsp. *malaccensis*) มาแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.20 โมลาร์ ทำให้เกิดการเจริญเติบโตผิดปกติมากขึ้น และหลังจากจุ่ม EMS ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ทำให้การงอกของต้นกล้าลดลง 50 เปอร์เซ็นต์

มนสุรีย์ ก่องตาวงศ์ และ ทิพย์มณี ภะระตะศิลปินส์ (2527) ได้ทดลองแช่อับละอองเกสรของยาสูบ พันธุ์ Coker 347ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.002, 0.004, 0.01 และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 และ 18 ชั่วโมง ส่งผลให้ละอองเกสรงอกช้า ยับยั้งการเกิดรากของต้น ต้นที่ได้มีลักษณะใบด่าง มีสีเขียว สีขาว และสีเหลืองบางส่วน ซึ่งเป็นการกลายในเม็ดสีและให้ดอกมีลักษณะผิดปกติ

Kang และ Kameya (1993) ได้ทดลองแช่ฝักข้าวโพดพันธุ์ Danggin หลังจากการที่มีการผสมเกสร 3, 6 และ 9 ชั่วโมง ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที พบว่าต้นข้าวโพดที่ได้เกิดการกลายเพียงบางส่วน คลอโรฟิลล์ลดลง และมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยาบางลักษณะ และการแช่สารหลังจากที่มีการผสมเกสร 6 ชั่วโมง ให้ต้นข้าวโพดมีความต้านทานต่อ 5-methyltryptophan (5-MT) ทั้งในสภาพประกอบที่เป็นแคลลัสและต้นกล้า

Kumar และคณะ (2010) ได้นำแคลลัสของลัฟเลมอนมาทรีต EMS เข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ EMS เพิ่มขึ้นอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสลดลง โดยที่ความเข้มข้นของ EMS 0.4 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้แคลลัสตายทั้งหมด และยังพบว่ามีเพียงแคลลัสกลุ่ม ควบคุมและแคลลัสที่ผ่านการทรีต EMS 0.1 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ที่สามารถพัฒนาต่อไปได้ คิดเป็น 9 และ 5.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Luan, Zhang, Gao, และ An (2007) ได้ชักนำการกลายในแคลลัสของมันเทศเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่สามารถต้านทานต่อความเค็ม โดยใช้ EMS เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 0, 1, 1.5, 2

2.5 และ 3 ชั่วโมง พบว่าแคลลัสที่แช่สาร EMS เข้มข้น 0.5 เปอรเซ็นต์ นาน 2 และ 2.5 ชั่วโมง สามารถเจริญและพัฒนาต่อไปได้ในอาหารที่เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์

Dhakshanamoorthy, Selvaraj และ Chidambaram (2010) ได้ชักนำการกลายของสบู่ดำ โดยการนำเมล็ดมาแช่สาร EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าต้นที่เจริญจากเมล็ดที่ผ่านการแช่สาร EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีการผลิตจำนวนช่อผลต่อต้นและจำนวนผลต่อช่อสูงที่สุดเฉลี่ย 14.66 ช่อ และ 11.00 ผล ซึ่งมากกว่าต้นที่เจริญจากเมล็ดที่ไม่ผ่านการแช่สาร EMS

6.3 การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชที่ได้รับการกลาย

ชญานีย์ สังวาลย์ (2557) ได้ชักนำการกลายโซมาติกเอมบริโอปาล์มน้ำมันโดย EMS ความเข้มข้น 0 – 1 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SSR โดยใช้ไพรเมอร์ 9 คู่ คือ คือ EgCIR0008, EgCIR0243, EgCIR0337, EgCIR0409, EgCIR0446, EgCIR0465, EgCIR0781, EgCIR0905 และ EgCIR1772 พบว่ามีเพียงไพรเมอร์ EgCIR0465 ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะ polymorphism และให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 275 bp ระหว่าง ต้นกล้าปกติกับต้นกล้าที่มีการสร้างช่อดอกที่เจริญจากโซมาติกเอ็มบริโอและผ่านแช่สารละลาย EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สำหรับไพรเมอร์อื่น ๆ ให้รูปแบบดีเอ็นเอที่เหมือนกันในทุกตัวอย่าง สรุปได้ว่า EMS ที่ความเข้มข้นสูงส่งผลต่อการออกดอกของต้นกล้า และทำให้รูปแบบของดีเอ็นเปลี่ยนแปลงไปเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค SSR

Paliwal และคณะ (2013) ศึกษาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชกลุ่มบอระเพ็ดจำนวน 21 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายสก๊อต พบไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมจำนวน 19 ไพรเมอร์จาก 35 ไพรเมอร์ สามารถให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 102 แถบ มีค่าเฉลี่ย 5.3 แถบต่อไพรเมอร์ พบว่าค่า polymorphic information content มีค่าเท่ากับ 87.2

Wahyudi et al. (2020) ตรวจสอบการกลายของถั่วเหลืองจาก EMS ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 4, 6 และ 8 ชั่วโมง และตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD พบว่า EMS 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 6 ชั่วโมง ได้ชักนำให้ถั่วเหลืองกลายแสดงความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม การศึกษานี้จึงเป็นแนวทางใหม่ในการชักนำความแปรปรวนทางพันธุกรรมในถั่วเหลืองและช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองต่อไป

Chauhan et al. (2018) ชักนำการกลายของฝ้าย 2 สายพันธุ์ คือ *G. hirsutum* (GSHV-01/1338) และ *G. arboreum* (G.27) ในสาร EMS ความเข้มข้น 0.75, 1.50 และ 2.25 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ EMS เพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์การงอก ความยาวราก และความยาว

ยอดลดลง เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD แสดงว่า EMS ชักนำการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม 2 เปอร์เซ็นต์ในฝ้าย G.27 และ 1 เปอร์เซ็นต์ในฝ้าย GSHV-01/1338 เมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม

ปวีณา นวมเจริญ (2541) ได้ศึกษาความแปรปรวนของคำฝอยที่ผ่านการชักนำด้วยสาร EMS ในช่วงความเข้มข้น 0.2 – 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าต้นคำฝอยที่พัฒนาจากแคลลัสที่ผ่านการแช่สาร EMS มีลักษณะทางสัณฐานที่แตกต่างจากต้นปกติ คือ ปริมาณยอดเพิ่มขึ้น มีลักษณะการยืดยาวของลำต้น การอวบน้ำของใบ รูปร่างใบ ความยาวหนามที่ใบ แตกต่างจากที่ไม่ผ่านการแช่สาร EMS

Singh, Raghava, and kalia (2000) ศึกษาสีของดอกคาร์เนชั่นที่ผ่านการชักนำการกลายโดยการใช้ EMS ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งเติมในอาหารแข็งและในอาหารเหลวในสภาพเขย่าเลี้ยง 3 ชั่วโมง พบว่าเข้มข้น 0, 025 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารแข็ง และ 0.025 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลวสามารถชักนำให้เกิดยอดและดอกมากที่สุด โดยยอดมีลักษณะสีขาวสลับแดง และสีชมพูสลับขาว

Javed Ansari (2012) ศึกษาลักษณะของต้นข้าวสาลี (*Triticum monococcum* L.) พบว่าต้นข้าวสาลีที่ผ่านการชักนำการกลายโดยใช้ EMS ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีลักษณะของใบ กอ และรากที่เปราะบาง มีความสูงของลำต้น และจำนวนกอน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ผ่านการทรีตด้วย EMS

ยุวดี มานะ และ ศุจิรัตน์ สงวนศิริกุล (2553) ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของกวาวเครือขาว พบว่ามีขนาดของแถบดีเอ็นเอประมาณ 280 bp ถึง 1,550 bp ในจำนวนนี้มีแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง (polymorphic band) คิดเป็น 82.54 เปอร์เซ็นต์ ของทั้งหมดและเป็นตำแหน่งที่ไม่แตกต่างกัน (monomorphic) จำนวน 62 ตำแหน่ง คิดเป็น 17.46 เปอร์เซ็นต์

Malik, Li, Shuxia, and Jin-feng (2011) ใช้เครื่องหมาย SSR ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเมลอน (*Cucumis melo* L.) ที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสม โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 23 ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ CMGA172 สามารถแยกความแตกต่างออกจากพ่อแม่ได้

Thawaro and Te-chato (2010) ตรวจสอบความแปรรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันลูกผสมด้วยเครื่องหมาย SSR พบว่าไพรเมอร์ EgCIR0008 สามารถแยกความแตกต่าง

ระหว่างลูกผสมกับพ่อพันธุ์และพันธุ์ได้ นอกจากนี้ยังบอกความตรงตามพันธุ์ของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้จากการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเอมบริโอ

สกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์ (2553) ทำการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันทุกระยะ คือ แคลลัส โซมาติกเอมบริโอ และต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าไม่มีความแปรปรวนจากการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของทั้ง 3 ระยะ

จากงานวิจัยข้างต้นจะเห็นว่า สูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สูตรอาหาร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 20 μM และ TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ปลายยอดหนอนตายหยากเกิดยอดใหม่ได้สูงสุด และสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติม IBA และสูตรอาหารที่เติม IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 2 เดือน สามารถชักนำหนอนตายหยากให้มีการเจริญของรากได้ ซึ่งสามารถนำสูตรอาหาร ความเข้มข้น และระยะเวลาดังกล่าวไปปรับใช้ในการเพาะเลี้ยงยอดและรากของหนอนตายหยากดอกสั้นในการทดลองครั้งนี้ได้ และพบว่าสารละลาย EMS เป็นสารก่อกลายที่นิยมนำมาใช้ในพืชหลายชนิด พบว่าเมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 0 – 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 30 นาที – 2 ชั่วโมง แตกต่างกันในแต่ละชนิดของพืช สามารถชักนำการกลายในพืชได้ดีและความถี่ของการกลายที่สูงกว่าการกลายในธรรมชาติ จึงคาดว่าสารละลาย EMS สามารถชักนำให้เกิดการการกลายในหนอนตายหยากดอกสั้นได้เช่นกัน และสามารถใช้เทคนิคทางโมเลกุล เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นหนอนตายหยากดอกสั้นที่ผ่านการแช่สารละลาย EMS ได้ ซึ่งถือเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำและมีประสิทธิภาพสูง สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ โดยจากงานวิจัยข้างต้นจะพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลในระดับดีเอ็นเออาจทำได้หลายวิธี เช่น เครื่องหมาย simple sequence repeat (SSR) Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) และStart Codon Targeted (SCoT)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. พืชที่ใช้ในการวิจัย

หนอนตายหยากชนิด *S. collinsiae* Craib ที่อยู่ในขวดเพาะเลี้ยงอาหารสูตร MS ระยะเวลา 4 เดือน ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการวิจัยการศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

2. วัสดุและอุปกรณ์

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

2.1.1 ขวดแก้ว (bottle) ขนาด 4 ออนซ์ และ 8 ออนซ์ พร้อมฝาปิด

2.1.2 ขวดวัดปริมาตรขนาด (Volumetric flask) 500, 1000 และ 2000 มิลลิลิตร

2.1.3 ปิเปตต์ (pipette)

2.1.4 ช้อนตักสาร (spatula)

2.1.5 แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)

2.1.6 เครื่องมือวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

2.1.7 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง (balance)

2.1.10 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)

2.1.11 ตู้อบไมโครเวฟ (microwave)

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.2.1 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (lamina air-flow cabinet)

2.2.2 มีด (surgical knife)

2.2.3 ปากคีบ (forceps)

2.2.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol burner)

2.2.5 ตะแกรงโลหะ (metal rack)

2.2.6 จานแก้ว (petri dish)

2.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.3.1 ชั้นวางเลี้ยงเนื้อเยื่อ (culture shelf)

2.3.2 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (air condition)

2.3.3 เครื่องควบคุมเวลา (timer)

2.3.4 หลอดฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent lamp)

2.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบลักษณะความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเทคนิค RAPD และ SCoT

2.4.1 เครื่องชั่งสาร

2.4.2 ไมโครปิเปต

2.4.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง

2.4.4 เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA

2.4.5 ชุดอิเล็กโตรโฟริซิส

2.4.6 คอมพิวเตอร์

2.4.7 โปรแกรมสำเร็จรูป MEGA 11

2.4.8 แท่งบดสำหรับบดพืช

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

3.1.1 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบสำเร็จรูป MS ใช้ 4.74 กรัมต่อลิตร Stock solution (Murashige; and Skoog, 1962) ซึ่งประกอบด้วย ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง กรดอะมิโน และวิตามิน

3.1.2 สารเคมีใช้ในการปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ได้แก่ 1 N NaOH

3.1.3 น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (sterile distilled water)

3.1.4 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ BA จาก stock 100 ppm.

3.1.5 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ IBA จาก stock 100 ppm.

