



การศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อความสามารถในการสร้างสารแอลโดปป้าในต้นอ่อน  
ของหมามุ่มอินเดีย

EFFECTS OF GAMMA RADIATION ON THE CAPABILITY OF L-DOPA PRODUCTION  
FROM *MUCUNA PRURIENS* PLANTLETS.

เดชมนตรี วชิสุนทร

บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2561

การศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อความสามารถในการสร้างสารแอลโดปีในต้นอ่อน  
ของหมามุ่ยอินเดีย



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเกษตรขั้นสูง  
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปีการศึกษา 2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

EFFECTS OF GAMMA RADIATION ON THE CAPABILITY OF L-DOPA  
PRODUCTION FROM *MUCUNA PRURIENS* PLANTLETS.



A Thesis Submitted in partial Fulfillment of Requirements  
for MASTER OF SCIENCE (Pharmaceutical Product Development)

Faculty of Pharmacy Srinakharinwirot University

2018

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญาานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อความสามารถในการสร้างสารแอลโดป่าในต้นอ่อน

ของหมามุ่ยอินเดีย

ของ

เดชมนตรี วิจิสุนทร

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเกษตรศาสตร์

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์

ที่ปรึกษาหลัก

ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวรรณ สิทธิถาวร)

(ดร.สุวิมล เจตะวัฒนะ)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี)

ชื่อเรื่อง	การศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อความสามารถในการสร้างสารแอลโดป้าในต้นอ่อนของหมามุ่มยีนเดี่ยว
ผู้วิจัย	เดชมนตรี วชิสุนทร
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. วรพรรณ สิทธิถาวร

สารสำคัญหลักในเมล็ดของต้นหมามุ่มยีนเดี่ยวคือ สาร L-3,4-dihydroxyphenylalanine (แอลโดป้า) ซึ่งใช้เป็นยาหลักสำหรับรักษาโรคพาร์กินสัน แต่การผลิตแอลโดป้าจากเมล็ดนั้นมีอุปสรรค เช่น ฝักของเมล็ดจะมีเข็มพิษอยู่ และการปลูกต้องอาศัยสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างสารแอลโดป้าในตัวอย่างต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเมล็ดที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา เพื่อใช้เป็นวิธีทางเลือกสำหรับการผลิตสารแอลโดป้า โดยผู้วิจัยสามารถพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์แอลโดป้าในต้นอ่อนได้ โดยสกัดตัวอย่างผงแห้งของต้นอ่อนด้วย อะซิโตไนไตรล์: น้ำ: กรดฟอร์มิก (50 : 50 : 1) แล้วทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วย SPE ชนิด Silica จากนั้นตรวจวิเคราะห์โดยระบบ UPLC ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี พบว่าวิธีมีความไว ความจำเพาะ ความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ดี สามารถนำไปใช้ตรวจตัวอย่างได้อย่างถูกต้องน่าเชื่อถือ การศึกษาผลของการฉายรังสีพบว่า เมล็ดพืชที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณ 200 เกรย์ และ 300 เกรย์ สามารถสร้างสารแอลโดป้าในต้นอ่อนได้มากกว่ากลุ่มควบคุม ถึง 300% และ 220% ตามลำดับ ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยใช้ real-time PCR พบว่าการเพิ่มขึ้นของสารแอลโดป้านี้ ไม่สามารถสรุปได้ว่าเกิดจากการยับยั้งการทำงานของยีน dopadecarboxylase เนื่องจากตัวอย่างจากทุกกลุ่มที่ได้รับรังสีนั้น มีทั้งตัวอย่างที่แสดงผลยับยั้งและตัวอย่างที่กระตุ้นการแสดงออกของยีนนี้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นจำเป็นต้องศึกษายีนอื่นที่อาจเกี่ยวข้องกับการสร้างสารแอลโดป้าเพิ่มเติม เพื่อทราบถึงกลไกการเพิ่มความสามารถในการสร้างสารแอลโดป้าของรังสีแกมมาในต้นอ่อน

คำสำคัญ : รังสีแกมมา, การสร้างสารแอลโดป้า, ต้นอ่อนหมามุ่มยีนเดี่ยว

Title	EFFECTS OF GAMMA RADIATION ON THE CAPABILITY OF L-DOPA PRODUCTION FROM <i>MUCUNA PRURIENS</i> PLANTLETS.
Author	DETMONTREE WACHISUNTHON
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2018
Thesis Advisor	Associate Professor Worapan Sitthithaworn , Ph.D.

The main active compound in the seeds of *Mucuna pruriens* var. *utilis* is L-3,4-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA) which is the first-choice drug for treatment of Parkinson's disease. The production of L-dopa from the seeds has some obstacles. For instance, the pods have a stringent trichome, and planting requires a suitable environment. Therefore, this research aimed to study the ability to produce L- DOPA in plantlets of *M. pruriens* cultivated *in vitro* from gamma irradiated seeds to be used as an alternative method for producing L-DOPA. A method for the determination of L-DOPA in plantlets was developed. The dried sample was extracted with a mixture of acetonitrile: water: formic acid(50:50:1) and it was cleaned-up with a silica SPE cartridge. L-DOPA in the extract was measured by the UPLC system. The method was validated and revealed good sensitivity, specificity, precision and accuracy. Thus, this method provided accurate and reliable results in determination of L-DOPA content in the plantlets. The plantlets growing from seeds received 200Gy and 300Gy produced L-DOPA 300% and 220% higher than the non-irradiated group, respectively. The gene expression study using real-time PCR revealed that the dopadecarboxylase gene which is responsible for L-DOPA degradation might not be involved in L-DOPA accumulation in the plantlets. Therefore, it is necessary to study other genes related to L-DOPA in order to understand mechanism of gamma irradiation and increasing the amount of L-DOPA in the plantlets.

Keyword : Gamma radiation, L-Dopa production, *Mucuna pruriens* plantlets

## กิตติกรรมประกาศ

ปริญญาานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้เพราะได้รับความช่วยเหลือจากอาจารย์ที่ปรึกษาปริญญา  
นิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.วรวรรณ สิทธิถาวร ที่ช่วยกำหนดแนวทางการวิจัย และให้คำปรึกษา  
ตลอดระยะเวลาการทำวิจัย ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงสำหรับความกรุณานี้ รวมทั้งขอกราบ  
ขอบพระคุณคณะกรรมการสอบปากเปล่าทุกท่าน ที่ช่วยพิจารณาและให้คำแนะนำปรับปรุงปริญญา  
นิพนธ์นี้ให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.สุวิมล เจตะวัฒนะ สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การ  
มหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการฉายรังสีแกมมาต่อตัวอย่างเมล็ดพืช อันเป็นตัวแปรสำคัญที่  
ก่อให้เกิดคุณค่าของงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้  
ความเชื่อเพื่อสถานที่ และเครื่องมือสำหรับการทำวิจัย ขอขอบคุณ คุณสรเพชร มาสุดี และคุณกร  
วิชญ์ สมคิด สถาบันวิจัยสมุนไพร สำหรับคำแนะนำในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และการตรวจการ  
แสดงออกของยีน และขอขอบคุณ ดร.สุภัชฉา พูนศรีธธา ที่คอยสนับสนุนให้ความช่วยเหลือและให้  
กำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้โอกาส ให้การสนับสนุน และเป็นแรงบันดาลใจอันนำไปสู่ความสำเร็จในงานวิจัยนี้

เดชมนตรี วชิสุนทร

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ .....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์งานวิจัย .....	2
สมมติฐานการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย .....	2
ตัวแปรที่เกี่ยวข้อง.....	3
กรอบแนวคิดในการวิจัย .....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
สถานที่ทำการวิจัย .....	3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	4
1. สมุนไพรหมาม่วยอินเดีย .....	4
1.1 ข้อมูลทั่วไป.....	4
1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ .....	4
1.3 องค์ประกอบทางเคมี.....	4
1.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา.....	4



2. L-DOPA .....	5
2.1 ข้อมูลทั่วไป.....	5
2.2 พืชที่มีสาร L-DOPA .....	6
2.3 การผลิต L-DOPA ในปัจจุบัน .....	8
3. การกลายพันธุ์.....	9
3.1 การกลายตามธรรมชาติ.....	10
3.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลาย.....	11
4. รังสีแกมมา.....	12
4.1 วิธีการฉายรังสี .....	13
4.2 อุปกรณ์ฉายรังสีแกมมา.....	13
4.3 หน่วยวัดรังสี .....	14
4.4 ส่วนของพืชที่นำมาฉายรังสี.....	15
4.5 ปริมาณและอัตรารังสีที่ใช้ในการฉายรังสี .....	16
5. ผลต่าง ๆ ของรังสีแกมมาที่เกิดต่อพืช .....	17
5.1 ผลของรังสีแกมมาต่อการงอกของเมล็ด .....	17
5.2 ผลของรังสีแกมมาต่อการเจริญและการพัฒนาของพืช .....	20
5.3 ผลของรังสีแกมมาต่อ oxidative stress และ ระบบป้องกัน (antioxidant).....	22
5.4 ผลของรังสีแกมมาต่อ bioactive agent .....	25
6. HPLC (High performance liquid chromatography) .....	27
6.1 หลักการทำงานของเครื่อง HPLC .....	27
6.2 องค์ประกอบของ HPLC .....	27
7. กระบวนการสังเคราะห์ L-DOPA ในพืช.....	29
8. ทฤษฎีและหลักการของเทคนิคการทำพีซีอาร์.....	34

9. การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนโดยวัดระดับ mRNA.....	36
9.1 การสกัด RNA จากตัวอย่างพืช.....	36
9.2 การสร้างคอมพลีเมนต์อาร์ดีเอ็นเอ (complementary DNA, cDNA) ด้วยรีเวิร์สทรานสคริปชัน (Reverse transcription, RT).....	37
9.3 การวิเคราะห์ปริมาณ mRNA โดย Polymerase Chain Reaction (PCR).....	37
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	39
1. วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี .....	39
1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ .....	39
1.2 วัสดุดิบและสารเคมี.....	40
2. วิธีการวิจัย.....	40
2.1 การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สาร L-DOPA ในตัวอย่างใบหมาม่วยอินเดีย.....	40
2.2 การฉายรังสีแกมมาต่อเมล็ดหมาม่วย .....	41
2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ plantlet จากเมล็ดหมาม่วยอินเดีย .....	41
2.4 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร L-DOPA ในตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช .....	42
2.5 การตรวจวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีนเป้าหมาย.....	42
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย.....	48
1. ผลของรังสีแกมมาต่อการงอกของเมล็ดหมาม่วยอินเดียบนอาหารสูตร MS.....	48
2. ผลของรังสีแกมมาต่อการเจริญของต้นอ่อนหมาม่วยอินเดียบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1.125 มิลลิกรัม/ลิตร.....	51
3. ผลของรังสีแกมมาต่อปริมาณสาร L-DOPA ในต้นอ่อนหมาม่วยอินเดีย.....	52
4. ผลการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สาร L-DOPA ในตัวอย่างต้นอ่อนหมาม่วยอินเดีย .....	55
4.1 วิธีการตรวจวิเคราะห์สาร L-DOPA ในตัวอย่างต้นอ่อนหมาม่วยอินเดียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ .....	55

4.1.1 การเตรียมตัวอย่างวัตถุดิบให้อยู่ในรูปผงแห้ง .....	56
4.1.2 วิธีการสกัดตัวอย่างผงแห้ง .....	56
4.1.3 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดก่อนการตรวจวิเคราะห์ .....	56
4.1.4 สภาพของระบบ HPLC .....	57
4.2 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ .....	57
4.2.1 ความจำเพาะเจาะจงของวิธี (specificity) .....	58
4.2.2 ความเป็นเส้นตรงของวิธี (linearity) .....	58
4.2.3 ความเที่ยงของวิธี (precision) .....	59
4.2.4 ความแม่นยำของวิธี (accuracy) .....	60
4.2.5 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) .....	60
4.2.6 ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) .....	61
5. ผลการตรวจวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีนเป้าหมาย .....	61
5.1 ผลการคัดเลือกยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร L-DOPA .....	61
5.2 ผลการสกัด RNA ทั้งหมด (total RNA) จากตัวอย่างต้นอ่อนหามามูยอินเดีย .....	61
5.3 ผลการสังเคราะห์ cDNA จาก template RNA .....	62
5.4 ผลการหาค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยา PCR (Amplification efficiency, E) ของไพรเมอร์ .....	63
5.4.1 ค่า amplification efficiency ของไพรเมอร์ ยีน DDC .....	63
5.4.2 ค่า amplification efficiency ของไพรเมอร์ ยีน 18S .....	65
5.5 ผลการตรวจปริมาณยีน DDC และ ยีน 18S ในตัวอย่าง cDNA .....	66
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ .....	68
สรุปผลการวิจัย .....	68
อภิปรายผลการวิจัย .....	70

ข้อเสนอแนะ ..... 71

บรรณานุกรม ..... 74

ประวัติผู้เขียน..... 78



## สารบัญตาราง

### หน้า

ตาราง 1 แสดงรายงานชนิดของพืชและปริมาณสาร L-DOPA.....	6
ตาราง 2 แสดงผลของรังสีแกมมาต่อการงอกของเมล็ดพืชชนิดต่าง ๆ .....	19
ตาราง 3 แสดงลักษณะภายนอกของต้นที่ออกจากเมล็ดบนอาหารสูตร MSที่ระยะเวลา 14 วัน ..	49
ตาราง 4 แสดงการแตกยอดและลักษณะความผิดปกติของต้นอ่อนที่ระยะเวลา 14 วัน .....	51
ตาราง 5 แสดงน้ำหนักของต้นหมามุ่ยอินเดียวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ .....	52
ตาราง 6 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร L-DOPA ในตัวอย่าง .....	53
ตาราง 7 แสดงผลการทดสอบความเที่ยงของวิธีการตรวจวิเคราะห์.....	60
ตาราง 8 แสดงผลการทดสอบค่า %recovery ของวิธี .....	60
ตาราง 9 แสดงไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ส่วนหนึ่งของยีน DDC และยีน 18S .....	61
ตาราง 10 แสดงผลการตรวจวัดคุณภาพของ total RNA .....	62
ตาราง 11 แสดงผลการตรวจวัดคุณภาพของ cDNA.....	63
ตาราง 12 แสดงผลปฏิกิริยา Real time PCR ของไพรเมอร์ของยีน DDC .....	64
ตาราง 13 แสดงผลปฏิกิริยา Real time PCR ของไพรเมอร์ของยีน 18S.....	65
ตาราง 14 แสดงผลการตรวจปริมาณยีน DDC และยีน 18s ในตัวอย่าง .....	67

## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 ภาพโครงสร้างทางเคมีของ L-DOPA .....	5
ภาพประกอบ 2 ภาพแสดงกลไกการเกิด water radiolysis .....	24
ภาพประกอบ 3 ภาพแสดงองค์ประกอบหลักของเครื่อง HPLC .....	28
ภาพประกอบ 4 ภาพแสดงกระบวนการสังเคราะห์สาร aromatic amino acid และสาร สารประกอบทุติยภูมิต่าง ๆ .....	30
ภาพประกอบ 5 ภาพแสดงกระบวนการ shikimate pathway .....	31
ภาพประกอบ 6 ภาพแสดงกระบวนการสร้าง tryptophan, tyrosine และ phenylalanine จาก chorismate .....	32
ภาพประกอบ 7 ภาพแสดงกระบวนการเกิด L-DOPA .....	33
ภาพประกอบ 8 กราฟแสดงสัดส่วนการออกของเมล็ดบนอาหารสูตร MS ที่ระยะเวลา 14 วัน.....	48
ภาพประกอบ 9 ภาพแสดงต้นหมามูยอินเดียที่ได้จากการเพาะเมล็ดกลุ่มควบคุม .....	50
ภาพประกอบ 10 ภาพแสดงต้นหมามูยอินเดียที่ได้จากการเพาะเมล็ด กลุ่ม 200 เกรย์ 300 เกรย์ 400 เกรย์ และ 500 เกรย์ .....	50
ภาพประกอบ 11 ภาพแสดงต้นหมามูยอินเดียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ .....	52
ภาพประกอบ 12 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน L-DOPA.....	53
ภาพประกอบ 13 ภาพแสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม .....	54
ภาพประกอบ 14 กราฟแสดงปริมาณ L-DOPA ของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง .....	55
ภาพประกอบ 15 ภาพแสดงตัวอย่างผงแห้งของต้นหมามูยอินเดีย .....	56
ภาพประกอบ 16 ภาพแสดงการเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน L-DOPA และของ ตัวอย่าง .....	58
ภาพประกอบ 17 กราฟแสดงความเป็นเส้นตรงของวิธีการตรวจวิเคราะห์ .....	59

ภาพประกอบ 18 กราฟมาตรฐานระหว่างค่า $\log$ ของปริมาณ DNA กับค่า $C_T$ ของการทดสอบ ไพรเมอร์ของยีน DDC .....	64
ภาพประกอบ 19 กราฟมาตรฐานระหว่างค่า $\log$ ของปริมาณ DNA กับค่า $C_T$ ไพรเมอร์ของยีน 18S.....	66



## บทที่ 1

### บทนำ

#### ที่มาและความสำคัญของปัญหา

โรคพาร์กินสันเป็นโรคที่สมองเกิดการเสื่อม พบได้ประมาณร้อยละ 1.5 ของประชากรโลกที่มีอายุมากกว่า 50 ปี โดยมีอาการสำคัญคืออาการสั่นเกร็งของกล้ามเนื้อ เคลื่อนไหวร่างกายลำบาก เสียการทรงตัว และมีอาการซึมเศร้า<sup>(1)</sup> ความสำเร็จในการรักษาโรคพาร์กินสันเริ่มขึ้นในช่วงปี ค.ศ. 1960 จากการที่นักวิจัยพบว่าผู้ป่วยจะมีระดับของโดพามีน ซึ่งเป็นที่สารที่ทำหน้าที่เชื่อมสัญญาณสมองระหว่างเซลล์ประสาทอยู่ในระดับต่ำ นำไปสู่การพัฒนาสารสำคัญ L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) เพื่อใช้เป็นยา โดยพบว่า L-DOPA สามารถผ่าน blood brain barrier ได้ดีและจะถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ให้กลายเป็นโดพามีน ซึ่งจะทำให้สามารถบรรเทาอาการของโรคพาร์กินสันได้ โดย L-DOPA นี้ถูกใช้เป็นยารักษาโรคพาร์กินสันจนถึงทุกวันนี้<sup>(2)</sup>