3.1.6 น้ำตาล sucrose ใช้ 30 กรัมต่อลิตร

3.1.7 วุ้น (agar) ใช้ 8 กรัมต่อลิตร

3.1.8 ผงถ่าน (activated charcoal) ใช้ 1 กรัมต่อลิตร

3.1.9 แอลกอฮอล์ (alcohol) 70เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการชักนำการกลาย

3.2.1 Ethyl methane sulfonate (EMS)

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบลักษณะความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเทคนิค RAPD และ SCoT

3.3.1 *Taq* DNA polymerase

3.3.2 agarose

3.3.3 ethidium bromide

3.3.4 primer

3.3.5 CTAB buffer

3.3.6 chloroform

3.3.7 dNTP

4. ขั้นตอนการดำเนินการ

4.1 การเพาะเลี้ยงเพื่อการขยายให้ได้ยอดมาทดลอง

ตัดแบ่งเนื้อเยื่อส่วนข้อที่มีตาข้างติดอยู่ของหนอนตายหยากขนาด 1-2 เซนติเมตร ของหนอนตายหยากไปเพาะเลี้ยงบนหารสูตร Murashige and Skoog (MS) เลี้ยงในสภาพที่ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 ℃ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มปริมาณจำนวนยอดไว้ใช้สำหรับการทดลองต่อไป

4.2 ภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดและราก

4.2.1 การชักนำการเกิดยอดหลายยอด (multiple shoot)

นำชิ้นส่วนยอดและตาข้างหนอนตายหยากดอกสั้นจากการทดลอง 4.1 ขนาด1-2 เซนติเมตรมาเลี้ยงและเพิ่มปริมาณยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 0, 1, 3, 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด เพื่อหาความเข้มข้นที่สามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ดีที่สุด จากนั้นบันทึกผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเกิดจำนวนยอด และความยาวยอด ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

4.2.2 การชักนำการเกิดราก

นำชิ้นส่วนยอดและตาข้างหนอนตายหยากดอกสั้นจากการทดลอง 4.1 ขนาด 1-2 เซนติเมตรมาเลี้ยงและชักนำรากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม IBA ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด บันทึกผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีต่อการเกิดจำนวนราก และความยาวราก ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

การทดลองการชักนำยอดและรากนี้ ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) ทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด โดยแสดงผลการวิจัยเป็นค่าเฉลี่ยและค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว หรือ one-way

ANOVA จากนั้นทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukey-Kramer method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS statistics 20

4.3 การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการเหนี่ยวนำให้กลายด้วย EMS

นำชิ้นส่วนยอดหนอนตายหยากขนาด 1 เซนติเมตร ใส่ขวดรูปชมพู่ซึ่งบรรจุสารละลาย EMS 5 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์ ขวดละ 10 ยอด ปิดผนึกด้วยอะลูมินัมฟอยล์นำไปวางบนเครื่องเขย่า เขย่าที่ความเร็ว 40-50 รอบต่อนาที ระยะเวลาแช่ในสารละลายต่างกัน 2 ช่วงเวลา คือ 60 และ 90 นาที เมื่อครบเวลาตามที่กำหนดแล้ว แยกชิ้นส่วนพืชออกสารละลาย EMS ล้างในอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต 3 ครั้ง แล้วจึงซับด้วยกระดาษชำระที่ผ่านการฆ่าเชื้อจนแห้ง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วยอดที่เกิดขึ้นใส่สูตรอาหารเดิมอีก 1 ครั้ง เพาะเลี้ยงต่อไปอีก 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการแช่สารร่วมกับสารละลาย EMS ความเข้มข้นต่าง ๆ และจำนวนยอดใหม่ที่เกิดขึ้น จากนั้นหาความเข้มข้นของสาร EMS ที่ยับยั้งการรอดชีวิตได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (LC50)

เนื่องจากเกิดปัญหาระหว่างการทดลอง คือ ต้นหนอนตายหยากในขั้นตอนที่ได้รับสาร EMS แต่ละความเข้มข้นข้างต้น เมื่อเพาะเลี้ยงไประยะเวลาหนึ่งพบว่ายอดที่เพาะเลี้ยงไว้จะค่อย ๆ มีการเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนจนถึงขาว และบางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด จึงทำให้ยอดที่จะนำไปใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไปไม่เพียงพอ จึงมีความจำเป็นต้องไปขอความอนุเคราะห์จากกรมวิชาการเกษตรอีกครั้งเพื่อนำต้นแม่พันธุ์มาใช้ทำการทดลองต่อ การทดลองหลังจากนี้ คือ การให้สาร EMS แก่หนอนตายหยากด้วยความเข้มข้น LC50 เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม ซึ่งจะเป็นต้นพันธุ์รอบใหม่ที่เป็นชนิดเดียวกันในขวดเพาะเลี้ยงอาหารสูตร MS

ต่อมานำชิ้นส่วนยอดของหนอนตายหยากดอกสั้นขนาด 1 เซนติเมตร ใส่ขวดรูปชมพู่ซึ่งบรรจุสารละลาย EMS ที่ยับยั้งการรอดชีวิตได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) คือความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับต้นแม่ ทำ 2 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด ปิดผนึกด้วยอะลูมินัมฟอยล์นำไปวางบนเครื่องเขย่า เขย่าที่ความเร็ว 40-50 รอบต่อนาที ระยะเวลาแช่ในสารละลาย 60 นาที เมื่อครบเวลาตามที่กำหนดแล้ว แยกชิ้นส่วนพืชออกสารละลาย EMS ล้างในอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต 3 ครั้ง แล้วจึงซับด้วยกระดาษชำระที่ผ่านการฆ่าเชื้อจนแห้ง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจาก

เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วย้ายยอดที่เกิดขึ้นใส่สูตรอาหารเดิมอีก 1 ครั้ง เพาะเลี้ยงต่อไปอีก 4 สัปดาห์ บันทึกการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน

นำข้อมูลดังกล่าวมาวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยใช้สถิตินอนพาราเมตริก (Nonparametric Statistics) วิธีทดสอบแบบ Mann-Whitney U test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS statistics 20

นำชิ้นส่วนยอดที่รอดชีวิตมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร BA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ เพื่อให้มีการเจริญพัฒนาเป็นต้นหรือกิ่งเป็นต้นใหม่เดี่ยว ๆ ที่มีลักษณะค่อนข้างสม่ำเสมอ ช่วยให้สามารถค้นพบส่วนที่เกิดการกลายได้ดีขึ้น หลังจากครบระยะเวลา 8 สัปดาห์ จึงนำมาชักนำรากต่อ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร IBA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 8 สัปดาห์อีกครั้งเพื่อใช้ในการตรวจสอบการกลายต่อไป

4.3 การตรวจสอบการกลายของพืชที่ได้จากการชักนำโดย EMS

4.3.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐาน

ตรวจสอบอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้าในแต่ละความเข้มข้นของ EMS เปรียบเทียบกัน โดยวัดความสูงของต้น จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนราก และความยาวราก บันทึกข้อมูลและหาค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลอง

4.3.2 การตรวจสอบลักษณะความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเทคนิค RAPD และ SCoT

4.3.2.1 สกัดดีเอ็นเอจากใบของหนอนตายหยากที่ได้จากชักนำให้เกิดการกลายโดย EMS ในหลอดทดลอง

ในขั้นตอนนี้ยอดของหนอนหตายหยากที่ไม่ได้รับสาร EMS หรือต้นแม่ตายลง เนื่องจากปัญหาเดียวกันกับที่เจอก่อนหน้านี้ จึงทำให้ใบของต้นแม่ที่จะนำไปใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ได้รับสาร EMS ไม่เพียงพอ จึงมีความจำเป็นต้องไปขอความอนุเคราะห์จากกรมวิชาการเกษตรเป็นครั้งที่สามเพื่อนำใบของต้นแม่ที่เป็นชนิดเดียวกันในขวดเพาะเลี้ยงอาหารสูตร MS มาทำการสกัดดีเอ็นเอ ในขณะที่ยอดที่ได้รับสาร EMS ยังเป็นยอดเดิมจากการทดลองก่อนหน้านี้ โดยยอดของหนอนตายหยากที่คาดว่าจะเกิดการกลายหลังจากได้รับสาร EMS ที่ระดับ LC50 คือ ความเข้มข้น 0.90 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 60 นาที มี 8 ยอด โดยได้ให้รหัสแต่ละยอดคือ C1A, C1B, C2, C3, C4, C5A, C5B และ C6 (1-6 คือจำนวนยอดที่ได้คาดว่าจะกลายจากการ

ได้รับสาร EMS, A และ B คือ หนอนตายหยากจากยอดเดียวกันแล้วทำการ subculture แยกขวด) ทำการเปรียบเทียบกับต้นแม่ โดยให้รหัสเป็น M0

วิธีการคือนำใบของหนอนตายหยากดังกล่าวมาตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1×1 เซนติเมตร ใส่ในหลอดทดลอง เติม CTAB 200 มิลลิลิตร แล้วบดให้ละเอียด เติม CTAB buffer 800 มิลลิลิตร และบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 - 60 นาที แล้วทิ้งให้ส่วนผสมเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติม "wet" chloroform 200 ไมโครลิตร และกลับหลอด ไมโครเซนติฟิวก์ขึ้น-ลง เบา ๆ 3 - 4 ครั้งตามด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที นำ aqueous (upper) phase ใส่ลงใน microcentrifuge tube อันใหม่ และ re-extract ด้วย "wet" chloroform 200 ไมโครลิตร นำ aqueous (upper) phase ใส่ลงใน microcentrifuge tube อันใหม่ และเติม isopropanol (ที่เย็นจัด) 600 ไมโครลิตร ผสมเบา ๆ ให้เข้ากัน และทิ้งไว้ 15 นาที หลังจากนั้นจึงปั่นเหวี่ยงที่ 13,0000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ทิ้ง supernatant และเติม wash buffer 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที และทิ้ง supernatant ล้างด้วย 70% alcohol 1,000 มิลลิตร โดยเติมลงในหลอดที่มีตะกอนดีเอ็นเอทิ้งไว้ 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง แล้วเท supernatant ทิ้งไป ละลาย DNA pellet ใน sterile distilled water 50 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บในอุณหภูมิ 4 เซลเซียส

นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำการตรวจสอบปริมาณด้วย spectrophotometer โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจางด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ วัดค่าของ blank (น้ำกลั่น) ปรับค่าอยู่ที่ 0 จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 260 นาโนเมตร ทำการบันทึกข้อมูลและปรับความเข้มข้นปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ในแต่ละตัวอย่างให้ใกล้เคียงกันก่อนนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำ PCR

4.3.2.2 การทดสอบไพร์เมอร์โดยการทำ PCR โดยการนำ DNA ที่สกัดได้มาตรวจสอบโดยไพรเมอร์ RAPD 7 ชนิด และทดสอบโดยเครื่องหมาย SCoT 22 ชนิด และดำเนินการในปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Distilled water	16.875	ไมโครลิตร
10x buffer	2.5	ไมโครลิตร
dNTP(2.5 mM)	2	ไมโครลิตร
Primer	0.5	ไมโครลิตร
Mg^{2+}(25 mM)	2	ไมโครลิตร
Taq Enzyme	0.125	ไมโครลิตร

DNA Template 1 ไมโครลิตร

นำเข้าเครื่อง thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

- Primer RAPD

ขั้นตอนที่ 1 Initial denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที	
ขั้นตอนที่ 2 Denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที	35 รอบ
ขั้นตอนที่ 3 Annealing	อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที	
ขั้นตอนที่ 4 Extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที	
ขั้นตอนที่ 5 Final Extension	อุณหภูมิ 72องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที	

- Primer SCoT

ขั้นตอนที่ 1 Initial denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที	
ขั้นตอนที่ 2 Denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที	35 รอบ
ขั้นตอนที่ 3 Annealing	อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที	
ขั้นตอนที่ 4 Extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที	
ขั้นตอนที่ 5 Final Extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที	

4.3.2.3 นำ PCR product ที่ได้มาทำการตรวจสอบลายพิมพ์ DNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis 0.8 กรัม ใน 1X TAE buffer 80 มิลลิลิตร และย้อมด้วยสี ethidium bromide 1.5 มิลลิลิตร แล้วตรวจสอบการปรากฏของแถบ DNA จากนั้นทำการเลือก ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมต่อไป

4.3.2.4 การทดสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยการทำ PCR โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ผ่านการทดสอบแล้ว และดำเนินการในปริมาตรรวม 250 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Distilled water	183.75	ไมโครลิตร
10x buffer	25	ไมโครลิตร
dNTP(2.5 mM)	5	ไมโครลิตร
Primer	5	ไมโครลิตร
Mg^{2+}(25 mM)	10	ไมโครลิตร
Taq Enzyme	1.25	ไมโครลิตร
DNA Template	2	ไมโครลิตร

นำเข้าเครื่อง thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

- Primer RAPD

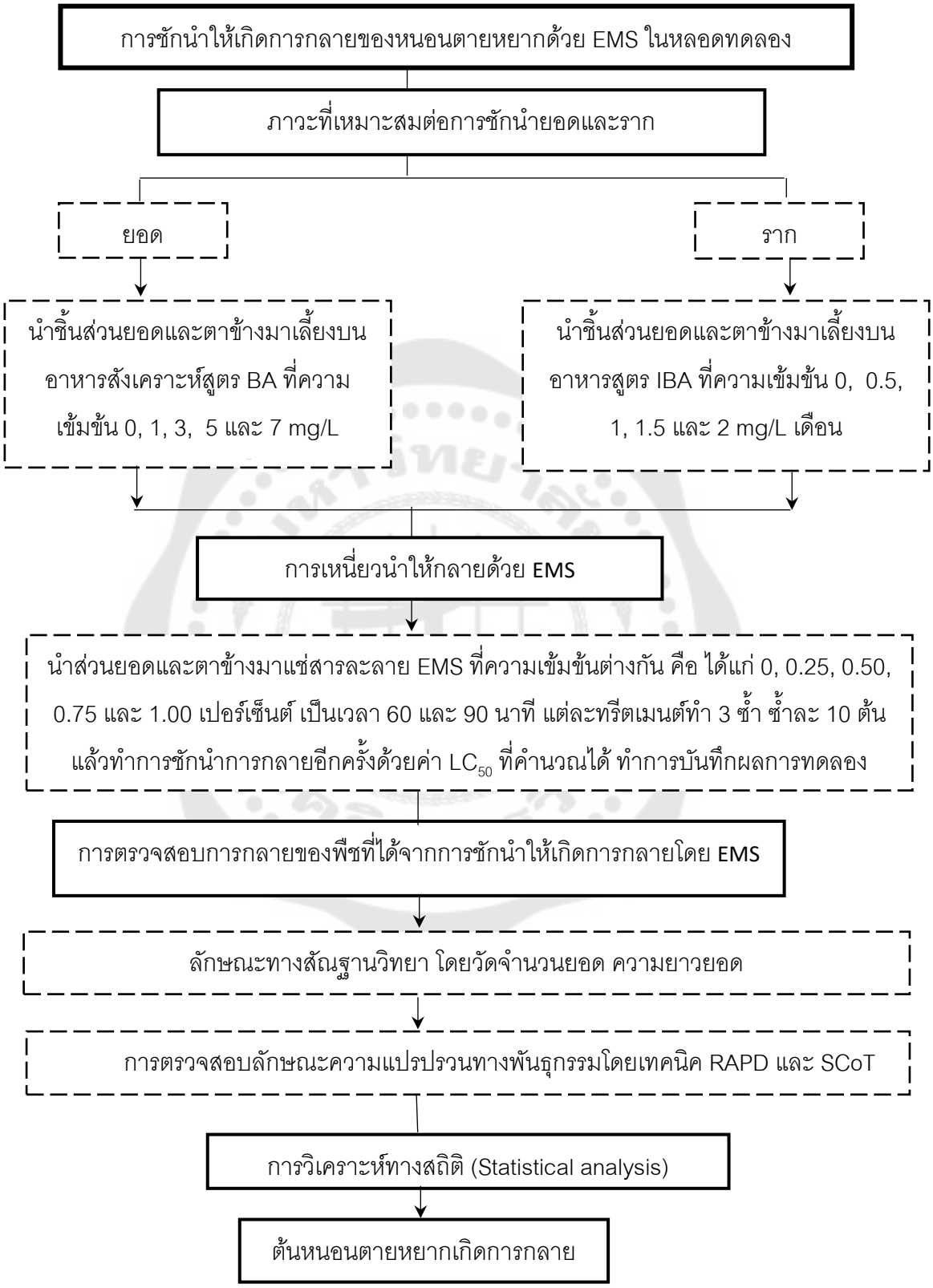
ขั้นตอนที่ 1 Initial denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที	
ขั้นตอนที่ 2 Denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที	35 รอบ
ขั้นตอนที่ 3 Annealing	อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที	
ขั้นตอนที่ 4 Extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที	
ขั้นตอนที่ 5 Final Extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที	

- Primer SCoT

ขั้นตอนที่ 1 Initial denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที	
ขั้นตอนที่ 2 Denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที	35 รอบ
ขั้นตอนที่ 3 Annealing	อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที	
ขั้นตอนที่ 4 Extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที	
ขั้นตอนที่ 5 Final Extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที	

4.3.2.4 นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาทำการตรวจสอบลายพิมพ์ DNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TAE buffer และย้อมด้วยสี ethidium bromide 1.5 มิลลิลิตร ทำการเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏระหว่างแถบดีเอ็นเอที่ได้จากต้นที่ได้จากการเพาะชักนำการกลายด้วย EMS กับต้นควบคุม เพื่อประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรม โดยนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดโดยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) เพื่อสร้างเดนโดรแกรม (dendrogram)

วิธีการดำเนินการดังภาพประกอบที่ 6



ภาพประกอบ 6 แผนผังการดำเนินการ

บทที่ 4
ผลการดำเนินงานวิจัย

1. ภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดและราก

1.1 การชักนำการเกิดยอดหลายยอด (multiple shoot)

การชักนำการเกิดยอดของหนอนตายหยากดอกสั้น (S. *collinsiae* Craib) ภายใต้สภาพปลอดเชื้อโดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 3, 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในทุกระดับความเข้มข้นให้จำนวนยอดเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุดและมีความแตกต่างจากชุดควบคุมคือ 7.13±2.75 ยอดต่อต้น โดยชุดควบคุมให้จำนวนยอดเฉลี่ย 2.80±1.75 ยอดต่อต้น รองลงมาคืออาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเท่ากับ 6.00±3.84 ยอดต่อต้น (ตารางที่ 3) ในขณะที่อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุดคือ 1.46±0.62 เซนติเมตร รองลงมาคืออาหารสูตร MS ที่ไม่ได้เติม BA ให้ความยาวยอดเฉลี่ย 1.10±0.78 เซนติเมตร (ตารางที่ 3) (ภาพที่ 7)

1.2 การชักนำการเกิดราก

การชักนำการเกิดรากของหนอนตายหยากดอกสั้นภายใต้สภาพปลอดเชื้อโดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในแต่ละระดับความเข้มข้นให้จำนวนรากเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน โดยอาหารสูตร MS ที่เติม IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุดคือ 0.90±0.40 รากต่อต้น รองลงมาคืออาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนราก 0.33±0.21 รากต่อต้น โดยอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม IBA ให้จำนวนรากเฉลี่ย 0.20±0.22 รากต่อต้น (ตารางที่ 4) ในขณะที่อาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวรากเฉลี่ยสูงสุดเช่นเดียวกันคือ 1.44±0.46 เซนติเมตร รองลงมาคืออาหารสูตร MS ที่เติม IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวรากเฉลี่ย 0.74±0.43 เซนติเมตร (ตารางที่ 4) (ภาพที่ 8)

MS

MS+BA 1 mg/L

MS+BA 3 mg/L

MS+BA 5 mg/L

MS+BA 7 mg/L

ภาพประกอบ 7 ลักษณะการเกิดยอดของหนอนตายหยากดอกสั้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS โดยเติม BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ระยะเวลา 8 สัปดาห์

MS

MS+IBA 0.5 mg/L

MS+IBA 1 mg/L

MS+IBA 1.5 mg/L

MS+IBA 2 mg/L

ภาพประกอบ 8 ลักษณะการเกิดรากของหนอนตายหยากดอกสั้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS โดยเติม IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ระยะเวลา 8 สัปดาห์

ตาราง 3 ผลของ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีต่อการเกิดจำนวนยอด และความยาวยอด ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

ระดับความเข้มข้น BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	การชักนำยอด	
	จำนวนยอด / ต้น (ยอด)	ความยาวยอด (เซนติเมตร)
0	2.80±1.75[a]	1.10±0.78
1	5.22±2.33[ab]	1.46±0.62
3	6.00±3.84[ab]	1.03±0.45
5	7.13±2.75[b]	1.00±0.70
7	4.11±3.07[ab]	0.90±0.59
F-test	*	ns

หมายเหตุ * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P>0.05)

ตาราง 4 ผลของ IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีต่อการเกิดจำนวนราก และความยาวราก ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

ระดับความเข้มข้น IBA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	การชักนำยอด		การชักนำราก	
	จำนวนยอด / ต้น (ยอด)	ความยาวยอด (เซนติเมตร)	จำนวนราก / ต้น (ราก)	ความยาวราก (เซนติเมตร)
0	2.10±1.66	1.54±0.96[b]	0.20±0.22	0.06±0.13
0.5	6.78±4.12	3.63±1.54[ab]	0.33±0.20	0.74±0.43
1	5.50±3.44	3.53±1.76[ab]	0.90±0.44	1.44±0.46
1.5	4.88±3.83	4.08±2.53[a]	0.13±0.08	0.29±0.81
2	5.67±4.27	4.07±1.12[a]	0.33±0.21	0.46±0.48
F-test	ns	*	ns	ns

หมายเหตุ * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P>0.05)

2. การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการชักนำให้เกิดการกลายด้วย EMS

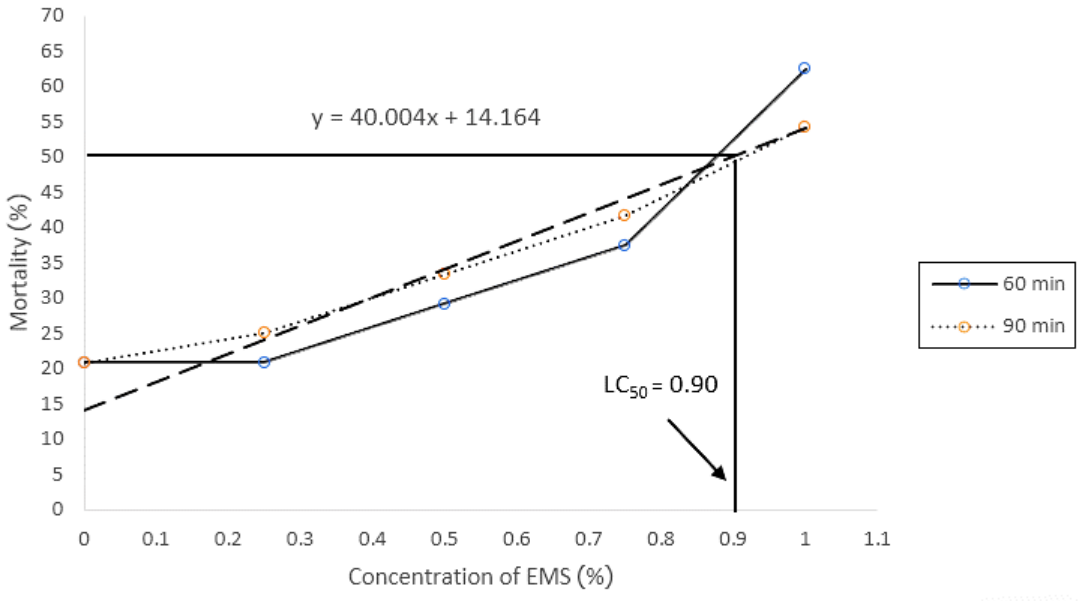
เมื่อนำยอดของหนอนตายหยากดอกสั้นแช่ในการละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ ได้แก่ 0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 และ 90 นาที เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ ยอดของหนอนตายหยากดอกสั้นที่แช่ในสารละลาย EMS ทุกระดับความเข้มข้นนาน 60 นาที มีอัตราการตาย 20.83, 20.83, 29.17, 37.50 และ 62.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และนาน 90 นาที มีอัตราการตาย 20.83, 25.00, 33.33, 41.67 และ 54.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5) และเมื่อนำมาเขียนกราฟพบว่าที่ความเข้มข้นของ EMS 0.90 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการตายลดลงครึ่งหนึ่ง (ภาพที่ 9) เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดพบว่ายอดที่แช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที ให้การสร้างยอดสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ยอดที่ไม่แช่สารละลาย EMS (ชุดควบคุม) นาน 90 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดต่ำสุด คือ 47.37 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาในด้านจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนพบว่า ยอดที่แช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนสูงสุด คือ 5 ยอดต่อชิ้นส่วน รองลงมาคือยอดที่แช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนคือ 4.13 ยอดต่อชิ้นส่วน (ตารางที่ 6)

ตาราง 5 อัตราการตายของ *S. collinsiae* Craib หลังจากแช่สารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

EMS (%)	อัตราการตาย (%)	
	60 นาที	90 นาที
0	20.83	20.83
0.25	20.83	25.00
0.50	29.17	33.33
0.75	37.50	41.67
1.00	62.50	54.17

ตาราง 6 การสร้างยอดและจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนของ *S. collinsiae* หลังจากแช่สารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

EMS (%)	การสร้างยอด (%)		จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน	
	60 นาที	90 นาที	60 นาที	90 นาที
0.00	73.68	47.37	3.80	3.22
0.25	84.21	55.56	3.31	3.30
0.50	70.60	68.75	3.08	2.82
0.75	100.00	64.30	4.13	5.00
1.00	77.78	63.64	3.00	2.14



ภาพประกอบ 9 อัตราการตาย (Mortality) ของ *S. collinsiae* หลังจากจากแช่สารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยลูกศรชี้ตำแหน่งอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (แกน Y) และความเข้มข้นของสารละลาย EMS ที่ได้ (แกน X)

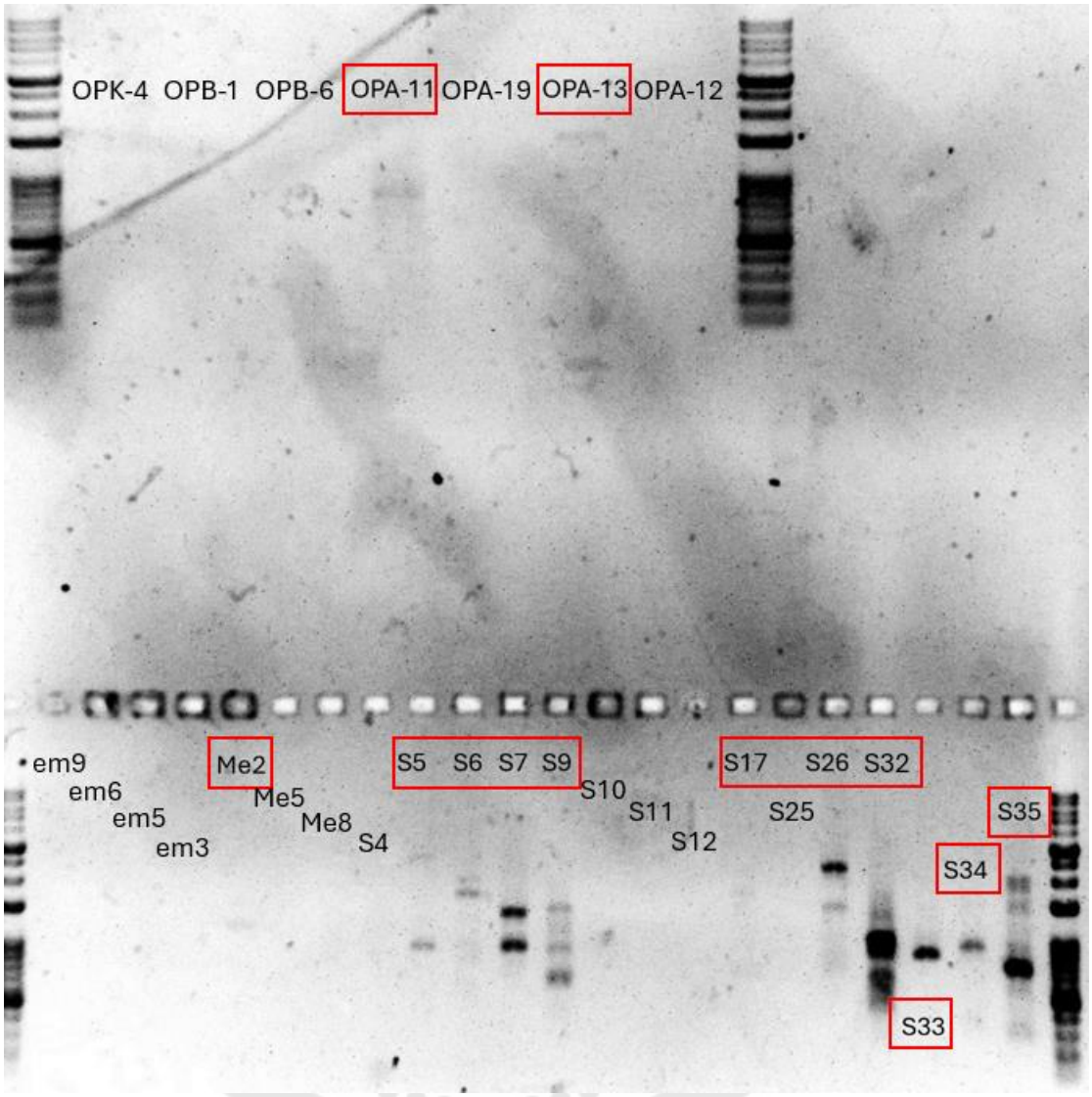
ภาพประกอบ 10 ลักษณะการเกิดยอดและราก หลังเพาะเลี้ยงระยะเวลา 8 สัปดาห์ ก) MS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ข) MS ที่เติม IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ค) ยอดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุดหลังจากแช่สารละลาย EMS

3. การตรวจสอบลักษณะความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเทคนิค Random Ampified Poiymorphic Rapid (RAPD) และ Start Codon Targeted (SCoT)