L-DOPA ถูกสกัดได้ครั้งแรกจากต้น *Vicia faba* ต่อมาสามารถสกัดได้จากเมล็ดของต้นหมาม่วยอินเดีย (*Mucuna pruriens*) โดยพืชทั้งสองชนิดนี้เป็นที่รู้จักกันดีว่าเป็นแหล่งของ L-DOPA ที่สำคัญ โดยเฉพาะเมล็ดของหมาม่วยอินเดีย จะมีปริมาณสารสูงที่สุดกว่าพืชชนิดอื่น โดยสามารถนำมาสกัดแยกสาร L-DOPA เพื่อใช้ประโยชน์ในเชิงการค้าได้สำเร็จ ซึ่งพบว่าปัจจุบันนี้ปริมาณทางการค้าของ L-DOPA มีจำนวนสูงมากคือประมาณ 250 ตันต่อปี คิดเป็นมูลค่า 101 พันล้านเหรียญสหรัฐ จึงมีความพยายามในการผลิต L-DOPA จากแหล่งต่าง ๆ พบว่าการผลิต L-DOPA จากเมล็ดของหมาม่วยอินเดีย จะมีอุปสรรคอยู่บ้างเนื่องจากเมล็ดจะอยู่ในฝักที่มีขนพิษป้องกันอยู่ ส่วนการผลิตโดยการสังเคราะห์ทางเคมีนั้นต้องใช้สารเคมีจำนวนมากภายใต้สภาวะที่รุนแรงและมีต้นทุนสูง นักวิจัยจึงให้ความสนใจในการศึกษาวิธีการผลิตด้วยเทคนิควิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพแทน โดยมีรายงานวิธีการผลิตที่หลากหลายเช่นการใช้เอนไซม์ในการผลิต การใช้เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย และการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแบบแคลลัสหรือแบบ suspension เป็นต้น<sup>(2)</sup> สำหรับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแบบ plantlet (ต้นอ่อน) จากเมล็ดหมาม่วยอินเดียนั้น มีความน่าสนใจตรงที่จะสามารถเพิ่มจำนวนต้นอ่อนของหมาม่วยอินเดียได้จำนวนมากภายในระยะเวลาอันสั้น โดยไม่มีความแปรปรวนจากธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ซึ่งหากพบว่าในต้นอ่อนที่ได้นั้นมีปริมาณสาร L-DOPA อยู่มากเพียงพอก็จะสามารถนำมาใช้สกัดแยกสาร L-DOPA ได้ ซึ่งจะเป็นวิธีในการผลิตสาร L-DOPA ได้อีกทางเลือกหนึ่ง



ปัจจุบันนี้เทคนิคการฉายรังสีแกมมา (Gamma irradiation) ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการเหนี่ยวนำให้พืชเกิดการกลายเพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยมีกลไกสำคัญคือรังสีแกมมาจะก่อให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในเซลล์พืช ซึ่งอนุมูลอิสระนี้จะไปมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้าง หน้าที่การทำงานและกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์<sup>(3)</sup> นอกจากนี้จะใช้ปรับปรุงพันธุ์พืชแล้วยังมีการนำเทคนิคการฉายรังสีแกมมามาใช้เหนี่ยวนำพืชให้มีการสร้างสารสำคัญของพืชมากขึ้น ซึ่งสามารถทำการศึกษาได้หลายรูปแบบ เช่นตัวอย่างพืชที่นำมาฉายรังสีแกมมาอาจใช้ส่วนที่เป็นเมล็ดหรือตัวอย่างพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ใช้รังสีแกมมาเพื่อเป็นตัวกระตุ้นการสร้างสารสำคัญโดยตรง หรืออาจใช้เป็นส่วนก่อการกลายเพื่อดูสารสำคัญที่เกิดขึ้นในพืชที่มีการกลายเกิดขึ้นก็ได้

จากประโยชน์ของเทคนิคการฉายรังสีแกมมาและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแบบ plantlet ที่กล่าวมานี้ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างสาร L-DOPA ในตัวอย่าง plantlet (ต้นอ่อน) ที่ได้จากเมล็ดหมามูยอินเดียที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา ทั้งนี้เพื่อเป็นประโยชน์ในการประเมินความเป็นไปได้ที่จะใช้เป็นวิธีการผลิต L-DOPA อีกวิธีการหนึ่ง

### วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. เพื่อศึกษาถึงความสามารถในการสร้างสาร L-DOPA ในตัวอย่าง plantlet จากเมล็ดหมามูยอินเดียที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
2. เพื่อศึกษาการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร L-DOPA

### สมมติฐานการวิจัย

การฉายรังสีแกมมาต่อเมล็ดหมามูยอินเดียมีผลต่อปริมาณสาร L-DOPA ในตัวอย่าง plantlet ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดหมามูยอินเดียนั้น

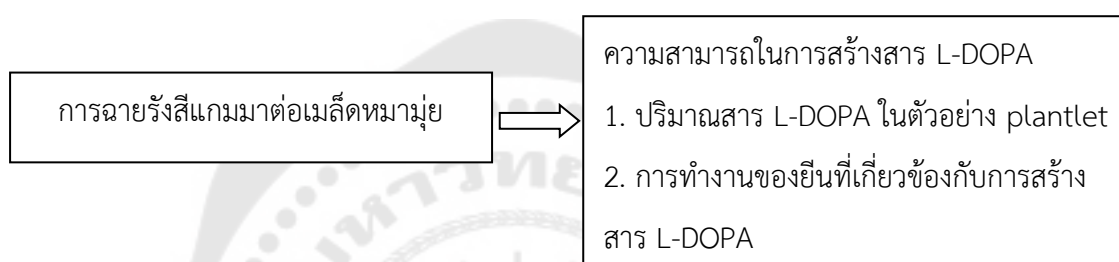
### ขอบเขตของการวิจัย

1. พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สาร L-DOPA ในตัวอย่างใบหมามูยอินเดียโดยวิธี HPLC
2. ทำการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันต่อตัวอย่างเมล็ดหมามูยอินเดีย
3. ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแบบ plantlet จากเมล็ดหมามูยอินเดีย
4. ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร L-DOPA ในตัวอย่าง plantlet ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
5. ตรวจสอบการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร L-DOPA

### ตัวแปรที่เกี่ยวข้อง

1. ตัวแปรต้น ได้แก่ การฉายรังสีแกมมาต่อเมล็ดหามามูยอินเดียที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
2. ตัวแปรตาม ได้แก่
  - 2.1 ปริมาณสาร L-DOPA ในตัวอย่าง plantlet
  - 2.2 การทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร L-DOPA

### กรอบแนวคิดในการวิจัย



### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีการผลิตสารสำคัญ L-DOPA โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นทางเลือกอีกวิธีการหนึ่ง
2. ได้ข้อมูลกลไกการสร้างสาร L-DOPA ในระดับยีนของต้นหามามูยอินเดีย
3. ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร L-DOPA ในตัวอย่างใบของหามามูยอินเดีย

### สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการเภสัชวิทยา สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
2. ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
3. ห้องปฏิบัติการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

#### 1. สมุนไพรหมามุ่ยอินเดีย

เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศอินเดีย โดยพบว่าเป็นส่วนประกอบในตำรับยามากกว่า 200 ตำรับ และที่สำคัญในประเทศอินเดียเป็นที่แรกที่มีการนำเมล็ดมาใช้รักษาโรคพาร์กินสันโดยในภายหลังเมื่อมีการศึกษาพบว่าในเมล็ดมีสารสำคัญที่ชื่อว่า L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) สามารถใช้เป็นยารักษาโรคพาร์กินสันได้ ทำให้เกิดความต้องการทางการตลาดสูงขึ้นหลายเท่าตัว<sup>(4)</sup>

##### 1.1 ข้อมูลทั่วไป

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Mucuna pruriens* (L.) DC.<sup>(4)</sup>

ชื่ออื่น : velvet bean, cowitch, cowhage<sup>(4)</sup>

ชื่อวงศ์ : Leguminosae<sup>(4)</sup>

##### 1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เป็นไม้เลื้อยยาวได้ถึง 15 เมตร เมื่อตอนเป็นต้นอ่อนจะมีขนอ่อนปกคลุมทั้งหมด เมื่อโตขึ้นขนจะหายไป ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก มีใบย่อย 3 ใบ เรียงสลับ ก้านใบยาว 6.3 ถึง 11.3 เซนติเมตร ใบย่อยใบปลายเป็นรูปวงรีถึงรูปไข่แกมสี่เหลี่ยมขนมเป็ยกปุ่น ใบย่อยคู่ข้างจะมีขนาดใหญ่กว่า แผ่นใบสองข้างขนาดไม่เท่ากัน ดอกจะมีสีม่วงเข้ม รูปดอกถั่วแต่จะมีขนาดใหญ่กว่า ผลเป็นฝักโค้งรูปแถบขอบขนาน มี 4 ถึง 6 เมล็ด ยาวประมาณ 10 เซนติเมตร มีขนแข็งสีน้ำตาลปกคลุมซึ่งถ้าโดนผิวหนังจะทำให้คันปวดแสบปวดร้อนได้ เมล็ดมีสีดำน<sup>(4, 5)</sup>

##### 1.3 องค์ประกอบทางเคมี

ในเมล็ดของหมามุ่ยอินเดียจะมีสารสำคัญ L-DOPA ประมาณ 3.1-6.1% นอกจากนั้นยังพบสารสำคัญอื่น เช่น 5-hydroxy tryptamine (serotonin), nicotine, dimethyl tryptamine (DMT), bufolenine, 5-MeO-DMT และ beta-carboline<sup>(4)</sup>

ในส่วน of ใบจะพบ L-DOPA ประมาณ 0.5% พบ dimethyl tryptamine และ 5-MeO-DMT<sup>(4)</sup>

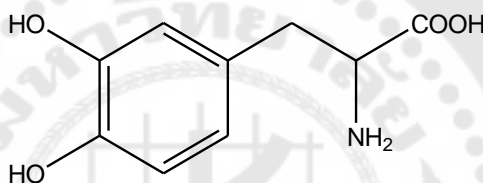
##### 1.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ฤทธิ์ที่สำคัญของหมามุ่ยอินเดียคือฤทธิ์ต้านพาร์กินสัน ในตำราอายุรเวทหรือแพทย์แผนโบราณของอินเดียพบว่าการนำผงของเมล็ดหมามุ่ยอินเดียมาใช้รักษาอาการของโรคพาร์กินสันมาอย่างยาวนานแล้ว มีการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าเมล็ดหมามุ่ยอินเดียให้ฤทธิ์ต้านพาร์กิน

สันติกว่า L-DOPA สังเคราะห์ 2 เท่า ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากมีสารช่วยออกฤทธิ์ตัวอื่นอยู่ในเมล็ดด้วย<sup>(6)</sup> นอกจากนี้ยังมีการศึกษาทางคลินิกที่พบว่าเมล็ดหมามุ่ยออกฤทธิ์เร็วและนานกว่ายา L-DOPA มาตรฐาน รวมทั้งมีผลข้างเคียงน้อยกว่า<sup>(7)</sup>

นอกจากฤทธิ์ต้านพาร์กินสันแล้วยังมีฤทธิ์อื่น ๆ เช่น ลดระดับน้ำตาลในเลือด ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เพิ่มจำนวนและความแข็งแรงของสูลิจ ฤทธิ์ต้านพิษงู และฤทธิ์ต้านจุลชีพ เป็นต้น<sup>(4)</sup>

## 2. L-DOPA



ภาพประกอบ 1 ภาพโครงสร้างทางเคมีของ L-DOPA

ที่มา: Ricardo Soares A. (2014). The role of L-DOPA in plants. *Plant Signal Behav.* 9:e28275-2

### 2.1 ข้อมูลทั่วไป

ชื่ออื่น : 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine, Levodopa, Dopa<sup>(8)</sup>

สูตรโมเลกุล :  $C_9H_{11}NO_4$ <sup>(9)</sup>

น้ำหนักโมเลกุล : 197.2<sup>(9)</sup>

จุดหลอมเหลว : 276-278 °C<sup>(9)</sup>

การละลาย : L-DOPA ละลายได้เล็กน้อยในน้ำ (ประมาณ 3.3 mg/ml) และในสารละลายกรดหรือด่าง แต่จะไม่ละลายในเอธานอล<sup>(9)</sup>

ความคงตัว : L-DOPA จะไม่คงตัวในสารละลายต่างและจะถูกออกซิไดส์ได้ง่าย ดังนั้นในการเตรียมสารละลาย L-DOPA จะต้องเตรียมสารละลายที่สดใหม่และหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับอากาศและแสง<sup>(9)</sup>

## 2.2 พืชที่มีสาร L-DOPA

มีการศึกษาหา L-DOPA ในเมล็ดของตัวอย่างพืชกว่า 1000 ชนิด ครอบคลุม 135 วงศ์ แต่ก็พบว่าพืชเพียงไม่กี่ชนิดที่มีสาร L-DOPA โดยนอกจากพืชใน สกุล *Mucuna* และ *Vicia* แล้วยังพบ L-DOPA ในพืชชนิดสกุลอื่น เช่น *Phanera*, *Pileostigma*, *Cassia*, *Canavalia* และ *Dalbergia* เป็นต้น แต่ปริมาณ L-DOPA ก็ไม่สูงเท่าพวก *Mucuna* โดยตารางที่ 1 จะแสดงรายงานชนิดของพืชและปริมาณ L-DOPA ที่พบ<sup>(1)</sup>

ตาราง 1 แสดงรายงานชนิดของพืชและปริมาณสาร L-DOPA

Plant	Plant part	L-DOPA(%)
<i>Mucuna cochinchinensis</i> .(Lour.) A. Chev.	-	0.96
<i>Mucuna cochinchinensis</i> . (Lour.) A. Chev.	Seed(ash)	4.2
	Pericarp(ash)	0.14
	Leaf(ash)	0.18
	Stem(ash)	0.28
	Root(ash)	0.14
<i>Mucuna cochinchinensis</i> . (Lour.) A. Chev.	Seed(grey)	2.5
<i>Mucuna cochinchinensis</i> . (Lour.) A. Chev.	Seed	3-4
<i>Mucuna deeringiana</i> .(Bort) Merr.	Seed	2.7-3.13
<i>Mucuna gigantean</i> .(Wild.)DC.	Seed	1.50-3.78
<i>Mucuna holtonii</i> .(Kuntze)Mold	-	
<i>Mucuna monosperma</i> .DC.exWight	Seed	6.13-7.5
<i>Mucuna mutisiana</i> .(Kunth)DC.	Seed	4.24-4.56
<i>Mucuna pruriens</i> . (Linn) DC.	Seed	3.9-6.8
<i>Mucuna pruriens</i> . (Linn) DC.	Seed (excluding seed coat)	5.9-6.4
<i>Mucuna pruriens</i> . (Linn) DC.	Seed	1.25-9.16
	Seed(Black)	3.8
	Pericarp	0.09-0.22
	Leaf	0.35
	Stem	0.31

## ตาราง 1 (ต่อ)

Plant	Plant part	L-DOPA(%)
<i>Mucuna pruriens</i> . (Linn) DC.	Root	0.16
	Whole bean	4.02
<i>Mucuna pruriens</i> f. <i>hirsute</i>	Endocarp	5.28
<i>Mucuna pruriens</i> f. <i>utilis</i>	Seed	1.4-1.5
<i>Mucuna pruriens</i> var. <i>utilis</i> .(Wall.ex Wight)	Seed	1.8
<i>Baker ex Burck.</i>	White (Whole seed)	4.96
	Black (Whole seed)	4.1-6.86
	White (Dehulled seed)	5.21
<i>Mucuna pruriens</i> var. <i>utilis</i> .(Wall.ex Wight)	Black (Dehulled seed)	4.66
<i>Baker ex Burck.</i>	Seed	8.05
<i>Mucuna pruriens</i> var. <i>utilis</i> .(Wall.ex Wight)	Seed (white)	6.08
<i>Baker ex Burck.</i>		
<i>Mucuna pruriens</i> var. <i>utilis</i> .(Wall.ex Wight)	Seed (spotted)	3.6
<i>Baker ex Burck.</i>		
<i>Mucuna sloanei</i> Fawcett & Rendle	Pericarp	0.16
	Leaf	0.17
	Stem	0.19
	Root	0.12
<i>Mucuna</i> sp	Seed	3.34-9.0
	Root	1.96-4.96
<i>Mucuna urens</i> .(Linn.) Medik	Seed	4.92-7.4
<i>Parkinsonia aculeate</i> .Linn.	Seed	0.64
<i>Phanera vahlii</i> .Benth.	Seed	2.35
<i>Pileostigma malabarica</i> .Benth.	Seed	2.13
<i>Prosopis chilensis</i> Stuntz	Seed	1.25
<i>Vicia faba</i> Linn.	Seed	1.25
	Green peel of pod	0.2-0.75
	Flowering green plant	0.09
	Green pod	0.006-0.01
	Dry seeds	tr

ตาราง 1 (ต่อ)

Plant	Plant part	L-DOPA(%)
<i>Vicia faba</i> var <i>minor</i>	Dry cotyledons (peeled)	tr
	Dry seeds	0.07
	Green pods (whole unripe fruit)	0.6
	Green plant with pods	0.56
	Green flowering plant	0.40-0.46
	Green vegetative plant	0.24-0.57
<i>Vicia narbonensis</i> Linn.	Green pods (peel only)	0.5
	Green plant with pods	0.6
<i>Vigna aconitifolia</i> .(Jacq.) Marechal	Seed	0.2
<i>Vigna unguiculata</i> .(Linn.) Walp.	Seed	0.45
<i>Vigna vexillata</i> .(Benth.)A. rich	Seed	0.52-0.58

ที่มา: Ingle PK. (2003). L-DOPA bearing plants. Nat Prod Rad. 2(3): 131-32

### 2.3 การผลิต L-DOPA ในปัจจุบัน

จากมูลค่าทางการตลาดที่สูงและมีผู้ป่วยจำนวนมาก โดยในสหรัฐอเมริกา มีผู้ป่วยประมาณ 1 ล้านคน และทั่วโลกประมาณ 5 ล้านคน จึงมีความพยายามในการผลิตจากแหล่งต่างๆ ดังนี้<sup>(2)</sup>

2.3.1) จากการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical synthesis) ต้องใช้สารเคมีจำนวนมาก ภายใต้สภาวะที่รุนแรง โดยการสังเคราะห์ทางเคมีสามารถทำให้เกิด racemic DL mixture ได้ง่าย แต่การแยกให้ได้ L-DOPA บริสุทธิ์ทำได้ยาก และมีต้นทุนสูงมาก แต่ทั้งนี้ก็มีการผลิต L-DOPA โดยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีจำหน่ายในท้องตลาด

2.3.2) L-DOPA จากแหล่งทางชีวภาพ หลังจากที่มีการยืนยันแล้วว่า L-DOPA เป็นสารตั้งต้นของสารสื่อประสาทที่สามารถช่วยในการรักษาพาร์กินสันได้ดี ทำให้ต่อมา มีการศึกษาวิจัยและมีรายงานจำนวนมากถึงการสังเคราะห์สาร L-DOPA บริสุทธิ์จากแหล่งชีวภาพต่าง

การผลิต L-DOPA จากแหล่งทางชีวภาพจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ oxidation ของ L-tyrosine โดยเอนไซม์ tyrosinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยกระบวนการสังเคราะห์ L-DOPA ในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันก็จะมีกระบวนการที่ต่างกันไป

- Enzymatic synthesis เอนไซม์ mushroom tyrosinase ถูกใช้ในทางการค้าในการผลิต L-DOPA โดยเทคนิค enzyme immobilization ซึ่งจะใช้ต้นทุนที่ต่ำในการผลิต โดยเทคนิค enzyme immobilization ที่ใช้มีหลายวิธีเช่น polymeric gel, adsorption onto insoluble material, encapsulation in membranes, cross-linking with bifunctional or multifunctional reagents และ linking to an insoluble carrier สารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ L-DOPA ก็จะมาประกอบด้วย catechol, sodium pyruvate และ ammonium acetate

- Fungal sources L-DOPA ที่ผลิตจากเชื้อราส่วนใหญ่แล้วจะได้จาก reaction mixture ซึ่งประกอบด้วยสารตั้งต้นคือ L-tyrosine กับ mycelia ใน buffer โดย mycelia จะถูกกระจายตัวใน reaction mixture ที่ประกอบด้วย L-tyrosine, L-ascorbic acid และ intact mycelia ในสภาวะที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังมีสารช่วย elicitor มาเพิ่มกำลังการผลิตได้ การผลิตจะได้สาร L-DOPA ที่บริสุทธิ์โดยใช้ต้นทุนที่ต่ำ นอกจากนี้ยังมีรายงานการผลิต L-DOPA จากยีสต์ด้วย

- Bacterial sources สามารถผลิต L-DOPA ได้จากแบคทีเรียหลายชนิดทั้งการเลี้ยงใน broth และใน buffer ที่มีสารตั้งต้นกับ acclimatized cell ซึ่งจะช่วยลดปัญหา tedious downstream ได้ นอกจากนี้การพัฒนา medium จะช่วยเพิ่มผลผลิตของ L-DOPA ได้ ทั้งนี้มีตัวอย่างคือบริษัท Ajinomoto ใช้ recombinant *E. herbicola* ในการผลิตทางการค้าสามารถให้กำลังการผลิต 15 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง

- Plants พืชถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการนำมาผลิตแยก L-DOPA ได้ โดยในการสำรวจพืชกว่า 1000 ชนิด ใน 135 สกุล พบว่าพืชสกุล *Mucuna* (Leguminosae) จะมีปริมาณ L-DOPA สูงที่สุดและประสบความสำเร็จในการผลิตเพื่อทางการค้า โดยในสกุล *Mucuna* นี้พืชชนิดสำคัญที่มี L-DOPA อยู่ในเมล็ดเช่น *M. holtonii*, *M. pruriens* และ *M. monosperma* นอกจากนี้ Fava bean (*Vicia faba*) ซึ่งเป็นพืชที่มีการเพาะปลูกอย่างแพร่หลายและปกติก็ใช้เป็นอาหาร ถือเป็นพืชสำคัญอีกชนิดหนึ่งที่ให้สาร L-DOPA โดยจะพบได้ที่ต้นอ่อน ผักและเมล็ด

### 3. การกลายพันธุ์

การกลายหรือการกลายพันธุ์ หมายถึง การเปลี่ยนแปลงทุกชนิดที่เกิดขึ้นกับสารพันธุกรรม (genetic material) หรือดีเอ็นเอ (DNA) ในเซลล์ ซึ่งไม่ได้เกิดจากการรวมตัว



(recombination) หรือการแยกตัว (segregation) ของสารพันธุกรรมตามปกติ และสามารถถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงนั้น ๆ จากเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปยังเซลล์ลูกได้ด้วยกระบวนการแบ่งเซลล์ การเปลี่ยนแปลงทางกรรมพันธุ์อาจเกี่ยวข้องกับลักษณะรูปร่างทั่วไป ลักษณะทางสรีระ ลักษณะทางชีวเคมี หรือลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสปีชีส์ การกลายเป็นสมบัตಿಯ่างหนึ่งของสิ่งมีชีวิต และเป็นกลไกสำคัญอันดับแรกที่ทำให้เกิดความแปรผันในองค์ประกอบทางพันธุกรรม อันเป็นพื้นฐานจำเป็นสำหรับกระบวนการวิวัฒนาการ<sup>(10)</sup>

การกลายสามารถแสดงออกได้หลายรูปแบบ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิธีการที่ใช้ตรวจสอบ เช่น

1) การกลายที่แสดงออกทางลักษณะสัณฐาน (morphological mutation) ได้แก่ การแสดงออกของยีนกลาย (mutant gene) ที่ควบคุมลักษณะภายนอก ซึ่งสามารถสังเกตและตรวจสอบได้ง่าย

2) การกลายของยีนที่ทำให้ตาย (lethal mutation) ได้แก่ ยีนกลายที่ก่อให้เกิดอันตรายถึงแก่ชีวิตของสิ่งมีชีวิตที่มียีนนั้น ๆ อยู่

3) การกลายที่แสดงออกทางชีวเคมี (biochemical mutation) ได้แก่ ยีนกลายที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์บางชนิดที่จำเป็นสำหรับกระบวนการชีวเคมี ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยวิธีการทางชีวเคมี บางกรณีก็อาจส่งผลกระทบต่อลักษณะภายนอก แต่บางกรณีก็ไม่ส่งผลต่อลักษณะภายนอก

สามารถแบ่งการกลายได้หลายประเภท ขึ้นอยู่กับว่าจะใช้อะไรเป็นเกณฑ์ในการจัดประเภท เช่น แบ่งตามตำแหน่งที่เกิดการกลายภายในเซลล์ แบ่งได้เป็น การกลายภายในนิวเคลียส และการกลายนอกนิวเคลียส แบ่งตามสาเหตุการเกิดได้ 2 ประเภทคือ การกลายตามธรรมชาติ และการกลายจากการเหนี่ยวนำ แบ่งตามลักษณะการควบคุมของยีนได้ 2 ประเภทคือ แมโครมิวเทชัน และไมโครมิวเทชัน นอกจากนี้ยังแบ่งตามลักษณะฟีโนไทป์ที่เปลี่ยนแปลงก็ได้<sup>(10)</sup>

### 3.1 การกลายตามธรรมชาติ

การกลายตามธรรมชาติ หมายถึง การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองโดยมนุษย์ไม่มีส่วนเกี่ยวข้อง สาเหตุของการกลายตามธรรมชาติไม่เป็นที่แน่ชัด ไม่สามารถบอกได้ว่ามาจากปัจจัยใด ปัจจัยหนึ่ง หรือหลาย ๆ ปัจจัยร่วมกัน อาจเป็นผลของปัจจัยภายในเซลล์พืชเอง เช่น องค์ประกอบทางพันธุกรรมของพืช ภาวะทางสรีระของพืช สิ่งก่อกการกลายภายในพืชที่เกิดเองตามธรรมชาติ หรืออาจเกิดจากสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นปัจจัยภายนอก เช่น อาหาร อุณหภูมิ หรือรังสีที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติ

ความถี่ของการกลายตามธรรมชาติโดยทั่วไปจะต่ำ แต่การกลายดังกล่าวก็ยังมีบทบาทสำคัญในการเป็นแหล่งของการแปรผันทางพันธุกรรมของประชากรพืช<sup>(10)</sup>

### 3.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลาย

การกลายนอกจากเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติแล้ว ยังสามารถใช้วิธีการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายได้ด้วย โดยจะได้อัตราการกลายสูงกว่าที่เกิดเองตามธรรมชาติอีกหลายเท่า ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่นำมาเหนี่ยวนำให้เกิดการกลาย การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายทำได้หลายวิธีดังนี้<sup>(10)</sup>

1) การเหนี่ยวนำให้พืชเกิดการกลายโดยการสอดแทรกดีเอ็นเอ ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สอดแทรกเข้าไปอยู่ใกล้ยีนใดในจีโนม จะมีผลต่อการทำงานของยีนนั้น ๆ ทำให้ยีนมีการทำงานที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ส่งผลให้ลักษณะซึ่งถูกควบคุมด้วยยีนนั้นมีการเปลี่ยนแปลงไปด้วย

2) การเหนี่ยวนำให้พืชเกิดการกลายโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การชักนำให้เกิดแคลลัสในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรือการเลี้ยงเซลล์ในสภาพเซลล์แขวนลอย ตลอดจนการเพาะเลี้ยงโปรโทพลาสต์ เมื่อชักนำให้เซลล์หรือกลุ่มเซลล์ในสภาพดังกล่าวเจริญเป็นต้นพืชได้พบว่าต้นพืชใหม่อาจมีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงหรือแตกต่างไปจากเดิม แม้ว่าจะมาจากชิ้นส่วนของพืชเริ่มต้นที่เหมือนกันก็ตาม ลักษณะบางอย่างอาจไม่เคยปรากฏในพืชพันธุ์เดิมมาก่อน และบางลักษณะสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นกับสารพันธุกรรม

3) การเหนี่ยวนำให้พืชเกิดการกลายโดยสารเคมี สารเคมีหลายชนิดมีสมบัติเป็นสิ่งก่อกำเนิดการกลายส่วนใหญ่ทำงานโดยเข้าทำปฏิกิริยากับเบสของดีเอ็นเอโดยตรง หรืออาจแทรกเข้าไปอยู่ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ สารเคมีก่อกำเนิดการกลายบางชนิด มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับเบสของดีเอ็นเอจึงสามารถเข้าแทนที่คู่เบสในดีเอ็นเอได้ ทั้งก่อนและหลังการจำลองดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังสามารถจับคู่กับเบสที่ไม่ใช่คู่ตามปกติ เป็นสาเหตุให้เกิดการกลายได้ สารเคมีก่อกำเนิดการกลายที่มีประสิทธิภาพสูงในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายกับพืช ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม alkylating agent ได้แก่ ethyl methanesulphate (EMS), ethyleneimine (EI), diethylsulphate (dES) สารเคมีอีกชนิดหนึ่งคือ เอไซด์ (azide) ที่อยู่ในรูปของโซเดียมเอไซด์ (sodium azide) หรือโพแทสเซียมเอไซด์ (potassium azide) ก็เป็นสารเคมีที่มีสมบัติเป็นสิ่งก่อกำเนิดการกลายที่ดีที่สุดชนิดหนึ่ง

4) การเหนี่ยวนำให้พืชเกิดการกลายโดยรังสี รังสีที่นำมาใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายในพืช ควรเป็นรังสีก่อกำเนิดไอออน ได้แก่ รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา และรังสีนิวตรอน เพราะมีสมบัติทำให้อะตอมหรือโมเลกุลที่ได้รับรังสีแตกตัวเป็นไอออนได้ การวิจัยเกี่ยวกับการใช้รังสีกับพืช

เริ่มตั้งแต่ปี ค.ศ. 1928 เมื่อ L.J. Stadler พบว่ารังสีเอกซ์สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายในข้าวโพดและในข้าวบาร์เลย์ได้ โดยให้อัตราการกลายสูงกว่าที่เกิดตามธรรมชาติ ในช่วงแรกของการวิจัยการใช้รังสีเหนี่ยวนำให้พืชกลายพันธุ์ จะเน้นไปในการใช้รังสีเอกซ์เป็นส่วนใหญ่ ต่อมาเมื่อมีการสร้างเครื่องปฏิกรณ์นิวเคลียร์ (nuclear reactor) ซึ่งเป็นแหล่งสำคัญในการผลิตรังสีนิวตรอน จึงมีการใช้นิวตรอนกับพืช รังสีนิวตรอนมีความรุนแรงกว่ารังสีเอกซ์ทำให้เกิดความเสียหายแก่โครโมโซมมาก โดยทำให้โครโมโซมแตกหักมากกว่าเกิดความเสียหายกับยีน รังสีนิวตรอนก่อให้เกิดการกลายของโครโมโซมมากกว่าการกลายของยีน นอกจากนี้การฉายตัวอย่างพืชด้วยรังสีนิวตรอน รวมทั้งการปฏิบัติกับส่วนของพืชภายหลังการฉายรังสีนิวตรอนแล้วมีความยุ่งยากมากกว่าการฉายรังสีเอกซ์ จึงได้รับความนิยมน้อยกว่ารังสีเอกซ์ ส่วนรังสีแกมมาซึ่งได้จากการสลายตัวของสารกัมมันตภาพรังสี เช่น โคบอลต์-60 และซีเซียม-137 มีสมบัติใกล้เคียงกับรังสีเอกซ์ จึงนิยมนำมาใช้กับพืชมากกว่ารังสีเอกซ์ เนื่องจากสามารถฉายรังสีให้กับตัวอย่างพืชทั้งแบบเฉียบพลัน และแบบเรื้อรัง ประกอบกับสามารถพัฒนาเครื่องฉายรังสีได้หลายแบบ เพื่อวัตถุประสงค์ของการใช้งานที่แตกต่างกัน

#### 4. รังสีแกมมา

รังสีแกมมาเป็นรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความถี่สูง ไม่มีมวล ไม่มีประจุ มีอำนาจทะลุทะลวงสูง เกิดจากการปล่อยพลังงานของนิวไคลด์กัมมันตรังสี (radionuclide หรือ radioactive nuclide) ที่สลายตัวให้รังสีชนิดอื่นแล้ว แต่ยังมีพลังงานเหลืออยู่ จึงปล่อยพลังงานออกมาในรูปของรังสีแกมมา รังสีแกมมาจัดเป็นรังสีนิวเคลียร์ เนื่องจากเกิดจากนิวเคลียสของนิวไคลด์กัมมันตรังสี ตัวอย่างของนิวไคลด์กัมมันตรังสีคือ โคบอลต์-60 (Cobalt-60,  $^{60}\text{Co}$ ) และซีเซียม-137 (cesium-137,  $^{137}\text{Cs}$ ) ซึ่งนิยมนำมาใช้เป็นต้นกำเนิดของรังสีแกมมาในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายในพืช รังสีแกมมามีพลังงานอยู่ในช่วง keV- MeV สำหรับความสามารถในการทะลุทะลวงผ่านตัวกลางใด ๆ ขึ้นอยู่กับพลังงานและชนิดของตัวกลาง

นักปรับปรุงพันธุ์พืช นิยมใช้รังสีแกมมาในการเหนี่ยวนำให้พืชเกิดการกลายมากกว่ารังสีเอกซ์ เนื่องจากสามารถฉายรังสีตัวอย่างพืชได้ทั้ง 2 แบบ คือการฉายรังสีแบบเฉียบพลัน (acute irradiation) คือให้อัตรา (dose rate) และปริมาณ (total dose) รังสีสูง ใช้ระยะเวลาในการฉายรังสีสั้น เช่น นาที หรือชั่วโมง ส่วนของพืชที่ฉายรังสีด้วยวิธีนี้มักเป็นเมล็ด ท่อนพันธุ์ หรือเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง และการฉายรังสีแบบเรื้อรัง (chronic irradiation) โดยฉายในอัตราและปริมาณรังสีต่ำ แต่ให้ตัวอย่างพืชได้รับรังสีเป็นระยะเวลานาน ๆ เช่น สัปดาห์ เดือน หรือปี นิยมใช้กับพืชที่กำลัง

เติบโต ทั้งนี้เพื่อให้พืชได้รับรังสีตลอดระยะเวลาในการเติบโต หรือเลือกให้เฉพาะช่วงใดช่วงหนึ่งของ การเติบโตก็ได้<sup>(10)</sup>

#### 4.1 วิธีการฉายรังสี

การฉายรังสีกับตัวอย่างพืชทำได้ 2 วิธีการ คือ<sup>(10)</sup>

1) การฉายรังสีแบบเฉียบพลัน (acute irradiation) คือให้รังสีโดยใช้อัตรารังสีและ ปริมาณรังสีสูง ๆ และสิ้นสุดการฉายรังสีในระยะเวลาสั้น ๆ เช่นเป็นนาที หรือชั่วโมง

2) การฉายรังสีแบบเรื้อรัง (chronic irradiation) คือการให้รังสีโดยใช้อัตรารังสีและ ปริมาณรังสีต่ำ ๆ แต่ใช้เวลาในการฉายรังสีเป็นระยะเวลานาน ๆ เช่น เป็นสัปดาห์ เดือน ปี หรือ หลายปี ตัวอย่างพืชที่เหมาะสมในการฉายรังสีแบบเรื้อรัง คือ พืชทั้งต้นที่กำลังเติบโต หรืออาจเป็น ต้นกล้าพืชหรือส่วนของพืชที่เติบโตในสภาพเพาะเลี้ยง

การฉายรังสีซ้ำ (recurrent irradiation) มีผู้เสนอวิธีการฉายรังสีกับตัวอย่างพืชที่เคย ผ่านการฉายรังสีมาแล้ว โดยฉายรังสีในชั่วรุ่นต่อ ๆ มาซ้ำอีก ทั้งนี้เพื่อเป็นการสะสมและเพิ่มความ แปรผันทางพันธุกรรมให้กับตัวอย่างนั้น ๆ มีนักปรับปรุงพันธุ์หลายกลุ่มพยายามทดลองโดยใช้วิธี ดังกล่าว แต่ผลที่ได้ยังมีความหลากหลาย ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น ชนิดพืช ปริมาณรังสี วิธีการให้ที่รติเมนต์

#### 4.2 อุปกรณ์ฉายรังสีแกมมา

1) เครื่องฉายรังสีแกมมาแบบปิด (self shield irradiator) เป็นเครื่องฉายรังสีที่มีต้น กำเนิดรังสี และเครื่องกำบังอยู่ในตัวเครื่องซึ่งทำด้วยตะกั่ว ใช้ต้นกำเนิดรังสีแกมมาที่มีความแรง รังสีสูง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อฉายรังสีตัวอย่างพืชแบบเฉียบพลัน และเหมาะสำหรับฉายรังสี ตัวอย่างพืชที่มีขนาดเล็ก เช่น เมล็ด ท่อนพันธุ์ หรือเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง เครื่องฉายรังสีแบบปิดนี้จะมี ช่องสำหรับใส่ตัวอย่างพืช มีปุ่มสำหรับตั้งเวลาให้ตัวอย่างพืชได้รับรังสีในปริมาณตามต้องการ มี กลไกการนำตัวอย่างพืชเข้าไปฉายรังสีแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับการออกแบบของบริษัทผู้ผลิต<sup>(10)</sup>

2) ห้องฉายรังสีแกมมา (gamma irradiation room) มีลักษณะเป็นห้องที่ทำด้วยผนัง คอนกรีตหนา รวมทั้งส่วนเพดานก็เป็นคอนกรีตเช่นเดียวกัน ห้องฉายรังสีแกมมาสามารถออกแบบ เพื่อฉายรังสีแบบเฉียบพลันคล้าย ๆ กับเครื่องฉายรังสีแกมมาแบบปิด แต่มีขนาดใหญ่กว่า ทำให้ สามารถฉายตัวอย่างพืชที่มีขนาดใหญ่ และฉายได้เป็นจำนวนมากในแต่ละครั้ง ต้นกำเนิดรังสีใน ห้องฉายรังสีแกมมาที่มีวัตถุประสงค์ในการฉายแบบเฉียบพลันจะมีความแรงรังสีสูง นอกจากนี้ยัง สามารถออกแบบห้องรังสีแกมมา เพื่อฉายรังสีแบบเรื้อรังได้ด้วย โดยใช้ต้นกำเนิดที่มีกำลังแรงของ รังสีต่ำกว่าการใช้ในการฉายแบบเฉียบพลัน<sup>(10)</sup>