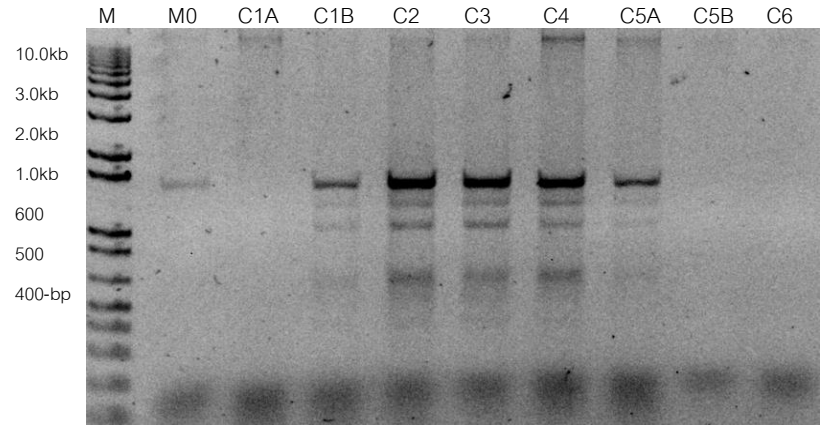
จากการตรวจสอบไพรเมอร์โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ RAPD ทั้งหมด 7 ไพรเมอร์ มี 2 ไพรเมอร์ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ คือ OPA-11 และ OPA-13 และเครื่องหมาย SCoT ทั้งหมด 22 ไพรเมอร์ มี 11 ไพรเมอร์ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ คือ ME2, S5, S6, S7, S9, S17, S26, S23, S32, S34 และ S35 (ภาพที่ 11) และลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้อุณหภูมิในขั้น annealing stage ที่ 30 องศาเซลเซียส ที่ทดสอบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ RAPD 2 ไพรเมอร์ คือ OPA-11 และ OPA-13 และทดสอบโดยเครื่องหมาย SCoT ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้อุณหภูมิในขั้น annealing stage ที่ 50 องศาเซลเซียส พบไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมจำนวน 6 ไพรเมอร์ คือ S6, S17, S26, S32, S34 และ S35 (ภาพที่ 12-19) ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอและสามารถใช้ระบุความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างหนอนตายหยากดอกสั้นต้นแม่ (M0) รวมเป็น 33 แถบดีเอ็นเอ และหนอนตายหยากดอกสั้นที่ผ่านการแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.90 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด (C1A, C1B, C2, C3, C4, C5A, C5B และ C6) รวมเป็น 32, 16, 31, 35, 33,30, 21 และ 28 แถบดีเอ็นเอตามลำดับ (ตารางที่ 7) โดยแสดงแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 52 แถบ ซึ่งเป็นแถบที่มีความหลากหลายจำนวน 47 แถบ คิดเป็น 90.40 เปอร์เซ็นต์ โดยจำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบมี 4 - 9 แถบต่อไพรเมอร์ ซึ่งแตกต่างกันไปในแต่ละไพรเมอร์ โดยคิดเป็นค่าเฉลี่ยของแถบดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์เท่ากับ 6 แถบในจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด พบว่าดีเอ็นเอแตกต่างกันตั้งแต่ 3 – 9 แถบต่อไพรเมอร์ คิดเป็นค่าเฉลี่ย 5.88 พบว่าทุกไพรเมอร์แสดงเปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอ คือ เครื่องหมาย OPA-11, OPA-13,

S26, S34 และ S35 มีเปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ S6 (85.72), S17 (75.00) และ S32 (62.50) ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

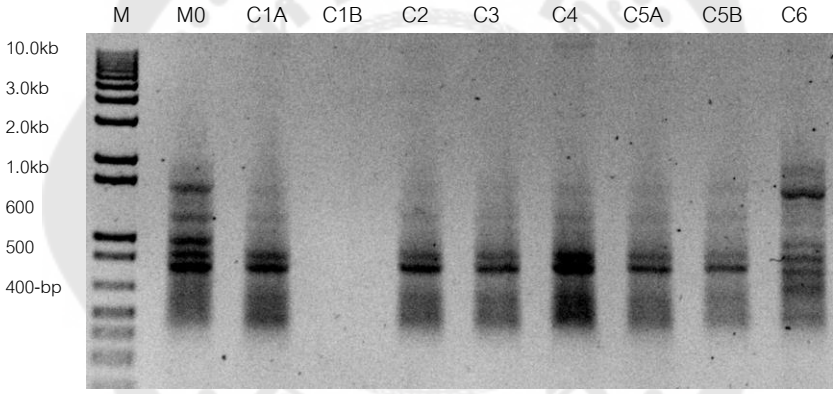
ผลจากการใช้เครื่องหมาย RAPD 2 ไพรเมอร์และ SCoT 6 ไพรเมอร์ แสดงแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 52 แถบ ซึ่งเป็นแบบพอลิมอร์ฟิกจำนวน 47 แถบ และมอนอมอร์ฟิก 5 แถบ โดยนำข้อมูลทั้ง 52 แถบดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA 11 ด้วยการวิเคราะห์ค่า pairwise distance สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (UPGMA tree) (ภาพที่ 20) เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์พบว่าหนอนตายหยาก C3 และ C4 ใกล้ชิดกันมากที่สุด (pairwise distance = 0.132) และเมื่อเปรียบเทียบกับต้นแม่พบว่าหนอนตายหยาก C6 มีค่า pairwise distance น้อยที่สุด คือ 0.226 และ C2 มีค่า pairwise distance มากที่สุด คือ 0.528 (ตารางที่ 9) สามารถจัดกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย C6 ที่มีความใกล้เคียงกับต้นแม่ และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย C1A, C1B, C2, C3, C4, C5A และ C5B ที่มีความแตกต่างกับต้นแม่และ C6 มากกว่า



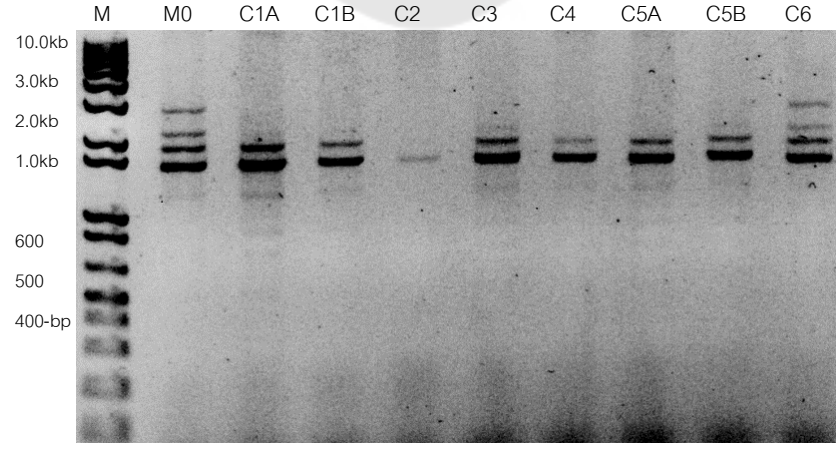
ภาพประกอบ 11 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบไพรเมอร์ของเครื่องหมาย RAPD 7 ชนิด (บน) และ SCoT 22 ชนิด (ล่าง)



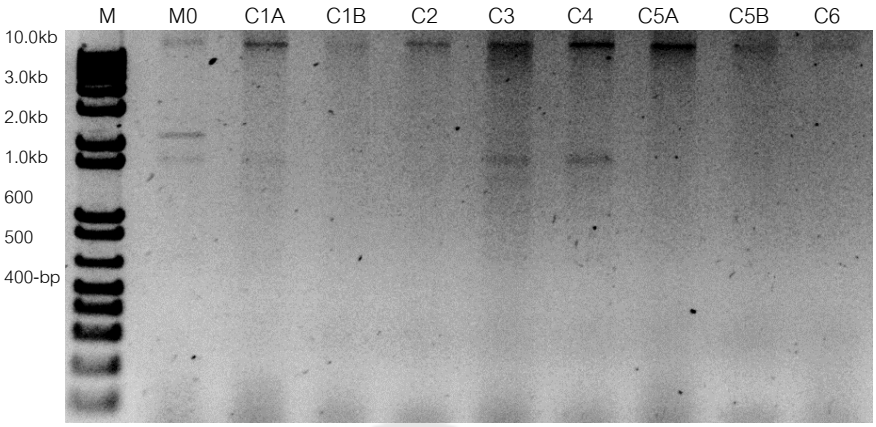
ภาพประกอบ 12 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-11



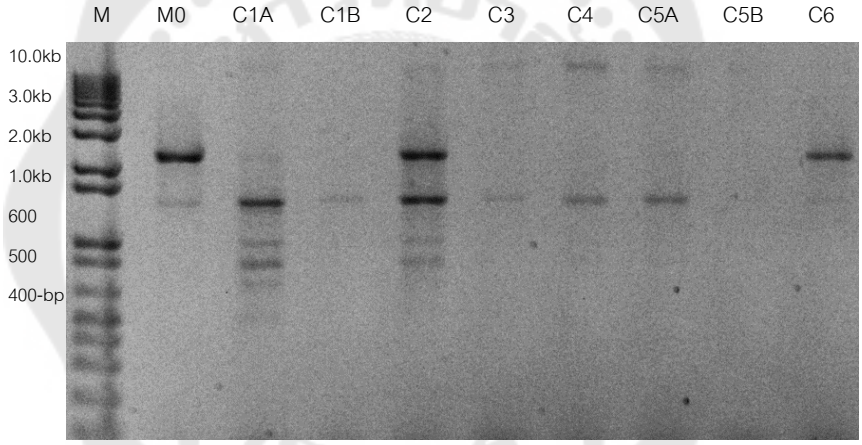
ภาพประกอบ 13 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-13



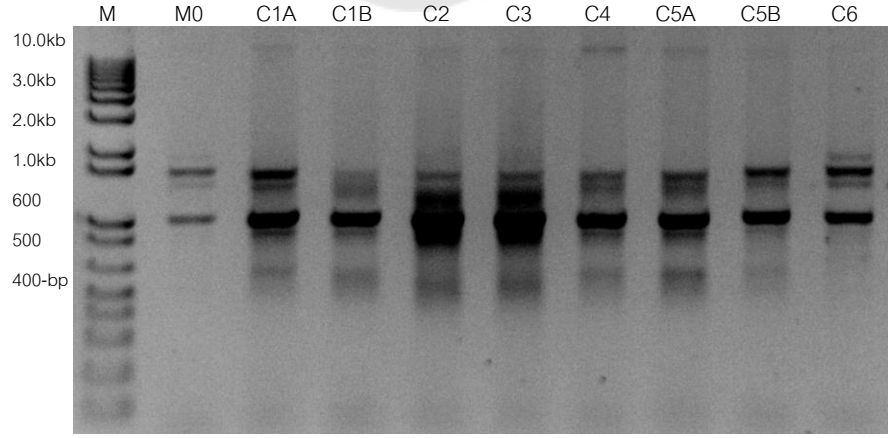
ภาพประกอบ 14 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ S6



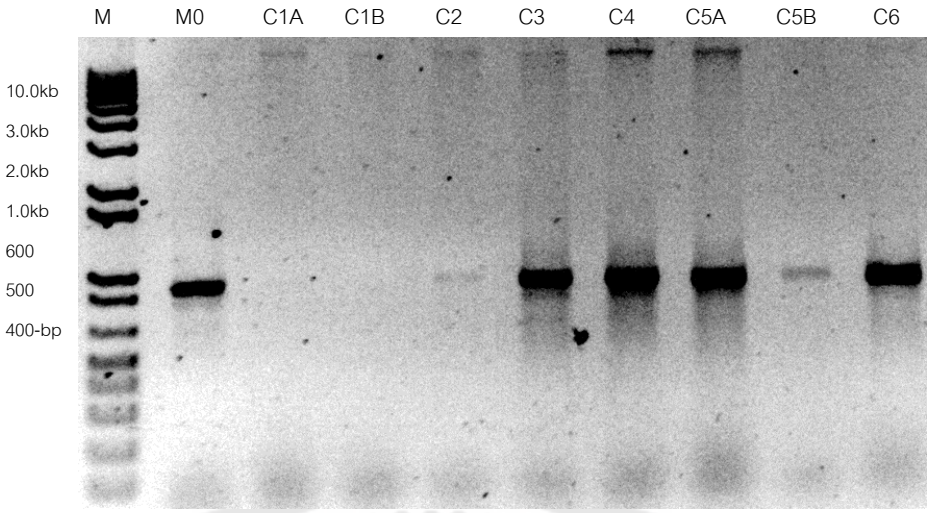
ภาพประกอบ 15 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ S17



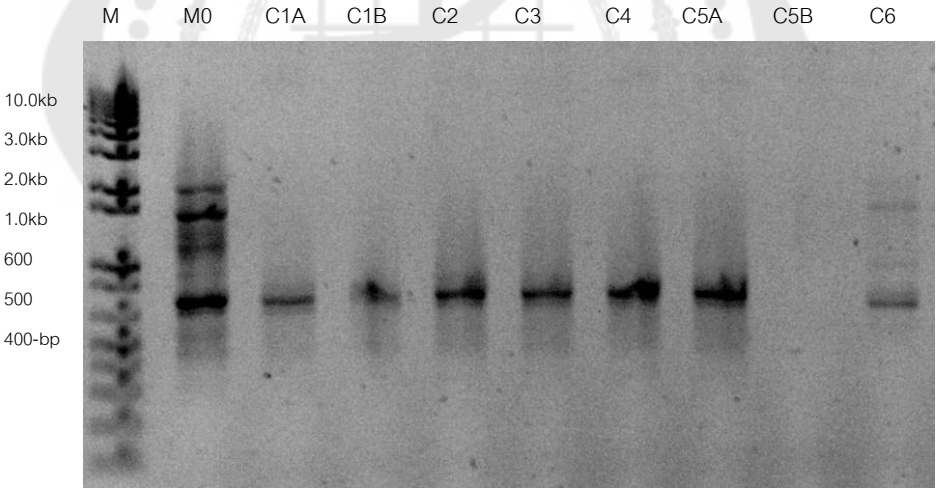
ภาพประกอบ 16 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ S26



ภาพประกอบ 17 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ S32



ภาพประกอบ 18 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ S34



ภาพประกอบ 19 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ S35

ตาราง 7 จำนวน amplicons ที่สร้างโดยเครื่องหมายโมเลกุล

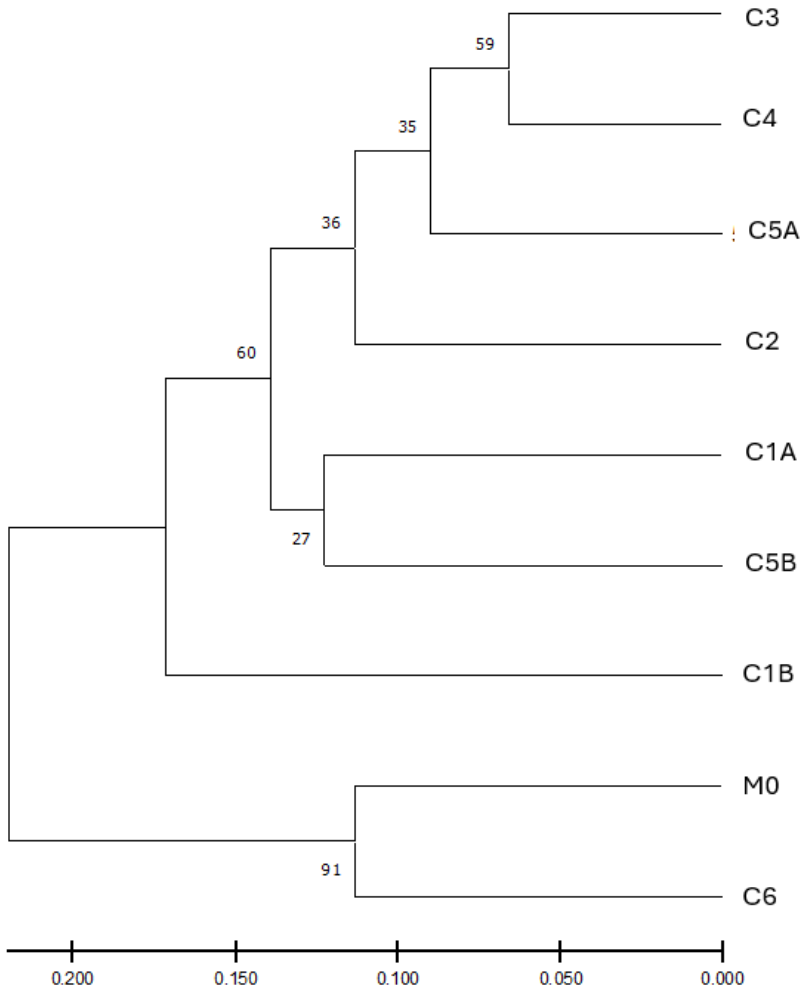
Treatment	RAPD	SCoT	Total
M0	7	26	33
C1A	7	25	32
C1B	2	14	16
C2	11	20	31
C3	11	24	35
C4	12	21	33
C5A	10	20	30
C5B	7	14	21
C6	8	20	28