3) เรือนกระจกขั้วรังสี (gamma greenhouse) มีลักษณะเป็นห้องฉายรังสีซึ่งมีกำแพงคอนกรีตหนาเพื่อกำบังรังสี ส่วนหลังคาโปร่ง เพื่อรับแสงตามธรรมชาติ มีต้นกำเนิดรังสีที่สามารถให้รังสีกับตัวอย่างพืชที่นำไปวางไว้ ณ ตำแหน่งต่าง ๆ ภายในห้อง ตัวอย่างพืชจะได้รับอัตรารังสีและปริมาณรังสีแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับระยะห่างจากต้นกำเนิดรังสีและเวลาที่ใช้ในการฉายรังสี เรือนกระจกขั้วรังสีจะออกแบบเพื่อวัตถุประสงค์ในการฉายรังสีแบบเรื้อรัง การออกแบบเรือนกระจกขั้วรังสีขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการใช้ประโยชน์<sup>(10)</sup>

4) ไร่รังสีแกมมา (gamma field) เป็นการติดตั้งเครื่องฉายรังสีไว้กลางแจ้งในบริเวณที่มีพื้นที่กว้างขวางและเหมาะสำหรับปลูกพืชได้จำนวนมาก ห่างไกลจากชุมชนและที่อยู่อาศัย เช่นพื้นที่ที่ล้อมรอบด้วยภูเขา ทำหน้าที่เป็นเครื่องกำบังรังสีตามธรรมชาติ ในไร่รังสีแกมมาสามารถปลูกพืชทดลองได้หลายชนิด เช่น พืชไร่ ไม้ดอก ไม้ประดับ ไม้ผล ทั้งไม้ล้มลุกและไม่ยืนต้น พืชที่ปลูกในไร่รังสีจะได้รับรังสีแบบเรื้อรัง โดยได้รับในอัตรารังสีที่ต่ำ ๆ และได้รับต่อเนื่องเป็นระยะเวลายาวนาน อาจเป็นเวลาหลายเดือนหรือหลายปี สามารถตรวจสอบผลของรังสีที่มีต่อพืชได้ทุกระยะของการเติบโต ตลอดจนชีพจักรของพืช รวมทั้งศึกษาการกลายที่เกิดขึ้น ทำการคัดเลือกและนำมาใช้ประโยชน์ได้ตลอดเวลา<sup>(10)</sup>

### 4.3 หน่วยวัดรังสี

หน่วยวัดรังสี (radiation unit) มีหลายประเภทขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการวัด เช่น วัดอัตราการสลายตัวของธาตุกัมมันตรังสี วัดปริมาณการแตกตัวเป็นไอออนของตัวกลาง วัดการดูดกลืนพลังงานจากรังสีของตัวกลาง วัดผลทางชีววิทยาที่เกิดขึ้นเมื่อได้รับรังสี หน่วยงานที่กำหนดการวัดรังสีและหน่วยวัดรังสีคือ International Commission on Radiation Units and Measurement (ICRU)<sup>(10)</sup>

สำหรับการใช้รังสีในการเหนี่ยวนำให้พืชกลายพันธุ์นั้น จะเกี่ยวข้องกับการวัดการดูดกลืนพลังงานจากรังสีของตัวกลาง หรือเรียกว่าปริมาณรังสีดูดกลืน (absorbed dose) เป็นส่วนใหญ่ โดยในปี ค.ศ. 1953 ICRU ได้ให้ข้อกำหนดของปริมาณรังสีดูดกลืนเป็นครั้งแรก โดยเน้นถึงปริมาณรังสีที่ตัวกลางใด ๆ ดูดกลืนไว้ต่อหน่วยน้ำหนักของตัวกลางนั้นเมื่อได้รับรังสี<sup>(10)</sup>

หน่วยวัดปริมาณรังสีดูดกลืน คือ แรด (rad, radiation absorbed dose)<sup>(10)</sup>

โดยที่ปริมาณรังสี 1 แรด หมายถึง ปริมาณรังสีที่ตัวกลางสามารถดูดกลืนไว้ได้ 100 เอิริกต่อกรัมของตัวกลาง

สำหรับหน่วยสากล (The International System of Unit, SI unit) จะใช้หน่วย เกรย์ (gray, Gy) แทน แรด โดยมีความสัมพันธ์ดังนี้

1 เกรย์ = 100 แรด

หรือ 1 แรด =  $10^{-2}$  เกรย์

#### 4.4 ส่วนของพืชที่นำมาฉายรังสี

การฉายรังสีกับพืชเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหรือเกิดการกลาย สามารถฉายกับส่วนใดของพืชก็ได้ที่สามารถนำไปปลูกขยายพันธุ์สำหรับติดตามผลได้ เช่น เมล็ด พืชทั้งต้น ละอองเรณู แกมีโทไฟต์ ไชโกต ส่วนอื่น ๆ ของพืชที่ขยายพันธุ์จากเนื้อเยื่อร่างกาย เช่น กิ่ง ใบ หัว ไหล ราก รวมทั้งเซลล์และเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของงาน ตัวอย่างของพืชที่นำมาฉายรังสีได้แก่<sup>(10)</sup>

1) เมล็ด (seed) เหมาะที่นำมาฉายรังสี เนื่องจากเมล็ดทนต่อสภาพเครียดต่าง ๆ ได้ดี เช่นสภาพแห้งจัดหรือชื้นจัด อุณหภูมิสูงหรือต่ำ มีหรือไม่มีออกซิเจน จึงสามารถปรับสภาพของเมล็ดได้หลายวิธีการ โดยไม่ไปเพิ่มความเสียหายทางชีววิทยามากนัก แต่มีข้อเสียอยู่บ้างคือ มีโอกาสจะเกิดไคเมอรา (chimera) สูง ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดจากการที่เอ็มบริโอในเมล็ดพืชประกอบด้วยเซลล์มากกว่า 1 เซลล์ เมื่อเกิดการกลายขึ้นกับเซลล์ใดเซลล์หนึ่ง ทำให้จีโนไทป์ของเซลล์เริ่มต้นเกิดความแตกต่างกัน เมื่อเซลล์เหล่านี้เจริญเป็นต้นขึ้นมาจะทำให้จีโนไทป์ของต้นเดียวกันนี้มีความแตกต่างกันได้

2) พืชทั้งต้น (whole plant) การฉายรังสีพืชทั้งต้นที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่จำเป็นต้องฉายในไร่รังสี หรือห้องฉายรังสีแกมมา ข้อดีของการใช้พืชทั้งต้นฉายรังสีจากไร่รังสีหรือห้องฉายรังสีแกมมาคือ สามารถปรับอัตรารังสีได้ โดยจะให้ได้รับรังสีแบบเฉียบพลันหรือแบบเรื้อรังก็ได้ และอาจให้รังสีที่ระยะใดระยะหนึ่งของการเติบโต หรือให้ได้รับตลอดระยะการเติบโตของพืชนั้น ๆ นอกจากนี้ยังสามารถฉายรังสีในปริมาณเดียวกันได้ที่ละมาก ๆ โดยวางตัวอย่างไว้ห่างจากต้นกำเนิดรังสีในระยะทางที่เท่ากัน แต่ข้อเสียของการฉายรังสีพืชทั้งต้นที่มีขนาดใหญ่ คือต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการลงทุนสร้างอุปกรณ์สำหรับฉายรังสี

สำหรับต้นกล้า หรือต้นพืชที่มีขนาดเล็ก ตลอดจนต้นพืชในสภาพเพาะเลี้ยง ก็สามารถนำมาฉายในห้องฉายรังสีแกมมา หรือเครื่องฉายรังสีแบบปิดได้

3) ละอองเรณู (pollen grains) ข้อดีของการฉายรังสีกับละอองเรณูซึ่งเป็นเซลล์แฮพลอยด์ (haploid cell) คือตัดปัญหาการเกิดไคเมอรา พืชที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างไซโทที่ไม่ได้รับรังสีกับละอองเรณูที่ได้รับรังสี ถ้ามีลักษณะกลายเกิดขึ้นก็จะอยู่ในสภาพเฮเทอโรไซกัส นอกจากนี้ ละอองเรณูยังเป็นส่วนของพืชที่สามารถใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นสื่อการกลายได้ซึ่ง

ไม่สามารถใช้รังสีนี้กับส่วนอื่น ๆ ของพืช แต่ข้อเสียของละอองเรณูคือ มีอายุสั้น ทำให้สามารถเก็บตัวอย่างได้จำนวนไม่มากนักในการเก็บแต่ละครั้ง

4) ส่วนของพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเนื้อเยื่อต้นพืช (vegetative propagation) พืชหลายชนิดสามารถนำส่วนเนื้อเยื่อต้นพืชมาขยายพันธุ์ได้ เช่น กิ่ง หัวใต้ดิน ราก เหง้า ไหล ส่วนของพืชดังกล่าวมีบริเวณเนื้อเยื่อเจริญที่จะแบ่งเซลล์เพื่อการเติบโตได้ โครงสร้างบริเวณเนื้อเยื่อเจริญ จะเป็นจุดสำคัญในการรับรังสี

5) เซลล์หรือเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง (cultured cells or tissues) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการชักนำให้เกิดแคลลัส หรือเลี้ยงในสภาพเซลล์แขวนลอย เมื่อเซลล์หรือกลุ่มเซลล์เจริญไปเป็นต้นพืช พบว่ามีการแปรผันในลักษณะต่าง ๆ เกิดขึ้น ในกลุ่มต้นพืชที่เกิดใหม่ บางลักษณะไม่เคยปรากฏในพันธุ์เดิมมาก่อน บางลักษณะสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ แสดงว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงกับสารพันธุกรรม ส่วนของพืชที่อยู่ในสภาพเพาะเลี้ยงเป็นที่สนใจของนักปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลาย เนื่องจากสามารถนำมาฉายรังสีในแต่ละครั้งได้เป็นจำนวนมาก ไม่ต้องใช้พื้นที่มาก การฉายรังสีสามารถเพิ่มอัตราการแปรผันให้สูงขึ้น จึงมีโอกาสคัดลักษณะดีไปใช้ประโยชน์ในการสร้างพืชพันธุ์ใหม่ได้

#### 4.5 ปริมาณและอัตรารังสีที่ใช้ในการฉายรังสี

1) ปริมาณรังสี จะใช้ปริมาณรังสีเท่าใดขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และส่วนของพืชที่ใช้ในการฉายรังสี ตลอดจนวิธีการฉายรังสี พืชแต่ละชนิดมีความไวต่อรังสีแตกต่างกันออกไป ลักษณะต้านทานต่อรังสีหรือไวต่อรังสี ส่วนหนึ่งควบคุมด้วยยีน สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ สำหรับปริมาณรังสีที่เหมาะสมต่อพืชแต่ละชนิด นักวิจัยอาจค้นคว้าจากผลงานวิจัยที่ผู้อื่นทำไว้ หรือที่แนะนำโดยทบวงการพลังงานปรมาณูระหว่างประเทศ (IAEA, 1977)

ในการฉายรังสีแบบเฉียบพลันสามารถคาดคะเนปริมาณรังสีที่เหมาะสม โดยทำการทดลองหาค่า LD<sub>50</sub> (50% lethal dose) ซึ่งหมายถึงปริมาณรังสีที่ทำให้พืชตายคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ของกลุ่มควบคุม เมื่อตรวจสอบต้นพืชที่ระยะใดระยะหนึ่งหลังจากการฉายรังสี เช่น 30 วัน (LD<sub>50(30)</sub>) หรือ 60 วัน (LD<sub>50(60)</sub>) ปริมาณรังสีที่เหมาะสมควรอยู่ระหว่าง LD<sub>30</sub> – LD<sub>50</sub> ส่วนค่า GR<sub>50</sub> (50% growth reduction) ซึ่งหมายถึงปริมาณรังสีที่ทำให้การเติบโตของชุดที่ได้รับรังสีลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ของกลุ่มควบคุม ก็สามารถนำมาพิจารณาหาปริมาณรังสีที่เหมาะสมได้ โดยแทนที่จะวัดเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหรือการตายของต้นพืชก็ใช้วิธีวัดความสูง น้ำหนักสดหรือน้ำหนักแห้งของต้นกล้า เป็นต้น ปริมาณรังสีที่แนะนำให้ใช้อยู่ระหว่าง GR<sub>30</sub> – GR<sub>50</sub>

สำหรับการฉายรังสีแบบเรื้อรังนั้น ไม่ค่อยมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับปริมาณรังสีที่เหมาะสมกับพืชไว้มากนัก เนื่องจากมีความหลากหลายในเรื่องของอัตรารังสี และระยะเวลาที่ใช้ในการฉาย<sup>(10)</sup>

2) อัตรารังสี อัตรารังสีที่ปริมาณรังสีใด ๆ จะมีผลต่อพืชทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ ดังนั้นการเลือกใช้อัตรารังสีควรต้องพิจารณาให้ดี และในการทดลองทุกครั้งนอกจากจะบันทึกเรื่องปริมาณรังสีแล้ว ควรบันทึกอัตรารังสีด้วย การศึกษาส่วนใหญ่แสดงให้เห็นว่าการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลาย จะมีประสิทธิภาพสูงเมื่อใช้อัตรารังสีสูงมากกว่าอัตรารังสีต่ำ แต่ก็มีหลายการทดลองที่อัตรารังสีไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเมื่อให้ได้รับปริมาณรังสีเท่ากัน<sup>(10)</sup>

## 5. ผลต่าง ๆ ของรังสีแกมมาที่เกิดต่อพืช

### 5.1 ผลของรังสีแกมมาต่อการงอกของเมล็ด

การฉายรังสีมีผลต่อการงอกของเมล็ดได้หลากหลาย ในงานทดลองต่าง ๆ ที่ผ่านมาพบว่าทั้งอัตราการงอก (germination rate) และสัดส่วนการงอก (percent) มีรายงานผลทั้งการเพิ่มขึ้น ลดลง และไม่เปลี่ยนแปลง แต่ก็จะพบว่าการได้รับรังสีในขนาดที่สูงมักจะทำให้ผลในการยับยั้งการงอก ส่วนในขนาดรังสีต่ำ ๆ มักจะให้ผลในการกระตุ้นการงอกของเมล็ด<sup>(11)</sup>

รังสีแกมมาขนาดต่ำสามารถกระตุ้นการงอกได้จากสมมติฐานหรือสาเหตุที่มีรายงานดังนี้

1. เป็นไปตามหลักการของ Hormesis ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่สารชนิดใดชนิดหนึ่ง ที่ปริมาณรังสีต่ำ ๆ จะเกิดผลดีหรือผลกระตุ้นต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิต แต่ในขณะที่เมื่อได้รับในปริมาณที่สูงขึ้น จะเกิดผลการยับยั้งหรือเป็นพิษต่อร่างกาย<sup>(11, 12)</sup>

2. จากการทดลองของ Kuzin และคณะ ในปี 1975 ที่ทำการทดลองกับ castor bean (*Ricinus communis* L.) ที่ปริมาณของรังสีแกมมา 40 เกรย์ เกิดผลในการกระตุ้น ซึ่งให้สมมติฐานว่าเกิดจากกระบวนการกระตุ้นการสังเคราะห์ RNA หรือการสังเคราะห์โปรตีนที่เกิดขึ้นในระยะแรกของการงอก<sup>(11)</sup>

3. ในปี 1992 Lokesh และคณะ ทำการทดลองพบว่าเมล็ดของ *Bambusa arundinacea* เมื่อได้รับรังสีที่ปริมาณต่ำ ๆ คือที่ 100 เกรย์ จะมีการงอกและมีความแข็งแรงของต้นอ่อนสูงกว่ากลุ่มควบคุม ทั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยหลายงานที่ผ่านมาโดยให้สมมติฐานเกี่ยวกับผลของการกระตุ้นนี้ว่าเกิดจากการเพิ่มขึ้นของ rate of respiration หรือ auxin metabolism<sup>(11, 13)</sup>

รังสีแกมมาขนาดปริมาณสูงสามารถยับยั้งการงอกได้จากสมมติฐานหรือสาเหตุดังนี้



1. จากการทดลองเดียวกันของ Lokesh และคณะในปี 1992 พบว่าที่รังสีที่ปริมาณสูงขึ้นคือ มากกว่า 300 เกรย์ จะเกิดผลยับยั้งการงอกโดยสมบูรณ์ โดยให้เหตุผลของการยับยั้งดังนี้ (11, 13)

a) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงอย่างมากกับโครงสร้างสัณฐานและโครงสร้างของเซลล์

b) เกิดการเสียหายหรือรบกวนโครงสร้างของชั้นเยื่อเมล็ดหรือชั้นหุ้มของเมล็ด ซึ่งเป็นไปตามปริมาณของขนาดรังสีที่ได้รับ

c) เกิดการเสียหายของระบบ mitosis หรือเกิดการยับยั้งการแบ่งเซลล์ที่บริเวณ meristematic zone

2. เกิดจากอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างขึ้นในเมล็ดที่ได้รับรังสี

มีงานวิจัยหลายงานวิจัยที่เชื่อว่าการยับยั้งการงอกของเมล็ดนั้นเกิดจากอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างขึ้นในเมล็ด ยกตัวอย่างเช่นงานวิจัยของ Kumagai และคณะในปี 2000 ที่ทำการศึกษาถึงกลไกการยับยั้งการงอกของเมล็ด *Arabidopsis thaliana* ที่เกิดจากการได้รับรังสีแกมมา ซึ่งจากการศึกษาพบว่า เมล็ด *Arabidopsis thaliana* กลุ่มที่ไม่ได้รับรังสีและได้รับรังสีขนาด 1 กิโลเกรย์ สามารถงอกได้หมดภายใน 5 วัน แต่กลุ่มที่ได้รับรังสีในปริมาณที่สูงคือ 10 กิโลเกรย์ ไม่สามารถงอกได้เลย โดยจากการตรวจวิเคราะห์กลุ่มที่ได้รับรังสีปริมาณ 1 กิโลเกรย์ จะพบอนุมูลอิสระชนิด long-lived แต่กลุ่ม 10 กิโลเกรย์ จะพบอนุมูลอิสระจำนวนที่มากกว่าและพบได้ 2 ชนิดคือ ชนิด long-lived และ super-long-lived เมื่อเมล็ดได้รับการสัมผัสน้ำเพื่อทำการงอก พบว่าอนุมูลอิสระชนิด long-lived ลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 1 ชั่วโมง ก่อนที่กระบวนการงอกจะเกิดขึ้น ในขณะที่อนุมูลอิสระชนิด super-long-lived ที่พบได้ในกลุ่ม 10 กิโลเกรย์ ก็ลดลงได้เช่นกันแต่ลดลงในอัตราที่ช้าและยังคงเหลืออยู่ ทำให้เชื่อได้ว่าอนุมูลอิสระนี้เป็นสาเหตุสำคัญในการยับยั้งกระบวนการงอกของกลุ่มที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณ 10 กิโลเกรย์ (11, 14)

มีผลการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับผลของรังสีแกมมาต่อการงอกของเมล็ดพืชชนิดต่าง ๆ ดังตารางที่ 2

ตาราง 2 แสดงผลของรังสีแกมมาต่อการงอกของเมล็ดพืชชนิดต่าง ๆ

พืช	ส่วนที่ใช้	ปริมาณของรังสี (เกรย์)	ผล
Fennel ( <i>Foeniculun vulgare Mill.</i> )	Seeds	20-500	20 เกรย์ เพิ่มการงอกได้ 2% 500 เกรย์ เพิ่มการงอกได้ 0.7%
Rice ( <i>Oryza sativa L.</i> )	Seeds	150-300	การงอกลดลงจาก 100% เหลือ 97.2%
Maize ( <i>Zea mays</i> )	Seeds	150-1000	240 เกรย์ งอกได้ 90%
Okra ( <i>Abelmosxhus esculentus</i> )	Seeds	150-1000	170 เกรย์ งอกได้ 70%
Groundnut ( <i>Arachis hypogeal L.</i> )	Seeds	150-1000	300 เกรย์ งอกได้ 58%
Long bean ( <i>Vinna sesquipedalis</i> )	Seeds	300-800	400 เกรย์ การงอกเพิ่มขึ้น 70.56% 800 เกรย์ ไม่มีการงอก
Tomato ( <i>Lycopersicon esculentum cv</i> )	Seeds	300-800	800 เกรย์ การงอกลดลงจาก 88% เหลือ 48.70%
Snap bean ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Seeds	300, 400, 500 600 และ 800	การงอกลดลงจาก 75.56% เหลือ 51.11% และ 800 เกรย์ ไม่มีการ งอก
<i>Atropa belladonna</i>	Seeds	20-110	110 เกรย์ การงอกเพิ่มขึ้น จาก 21.18% เป็น 93.33%
Chilli ( <i>Capsicum annuum</i> )	Seeds	300, 400, 500, 600 และ 800	การงอกลดลงจาก 42.22% เหลือ 15.56% และ 800 เกรย์ ไม่มีการ งอก
Wheat ( <i>Triticum aestivum L.</i> )	Seeds	100-400	%การงอกลดลงจาก 8.8% ที่ 100 เกรย์ เหลือ 5.5% ที่ 400 เกรย์
Corn ( <i>Zea mays L.</i> )	Seeds	100, 300, 500	100 เกรย์ การงอกลดลงจาก 50% เหลือ 30%

ที่มา: ดัดแปลงจาก Jan S. (2012). Effect of gamma radiation on morphological, biochemical and physiological aspects of plants and plant products. Environ Rev. 20: 20-21

## 5.2 ผลของรังสีแกมมาต่อการเจริญและการพัฒนาของพืช

การให้รังสีแกมมาต่อเมล็ดพืชพบว่าจะส่งผลกระทบต่อการเจริญของพืช โดยรังสีแกมมาสามารถทำให้เกิดผลในการกระตุ้นลักษณะพื้นฐานของพืช และยังสามารถเพิ่มผลผลิตในแง่ต่าง ๆ เช่นในแง่ของการเจริญเติบโตนั้นมีตัวอย่างว่าสามารถเพิ่มความสูงของพืชได้ ในแง่ของความสำเร็จในการสืบพันธุ์มีตัวอย่างว่าสามารถเพิ่มการเกิดเมล็ดได้ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มความสามารในการทนต่อความแห้งแล้งได้เป็นต้น<sup>(11)</sup>

ในปี 1957 Gunkel ได้แสดงลักษณะพื้นฐานผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นจากการได้รับรังสีดังนี้<sup>(15)</sup>

### 1) ผลที่เกิดต่อลำต้น (stems)

พบว่าลักษณะทั่วไปที่พบได้้นอกจากการกระตุ้นให้เกิดลักษณะแคระแกร็น การเพิ่มจำนวนของกิ่งก้านแล้วยังพบลักษณะต่าง ๆ ดังนี้

- fasciation คือลักษณะอาการที่ส่วนของพืชมีรูปร่างทรงกระบอก เช่นลำต้นเปลี่ยนเป็นรูปร่างแบน และแผ่กว้างออกเหมือนกับมีการเชื่อมติดกันของลำต้นหลาย ๆ ต้น เป็นลักษณะทั่วไปที่พบได้หลังจากได้รับรังสีสำหรับพืชบางชนิด

- เกิดการเปลี่ยนแปลงของ phyllotaxis หรือรูปแบบการเรียงตัวของใบบนลำต้นพืช

- ลักษณะบวมเฉพาะที่ของลำต้น (intumescence)

- การเพิ่มจำนวนของเนื้อเยื่อลำเลียง (vascular tissue) มากขึ้น

- การเกิดเนื้อเยื่อเจริญพิเศษ (adventitious tissue) และก้อนเนื้ออก (tumor)

### 2) ผลที่เกิดต่อดอก (flowers)

- การเพิ่มจำนวนของก้านดอก (floral stalks)

- การเพิ่มความหนา

- การเกิด fasciation

- การชะลอหรือการลดการเกิดจำนวนดอก

- การเพิ่มจำนวนดอก

- การเปลี่ยนสีของดอก
- เกิดการร่วงหล่นของดอก
- เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบ จำนวนของกลีบดอกและเกสรตัวผู้
- การเพิ่มโอกาสการเป็นหมัน

### 3) ผลที่เกิดต่อราก (roots)

- มีโอกาสเกิดการยับยั้งหรือกระตุ้นการเจริญของรากได้ขึ้นอยู่กับขนาดความแรงของรังสีที่ได้รับ โดยส่วนใหญ่ถ้าได้รับขนาดความแรงของรังสีสูงจะเกิดการยับยั้ง
- มีโอกาสเกิดรากพิเศษ (adventitious root) ซึ่งเป็นรากที่งอกออกตามข้อลำต้น โดยการเกิดรากพิเศษนี้มักจะเกิดได้ในกรณีที่เกิดอาการบวมของลำต้น

### 4) ผลที่เกิดต่อใบ (leaves)

ใบของพืชที่ได้รับรังสีส่วนใหญ่แล้วมักจะถูกกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีรูปแบบและลวดลายของใบ หรือเกิดก้อนเนื้อได้ในบริเวณที่ได้รับคามเสียหาย นอกจากนี้ยังมีลักษณะอื่น ๆ ที่มีโอกาสเกิดและเห็นได้ชัดเจนเช่น การเพิ่มจำนวนของขนใบ เกิดลักษณะของแผ่นใบมีรูปร่างไม่เรียบสม่ำเสมอ เกิดการหลุดร่วงของใบก่อนที่จะโตเต็มที่

การชะลอหรือยับยั้งการเจริญของพืชพบว่ามีความสัมพันธ์กับ metabolism และ action ของ auxins โดยสามารถบ่งชี้ได้ว่า ionizing radiation สามารถลดระดับปริมาณของ auxins และหรือ ลดความไวของเซลล์ต่อ auxins ร่วมด้วย โดยการลดระดับปริมาณของ auxins นั้นอาจเกิดจากการสลายตัวของ auxins โดยตรง หรืออาจเกิดจากการไปเปลี่ยนแปลง enzyme activity ของกระบวนการ biosynthesis หรือ metabolism ของ auxins พืชแต่ละชนิดจะมีกลไกอย่างไรจำเป็นต้องทำการศึกษาวิจัย ยกตัวอย่างเช่นงานวิจัยของ Miyuki Momiyama และคณะ ทำการศึกษาโดยการให้รังสีกับเมล็ดข้าวโพดที่กำลังงอก พบว่าเมื่อผ่านไปเป็นเวลา 3 วัน พืชที่ได้รับรังสีแกมมาในขนาดต่ำกว่า 1 กิโลเกรย์ จะเห็นผลการยับยั้งการเจริญของ coleoptiles แบบชั่วคราว จากการทดลองศึกษาถึงกลไกที่รังสีแกมมาสามารถกระตุ้นให้เกิดการยับยั้งการเจริญแบบชั่วคราวนี้พบว่า ความไวของ cell coleoptiles ต่อ auxins (indole-3-acetic acid หรือ IAA) ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับกลุ่ม control แต่พบว่าเกิดจากระดับของ IAA ที่บริเวณปลาย coleoptiles ลดลง ซึ่งทำการศึกษาต่อว่าการลดลงนี้เกิดจากกลไกอะไร พบว่ารังสีแกมมาจะทำให้ IAA ที่อยู่ในรูปสารละลายสลายตัวได้อย่างชัดเจน แต่ IAA ที่อยู่ในเนื้อเยื่อพืชคือบริเวณปลาย coleoptiles นั้นไม่เปลี่ยนแปลง และพบด้วยว่ารังสีแกมมาไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ IAA ในรูปแบบของ free IAA เป็น conjugated IAA ซึ่งทำให้สรุปผลการศึกษาว่า สาเหตุที่ทำให้

ให้ระดับของ IAA ลดลงนั้นน่าจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ IAA biosynthesis หรือกระบวนการ catabolism<sup>(16)</sup>

### 5.3 ผลของรังสีแกมมาต่อ oxidative stress และ ระบบป้องกัน (antioxidant)

พืชมักต้องเผชิญกับสิ่งทำลายของสภาวะแวดล้อมและสภาวะกดดันต่าง ๆ เช่น ความแห้งแล้ง ความเค็ม สภาวะอุณหภูมิต่ำ และรังสี ซึ่งทั้งหมดนี้จะส่งผลต่อการเจริญและการพัฒนาของพืช

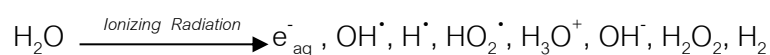
รังสีแกมมาจะเหนี่ยวนำให้เกิด oxidative stress จากการก่อให้เกิดการสร้างอย่างมากของ reactive oxygen species (ROS) เช่น superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ) และ hydroxyl radical ( $OH^{\cdot}$ ) เป็นต้น สารเหล่านี้จะไปทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชันของสารอินทรีย์ได้แก่โปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์<sup>(11)</sup>

ผลของการเกิด oxidative stress ที่สำคัญประการหนึ่งคือการทำลายให้เสียหายโดย hydroxyl radical ซึ่ง ionizing radiation (รังสีแกมมา) จะทำให้เกิด hydroxyl radical ได้ 2 ทาง คือ

1) เกิดได้โดยตรงจากไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับโมเลกุลของน้ำ เรียกว่าเกิดปฏิกิริยา water radiolysis

2) เกิดได้โดยอ้อมจากกระบวนการเกิด ROS

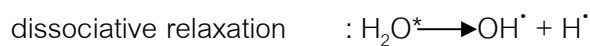
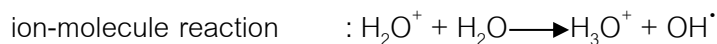
Water radiolysis<sup>(17)</sup> เป็นปฏิกิริยาที่รังสีจะเข้าไปทำอันตรกิริยาโดยตรงกับโมเลกุลของน้ำที่มีอยู่ในร่างกาย อันตรกิริยาหลักที่เกิดขึ้นคือ excitation และ ionization ได้ผลิตภัณฑ์เป็น ionized water molecules ( $H_2O^+$ ) และ hydrogen radical ( $H^{\cdot}$ ) และ  $OH^{\cdot}$  รวมทั้ง  $H_2O_2$  ซึ่งสามารถเขียนได้ดังสมการ



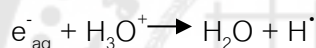
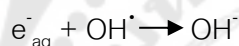
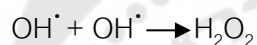
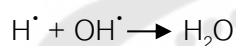
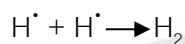
กลไกการเกิดจะแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ

1) Physical stage ใช้เวลาประมาณ 1 femtosecond พลังงานของรังสีกระทบกับโมเลกุลของน้ำทำให้เกิดโมเลกุลของน้ำที่อยู่ในสภาวะถูกกระตุ้นเรียกว่า excited water molecules ( $H_2O^*$ ) และโมเลกุลของน้ำเกิดการแตกตัวเป็นไอออนได้เป็น ionized water molecules ( $H_2O^+$ ) และ sub-excitations electrons ( $e^-$ )

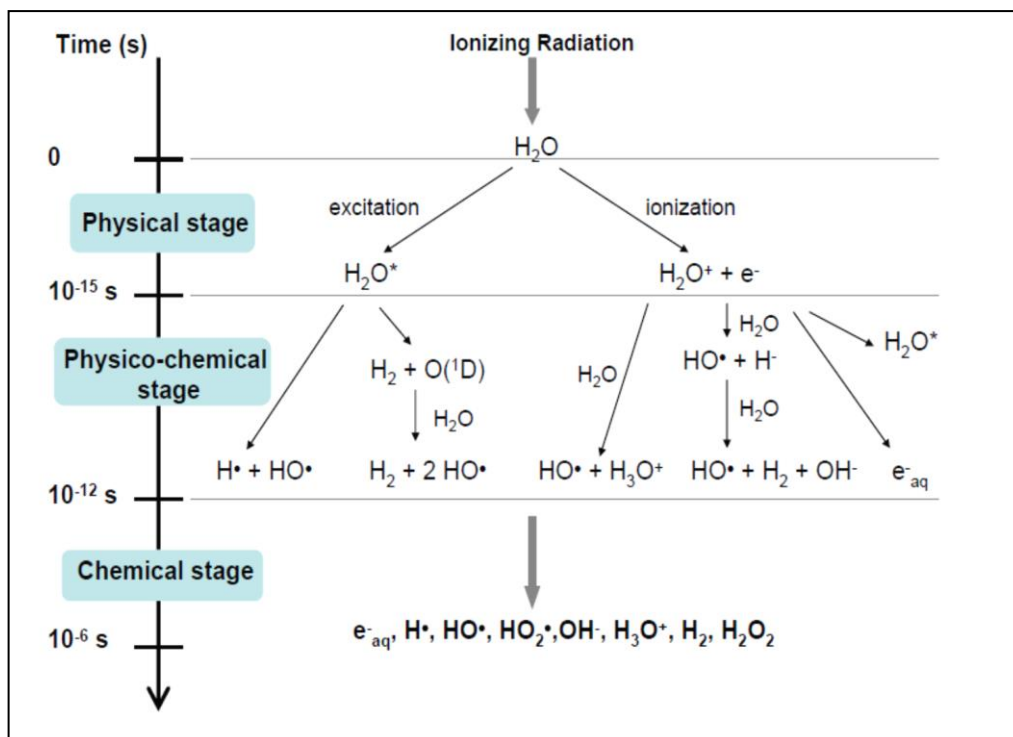
2) Physic-chemical stage ใช้เวลาประมาณ  $10^{-15}$ - $10^{-12}$  s เป็นระยะที่เกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องตามมาที่สำคัญคือ



3) chemical stage ใช้เวลาประมาณ  $10^{-12}$ - $10^{-6}$  s สารต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในระยะที่ 2 จะเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องโดยทำปฏิกิริยากันเองและทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ละลายอยู่ ปฏิกิริยาที่สำคัญเช่น



ปริมาณของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น พลังงานของรังสี หรือค่า pH กลไกทั้ง 3 ขั้นตอนนี้แสดงดังภาพที่ 2<sup>(17)</sup>



ภาพประกอบ 2 ภาพแสดงกลไกการเกิด water radiolysis

ที่มา: Le Caer S. (2011). Water Radiolysis: Influence of oxide surfaces on  $H_2$  production under ionizing radiation. *Water*. 3: 239

นอกจาก  $OH\cdot$  ที่เกิดโดยตรงจากปฏิกิริยา water radiolysis จะเห็นว่ามีปฏิกิริยาต่อเนื่องที่เกิดขึ้นซึ่งทำให้เกิด ROS ตัวอื่นตามมา โดยตัวที่สำคัญที่สุดคือ  $H_2O_2$  เนื่องจากสามารถเกิดปฏิกิริยาต่อทำให้เกิด  $OH\cdot$  ได้อีก

ปริมาณและอัตราการเกิด ROS นั้นจะถูกควบคุมโดยระบบ antioxidant ในเซลล์ ซึ่งในเซลล์พืชจะมีระบบ antioxidant แบบ enzymatic และ non-enzymatic โดย enzymatic antioxidant ที่สำคัญคือ superoxide dismutase (SOD), peroxidase, catalases (CAT) และ glutathione reductase เป็นต้น ส่วน non-enzymatic antioxidant ที่สำคัญได้แก่ Glutathione (GSH), L-ascorbic acid, tocopherols carotenoids และ สารกลุ่ม phenolic compound เช่น anthocyanins, flavonoids, isoflavonoids, tannins, coumarins เป็นต้น

#### 5.4 ผลของรังสีแกมมาต่อ bioactive agent

จากงานวิจัยต่าง ๆ เกี่ยวกับผลของรังสีแกมมาต่อสารสำคัญของพืช พบว่ามีการทดลองหลายรูปแบบเริ่มตั้งแต่ตัวอย่างพืชที่ใช้ก็มีหลายชนิดเช่น ตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้งรูปแบบ callus และ plantlet ตัวอย่างเมล็ดพืช ตัวอย่างที่เป็นส่วนยอดของพืช เป็นต้น จุดประสงค์ของการใช้รังสีแกมมาในการทดลองอาจจะใช้เพื่อเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารสำคัญ หรือใช้เป็นการทำลายเพื่อดูสารสำคัญที่เกิดขึ้นในพืชที่มีการกลายเกิดขึ้น

ผลการตอบสนองพบว่าเนื่องจากรังสีมีกลไกหลักทำให้เกิด oxidative stress เกิดขึ้นทำให้ส่วนใหญ่แล้วเมื่อพืชได้รับรังสี จะตอบสนองโดยใช้ระบบ antioxidant ของพืช ซึ่งส่วนหนึ่งที่สำคัญคือการสร้างสารที่มีคุณสมบัติเป็น non-enzymatic antioxidant มากำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น ดังนั้นจึงมีโอกาสที่จะเห็นสารกลุ่มนี้เกิดขึ้น ซึ่งสารที่มีคุณสมบัติเป็น non-enzymatic antioxidant ได้แก่ Glutathione (GSH), L-ascorbic acid, tocopherol carotenoids และ สารกลุ่ม phenolic compound เช่น anthocyanins, flavonoids, isoflavonoids, tannins, coumarins เป็นต้น สำหรับสารที่ไม่มีฤทธิ์เป็น antioxidant โดยตรง เช่น alkaloid อาจจะถูกสร้างขึ้นได้เพื่อตอบสนองต่อความเครียดอื่น ๆ ที่เกิดขึ้น หรืออาจจะถูกสร้างขึ้นเพื่อปกป้องไม่ให้เซลล์ถูกทำลายจาก by product ที่ได้จากกระบวนการต้านออกซิเดชัน ทั้งนี้ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับผลของรังสีแกมมาต่อ bioactive agent มีดังนี้

1) B.Y. Chung และคณะ ทำการศึกษาผลของรังสีแกมมา ต่อการสร้างสารสำคัญ shikonin ในเซลล์เพาะเลี้ยงของพืช *Lithospermum erythrorhizon* S. โดยทำการฉายรังสีแกมมาให้กับ callus ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนรากของพืชที่ปริมาณรังสี 0, 12, 16 และ 32 เกรย์ จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงในรูปแบบ suspension culture ใน bioreactor และวัดสารสำคัญ shikonin ที่ผลิตได้ พบว่ากลุ่มที่ได้รับรังสีขนาดปริมาณ 16 เกรย์ สามารถผลิต shikonin ได้มากที่สุดคือ 4 เท่าของกลุ่ม control รองลงมาคือกลุ่ม 2 เกรย์ ได้ 2.4 เท่า และ กลุ่ม 32 เกรย์ ได้ 1.8 เท่า สอดคล้องกับผลของการวัดค่า enzyme activity ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง shikonin คือ รังสีแกมมาทำให้ enzyme activity ของ PHB geranyltransferase เพิ่มขึ้น และทำให้ enzyme activity ของ PHB glucosyltransferase เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ซึ่งการเพิ่มขึ้นและลดลงของเอนไซม์ทั้งสองตามลำดับจะทำให้มีการสร้าง shikonin ได้สูง สามารถสรุปได้ว่ารังสีแกมมาสามารถช่วยเพิ่มการสร้าง shikonin ได้อย่างมีประสิทธิภาพ<sup>(18)</sup>

2) Min Young Kim และคณะ ทำการศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพืช ส้มที่ถูกเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์โดยรังสีแกมมา โดยนำส่วนยอดของพืช *Citrus unshiu* Marc. cv.