ตาราง 8 ผลการตรวจความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหนอนตายหยากดอกสั้น โดยใช้ไพรเมอร์ RAPD 2 ไพรเมอร์ และ SCoT 6 ไพรเมอร์ โดยแสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนและแตกต่างกัน

Primer	Primer sequence	Total bands amplified	Mono morphic bands	Poly morphic bands	Poly morphic (%)
OPA-11	CAATCGCCGT	5	0	5	100.00
OPA-13	CAGCACCCAC	9	0	9	100.00
S6	CAACAATGGCTACCACGC	7	1	6	85.72
S17	ACCATGGCTACCACCGAC	4	1	3	75.00
S26	ACCATGGCTACCACCGTC	7	0	7	100.00
S32	CCATGGCTACCACCGCCT	8	3	5	62.50
S34	ACCATGGCTACCACCGCA	4	0	4	100.00
S35	CATGGCTACCACCCGCCC	8	0	8	100.00
	Minimum	4	0	3	62.50
	Maximum	9	3	9	100.00
	Total	52.00	5.00	47.00	723.22
	Mean	6.50	0.63	5.88	90.40

ตาราง 9 Pairwise distances แสดงค่าความห่างทางพันธุกรรมของหนอนตายหยากดอกสั้นต้นแม่ (M0) และหนอนตายหยากดอกสั้นที่ผ่านการแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.90 เปอร์เซ็นต์ (C1A, C1B, C2, C3, C4, C5A, C5B และ C6)

	M0	C1A	C1B	C2	C3	C4	C5A	C5B	C6
M0									
C1A	0.509								
C1B	0.491	0.358							
C2	0.528	0.245	0.377						
C3	0.453	0.283	0.340	0.226					
C4	0.472	0.340	0.396	0.245	0.132				
C5A	0.472	0.226	0.245	0.208	0.208	0.151			
C5B	0.491	0.245	0.340	0.340	0.264	0.321	0.208		
C6	0.226	0.396	0.415	0.377	0.415	0.434	0.358	0.340	



ภาพประกอบ 20 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหนอนตายหยากดอกสั้นต้นแม่ (M0) และหนอนตายหยากดอกสั้นที่ผ่านการแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.90 เปอร์เซ็นต์ (C1A, C1B, C2, C3, C4, C5A, C5B และ C6)

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การชักนำการเกิดยอดของหนอนตายหยากดอกสั้นภายใต้สภาพปลอดเชื้อ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ในทุกระดับความเข้มข้นให้จำนวนยอดเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุดและมีความแตกต่างจากชุดควบคุมคือ 7.13±2.75 ยอดต่อต้น ในขณะที่ความยาวยอดเฉลี่ยของทุกสูตรอาหารมีขนาดไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 3) (ภาพที่ 7) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะต่อการนำไปใช้พัฒนาเป็นต้นใหม่เดี่ยว ๆ ที่มีลักษณะสม่ำเสมอ เพื่อช่วยให้สามารถค้นพบส่วนที่เกิดการกลายที่สม่ำเสมอขึ้น สอดคล้องกับงานทดลองของ กาญจนาและอริยาภรณ์ (2551) ที่พบว่าอาหารสูตร MS เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดได้จำนวนมากที่สุดเฉลี่ย 7 ยอดต่อชิ้น ในระยะเวลา 2 เดือน และสอดคล้องกับการทดลองของ ยุพา มงคลสุข (2543) พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยอดของหนอนตายหยากคือ สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 17.5 ยอด ในระยะเวลา 45 วัน โดยการพัฒนาของชิ้นส่วนพืชไปเป็นยอดในหลอดทดลอง เป็นผลมาจากทั้งปัจจัยภายในของพืชและปัจจัยภายนอก ได้แก่ อาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช โดยพบว่า BA เป็นไซโตไคนินที่ชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซีสที่จำเป็นต่อการกระตุ้นให้เกิดตายอดและการเพิ่มจำนวนยอดรวมจากชิ้นส่วนข้อ (Rathore et al., 2007) โดยกระตุ้นผ่านการแบ่งเซลล์ของเนื้อเยื่อเจริญ โดยส่งเสริมการสังเคราะห์ RNA และโปรตีน ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเพิ่มจำนวนยอดรวมในหลอดทดลอง แสดงให้เห็นว่า BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดหนึ่งในกลุ่มไซโทไคนินที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดของพืชในสกุลนี้

การชักนำการเกิดรากของหนอนตายหยากดอกสั้นภายใต้สภาพปลอดเชื้อ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในแต่ละระดับความเข้มข้นให้จำนวนรากเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน สำหรับการทดลองนี้ค่าเฉลี่ยของอาหารสูตร MS ที่เติม IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุดคือ 0.90±0.44 รากต่อต้น (ตารางที่ 4) ในขณะที่อาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุดเช่นเดียวกันคือ 1.44±0.46 เซนติเมตร (ตารางที่ 4) (ภาพที่ 8) ซึ่งถือได้ว่าสามารถชักนำการเกิดรากได้น้อยมากในสภาพปลอดเชื้อ ขัดแย้งกันกับการรายงานของ Animesh และคณะ (2011) สามารถชักนำหนอนตายหยากให้เกิดรากได้เฉลี่ย 4.7 ราก เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร half strength MS ที่เติม naphthyl acetic Acid (NAA) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และรายงานของ

กาญจนาและอริยาภรณ์ (2551) พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้หนอนตายหยากเกิดราก คือ สูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 2 เดือน อย่างไรก็ตาม การชักนำให้พืชในสภาพปลอดเชื้อเกิดรากขึ้นได้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่นำมาใช้เพาะเลี้ยงด้วยเช่นกัน เช่น หนอนตายหยาก (S. *tuberosa* Lour.) สามารถเกิดรากได้บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน โดยใช้เวลาเพาะเลี้ยง 2 เดือน (Montri และคณะ, 2009) เป็นต้น นอกจากนี้ชนิดและความเข้มข้นของออกซินที่ใช้ หากใช้ชนิดหรือความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสมกับพืชและชิ้นส่วนนั้น ๆ ก็ทำให้ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ (Geogre, 1980) เช่นรายงานของ อรพิน (2557) พบว่าการเพาะเลี้ยงต้นผักหวานป่าบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น เวลา 60 วัน ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากใหม่ได้ ในขณะที่อาหารสูตร MS ที่เติม IBA ให้ค่าเฉลี่ยความยาวยอดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คืออาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุดคือ 1.44±0.46 เซนติเมตร การเลือกใช้อาหารสูตร MS ที่เติม IBA จากการทดลองพบว่าอาหารทุกสูตรสามารถชักนำการเกิดจำนวนรากและความยาวรากได้ไม่แตกต่างกัน

เมื่อนำยอดของหนอนตายหยากดอกสั้นแช่ในการละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ได้แก่ 0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 และ 90 นาที โดยเพาะเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ พบว่ายอดของหนอนตายหยากดอกสั้นที่แช่ในการละลาย EMS นาน 60 นาที มีอัตราการตาย 20.83, 20.83, 29.17, 37.50 และ 62.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่แช่นาน 90 นาที มีอัตราการตาย 20.83, 25.00, 33.33, 41.67 และ 54.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่ายอดที่แช่ในสารละลาย EMS ที่มีความเข้มข้นสูงช่วง 1.5 – 2 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาในการแช่สารนานกว่า มีอัตราการตายเพิ่มขึ้น มีการเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนจนถึงขาว และบางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด (ภาพที่ 10ค) เนื่องจากผลของสารประกอบฟีนอลที่พืชปล่อยออกมาอันเนื่องมาจากความเป็นพิษของสารละลาย EMS เช่นเดียวกับการศึกษาของ ชานนท์ และเมิง-เจียว เจิง (2560) ที่ศึกษาในกล้วยไม้ *Erycina pussila* พบว่าอัตราต้นที่ตายจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารและระยะเวลา อีกทั้งยังแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อที่ผิดปกติ คือ ใบซีด เป็นต้น ในทางตรงกันข้ามพบว่ายอดที่แช่ในสารละลาย EMS ที่มีความเข้มข้นต่ำและระยะเวลาในการแช่สารน้อยกว่าส่งผลให้พืชมีอัตราการตายของชิ้นส่วนต่ำลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Fang (2011) พบว่าการใช้สารละลาย EMS กับต้นแอฟริกันไวโอเลตที่ระดับความเข้มข้นต่ำ 0.2 - 0.4 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้พืชมีอัตราการรอด

ชีวิตสูง 100 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นส่วนพืชที่แช่ในสารละลาย EMS ระยะเวลา 0.5 ชั่วโมง มีอัตราการตายน้อยกว่าระยะเวลา 1 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ เนื่องจากการใช้สาร EMS ที่มีความเข้มข้นต่ำส่งผลเพียงเล็กน้อยเท่านั้นหรือไม่ส่งผลเลยที่ทำให้เกิดความเสียหายในระดับเซลล์ แสดงความสอดคล้องของความเข้มข้นของสารละลาย EMS และระยะเวลาในการแช่สารมีผลต่ออัตราการตายของหนอนตายหยากดอกสั้นในหลอดทดลอง

เมื่อนำมาเขียนกราฟพบว่าที่ความเข้มข้นของ EMS 0.90 เปอร์เซ็นต์ ทำให้อัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 9) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของศิริญญา ม่วงสอน และ สมปอง เตชะโต (2551) ที่ได้นำ PLBs กล้วยไม้เหลืองจันทบูรมาแช่ในสารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 60 และ 90 นาที ภายหลังเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน พบว่า EMS ที่ความเข้มข้น 0.90 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที ให้อัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ และ Nuamjaroen (1998) ซึ่งได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการใช้สาร EMS เพื่อชักนำให้ดอกคำฝอยเกิดการกลายในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำใบมาแช่ในสารละลาย EMS พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือการใช้สาร EMS ที่ความเข้มข้น 0.90 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 ชั่วโมง ให้อัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากชิ้นส่วนที่มีกิจกรรมของเนื้อเยื่อเจริญเมื่อผ่านการแช่ในสารละลาย EMS เนื้อเยื่อจะถูกทำลายเป็นจำนวนมาก ดังนั้นเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงจึงมีอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC50) และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ ความเข้มข้นของสิ่งก่อกลายพันธุ์ทำให้เกิดการตายได้จำนวนครึ่งหนึ่งถือว่าเป็นค่าในการประเมินความเข้มข้นที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลาย เพราะความเข้มข้นดังกล่าวสร้างความเสียหายและก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม และยังมีต้นพืชที่เหลือในการทดสอบการแปรปรวนทางพันธุกรรมต่อไปได้ โดยในพืชแต่ละชนิดจะมีค่า LC50 แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชิ้นส่วน อายุของชิ้นส่วน ระยะเวลาในการแช่สาร และความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดพบว่ายอดที่แช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที ให้การสร้างยอดสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ยอดที่ไม่แช่สารละลาย EMS (ชุดควบคุม) นาน 90 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดต่ำสุด คือ 47.37 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาในด้านจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนพบว่า ยอดที่แช่ในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนสูงสุดคือ 5 ยอดต่อชิ้นส่วน (ตารางที่ 6) เช่นเดียวกับการศึกษาของธัญญาพร (2547) พบว่า ภายหลังการแช่แคลลัสของหน้าวัวพันธุ์โซเนตด้วยสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น 0.725 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที ให้อัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้โดยเกิดลักษณะผิดปกติคือด่างบางส่วน ด่างกระจาย และด่างทั้งใบ และวัชรินทร์และกัณยารัตน์ (2548)

ศึกษาการชักนำการกลายของกล้วยไม้ *Dendrobium* พบว่า EMS ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการตายครึ่งหนึ่ง สามารถชักนำให้เกิดลักษณะผิดปกติ และมีผลทำให้การเจริญเติบโตในด้านต่าง ๆ ช้าลง เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

สำหรับการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชที่ได้รับสาร EMS นั้น ส่วนใหญ่มีรายงานการตรวจสอบโดยการใช้เครื่องหมาย RAPD ในพืชหลายชนิด เช่น ถั่วเหลือง (Hofmann et al., 2004) สบู่ดำ (Dhakshanamoorthy et al., 2010) กล้วย (Bidabadi et al., 2012) และโลควอต (Qin et al., 2011) เป็นต้น หรือใช้เครื่องหมาย SCoT ในพืช เช่น กล้วยใสกุลก้านก่อ (จุฑามาศ เจียมเจือจันทร์, 2016) และกระท้อน (ธีรชัย ธนานันต์, ทีปกา มีเสงี่ยม และสุพัตรา โพธิ์เอี่ยม, 2017) เป็นต้น แต่ยังไม่มีรายงานการตรวจสอบหนอนตายหยากที่ผ่านการให้สาร EMS และจากการศึกษาแถบดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมาย RAPD ไพร์เมอร์ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 ชนิด คือ OPA-11 และ OPA-13 และเครื่องหมาย SCoT จำนวน 6 ไพรเมอร์ คือ S6, S17, S26, S32, S34 และ S35 สามารถใช้ระบุความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างหนอนตายหยากดอกสั้นต้นแม่ (M0) และหนอนตายหยากดอกสั้นที่ผ่านการแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.90 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมดได้ (C1A, C1B, C2, C3, S4, C5A, C5B และ C6) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถใช้เครื่องหมาย RAPD และ SCoT ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหนอนตายหยากในการทดลองได้ เนื่องจากทุกไพรเมอร์แสดงความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอตั้งแต่ 62.50 – 100 เปอร์เซ็นต์ นั่นคือเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่าไพรเมอร์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบ polymorphism สามารถใช้ตรวจสอบและแยกความแตกต่างของสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการได้รับสาร EMS ได้ เช่น การใช้ไพรเมอร์ mSSCiR47 และ SMC222CG ในกล้วยพันธุ์ Cp48-103 และ CP57-614 (Sodat and Hoveize, 2012) ไพรเมอร์ Xbarc37, Xberc113 และ Xcfd62 ในข้าวสาลี (Ansari, 2012) และไพรเมอร์ S36 และ S38 ในต้นข้าว (นฤมล ประคองรักษ์ และ มณฑิรา มณฑาทอง, 2552) แสดงถึงความแปรปรวนทางพันธุกรรม เช่นเดียวกับรายงานของจันทร์เพ็ญ ใจซื่อ (2563) ได้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิง *Nepenthes khasiana* ด้วยเทคนิค RAPD พบว่ามี 4 ไพรเมอร์มีความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอ เนื่องจากความแปรปรวนทางพันธุกรรมในต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงรุ่นที่ 3 ที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เมื่อวิเคราะห์ความเหมือนความแตกต่างโดยวิธี UPGMA สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าสามารถจัดกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย C6 ที่มีความใกล้เคียงกับต้นแม่ สอดคล้องกับค่าความห่างทางพันธุกรรม คือ ต้นแม่กับหนอนตายหยาก C6 มี