Miyagawa อายุ 1 ปี ทำการฉายรังสีที่ปริมาณ 120 เกรย์ จากนั้นนำยอดที่ผ่านการฉายรังสีและไม่ได้ฉายรังสีไปทาบบนกิ่งของต้น *C. aurantium* L. ที่อายุ 1 ปี เช่นกัน เลี้ยงให้เจริญเต็มที่และเก็บผลทำการตรวจวิเคราะห์สารสำคัญที่เปลือกและเนื้อผล ซึ่งผลส้มที่ได้จะมีการแบ่งเป็นกลุ่มตามลักษณะการกลายได้ 4 กลุ่ม โดยพบว่าปริมาณสาร flavonoids ได้แก่ naringin, hesperidin, narirutin และ rutin ในเนื้อและเปลือกของผลส้มที่มีลักษณะกลายจะสูงกว่ากลุ่ม control ยกเว้นเฉพาะปริมาณ rutin ของกลุ่มการกลายที่ 1 และ 3 จะมีปริมาณน้อยกว่ากลุ่ม control<sup>(19)</sup>

3) Sumira Jan และคณะ ทำการศึกษารวมผลของรังสีแกมมาต่อการเจริญและการสร้างสาร psoralen ของพืช *Psoralea corylifolia* L. โดยทำการฉายรังสีให้กับเมล็ดที่ปริมาณ 2.5, 5, 10, 15 และ 20 กิโลเกรย์ จากนั้นนำไปเลี้ยงให้เจริญ แล้ววัดค่าความสูง plant biomass ขนาดของใบ จำนวนใบ จำนวนกิ่ง จำนวนเมล็ด น้ำหนักของเมล็ด 100 เมล็ด ที่ 3 ระยะคือ ระยะ pre flowering (45 วัน) ระยะ flowering (90 วัน) และระยะ post flowering (135 วัน) รวมทั้งวัดปริมาณสารสำคัญ psoralen ที่ใบและราก ทั้ง 3 ระยะ และสุดท้ายวัดปริมาณสารในเมล็ด พบว่าในกลุ่มที่ได้รับปริมาณของรังสีในขนาดต่ำคือ 2.5, 5 และ 10 กิโลเกรย์ จะมีผลในการกระตุ้นการเจริญ ส่วนในขนาดปริมาณที่สูงคือ 15 และ 20 กิโลเกรย์ การเจริญจะลดลง ส่วนปริมาณสารสำคัญ psoralen พบว่าปริมาณจะสูงที่สุดในกลุ่ม 20 กิโลเกรย์ คือ 7.56% เมื่อเทียบกับกลุ่ม control ที่ 0.23%<sup>(20)</sup>

4) M.S.Abdel-Hady และคณะ ทำการศึกษารวมผลของรังสีแกมมาและ gibberellic acid ต่อการงอกและการสร้างสาร alkaloid ของพืชที่เจริญขึ้นมาในรุ่นที่ 1 และรุ่นที่ 2 โดยนำเมล็ดมาฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณ 0, 50, 110 และ 150 เกรย์ จากนั้นนำแต่ละกลุ่มไปจุ่มแช่ในสารละลาย gibberellic acid ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 มิลลิกรัม/ลิตร ทำการวัดค่า %การงอก เป็นค่า %การงอกของ M1 generation นำเมล็ดที่ได้จากพืช M1 ที่มี phenotype 2 แบบ คือ เมล็ดสีแดง (เป็นลักษณะกลาย) และเมล็ดสีดำ (ลักษณะปกติ) มาจุ่มแช่ใน gibberellic acid ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร วัดค่า %การงอกของ M2 generation จากนั้นทำการวัดปริมาณ alkaloid จากใบแห้งของพืช M1 (กลุ่ม control) เทียบกับ M1กลุ่มที่มีลักษณะกลายของลักษณะทางสัณฐาน และ M2 (กลุ่ม control) เทียบกับ M2 ที่มีลักษณะกลายของลักษณะทางสัณฐาน เช่นเดียวกัน พบว่าการงอกของเมล็ดเพิ่มขึ้นตามปริมาณของรังสีจนสูงสุดที่ปริมาณ 110 เกรย์ และจะเริ่มลดลงที่ปริมาณรังสี 150 เกรย์ ส่วนการงอกของ M2 พบว่าเมล็ดสีแดงซึ่งเป็นลักษณะกลายจะดีกว่าเมล็ดสีดำซึ่งเป็นสีปกติทำให้สามารถแก้ปัญหาการงอกของเมล็ดได้ พบว่า

ปริมาณ alkaloid ของพืชที่มีลักษณะกลายของทั้ง M1 และ M2 จะมีปริมาณสูงกว่ากลุ่ม control ของแต่ละรุ่นประมาณ 2 เท่า<sup>(21)</sup>

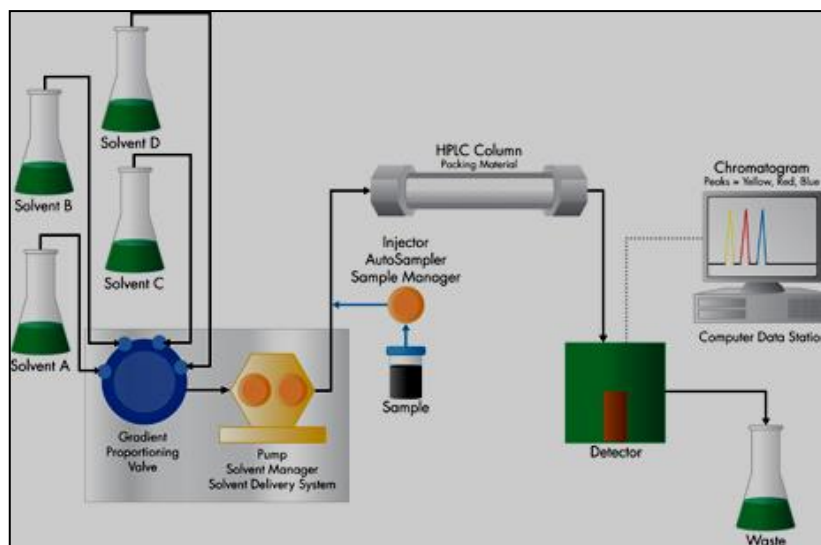
## 6. HPLC (High performance liquid chromatography)

### 6.1 หลักการทำงานของเครื่อง HPLC

HPLC (High performance liquid chromatography) เป็นคำที่ใช้เรียกทั้งชื่อเครื่องมือและเทคนิคการวิเคราะห์ ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ สามารถวิเคราะห์สารหลายชนิดที่ผสมกันได้พร้อมกัน โดยอาศัยหลักการของโครมาโตกราฟี ประกอบด้วยเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นของเหลวพาสารเข้าสู่เฟสนิ่ง (stationary phase) ซึ่งเรียกว่าคอลัมน์ อาศัยความชอบจับกับ mobile phase และ stationary phase ได้ต่างกัน ส่งผลให้สารเคลื่อนที่ออกจาก stationary phase ได้ต่างกัน ทำให้เกิดการแยกชั้น โดยในการวิเคราะห์ต้องสามารถแยกสารผสมออกจากกันอย่างสมบูรณ์ และสารแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่เข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector) ตามลำดับ โดยจะแสดงผลเป็นกราฟความสัมพันธ์ของเวลา (แกนนอน) กับสัญญาณทางไฟฟ้า (แกนตั้ง) เรียกว่าโครมาโตแกรม<sup>(22)</sup>

### 6.2 องค์ประกอบของ HPLC

องค์ประกอบหลักของเครื่อง HPLC แสดงดังภาพที่ 3



ภาพประกอบ 3 ภาพแสดงองค์ประกอบหลักของเครื่อง HPLC

ที่มา: Waters. Isocratic and gradient LC system operation. Retrieved October 19, 2017, from URL: [http://www.waters.com/waters/en\\_US/Identifying-and-Quantitating-Compounds/nav.htm?cid=10049064&locale=101](http://www.waters.com/waters/en_US/Identifying-and-Quantitating-Compounds/nav.htm?cid=10049064&locale=101)

6.2.1 สารละลายตัวชะ (mobile phase) เป็นสารละลายที่ใช้ในการพาสารให้เคลื่อนที่ มีความสำคัญต่อระบบ HPLC มาก เป็นส่วนที่มีผลกระทบต่อการแยกโดยตรง สารละลายที่ใช้นี้ได้แก่ organic solvent และ aqueous solution ซึ่งอาจจะเป็นน้ำ สารละลายบัฟเฟอร์ หรือ สารละลายเกลือก็ได้ องค์ประกอบและอัตราส่วนของสารละลายมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับระบบหรือแบบของการแยก

6.2.2 เครื่องสูบล (pump) เป็นส่วนของเครื่องมือที่ทำหน้าที่ดูดสารละลายตัวชะจากภาชนะบรรจุเข้าสู่ระบบ คือส่วนฉีดสาร คอลัมน์ ส่วนตรวจวัด และผ่านท่อทิ้งสารลงขวดทิ้งสาร โดยจะควบคุมการเคลื่อนที่ของสารละลายตัวชะในอัตราเร็วที่กำหนด โดยอาจจะเป็นระบบ isocratic elution ที่อัตราส่วนของสารละลายตัวชะจะคงที่ตลอดเวลา หรือจะเป็นการทำงานในแบบ gradient elution ที่จะมีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของสารละลายตัวชะตามเวลาที่กำหนด

6.2.3 ระบบฉีดสาร (injector) ทำหน้าที่ฉีดตัวอย่างเข้าระบบสู่คอลัมน์

6.2.4 คอลัมน์ (stationary phase) มีลักษณะเป็นแท่งหรือท่อ โดยมีเฟสคงที่บรรจุอยู่ภายใน ซึ่งคอลัมน์นี้เป็นส่วนสำคัญในการทำให้เกิดการแยกของสารผสมตามหลักการโครมาโตกราฟี

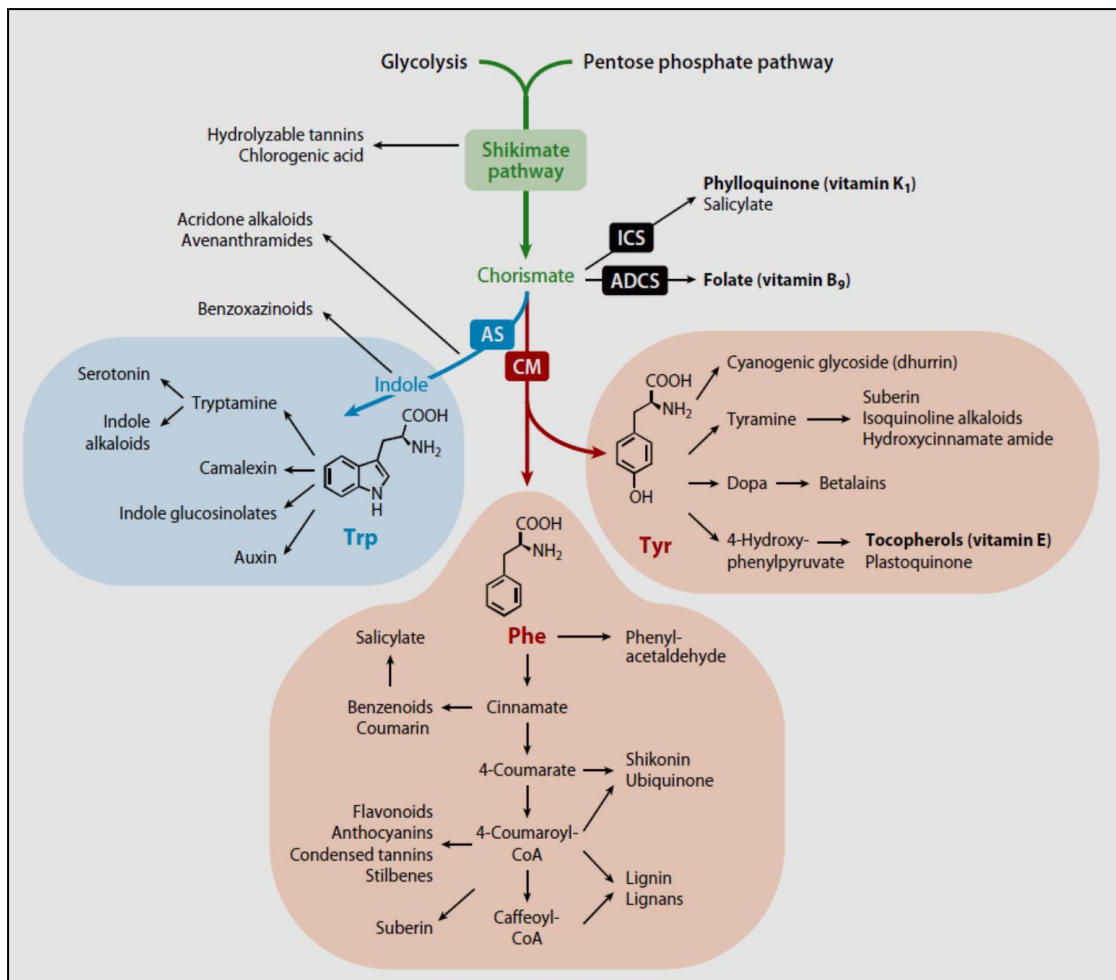
6.2.5 ส่วนตรวจวัด (detector) เป็นอุปกรณ์ของระบบที่ต่อกับส่วนปลายของคอลัมน์เพื่อรองรับของเหลวที่ออกมาจากคอลัมน์ โดยตรวจวัดสัญญาณของแต่ละสารที่ออกมาก่อนเข้าสู่ระบบประมวลข้อมูล และปรากฏเป็นโครมาโตแกรมของแต่ละสาร โดยเครื่องตรวจวัดที่ใช้กับ HPLC มีหลายชนิด เช่น

เครื่องตรวจวัดชนิดอัลตราไวโอเลตวิสิเบิล เป็นเครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้มากที่สุด วัดการดูดกลืนแสงของสารในช่วงยูวีและวิสิเบิล โดยปัจจุบันนี้มีชนิดที่เรียกว่า diode array detector (DAD) สามารถกำหนดค่าความยาวคลื่นของแสงได้ไม่จำกัด สามารถสแกนยูวีและแสดงสเปกตรัมเป็นภาพสามมิติ นอกจากนี้ก็มีเครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ เครื่องตรวจวัดชนิดอิเล็กโทรเคมีคัล เครื่องตรวจวัดชนิดรีแฟรคโตมิเตอร์ และเครื่องตรวจวัดชนิดแมสสเปกโตรเมตรี เป็นต้น

## 7. กระบวนการสังเคราะห์ L-DOPA ในพืช

กระบวนการสังเคราะห์ L-DOPA ในพืชเกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์ที่สำคัญคือ aromatic amino acid biosynthesis pathway ซึ่งเป็นกระบวนการสังเคราะห์ aromatic amino acid ที่สำคัญของพืชสามชนิด คือ L-tryptophan, L-phenylalanine และ L-tyrosine ซึ่งสารสำคัญทั้งสามชนิดนั้นนอกจากจะใช้เป็นส่วนประกอบสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีนแล้ว ยังใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารประกอบทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งเป็นสารที่มีความจำเป็นต่อพืชสำหรับการเจริญและการป้องกันพืชจากสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ตัวอย่างสารประกอบทุติยภูมิที่มีการสร้างมาจากสาร aromatic amino acid เช่น alkaloids, flavonoid, lignin, lignan เป็นต้น รวมทั้งสาร L-DOPA ที่มี L-tyrosine เป็นสารตั้งต้นด้วย<sup>(23)</sup>

กระบวนการสังเคราะห์ aromatic amino acid นี้สามารถแบ่งออกได้เป็นสองขั้นตอนคือ ขั้นตอนหนึ่ง เป็นกระบวนการ shikimate pathway ซึ่งกระบวนการนี้จะทำให้ได้สารตั้งต้นคือ chorismate และขั้นตอนที่สอง สารตั้งต้น chorismate เกิดกระบวนการต่อไปได้สาร L-tryptophan, L-phenylalanine และ L-tyrosine<sup>(23, 24)</sup> ทั้งนี้ภาพที่ 4<sup>(23)</sup> จะแสดงขั้นตอนการสังเคราะห์สาร aromatic amino acid และสารประกอบทุติยภูมิต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น

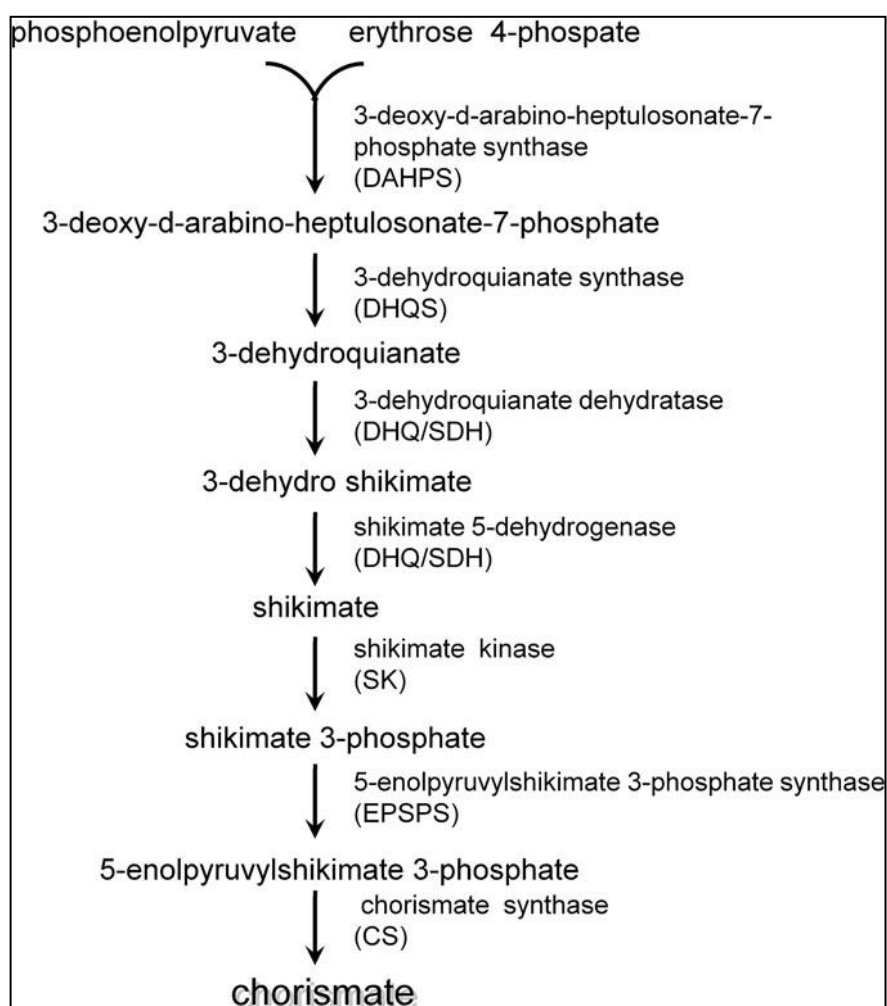


ภาพประกอบ 4 ภาพแสดงกระบวนการสังเคราะห์สาร aromatic amino acid และสารประกอบทุติยภูมิต่าง ๆ