ค่า pairwise distance น้อยที่สุด คือ 0.226 และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย C1A, C1B, C2, C3, C4, C5A และ C5B ที่มีความแตกต่างกับต้นแม่และ C6 มากกว่า โดยต้นแม่กับหนอนตายหยาก C2 มีค่า pairwise distance มากที่สุด คือ 0.528 ในทางเดียวกันคือ เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะสัณฐานที่พบว่ายอดที่แช่สารละลาย EMS ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดมากกว่ายอดที่ไม่แช่สารละลาย EMS (ต้นแม่) และเมื่อพิจารณาในด้านจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนพบว่ายอดที่แช่ในสารละลาย EMS ก็ให้จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนสูงกว่าต้นแม่ (ตารางที่ 6) แต่ต้นที่แช่ในสารละลาย EMS มีผลทำให้การเจริญเติบโตในด้านต่าง ๆ ช้าลง เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แสดงถึงการกลายของหนอนตายหยากดอกสั้นเบื้องต้นที่ได้รับสารละลาย EMS คือ มีลักษณะทางสัณฐานและลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากต้นแม่ และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบการกลายในลักษณะอื่น ๆ ควรมีการหาไพรเมอร์และลักษณะทางสัณฐานอื่นเพิ่มเติมเพื่อใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนให้มากขึ้น เพื่อบ่งลักษณะที่แปรปรวนที่เกิดจากการชักนำการกลายโดยใช้สาร EMS ให้ชัดเจนมากขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ จุฑามาศ เจียมเจือจันทร์ (2559) ที่สามารถประเมินความสัมพันธ์ที่ได้จากเครื่องหมาย SCoT และ RAPD พบว่าให้ผลไปทางเดียวกัน ซึ่งเครื่องหมายทั้งสองสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลก้านก่อจากการชักนำให้เกิดการกลายโดยสารเคมีและสอดคล้องกับลักษณะสัณฐานโครงสร้างของกล้วยไม้ได้ เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปสู่การปรับวิธีการเพาะเลี้ยงเพื่อปรับปรุงพันธุ์จากการกลายที่ได้ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

การทดลองนี้เป็นเพียงการทดลองเริ่มต้น ดังนั้นจึงอาจจะยังไม่เห็นความแตกต่างทางด้านฟีโนไทป์ของหนอนตายหยากดอกสั้นอย่างชัดเจน และยังไม่มีเกณฑ์ในการคัดเลือกลักษณะอันพึงประสงค์ไปใช้ในการปรับปรุง ดังนั้นการทดลองในอนาคตควรทำการศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ที่มีประโยชน์ และใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกเพิ่มเติมเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปในอนาคต อีกทั้ง EMS มีความเป็นพิษสูงอาจทำให้พืชตายได้ง่าย ต้องวางแผนการทดลองอย่างดี

บรรณานุกรม

Animesh, Bari, Roy, and Bhadra. (2011). *In vitro* Propagation of *Stemona tuberosa* Lour. – A rare medicinal plant through high frequency shoot multiplication using nodal explants. *Plant Tissue Culture and Biotech, 21*(2), 151-159.

Baird and Morwenna. (2009). Semisynthesis and biological activity of stemofoline alkaloids. *Journal of Nature Products*, 72(4), 679-684.

Bashir, Wani, and Nawchoo. (2013). Mutagenic sensitivity of gamma rays, EMS and sodium azide in *Trigonella foenum-graecum* L. *Science Research Reporter, 3*(1), 20-26.

Bidabadi, S. S., Meon, S. Wahab, Z., Subramaniam, S. and Mahmood, M. 2012. Induced mutations for enhancing variability of banana (*Musa* spp.) shoot tip cultures using ethyl mrthanesulphonate (EMS). *Australian Journal of Crop Science*: 391-401.

Bob Harwood, Kongkanda Chayamarit, Rachun Pooma, John AN Parnell and Susanne Renner. (2011). *Flora of Thailand* (Vol. 11/1).

Burikam, S., Jiwajinda, S., Wongmaneeroj, M., and Homhaul, R. (2005). Investigation on stemofoline and 16, 17-didehydro-16 (E)-stemofoline extracted from *in vitro* culture of S*temona collinsae* Craib *In Proceedings of 43rd Kasetsart University Annual Conference, Thailand, 1-4 February, 2005.Subject: Plants* 681-688.

Burkill, Isaac Henry. (1935). Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula. *Oxford University Press, London*, 2402.

Chauhan, Ruchi A., D. H. Patel, B. K. Rajkumar, Preeti R. Parmar, and Sejal R. Patel. (2018). Induction genetic variability using EMS and its molecular analysis using RAPD, ISSR and SSR markers in cotton. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 7*(3), 591-594.

Dhakshanamoorthy, D., R. Selvaraj, and A. Chidambaram.. (2010). Physical and chemical mutagenesis in *Jatropha curcas* to induce variability in seed germination, growth and yield traits. *Romanian Journal of Biology Plant Biology, 55*, 113-125.

Fang, J. Y. 2011. *In vitro* mutation induction of *Saintpaulia* using ethyl methanesulfonate.

HortScience 46(7):981-984

George, L., and P. S. Rao. (1980). *In vitro* regeneration of mustard plants (*Brassica juncea* var. RAI-5) on cotyledon explants from non-irradiated, irradiated and mutagen-treated seed. *Annals of Botany, 46*(1), 107-112.

Harwood Bob and kongkanda chayamarit. (2011). Flora of Thailand. Department of national park, wildlife and plant conservation Bangkok. *11*(1), 74-99.

Hofmann, N. E., Raja, R., Nelson, R. L. and Korban, S. S. 2004. Mutagenesis of embryogenic culture of soybean and detecting polymorphisms using RAPD marker. Biologia PLantarum 48; 173-177.

Inthachub, P. (2008). Taxonomic revision on the family Stemonaceae in Thailand. *Master Thesis*. Kasetsart University.

Javed Ansari, Mohd, Rahul Kumar, Kuldeep Singh, and Harcharan S. Dhaliwal. (2012). Characterization and molecular mapping of EMS-induced brittle culm mutants of diploid wheat (*Triticum monococcum* L.). *Euphytica*, *186*, 165-176.Baird and Morwenna. (2009). Semisynthesis and biological activity of stemofoline alkaloids. *Journal of natural products, 72*(4), 679-684.

Kaltenegger, E., Brem, B., Mereiter, K., Kalchhauser, H. and Greger, H. (2003). Insecticidal pyrido [1, 2-a] azepine alkaloids and related derivatives from *Stemona* species. *Phytochemistry, 63*(7), 803-816.

Kang, Kwon Kyoo, and Toshiaki Kameya. (1993). Selection and characterization of a 5-methyltryptophan resistant mutant in Zea mays *L. Euphytica 69*(1), 95-101.

Khoddamzadeh, Amir Ali, Uma Rani Sinniah, Midhzar Abdul Kadir, S. B. Kadzimin, M. Mahmood, and S. Sreeramanan. (2010). Detection of somaclonal variation by random amplified polymorphic DNA analysis during micropropagation of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) Christenson. *African Journal of Biotechnology,* 9(40), 6632–6639.

Kumar, K., Gill, Kaur, Choudhary, and Gosal. (2010). *In vitro* matagenesis and somaclonal variation assisted salt toleranc in Rough Lemon (*Citrus jambhiri* Lush.) *European Jounal of Horticaltural Science,* 75*(*6), 233-238.

Luan, Yu-Shi, Juan Zhang, Xiao-Rong Gao, and Li-Jia An. (2007). Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS), *in vitro* screening for salt tolerance and plant regeneration of saeet potato (*Ipomoea batatas* L.) *Plant cell, Tissue and Organ Culture, 88*, 77-81.

Malik, A. A., Li Cui, Shuxia Zhang, and Chen Jin-feng. (2011). Efficiency of SSR markers for determining the origin of melon plantlets derived through unfertilized ovary culture. *Horticultural Science, 38*(1), 27-34.

Menendez, T. (1973). A note on the effect of ethyl methane sulfonate on *Musa acuminata* seeds. *Proceedings of a panel induced mutations in vegetatively propagated plants*.

Montri N., CH. Wawrosch, and B. Kopp. 2006. Micropropagation of *Stemona curtisii* Hook F., a Thai medicinal plant. *Acta Horticulturae* 725: 341- 346.

Montri, N., Wawrosch, C. H., and Kopp, B. (2009). *In vitro* propagation of *Stemona tuberosa* Lour., an antitussive medicinal herb. *Acta Horticulturae, 812*, 165-172.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum, 15*(3), 473-497.

Nuamjaroen, P. (1998). Ethylmethanesulphonate induced variation and somaclonal variation of safflower (Carthamus tinctorius Linn.) tissue culture. *Master Thesis.* Chulalongkorn University, Bangkok. 112 pp.

Paliwal Ritu, Rakesh Singh, Amit Kumar Singh, Sundeep Kumar, Ashok Kumar and Rita SINGH Majumdar. (2013). Molecular characterization of giloe (*Tinospora cordifolia* Willd. Miers ex Hook. F. and Thoms.) accessions using start codon targeted (SCoT) markers. *Int J Med Arom Plants*. 3(4): 413-422.

Pilli, R. A., and de Oliveira. (2000). Recent progress in the chemistry of the *Stemona* alkaloids. *Natural Product Reports, 17*(1), 117-127.

Qin, Hong-Mei, Yong-Qing Wang and Chun-Xia Hou. (2011). Effect of ethyl methanesuifonate (EMS) *in vitro* mutation on anther - derived embryos in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *African Journal of Agricultural Research 6*, 2450-2455.

Rathore, J. S., Rathore, M. S., Singh, M., Singh, R. P. and Shekhawat, N. S. (2007).

Micropropagation of mature tree of *Citrus limon*. *Indian Jounal Biotechnol*. 6: 239-244.

Sastraruji T, Chaiyong S, Jatisatienr A, Pyne S. G., Ung A. T. (2011). Phytochemical studies on *Stemona aphylla*: isolation of a new stemofoline alkaloid and six new stemofurans. *Journal of natural products, 74*(1), 60-64.

Sadat, S. and Hoveize, M. S. (2012). Mutation induction using ethyl methaneesulfonatee (EMS) in regenerated plantlets of two varieties of sugarcane CP48-103 and CP57-614. *African Journal of Agricultural Research*, 7(8), 1282-1288.

Singh, K. P., Singh, and kalia, C. S. (2000). Induced flower colour mutations in carnation through *in vitro* application of chemical mutagen. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding, 60*(4), 535-539.

Singlaw, C., Kongbangkerd, and Saenpote, P. (2008). Effect of cytokinins on *In vitro* shoot proliferation of *Stemona tuberosa* Lour. NU. *International Journal of Science, 5*(2), 221-229.

Taji, A., Dodd, and Williams, R. R. (1997). *Plant tissue culture practice*. University of New England.

Thawaro, S., and Te-chato, S. (2010). Verification of legitimate tenera oil palm hybrids using SSR and propagation of hybrids by somatic embryogenesis. *Songklanakarin Journal of Science and Technology, 32*(1).

Wahyudi, D., Hapsari, L., and Sundari, S. (2020). RAPD analysis for genetic variability detection of mutant soybean (*Glycine max* (L.) Merr). *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology, 5*(1), 68-77.

Welsh, J., and McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research. 18: 7213-7218

กาญจนา รุ่งรัชกานนท, และ อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์. (2551). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหนอนตายหยาก (*Stemona collinsae* Craib). *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 10*(2), 1-13.

เกษม ตั้นสุวรรณ, และ สุทธิดา ตั้นสุวรรณ. (2546). รายงานการวิจัยเรื่องการเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากพืชบางชนิดต่อหนอนกระทู้ผัก. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

กรมส่งเสริมเกษตร. (2559). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 36.

เต็ม สมิตินันทน์. (2523). ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์ - ชื่อพื้นเมือง) (พิมพ์ครั้งที่ 2): ฟันนี่พับบลิชชิ่ง. กรุงเทพฯ.

เลาจนา ธีรภัทรสกุล. (2520). การศึกษาพิษของหนอนตายหยากที่มีกับหนอนแมลงวันบ้าน. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, *19*, 217-227.

โฉมศรี ชูช่วย. (2557). ความสามารถในการก่อกลายของฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 10 ไมครอนในเขตเมืองกรุงเทพมหานคร. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ และ ปิยะดา ทิพยผ่อง. (2550). หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

จันคนา บูรณะโอสถ, ปนัดดา พัฒนวศิน, ภัทราว ดีเหลืองธุวปราณีต, ปกรณ์ คามวุฒิ, และ อุทัย โสธนะพันธุ์. (2559). การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารหอมระเหยจากเครื่องยาในพิกัดเนาวโกฐด้วยวิธีโครมาโทกราฟี แบบแก๊ส-แมสสเปกโทรเมทรี. *Thai Bulletin of Pharmaceutical Sciences, 11*(2), 45-60.

จันทร์เพ็ญ ใจซื่อ. (2563). การประเมินเสถียรภาพทางพันธุกรรมของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิง *(Nepenthes mirabilis) ที่*ขยายพันธุ์ในหลอดทดลองโดยใช้เทคนิคโมเลกุลและสัณฐานวิทยา (Doctoral dissertation, มหาวิทยาลัย สงขลา นครินทร์).

จิราพร เหล่าบุราณ. (2564). การวิเคราะห์สารพฤกษเคมีเบื้องต้นจากสารสกัดหยาบพืชสกุลผักแขยง (*Limnophila* R.Br.). บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

จุฑามาศ เจียมเจือจันทร์ (2559). การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลก้านก่อด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

ชญานีย์ สังวาลย์. (2557). ผลของเอธิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) ที่ให้กับโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันต่อการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของต้นกล้าที่พัฒนา. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ชัชฎา แสนทิ, ชญาดา กลิ่นจันทร์ และ กฤษดา ปิติจะ. (2564). การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากดอกมหาหงส์ด้วยเทคนิค Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS). รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติสำหรับนักศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร, *1*, 846-851.

ชานนท์ ลาภจิตร, และ เมิง-เจียว เจิง. (2560). ประสิทธิภาพในการกลาย และผลของ Ethyl methanesulphonate (EMS) ต่อกล้วยไม้ *Erycina pusilla*. แก่นเกษตร, *45*(1).