ที่มา : Maeda H. (2012). The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 63: 75

กระบวนการ shikimate pathway เป็นกระบวนการที่นำเอาสารตั้งต้นคือ phosphoenolpyruvate จากกระบวนการ glycolysis และสารตั้งต้น erythrose 4-phosphate จากกระบวนการ pentose phosphate pathway มาทำปฏิกิริยากันโดยอาศัยเอนไซม์ตัวแรกคือ 3-Deoxy-D-Arabetulosonate 7-Phosphate (DAHP) Synthase ได้เป็นสาร DAHP จากนั้นเกิดปฏิกิริยาโดยอาศัยเอนไซม์เป็นตัวเร่งอีก 6 ขั้นตอน โดยเอนไซม์ตัวสุดท้ายคือ chorismate synthase ซึ่งจะทำให้การเปลี่ยน 5-Enolpyruvylshikimate 3-phosphate (EPSP) ได้

เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ chorismate ทั้งนี้ในระหว่างกระบวนการมีสารตัวหนึ่งที่เกิดขึ้นคือ shikimate จึงเรียกกระบวนการนี้ว่า shikimate pathway<sup>(23)</sup> โดยขั้นตอนทั้ง 7 ขั้นตอนของกระบวนการนี้แสดงดังภาพที่ 5<sup>(25)</sup>

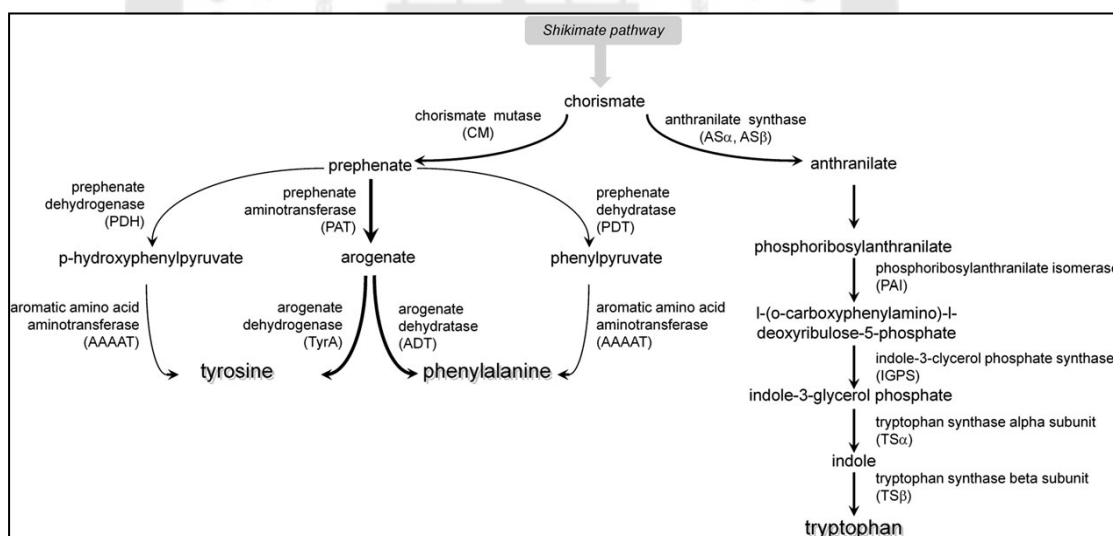


ภาพประกอบ 5 ภาพแสดงกระบวนการ shikimate pathway

ที่มา: Tzin V. (2010, Nov). New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Molecular Plant*. 3(6): 957

สารตั้งต้น chorismate จะเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องเพื่อเปลี่ยนเป็นสาร aromatic amino acid โดยแบ่งออกเป็น 2 สายใหญ่ คือ สายของการสร้าง tryptophan และสายของการสร้าง

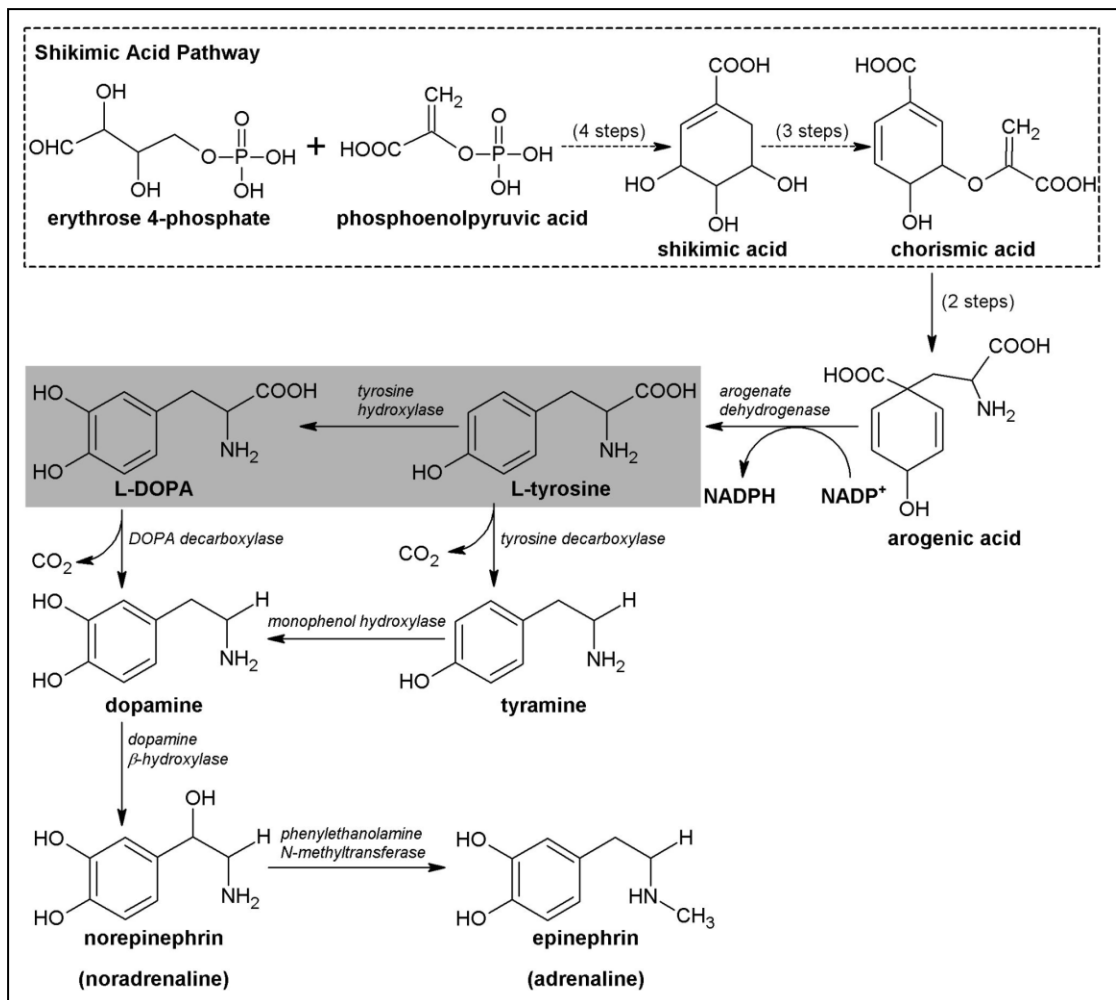
tyrosine กับ phenylalanine การสร้าง tryptophan นั้น chorismate จะถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ตัวแรกคือ anthranilate synthase ได้เป็น anthranilate จากนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงอีก 5 ขั้นตอน จนได้เป็น tryptophan สำหรับการสร้าง tyrosine กับ phenylalanine นั้นจะอยู่ในสายใหญ่เดียวกัน โดยเริ่มจาก chorismate จะถูกเอนไซม์ chorismate mutase (CM) เปลี่ยนให้เป็น prephenate จากนั้น prephenate จะถูกเอนไซม์ prephenate aminotransferase (PAT) เปลี่ยนให้เป็น arogenate ซึ่ง arogenate นี้จะถูกเปลี่ยนแปลงต่อโดยสามารถเปลี่ยนเป็น tyrosine โดยเอนไซม์ arogenate dehydrogenase หรือถูกเปลี่ยนเป็น phenylalanine โดยเอนไซม์ arogenate dehydratase<sup>(23, 25)</sup> สำหรับการสร้าง tyrosine ในพืชชั้นนี้ มีรายงานว่าพืชส่วนใหญ่จะสร้าง tyrosine โดยอาศัยเอนไซม์ arogenate dehydrogenase ตามกระบวนการที่กล่าวมานี้ แต่ก็มีพืชบางชนิด เช่น *Glycine max* และ *Medicago truncatula* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Leguminosae จะสร้าง tyrosine จากอีกทางหนึ่ง คืออาศัยเอนไซม์ prephenate dehydrogenase เป็นตัวสำคัญที่จะเปลี่ยน prephenate เป็น p-hydroxyphenylpyruvate ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น tyrosine ต่อไป<sup>(26)</sup> กระบวนการสร้าง aromatic amino acid นี้แสดงดังภาพที่ 6<sup>(25)</sup>



ภาพประกอบ 6 ภาพแสดงกระบวนการสร้าง tryptophan, tyrosine และ phenylalanine จาก chorismate

ที่มา: Tzin V. (2010). New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Molecular Plant*. 3(6): 957

จากกระบวนการ shikimic acid pathway (shikimate pathway) จะได้สารตั้งต้นคือ chorismic acid (chorismate) สารตั้งต้นนี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงต่อจนได้ L-tyrosine ตามที่กล่าวมา ซึ่ง L-tyrosine นี้จะถูกเอนไซม์ tyrosine hydroxylase เปลี่ยนแปลงเป็น L-DOPA ในที่สุด<sup>(27)</sup> กระบวนการเกิด L-DOPA นี้แสดงดังภาพที่ 7<sup>(27)</sup>



ภาพประกอบ 7 ภาพแสดงกระบวนการเกิด L-DOPA

ที่มา: Ricardo Soares A. (2014). The role of L-DOPA in plants. *Plant Signal Behav.* 9:e28275-2



## 8. ทฤษฎีและหลักการของเทคนิคการทำพีซีอาร์

เทคนิคสำคัญเทคนิคหนึ่งในการศึกษาทางด้านพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีของยีน คือ การเพิ่มปริมาณยีนหรือดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction, PCR) โดยทั่วไป มีวัตถุประสงค์เพื่อการสังเคราะห์ให้ได้ยีนหรือดีเอ็นเอที่ต้องการและเพิ่มขยายจำนวนดังกล่าวให้ได้จำนวนมาก นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการคัดแยกยีนหรือดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากยีนหรือดีเอ็นเออื่น ๆ ได้ เนื่องจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จะต้องอาศัยดีเอ็นเอไพรเมอร์ซึ่งต้องมีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอแม่แบบ หากออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับดีเอ็นเอที่ต้องการก็จะเกิดการสังเคราะห์เฉพาะดีเอ็นเอที่ต้องการเท่านั้น

เทคนิคการทำพีซีอาร์ ค้นพบครั้งแรกโดย Kary Mullis และคณะในปี 1983 โดยใช้หลักการเลียนแบบการถ่ายแบบดีเอ็นเอ (DNA replication) ที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิต โดยดีเอ็นเอซึ่งเป็นเกลียวคู่จะคลายเกลียวออกจากกันได้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวสองสาย ทำหน้าที่เป็นแม่แบบของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ จากนั้นเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) จะช่วยทำให้ดีเอ็นเอสายใหม่ยาวออกไปโดยจะนำเบสหรือนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ อะดีนีน (adenine) กัวนีน (guanine) ไทมีน (thymine) และไซโทซีน (cytosine) เข้ามาเติมตามชนิดคู่เบสในดีเอ็นเอแม่แบบ<sup>(28)</sup>

ส่วนประกอบที่จำเป็นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ได้แก่<sup>(28)</sup>

- 1) ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template)
- 2) โอลิโกนิวคลีโอไทด์ ไพรเมอร์ (Oligonucleotide primer) อย่างน้อย 1 คู่
- 3) ดีโออกซีนิวคลีโอไทด์ (deoxynucleotides, dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่อะดีนีน กัวนีน ไทมีน และไซโทซีน
- 4) เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ชนิดทนความร้อนได้
- 5) บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์

ในการทำพีซีอาร์ส่วนผสมทั้งหมดจะถูกผสมรวมกันอยู่ในหลอดทดลอง โดยต้องอาศัยปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องหลาย ๆ รอบ ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ

- 1) ขั้นตอน denaturation เป็นขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกเป็นสายเดี่ยวโดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส
- 2) ขั้นตอน primer annealing เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวตรงตำแหน่งเบสคู่สม

3) ขั้นตอน primer extension เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอโดยการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้ากับไพรเมอร์โดยอาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสซึ่งปกติจะใช้อุณหภูมิที่ประมาณ 70-75 องศาเซลเซียส

#### การออกแบบลำดับเบสไพรเมอร์สำหรับพีซีอาร์

ไพรเมอร์ (primer) เป็นโพลิโกนิวคลีโอไทด์หรือดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้เป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยเบสของไพรเมอร์จะเป็นเบสคู่สมกับเบสของดีเอ็นเอแม่แบบ การสังเคราะห์ดีเอ็นเออาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ซึ่งทำหน้าที่นำนิวคลีโอไทด์เข้ามาเรียงต่อกันเพื่อทำให้สายดีเอ็นเอยาวขึ้น โดยใช้ดีเอ็นเอสายเดิมเป็นแม่แบบ และการทำงานของเอนไซม์นี้จำเป็นต้องมีไพรเมอร์เป็นจุดเริ่มต้น ดังนั้นไพรเมอร์มีความสำคัญต่อความสำเร็จของการทำพีซีอาร์มาก การออกแบบไพรเมอร์ที่ถูกต้องจะทำให้ได้ผลผลิตดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการ

การทำพีซีอาร์ต้องใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ โดยไพรเมอร์หนึ่งมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอสายหนึ่ง (กำหนดเป็นสายเซนส์) อีกไพรเมอร์หนึ่งมีลำดับเบสเหมือนกับดีเอ็นเอสายเซนส์นี้ ทั้งนี้ข้อแนะนำในการเลือกและออกแบบไพรเมอร์ได้แก่<sup>(28)</sup>

#### 1) ความยาวของไพรเมอร์

ไพรเมอร์ควรมีความยาวอยู่ในช่วง 18-30 เบส หากไพรเมอร์สั้นเกินไปจะลดความเฉพาะเจาะจงในการจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ หากยาวเกินไปก็จะจับกับดีเอ็นเอแม่แบบได้ยาก

#### 2) ค่าความร้อนที่ทำให้ดีเอ็นเอหลอม (melting temperature, $T_m$ )

ค่าความร้อนที่ทำให้ดีเอ็นเอหลอมเป็นอุณหภูมิที่ทำให้ครึ่งหนึ่งของดีเอ็นเอคลายเกลียวเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ซึ่งค่าของไพรเมอร์ควรมีค่า  $T_m$  ใกล้เคียงกันหรือเท่ากันเพราะจะทำให้การเกาะของไพรเมอร์ทั้งสองกับดีเอ็นเอแม่แบบเกิดขึ้นในอัตราเท่ากัน โดยทั่วไปไพรเมอร์ควรมีค่า  $T_m$  มากกว่า 50 องศาเซลเซียส

#### 3) จำนวนเบสกวีนินและไซโทซีนในไพรเมอร์ (GC content)

ไพรเมอร์ควรมีจำนวนเบสกวีนินและไซโทซีนรวมกันคิดเป็นร้อยละ 45-55 ของจำนวนเบสทั้งหมด เนื่องจากพันธะที่เกิดจากเบสกวีนินและไซโทซีนจะมีความแข็งแรงกว่าพันธะที่เกิดจากเบสอะดีนีนและไธมีน การมี GC content ที่เหมาะสมจะทำให้การจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบเกิดขึ้นได้อย่างเฉพาะเจาะจง

#### 4) ลำดับเบสของไพรเมอร์

ควรหลีกเลี่ยงลำดับเบสของไพรเมอร์ไม่ให้เป็นคู่สมกันเองเพราะอาจจะจับกันเองระหว่างไพรเมอร์ และต้องระวังไม่ให้ลำดับเบสในไพรเมอร์สายเดียวกันที่ปลาย 3' และ 5' เป็นคู่สมกัน เพราะอาจจะจับกันเองภายในสายของไพรเมอร์ (self-annealing)

## 9. การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนโดยวัดระดับ mRNA

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนโดยวัดระดับ mRNA สำหรับตัวอย่างพืชสามารถทำได้โดยประกอบด้วยกระบวนการคือ การสกัด RNA จากพืช การสร้างคอมพลีเมนต์อาร์ดีเอ็นเอ และการวัดปริมาณ mRNA ด้วยการทำ Polymerase Chain Reaction

### 9.1 การสกัด RNA จากตัวอย่างพืช

การสกัด RNA ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ จะมีหลักการเดียวกันประกอบด้วยขั้นตอนคือ การทำให้เซลล์แตกเพื่อปลดปล่อยองค์ประกอบต่าง ๆ ออกจากเซลล์ การแยกองค์ประกอบของเซลล์ที่แตกให้เหลือเฉพาะ RNA โดยการกำจัดสิ่งปนเปื้อน เช่น ดีเอ็นเอ และโปรตีน ออกจาก RNA

วิธีการสกัด RNA จากพืชที่ดีต้องเริ่มจากวิธีการเก็บและรักษาตัวอย่างพืชโดยใช้ liquid nitrogen เป็นสิ่งสำคัญในการเก็บรักษาตัวอย่าง โดยแนะนำว่าเมื่อทำการเก็บเกี่ยวตัวอย่างพืชแล้วต้องรีบนำตัวอย่างไปจุ่มแช่ใน liquid nitrogen โดยเร็วที่สุด ทั้งนี้เพื่อทำการยับยั้งการแสดงออกของ mRNA จากการเกิดบาดแผลของเนื้อเยื่อพืชจากการเก็บเกี่ยว โดยระหว่างที่รอสกัด RNA ตัวอย่างพืชต้องเก็บในถัง liquid nitrogen หรือตู้แช่ -80 องศาเซลเซียส ข้อสำคัญอีกประการหนึ่งสำหรับการสกัด RNA คือการป้องกัน RNA เสื่อมสภาพจากเอนไซม์ RNase ซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อย RN โดยเอนไซม์นี้มีความเสถียรภาพมาก สามารถพบได้ทั่วไปเช่นบนมือของผู้ปฏิบัติงาน อุปกรณ์เครื่องแก้วต่าง ๆ ดังนั้นจำเป็นต้องสวมถุงมือยางตลอดเวลา และกำจัดเอนไซม์ RNase บนอุปกรณ์ต่าง ๆ ด้วยการผ่านการ autoclave หรือใช้สารละลาย diethyl pyrocarbonate ช่วยล้างกำจัดเอนไซม์