ชุลีพร วณิชกุลชัยพ, ธวัชชัย ศุภดิษฐ์, แตงอ่อน มั่นใจตน, และ บุญจง ขาวสทธิวงษ์. (2551). การใช้น้ำสกัดชีวภาพหนอนตายหยากควบคุมลูกน้ำยุงลาย. *Journal of Environmental Management* วารสารการจัดการสิ่งแวดล้อม, *1*, 107-121.

ณปภา สิริศุภกฤตกุล. (2560). คู่มือการตรวจพิสูจน์ยาเสพติดในของกลางเบื้องต้น. สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จ.นนทบุรี.

ณัฏฐากร เสมสันทัด. (2552). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพันธุ์ไม้ป่า (*Tissue Culture in Forest Tree)*. กลุ่มงานวนวัฒนวิจัย สำนักวิจัยและพัฒนาการป่าไม้ กรมป่าไม้.

ทิติยา จิตติหรรษา, และ ณรงค์ สามงามนิ่ม. (2542). การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากพืชบางชนิดต่อการตายและต่อพฤติกรรมการกินอาหารของเพลี้ยจั๊กจั่นสีเขียว. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ธวัชชัย ศุภดิษฐ์, วิโรจน์กิติคุณ, รุ่งจรัส หุตะเจริญ, สัญชัย จตุรสิทธา, และ สุทธาพันธ์ โพธิ์กำเนิด. (2545). การใช้รากสมุนไพรหนอนตายหยากผสมในอาหารและมูลไก่เพื่อควบคุมหนอนแมลงวัน. วารสารแก่นเกษตร, *30*, 137-145.

ธัญญาพร สุสานนท์. (2547). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหน้าวัว (Anthurium spp.). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. 57 หน้า

ธีระชัย ธนานันต์, ทีปกา มีเสงี่ยม และ สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม. (2017). การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกระท้อนด้วยเครื่องหมายสก๊อต. *Thai Science and Technology Journal*, 1015-1024.

ธีราพร ทองดีนอก. (2559). ความแปรปรวนทางพนัธุกรรมของลักษณะผลและเครื่องหมายโมเลกุลในลูกผสมระหว่างแตงไทย (*Cucumis melo L. var. conomon)* กับแคนตาลูป *Cucumis melo L. var. recticularis Naudin)*. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยสุรนารี.

นันทวัน บุณยะประภัศร, และ อรนุช โชคชัยเจริญพร. (2543). สมุนไพรไม้พื้นบ้าน. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.

นิจศิริ เรืองรังสี. (2547). สมุนไพรไทย: สำนักพัฒนาคุณภาพสินค้าเกษตร.

นิติยา สุขวรรณา, และ สุภาพร ภัสสร. (2559). ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและชนิดของอาหารสูตรMS ต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นหนอนตายหยาก. *24*(1), 64-75.

นฤมล ประคองรักษ์ และมณฑิรา มณฑาทอง. (2552). ผลของ EMS ต่อการตอบสนองต่อ

ความเครียดเกลือของข้าวขาวดอกมะลิ 105. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 12 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 12-13 กุมภาพันธ์ 2552. หน้า 1545-1552.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, และ สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช. (2554). ชีววิทยา *3*. มูลนิธิ สอวน. กรุงเทพฯ.

ปวีณา นวมเจริญ. (2541). ความแปรปรวนที่ได้จากการชักนำด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนตและจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคำฝอย *Carthamus tinctorius* Linn. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย/ กรุงเทพฯ.

พยอม ตันติวัฒนน์. (2521). สมุนไพร. สมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย.

พรรณทิพย์ นาคศรีคำ. (2558). การหาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรีและสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของส่วนสกัดหยาบจากใบและเปลือกของต้นผักเหมียง. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

พีรนุช จอมพุก. (2553). การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการเหนี่ยวนำให้กลาย (*mutation breeding*. เอกสารประกอบการอบรมหลักการปรับปรุงพันธุ์พืช รุ่นที่ 2 สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน).

มณฑา วงศ์มณีโรจน์, รงรอง หอมหวล, ศิริวรรณ บุรีคำ, และ สุรัตน์วดี จิวะจินดา. (2551). การเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำรากหนอนตายหยาก (*Stemona colinsae* Craib) ในสภาพปลอดเชื้อและการนำต้นออกปลูก. วารสารข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง, *21*(2), 29.

มณฑา วงศ์มณีโรจน์, สุรัตน์วดี จิวะจินดา, ริวรรณ บุรีคำ, และ รงรอง หอมหวล. (2548). หนอนตายหยาก: พืชที่เรียกชื่อเหมือนกันแต่เป็นพืชต่างชนิดกัน. วารสารข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง, *19*(2), 20-23.

มนสุรีย์ ก่องตาวงศ์, และ ทิพย์มณี ภะระตะศิลปินส์. (2527). ผลของ EMS ต่อลักษณะบางอย่างของต้นยาสูบที่งอกจากละอองเรณู. เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ครั้งที่ *4* ของชมรมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย *21-24* พ.ย. *2527.* หาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ยุทธนา วรวุธ, และ ภูษิต แสงประดับ. (2558). การพัฒนาระบบตรวจสอบสารอาหารในอาหารไทยโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางประสิทธิภาพสูง. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์.

ยุพา มงคลสุข, พัชราวดี วัฒนวิกย์กิจ, พนิดา วงษ์แหวน, และ วราพร วีระพลากร. (2543). การ

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหนอนตายหยาก. กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ทบวงมหาวิทยาลัย.

ยุวดี มานะ, และ ศุจิรัตน์ สงวนศิริกุล. (2553). พันธุ์ สารออกฤทธิ์สำคัญ และผลของสารสำคัญในกวาวเครือขาว. รายงานการวิจัย. นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. (2540). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หลักการและเทคนิค. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 219 หน้า.

รัตติยา นวลหล้า, และ พิทยา สรวมศิริ. (2542). การคัดเลือกพืชสมุนไพรป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ผัก. วารสารเกษตร, *15*(2), 192-202.

รงรอง วิเศษสุวรรณ. (2542). เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขั้นพื้นฐาน. งานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลองสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมก. มหาวิยาลัยเกษตรศาสตร์. แพงแสน. นครปฐม. 117 หน้า

วัชรินทร์ ชินกวิน และ กัณยารัตน์ สุไพบูลย์วัฒน. (2548). การทดสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายที่ชักนำให้กลายพันธ์และเกิดการแปรปรวนสายพันธุ์ผานโปรโตพลาสต์. คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ. 10 หน้า.

วรรณา เอี่ยมอาจ. (2557). การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พรีกาบาลินในตัวอย่างพลาสมาโดยการทำอนุพันธ์กับ *4*-คลอโร-*7*-ไนโตรเบนโซฟูราแซนก่อนทำการแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. (2554). พันธุศาสตร์. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร.

วัลย์ลิกา สุขสำราญ, วนิดา สุมาลัย, นฤชา ตั้งสกุล, และ ธนวัฒน์ ชัยทาน. (2565). ลายพิมพ์โครมาโทกราฟีของสารพฤกษเคมีจากเปลือกและเนื้อผลกระท้อน. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย, *1*(1).

วาสนา ไชยคำ. (2545). ฤทธิ์ฆ่าแมลงของสารสกัดจากหนอนตายหยาก (*Stemona sp.)* และเถาวัลย์เปรียง (*Derris scandens benth.).* วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วาสนา สอนเพ็ง, สภาณี พิมพ์สมาน, และ ฉันทนา อารมณ์ดี. (2552). ฤทธิ์ฆ่าแมลงของสารสกัดหนอนตายหยาก (*Stemona Tuberosa* Lour). วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น, *14*(2).

วิลาวรรณ ทิมทอง. (2562). การชักนำมันสำปะหลังให้เกิดการกลายโดยรังสีแกมมาและเอธิลมีเทน

ซัลโฟเนต. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

วีรพล จันทร์สวรรค์, สถาพร จิตตปาลพงศ์, และ นงนุช จันทรราช. (2536). ประสิทธิภาพของสารสกัดจากหนอนตายหยากต่อเห็บโค. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย์), *27*, 336-340.

ศิริวรรณ บุรีคำ, มณฑาวงศมณีโรจน์, สุรัตน์วดี จิวะจินดา และรงรอง หอมหวน. (2547). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหนอนตายหยากและการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์. วารสารข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง ปีที่ 18 (2): 8-11.

ศศิลักษณ์ กลิ่นมณฑา, และ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. (2556). คู่มือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเบื้องต้น สำหรับมือใหม่ (พิมพ์ครั้งที่ 1): ปทุมธานี : สำนักงาน.

ศิริญญา ม่วงสอน, และ สมปอง เตชะโต. (2551). การใช้ EMS เพื่อชักนำการกลายในกล้วยไม้เหลืองจันทบูร. วารสารเกษตร, *24*(2), 153-164.

สกุลรัตน์ แสนปุตะวงษ์. (2553). การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอร่าจากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนและการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม. วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สิริภัทร์ พราหมณีย์. (2558). เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายและปรับปรุงพันธุ์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2545). จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 116 หน้า.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายโมเลกุลในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. *วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี* มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 5(37-58)

ส่งศรี พิพิธกุล. (2551). สมุนไพรไทย (หนอนตายหยาก).

สมจิตร พงษ์พงัน, และ สุภาพ ภู่ประเสริฐ. (2534). พืชกินได้และพืชมีพิษในป่าเมืองไทย. สำนักพิมพ์โคเดียนสโตร์: วังบูรพา กรุงเทพฯ.

สมพร ประเสริฐส่งสกุล. (2552). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับการปรับปรุงพันธุ์พืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ. สำนักพิมโฟร์เพซ (forepace publishing house) ภายใต้การบริหารจัดการและจำหน่ายโดยบริษัทก้าวใหม่ จำกัด.

สมพร ราชโยธา, พิสมัย ประสมสัตย์, และ ชดากร ไตรราส. (2545). ผลของสารสกัดพืชสมุนไพรบางชนิดในการควบคุมหนอนแมลงวันในสุกร. *รายงานผลการวิจัย อุบลราชธานี*.

สรัญญา วัชโรทัย. (2551). ความหลากหลายของพืชสกุลหนอนตายหยาก (*Stemona*) ในประเทศไทย

และปัญหาในการวิจัย. วารสารข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง, 22(1), 22-24.

สาโรช เจริญศักดิ์, กาญจนา ชินสำราญ, และ ดวงสุรีย์ แสนสีระ. (2560). ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากหนอนตายหยาก (*Stemona tuberosa Lour.)*. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ กรุงเทพฯ.

สาวิตรี ศิลาเกษ, ดาราวรรณ ยุทธยงค์, อรทัย ช่วงโชติ, ทวี วิพุทธานุมาศ, และ จูอะดี พงศ์มณีรัตน์. (2559). การใช้ Solid Phase Extraction ในการเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ยากลุ่ม Nitrofurans ในอาหารกุ้งด้วยเครื่อง HPLC. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด เขต 6 (ขอนแก่น).

สิรนุช ลามศรีจันทร. (2540). การกลายของพืช. (คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์).

สุชาดา บุญนิยม, วรนันธ์ เหล็กเพชร, สุนทรา เฟื่องฟุ้ง, ชวัลวิทย์ คุ้มทรัพย์, และ พรยุทธ สายัณต์. (2561). การวิเคราะห์การปลอมปนไซบูทรามีนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ขายตามท้องตลาด ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ.

สุดารัตน์ หอมหวล. (2553). หนอนตายหยาก. สืบค้นจาก http://www.phargarden.com/main.php. 25 สิงหาคม 2565.

อนรรฆอร วรรณจินดาพร. (2558). การชักนำให้เกิดการกลายในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียดสกุลโดยโซเดียมเอไซด์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยสุรนารี.

อนันต์ เลิศสุทธิชวาล. (2563). การกลายของเบญจมาศด้วยสาร *EMS* และ *Colchicine*. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร.

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. (2541). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. อติสรรค์, กรุงเทพฯ. 133 หน้า

อรพิน เสละคร. (2557). ผลของ BA และ IBA ต่อการเพิ่มปริมาณหน่อและการออกรากของผักหวานป่าในสภาพปลอดเชื้อ. *ราชภัฏเพชรบูรณ์สาร*, 16(1): 87-94.

อรุณี ม่วงแก้วงาม. (2561). การปรับปรุงพันธุ์ดาหลา (*Etlingera elatior L.)* โดยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อรุณี วงศ์ปิยะสถิต. (2554). การกลายเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อารักษ์ ธีรอำพน. (2557). ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Doritaenopsis* ที่

ถูกชักนำให้เกิดการกลายในสภาพปลอดเชื้อ. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวก 1 ชนิดและปริมาณสารละลายของอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

สาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962 (มก./ล.))
1. ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
2. ธาตุอาหารรอง	
CuSo4· 5H2O	0.025
KI	0.83
ZnSO4·7H2O	8.60
MnSO4·4H2O	22.30
H3BO4	6.20
NaMoO4· 2H2O	0.25
CoCl2· 6H2O	0.025
3. สารอินทรีย์	
Glycine	2.0
Thiamine-HCl	0.1
Pyridoxine-HCl	0.5
Nicotinic acid	0.5
Myo-inosotal	100
4. สารละลายเหล็ก	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.8
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	37.3

ตารางภาคผนวก 2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีต่อการเกิดจำนวนยอด และความยาวยอด ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

ระดับความเข้มข้น BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ยอด	การชักนำยอด	
		จำนวนยอด / ต้น (ยอด)	ความยาวยอด (ซม.)
0	1	2	1.20
	2	4	1.15
	3	4	1.63
	4	3	1.64
	5	2	2.20
	6	4	1.56
	7	4	0.15
	8	0	0.00
	9	5	1.48
	10	0	0.00
	11	3	1.5
	12	3	1.45
	13	5	0.8
	14	2	0.9
	15	2	2.15
	16	4	1
	17	4	1.1
	18	1	0.5
	19	4	1.7
	20	0	0
	21	2	1.04
	22	2	1.1
	23	0	0
	24	3	0.7

ระดับความเข้มข้น BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ยอด	การชักนำยอด	
		จำนวนยอด / ต้น (ยอด)	ความยาวยอด (ซม.)
	25	5	0.6
	26	6	2.15
	27	4	1.2
	28	3	0.9
	29	1	1.32
	30	2	1.4
ค่าเฉลี่ย		2.80±1.75	1.10±0.78
	1	3	1.10
	2	5	0.54
	3	7	1.50
	4	2	1.55
	5	6	1.50
	6	5	1.46
	7	4	2.88
	8	5	1.36
	9	10	1.27
1	10	0	0
	11	4	0.55
	12	3	1.45
	13	6	1.5
	14	5	1.7
	15	8	2.3
	16	6	0.9
	17	5	0.6
	18	0	0
	19	6	1

ระดับความเข้มข้น BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ยอด	การชักนำยอด	
		จำนวนยอด / ต้น (ยอด)	ความยาวยอด (ซม.)
	20	5	1.75
	21	7	1.44
	22	3	2.65
	23	5	1.6
	24	5	2.2
	25	7	1.9
	26	11	1.45
	27	8	1.35
	28	6	2.82
	29	5	1.1
	30	7	1.54
ค่าเฉลี่ย		5.22±2.33	1.46±0.62
3	1	0	0
	2	1	1.40
	3	2	0. 85
	4	5	1.08
	5	8	1.18
	6	9	1.17
	7	9	1.16
	8	14	1.42
	9	0	0
	10	0	0
	11	8	1.5
	12	6	2.1
	13	2	0.95
	14	13	1.25

ระดับความเข้มข้น BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ยอด	การชักนำยอด	
		จำนวนยอด / ต้น (ยอด)	ความยาวยอด (ซม.)
	15	6	1.31
	16	7	1.46
	17	8	0.7
	18	0	0
	19	6	0.85
	20	8	0.96
	21	9	1
	22	7	1.34
	23	11	0.85
	24	5	1.55
	25	8	2.1
	26	7	1.32
	27	5	1.6
	28	8	0.7
	29	0	0
	30	4	0.8
ค่าเฉลี่ย		6.00±3.84	1.03±0.45
	1	0	0.00
	2	0	0.00
	3	4	1.05
	4	1	2.10
5	5	4	1.35
	6	13	1.18
	7	15	1.27
	8	20	1.02
	9	0	0

ระดับความเข้มข้น BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ยอด	การชักนำยอด	
		จำนวนยอด / ต้น (ยอด)	ความยาวยอด (ซม.)
	10	0	0
	11	4	0.55
	12	12	0.8
	13	4	1.1
	14	9	1.15
	15	10	2
	16	15	1.16
	17	1	1.2
	18	3	1.65
	19	15	1.11
	20	10	1.6
	21	6	2.3
	22	8	1.6
	23	3	1.4
	24	0	0
	25	0	0
	26	6	0.6
	27	7	0.8
	28	9	1.26
	29	12	1.35
	30	13	0.7
ค่าเฉลี่ย		7.13±2.75	1.00±0.70
7	1	0	0.00
	2	2	1.70
	3	0	0.00
	4	3	0.77

ระดับความเข้มข้น BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ยอด	การชักนำยอด	
		จำนวนยอด / ต้น (ยอด)	ความยาวยอด (ซม.)
	5	1	1.50
	6	2	1.10
	7	2	1.00
	8	8	0.81
	9	19	1.21
	10	0	0
	11	0	0
	12	2	0
	13	0	1.36
	14	3	1.15
	15	1	1.1
	16	2	0.5
	17	2	0.96
	18	8	1.4
	19	19	2
	20	0	0
	21	0	1.1
	22	0	0.77
	23	6	1.38
	24	11	1.04
	25	13	2.23
	26	6	2.6
	27	7	0.92
	28	5	1.12
	29	2	0.3
	30	0	0

ระดับความเข้มข้น BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ยอด	การชักนำยอด	
		จำนวนยอด / ต้น (ยอด)	ความยาวยอด (ซม.)
ค่าเฉลี่ย		4.11±3.07	0.90±0.59

ตารางภาคผนวก 3 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีต่อการเกิดจำนวนราก และความยาวราก ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

ระดับความเข้มข้น IBA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ยอด	การชักนำราก			
		จำนวนยอด / ต้น (ยอด)	ความยาวยอด (เซนติเมตร)	จำนวนราก / ต้น (ราก)	ความยาวราก (เซนติเมตร)
0	1	0	0.00	0	0
	2	2	1.10	1	0.4
	3	2	3.00	0	0
	4	3	1.00	1	0.2
	5	2	1.00	0	0
	6	1	0.50	0	0
	7	1	2.50	0	0
	8	6	2.40	0	0
	9	2	2.00	0	0
	10	3	1.90	0	0
	11	1	1	1	0.3
	12	3	1.6	0	0
	13	4	0.4	0	0
	14	2	1.3	0	0
	15	1	1.65	0	0
	16	4	2.4	0	0
	17	1	1.7	0	0

ระดับความเข้มข้น IBA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ยอด	การชักนำราก			
		จำนวนยอด / ต้น (ยอด)	ความยาวยอด (เซนติเมตร)	จำนวนราก / ต้น (ราก)	ความยาวราก (เซนติเมตร)
	18	3	1.8	1	0.4
	19	2	0.9	0	0
	20	1	2.9	0	0
	21	0	0	0	0
	22	5	1.75	0	0
	23	2	3.2	0	0
	24	3	2.7	0	0
	25	1	2.4	0	0
	26	1	1.7	1	0.3
	27	0	0	0	0
	28	0	0	1	0.5
	29	3	2.8	0	0
	30	4	1.5	0	0
ค่าเฉลี่ย		2.10±1.66	1.54±0.96	0.20±0.22	0.06±0.13
0.5	1	3	6.3	0	0
	2	4	3.2	0	0
	3	5	1.9	0	0
	4	5	5.6	0	0
	5	10	3	1	2.6
	6	2	4.5	0	0
	7	8	2.5	0	0
	8	15	3.6	1	3.7
	9	9	2.1	1	0.3
	10	0	0	0	0

ระดับความเข้มข้น IBA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ยอด	การชักนำราก			
		จำนวนยอด / ต้น (ยอด)	ความยาวยอด (เซนติเมตร)	จำนวนราก / ต้น (ราก)	ความยาวราก (เซนติเมตร)
	11	8	5.1	0	0
	12	9	4.3	1	0.6
	13	6	4.5	0	0
	14	13	5.8	0	0
	15	7	5.3	0	0
	16	9	0.8	1	1.8
	17	8	3.8	0	0
	18	14	3.1	0	0
	19	0	0	1	2.2
	20	0	0	0	0
	21	8	3.8	0	0
	22	13	4.8	0	0
	23	7	5.2	1	3.1
	24	6	4.6	1	1.2
	25	11	5.1	0	0
	26	8	5.7	0	0
	27	0	0	0	0
	28	9	4.9	1	3.4
	29	5	5.75	0	0
	30	8	7.3	1	4
ค่าเฉลี่ย		6.78±4.12	3.63±1.54	0.33±0.20	0.74±0.43
	1	1	3	0	0
	2	2	2.9	0	0
	3	5	1.6	0	0
	4	6	5.3	0	0
1	5	0	0	0	0

ระดับความเข้มข้น IBA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ยอด	การชักนำราก			
		จำนวนยอด / ต้น (ยอด)	ความยาวยอด (เซนติเมตร)	จำนวนราก / ต้น (ราก)	ความยาวราก (เซนติเมตร)
	6	7	3.9	0	0
	7	8	4.6	3	3.6
	8	9	5.1	0	0
	9	10	5.6	3	6.8
	10	7	3.3	3	4
	11	4	2.3	2	5.5
	12	6	1.9	0	0
	13	3	6.5	0	0
	14	11	1.8	0	0
	15	5	4.3	0	0
	16	8	3.4	0	0
	17	2	5.1	0	0
	18	3	5.5	0	0
	19	7	4.8	0	0
	20	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
	22	6	2.7	3	4.8
	23	12	5.7	4	5.3
	24	9	3.4	2	6.1
	25	8	4.9	0	0
	26	4	3.65	0	0
	27	5	3.6	0	0
	28	8	3.9	0	0
	29	9	4.7	0	0
	30	1	0.65	3	1.8
ค่าเฉลี่ย		5.50±3.44	3.53±1.76	0.90±0.44	1.44±0.46

ระดับความเข้มข้น IBA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ยอด	การชักนำราก			
		จำนวนยอด / ต้น (ยอด)	ความยาวยอด (เซนติเมตร)	จำนวนราก / ต้น (ราก)	ความยาวราก (เซนติเมตร)
1.5	1	0	0.00	0	0
	2	2	4.20	0	0
	3	2	2.10	0	0
	4	8	3.40	0	0
	5	6	4.70	1	2.3
	6	2	8.00	0	0
	7	10	3.40	0	0
	8	9	6.80	0	0
	9	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
	11	4	0	1	3.2
	12	6	8.2	0	0
	13	9	2.1	0	0
	14	7	3.8	0	0
	15	6	8.7	0	0
	16	13	10.2	0	0
	17	4	9.4	0	0
	18	6	7.8	0	0
	19	0	0	0	0
	20	0	0	0	0
	21	5	12.5	0	0
	22	3	8.7	1	2
	23	9	3.6	1	1.5
	24	7	5.8	0	0
	25	9	16.3	0	0
	26	10	7.2	0	0

ระดับความเข้มข้น IBA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ยอด	การชักนำราก			
		จำนวนยอด / ต้น (ยอด)	ความยาวยอด (เซนติเมตร)	จำนวนราก / ต้น (ราก)	ความยาวราก (เซนติเมตร)
	27	1	8.6	0	0
	28	6	9.5	0	0
	29	0	0	0	0
	30	7	0	0	0
ค่าเฉลี่ย		4.88±3.83	4.08±2.53	0.13±0.08	0.29±0.81
2	1	1	3.4	0	0
	2	2	5.3	0	0
	3	2	4.9	0	0
	4	3	2.7	0	0
	5	4	5.9	1	1.8
	6	6	4.4	0	0
	7	11	3.3	1	0.1
	8	10	2.9	0	0
	9	12	3.8	1	2.2
	10	0	0	0	0
	11	3	5.5	0	0
	12	4	6.2	0	0
	13	6	2.8	0	0
	14	8	0.8	0	0
	15	9	5.7	0	0
	16	6	2.9	1	0.5
	17	7	3.4	0	0
	18	16	4.4	1	1.1
	19	1	3.9	0	0
	20	5	4	1	1.3
	21	3	5.3	0	0

ระดับความเข้มข้น IBA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ยอด	การชักนำราก			
		จำนวนยอด / ต้น (ยอด)	ความยาวยอด (เซนติเมตร)	จำนวนราก / ต้น (ราก)	ความยาวราก (เซนติเมตร)
	22	0	0	1	1.6
	23	0	0	1	2.1
	24	8	6.1	1	3.1
	25	5	5.7	0	0
	26	10	2.5	0	0
	27	6	6.9	0	0
	28	4	7.2	0	0
	29	8	5.8	0	0
	30	7	4.1	1	0.4
ค่าเฉลี่ย		5.67±4.27	4.07±1.12	0.33±0.21	0.46±0.48

ตารางภาคผนวก 4 การ score band โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-11

ขนาด band (bp)	M0	C1A	C1B	C2	C3	C4	C5A	C5B	C6
400	0	0	0	1	1	1	0	0	0
500	0	0	0	1	1	1	0	0	0
600	0	0	1	1	1	1	1	0	0
800	1	0	1	1	1	1	1	0	0
10.0 kb	0	1	0	1	1	1	1	1	0

ตารางภาคผนวก 5 การ score band โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-13

ขนาด band (bp)	M0	C1A	C1B	C2	C3	C4	C5A	C5B	C6
500	0	1	0	1	1	1	1	1	1
600	1	1	0	1	1	1	1	1	1
800	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	1	1	0	1	1	1	1	1	1
1.0 kb	1	0	0	0	0	0	0	0	1
1.5 kb	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	1	1	0	1	1	1	1	1	1
2.0 kb	0	0	0	0	0	0	0	0	1
10.0 kb	0	0	0	0	0	1	1	0	0

ตารางภาคผนวก 6 การ score band โดยใช้ไพรเมอร์ S6

ขนาด band (bp)	M0	C1A	C1B	C2	C3	C4	C5A	C5B	C6
800	0	1	0	0	1	0	1	1	0
1.0 kb	1	1	1	0	1	1	1	1	0
1.5 kb	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2.0 kb	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	1	1	0	0	1	0	0	1	1
3.0 kb	1	0	0	0	0	0	0	0	1
10.0 kb	0	1	0	1	0	1	1	0	0

ตารางภาคผนวก 7 การ score band โดยใช้ไพรเมอร์ S17

ขนาด band (bp)	M0	C1A	C1B	C2	C3	C4	C5A	C5B	C6
1.5 kb	1	1	0	0	1	1	0	0	0
2.0 kb	1	0	0	0	1	0	0	0	0
3.0 kb	0	0	0	0	1	1	0	0	0
10.0 kb	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางภาคผนวก 8 การ score band โดยใช้ไพรเมอร์ S26

ขนาด band (bp)	M0	C1A	C1B	C2	C3	C4	C5A	C5B	C6
500	0	1	0	0	0	0	0	0	0
600	0	1	0	0	0	0	0	0	0
800	0	1	0	1	0	0	0	0	0
1.0 kb	0	1	0	1	0	0	0	0	0
1.5 kb	1	1	1	1	1	1	1	0	1
2.0 kb	1	1	0	1	0	0	0	0	1
10.0 kb	0	1	0	1	1	1	1	1	0

ตารางภาคผนวก 9 การ score band โดยใช้ไพรเมอร์ S32

ขนาด band (bp)	M0	C1A	C1B	C2	C3	C4	C5A	C5B	C6
500	0	1	0	0	0	0	0	0	0
600	0	1	0	0	0	0	0	0	0
800	0	1	0	1	0	0	0	0	0
1.0 kb	0	1	0	1	0	0	0	0	0
1.5 kb	1	1	1	1	1	1	1	0	1
2.0 kb	1	1	0	1	0	0	0	0	1
10.0 kb	0	1	0	1	1	1	1	1	0

ตารางภาคผนวก 10 การ score band โดยใช้ไพรเมอร์ S32

ขนาด band (bp)	M0	C1A	C1B	C2	C3	C4	C5A	C5B	C6
500	0	1	1	1	1	0	1	0	0
600	0	1	1	1	1	1	1	1	0
800	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1.0 kb	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1.5 kb	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2.0 kb	1	0	0	1	1	0	0	0	1
10.0 kb	0	1	0	1	1	1	1	1	0

ตารางภาคผนวก 11 การ score band โดยใช้ไพรเมอร์ S34

ขนาด band (bp)	M0	C1A	C1B	C2	C3	C4	C5A	C5B	C6
600	0	0	0	0	1	1	0	0	0
800	1	0	0	0	0	1	1	0	1
1.0 kb	1	0	0	1	1	1	1	1	1
10.0 kb	1	1	1	1	1	1	1	0	1

ตารางภาคผนวก 12 การ score band โดยใช้ไพรเมอร์ S35

ขนาด band (bp)	M0	C1A	C1B	C2	C3	C4	C5A	C5B	C6
400	1	0	0	0	0	0	0	0	0
500	1	0	0	0	0	0	0	0	0
600	1	1	1	1	1	1	1	0	1
800	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1.0 kb	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1.5 kb	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	1	0	0	0	0	0	0	0	
2.0 kb	1	0	0	0	0	0	0	0	0

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวเสาวลักษณ์ เพชรคง
วัน เดือน ปี เกิด	13 ธันวาคม 2539
สถานที่เกิด	พัทลุง
วุฒิการศึกษา	ระดับปริญญาตรี ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ที่อยู่ปัจจุบัน	87/1 หมู่ 10 ตำบลชุมพล อำเภอศรีนครินทร์ จังหวัดพัทลุง 93000