ขั้นตอนการทำให้เซลล์พืชแตกส่วนใหญ่จะใช้วิธีการ โดยการบดชิ้นส่วนพืชที่เย็นจัดในสภาพน้ำแข็ง ด้วยโกร่งและที่บดภายใต้ liquid nitrogen เมื่อเซลล์แตกแล้วจะทำการสกัด RNA โดยจะใช้สารประกอบกวานิดีนีเยมไทโอไซยาเนท ซึ่งเป็นสารทำให้โปรตีนเสถียรภาพและขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ RNase โดยเมื่อทำการผสมกับฟีนอลและคลอโรฟอร์ม แล้วทำการปั่นเหวี่ยง โปรตีนที่เสถียรภาพจะตกตะกอนแยกชั้น ส่วนดีเอ็นเอที่เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ก็จะแยกชั้นจาก RNA ซึ่งจะอยู่ชั้นบนสุด สามารถดู RNA ออกมาแล้วตกตะกอนด้วยเอทานอลหรือไอโซโพรพานอลก็จะได้ตะกอนของ RNA โดย RNA ที่ได้นี้เป็น RNA ทั้งหมด ซึ่งจะประกอบด้วย rRNA tRNA และ mRNA

## 9.2 การสร้างคอมพลีเมนต์อาร์ดีเอ็นเอ (complementary DNA, cDNA) ด้วยรีเวิร์สทรานสคริปชัน (Reverse transcription, RT)

เมื่อสามารถสกัดแยก RNA ออกมาจากตัวอย่างได้แล้ว สามารถนำมาเป็นต้นแบบสำหรับเพิ่มปริมาณได้ แต่โมเลกุล mRNA ไม่สามารถถูกสังเคราะห์ได้โดยตรง จึงต้องเปลี่ยน mRNA เป็นโมเลกุล DNA ที่เป็นคู่เบสสมของ mRNA เรียกว่า คอมพลีเมนต์อาร์ดีเอ็นเอ (complementary DNA, cDNA) จากนั้นโมเลกุล cDNA จึงจะถูกสังเคราะห์เพิ่มปริมาณได้

โมเลกุล RNA สามารถนำมาเป็นต้นแบบสำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ได้ด้วยกระบวนการรีเวิร์สทรานสคริปชัน หรือเรียกอย่างย่อว่า อาร์ที ในปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชัน ประกอบด้วย RNA ต้นแบบซึ่งอาจเป็น RNA ทั้งหมด หรือทำการสกัดแยกเฉพาะ mRNA ที่มีพอลิ A (poly A) ก็ได้ ไพรเมอร์อาจเป็นไพรเมอร์ลำดับเบสสั้น หรือไพรเมอร์โอลิโกดีที (oligo dT) dNTPs บัฟเฟอร์ และเอนไซม์รีเวิร์สทรานสคริปเทส (reverse transcriptase) ผลผลิตจากกระบวนการรีเวิร์สทรานสคริปชัน จะทำให้ได้ cDNA ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ mRNA จากนั้น cDNA จะทำหน้าที่เป็นต้นแบบสำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยพีซีอาร์ โดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส

## 9.3 การวิเคราะห์ปริมาณ mRNA โดย Polymerase Chain Reaction (PCR)

เทคนิค PCR สามารถใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA เป้าหมายจากตัวอย่าง RNA ทั้งหมดที่สกัดแยกจากเซลล์ที่ศึกษา เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่สนใจ โดยในการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA โดยวิธี PCR ต้องมี RNA มาตรฐานที่ต้องศึกษาเปรียบเทียบกับ mRNA เป้าหมาย RNA มาตรฐานนี้มี 2 แบบ แบบแรกเป็น mRNA ธรรมชาติที่แสดงออกจากยีนในสิ่งมีชีวิตในเนื้อเยื่อทุกชนิดตลอดเวลา ยีนในกลุ่มนี้เรียกว่า housekeeping gene เช่น mRNA ของ ยีน แอ ค ที น (actin) และ ยีน GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) เป็นต้น RNA มาตรฐาน แบบที่สองเป็น RNA สังเคราะห์จากกระบวนการถอดรหัสในหลอดทดลอง RNA มาตรฐานสังเคราะห์นี้สามารถถูกเพิ่มจำนวนได้ด้วยไพรเมอร์คู่เดียวกับ RNA เป้าหมายแต่ออกแบบให้ผลผลิตของ PCR มีขนาดต่างจากผลผลิตของ RNA เป้าหมาย

การวิเคราะห์ปริมาณ mRNA แบบที่ RNA มาตรฐาน เป็น housekeeping gene เรียกว่า relative reverse transcription PCR โดยในปฏิกิริยาจะประกอบด้วยองค์ประกอบที่สำคัญคือ cDNA ที่ได้จากการทำรีเวิร์สทรานสคริปชันและใช้ไพรเมอร์ 2 ชุด คือ ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ housekeeping gene และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนเป้าหมาย เมื่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ดำเนินไป ทั้ง housekeeping gene และยีนเป้าหมายจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อนำผลผลิตที่ได้มาวิเคราะห์ในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และวัดความเข้มข้นของผลผลิตที่เกิดขึ้นโดยแสดงผลว่ายีน

เป้าหมายมีความเข้มข้นเป็นกี่เท่าของยีนมาตรฐาน ก็จะทราบปริมาณการแสดงออกของยีนเป็นค่าอัตราส่วนของยีนเป้าหมายต่อยีนมาตรฐาน

การวิเคราะห์ปริมาณ mRNA แบบที่สองทำโดยเตรียมปฏิกิริยา PCR หลายหลอดทดลอง แต่ละหลอดทดลองจะใส่ RNA เป้าหมายเท่ากัน ขณะเดียวกันก็จะใส่ RNA มาตรฐานสังเคราะห์ที่แปรผันความเข้มข้นจากน้อยไปมาก ในปฏิกิริยา PCR ทั้ง mRNA เป้าหมายและ RNA มาตรฐานจะถูกเพิ่มปริมาณได้ด้วยไพรเมอร์คู่เดียวกัน จากนั้นนำผลผลิต PCR ไปวิเคราะห์ในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แถบดีเอ็นเอจาก mRNA เป้าหมายจะมีขนาดต่างจาก RNA มาตรฐาน ปริมาณของ mRNA เป้าหมายสามารถประมาณได้จากการเปรียบเทียบความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอที่เท่ากันระหว่างความเข้มข้นของแถบ RNA เป้าหมายกับความเข้มข้นของแถบ RNA มาตรฐาน การวิเคราะห์ปริมาณ mRNA โดยวิธีนี้เรียกว่า competitive RT-PCR



### บทที่ 3

#### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 1. วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี

##### 1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1) เครื่อง HPLC (Waters, USA)
- 2) เครื่องระเหยแห้งแบบไนโตรเจน (Organomation Associates, USA)
- 3) อ่างนำความถี่สูง (Branson, USA)
- 4) ตู้อบร้อน (Mettmert, Germany)
- 5) เครื่องบดปั่นสมุนไพรร
- 6) แร้ง No. 180 (Endecotts, England)
- 7) เครื่อง centrifuge (Labnet, USA)
- 8) Vacuum manifold (Waters, USA)
- 9) Sep-Pak silica 500 mg (Waters, USA)
- 10) คอลัมน์ Luna Omega Polar C18 (Phenomenex, USA)
- 11) Nylon membrane filter (Vertical, Thailand)
- 12) Syringe filter (Vertical, Thailand)
- 13) เครื่องแก้ว
- 14) เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, USA)
- 15) เครื่องกรองสูญญากาศ
- 16) Disposable syringe 1 ml (Nipro, Thailand)
- 17) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Hirayama, Japan)
- 18) ตู้แช่ -80 องศาเซลเซียส (Binder, Germany)
- 19) PCR thermocycle (Techne, UK)
- 20) Real-time PCR Cycler รุ่น qTOWER<sup>3</sup>G (Analytik Jena, Germany)
- 21) UV/Vis spectrophotometer รุ่น ScanDrop<sup>2</sup> (Analytik Jena, Germany)
- 22) โถรงและที่บด

## 1.2 วัตถุดิบและสารเคมี

- 1) เมล็ดหมามูยอินเดีย
- 2) สารมาตรฐาน L-DOPA (Sigma-Aldrich, USA)
- 3) Acetonitrile (Fisher Chemical, UK)
- 4) Formic acid (Fisher Chemical, UK)
- 5) น้ำกลั่น
- 6) น้ำสำหรับ HPLC
- 7) sterile distilled water
- 8) MS basal medium (Sigma-Aldrich, USA)
- 9) 6-benzyladenine (Sigma-Aldrich, USA)
- 10) methanol (Fisher Chemical, UK)
- 11) ethanol (Duksan, Korea)
- 12) ชุดสารเคมีในการแยกสกัด RNA (RBC Bioscience, Taiwan)
- 13) ชุดสารเคมีในการสังเคราะห์ cDNA (Qiagen, Germany)
- 14) ชุดสารเคมีสำหรับ polymerase chain reaction (Roche, Switzerland)
- 15) liquid nitrogen
- 16) dosimeter

## 2. วิธีการวิจัย

### 2.1 การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สาร L-DOPA ในตัวอย่างใบหมามูยอินเดีย

#### 2.1.1 การเตรียมวัตถุดิบใบหมามูยอินเดีย

1) นำตัวอย่างใบอ่อนจากการเพาะเมล็ดหรือเก็บจากต้นมาล้างทำความสะอาดตากผึ่งลมให้แห้ง

- 2) นำใบแห้งอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 50 °C
- 3) บดบั่นใบแห้งให้ละเอียดด้วยเครื่องบดบั่นสมุนไพร
- 4) นำผงใบแห้งผ่านร่อน No. 180

#### 2.1.2 พัฒนาการสกัดตัวอย่างใบหมามูยอินเดีย

พัฒนาวิธีการสกัดโดยวิธี ultrasound assisted extraction (UAE) และใช้ตัวทำละลายเป็น acetonitrile : น้ำ : formic acid ( 50 : 50 : 1)

#### 2.1.3 พัฒนาการเตรียมตัวอย่างสารสกัดใบหมามูยอินเดีย

พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างสารสกัดด้วยวิธี solid phase extraction (การสกัดด้วยสารสกัดของแข็ง) โดยทดลองเลือกกลไกการสกัดที่เหมาะสมทั้งจุดประสงค์แบบ reversed phase, normal phase หรือ ion-exchange

#### 2.1.4 พัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์โดย HPLC

ทำการพัฒนาโดยเลือกใช้ชนิดของ column และ mobile phase แบบ reversed phase และ normal phase ที่เหมาะสม

#### 2.1.5 ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่ได้ในหัวข้อต่าง ๆ คือ specificity, linearity, range, accuracy, precision, detection limit และ quantitation limit

## 2.2 การฉายรังสีแกมมาต่อเมล็ดหมามุ่ม

นำเมล็ดหมามุ่มอินเดียไปทำการฉายรังสีแกมมา ณ สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) อำเภอองครักษ์ โดยตัวเครื่องฉายรังสีแกมมาที่ใช้ต้นกำเนิดรังสีเป็น โคบอลต์-60 จำนวนทั้งหมด 6 แห่ง ซึ่งในช่วงเวลาที่ทำการศึกษา (พ.ศ. 2561) มีความแรงประมาณ 20,000 คูรี และมีอัตรารังสี (dose rate) อยู่ที่ประมาณ 115 เกรย์/ชม. สำหรับการฉายรังสีเมล็ดหมามุ่มนี้จะใช้ Alanine pellets dosimeters (FWT50, Far West Technology, Inc., USA) เป็นตัววัดปริมาณรังสีที่ได้รับ และแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 5 กลุ่มตามปริมาณรังสีที่ได้รับ ดังนี้

กลุ่ม 1 เป็นกลุ่ม control ไม่ได้รับการฉายรังสี

กลุ่ม 2 ได้รับการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณ 200 เกรย์

กลุ่ม 3 ได้รับการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณ 300 เกรย์

กลุ่ม 4 ได้รับการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณ 400 เกรย์

กลุ่ม 5 ได้รับการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณ 500 เกรย์

## 2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ plantlet จากเมล็ดหมามุ่มอินเดีย

นำเมล็ดพืชจากข้อ 2.2 มาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ plantlet โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ M. Faisal<sup>(29)</sup> ดังนี้

### 2.3.1 ขั้นตอนการเตรียมพืช

- 1) นำเมล็ดหมามุ่มอินเดียมาล้างในน้ำสะอาดจำนวน 2 รอบ ซับเมล็ดให้แห้ง
- 2) นำไปฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้สารละลาย 15% ไฮเตอร์<sup>®</sup> ในน้ำ (ให้ปริมาณคลอรีน 0.9%) ที่ผสมกับ Tween-20 1-2 หยด จำนวน 2 รอบ รอบละ 10 นาที



3) นำเมล็ดมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 3 รอบ แล้วซับเมล็ดให้แห้งโดยใช้กระดาษที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

4) นำเมล็ดไปเพาะบน Murashige and Skoog (MS) basal medium

8) ทำการตัดส่วนยอดอ่อนของต้นของพืชที่งอกมาใช้เป็น explants

2.3.2 การเพาะเลี้ยงกระตุ้นให้เกิดยอด (shoot induction)

ทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้ MS medium ผสมกับ 6-benzyladenine (BA) 1.125 มิลลิกรัม/ลิตร สภาวะการเพาะเลี้ยงที่  $24 \pm 2$  °C ภายใต้แสงขาว 16 ชั่วโมงต่อวัน

## 2.4 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร L-DOPA ในตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

นำตัวอย่างพืชที่ได้จากข้อ 2.3.2 มาทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสาร L-DOPA ตามวิธีที่ได้จากข้อ 2.1

## 2.5 การตรวจวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีนเป้าหมาย

2.5.1 ศึกษาข้อมูลเลือกยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร L-DOPA

เบื้องต้นเลือกศึกษายีนเป้าหมายเป็นยีน dopadecarboxylase gene (ยีน DDC) และเลือก housekeeping gene เป็นยีน 18S ribosomal RNA (ยีน 18S)

2.5.2 ออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสมกับยีนเป้าหมายและ housekeeping gene

2.5.3 ทำการสกัด RNA ทั้งหมด (total RNA)

ทำการสกัด RNA ทั้งหมด (total RNA) จากตัวอย่างต้นอ่อนหมามุ่ยอินเดีย โดยใช้ชุดสารเคมีในการสกัด RNA เป็นชุด Total RNA Extraction Kit ของ บริษัท RBC Bioscience โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) เตรียมโถงที่ใช้บดตัวอย่างพืชให้เย็นจัดโดยใช้ liquid nitrogen

2) นำตัวอย่างพืชประมาณ 100 มิลลิกรัม มาบดในโถงให้เป็นผงด้วย liquid nitrogen แล้วใส่ RB buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงไปบดผสมให้เข้ากัน เมื่อตัวอย่างเริ่มละลายให้ใส่  $\beta$ -mercaptoethanol ลงไป 5 ไมโครลิตร บดผสมให้เข้ากัน

3) ดูดสารละลายในข้อ 2 ใส่ใน microcentrifuge tube แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที บนน้ำแข็ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/นาที เพื่อแยกกากออก

4) นำส่วนใสในข้อ 3 ใส่ใน tube ที่เรียกว่า filter column set แล้วปั่น centrifuge ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นดูดส่วนใสใน microcentrifuge tube แล้วเติม ethanol จำนวนครึ่งหนึ่งของปริมาตรส่วนใสลงไปปั่นผสมให้เข้ากัน

5) นำสารละลายในข้อ 5 ใส่ใน tube ที่เรียกว่า RB column set แล้วปั่น centrifuge ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที จากนั้นให้ทิ้งส่วนใสที่อยู่ใน collection tube ของ RB column set และใส่ collection tube กลับคืน

6) ใส่ R-W1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงใน RB column set แล้วปั่น centrifuge ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งส่วนใสพร้อมกับใส่ collection tube กลับคืนเหมือนเดิม

7) ใส่ R-Wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน RB column set แล้วปั่น centrifuge ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งส่วนใสพร้อมกับใส่ collection tube กลับคืน จากนั้นปั่น centrifuge อีกรอบนาน 3 นาที

8) นำส่วน column ใสใน microcentrifuge tube อันใหม่ แล้วหยอด RNase free water ปริมาตร 30  $\mu$ L ลงตรงกลาง column matrix ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที แล้วปั่น centrifuge ที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วเก็บ RNA ที่ถูก elute ออกมา วิเคราะห์คุณภาพ RNA และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 280 และ 320 นาโนเมตร แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่ตู้  $-80^{\circ}\text{C}$

#### 2.5.4 ทำการสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ชุดสารเคมีในการสังเคราะห์ cDNA

RNA ที่สกัดได้จะถูกสังเคราะห์เป็น cDNA โดยใช้ชุดสารเคมีสำหรับสังเคราะห์ cDNA เป็นชุด Omniscript RT Kit ของบริษัท QIAGEN โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) ตั้งละลาย template RNA, Oligo-dT primer (10 ไมโครโมลาร์), 10x buffer RT, dNTP Mix (5 ไมโครโมลาร์) และ RNase-free water บนน้ำแข็ง

2) นำส่วนผสมต่าง ๆ มาเตรียมเป็นสารละลาย Master mix จำนวน 15.5 reaction สำหรับใช้กับ template RNA จำนวน 15 ตัวอย่าง ตามสูตรข้างล่าง

	ปริมาตร 1 reaction (ไมโครลิตร)	ปริมาตร 15.5 reaction (ไมโครลิตร)
10x buffer RT	2	31
dNTP Mix (5 ไมโครโมลาร์)	2	31
Oligo-dT primer (10 ไมโครโมลาร์)	2	31
Omniscript Reverse Transcriptase	1	15.5
RNase-free water	3	46.5
รวมปริมาตรทั้งหมด	10	155

3) เตรียม template RNA แต่ละตัวอย่าง ให้ได้ความเข้มข้นของ RNA เป็น 500 นาโนกรัม ใน 10 ไมโครลิตร โดยใช้ RNase-free water เป็นสารละลายเจือจาง

4) ผสม template RNA ที่เตรียมได้ในข้อ 4 กับสารละลาย master mix ตัวอย่าง ละ 10 ไมโครลิตร

5) ทำการ incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จะได้ cDNA ที่ต้องการโดยนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 2.5.5 วิเคราะห์ปริมาณ mRNA ของยีนเป้าหมายด้วยวิธี Real time PCR

นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณ mRNA ของยีน dopa decarboxylase gene (DDC) โดยใช้วิธีวิเคราะห์เทียบกับ housekeeping gene คือยีน 18S ด้วยวิธี Real time PCR ซึ่งจะใช้ชุดสารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยา Real time PCR เป็นชุด EXPRESS SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal ของบริษัท Roche โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.5.5.1 การหาค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยา PCR (Amplification efficiency,E) ของ primer

1) นำตัวอย่าง cDNA ที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมด 15 ตัวอย่าง (กลุ่ม control กลุ่มรังสี 200 เกรย์ และกลุ่มรังสี 300 เกรย์ กลุ่มละ 5 ตัวอย่าง) มาวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Nanodrop Spectrophotometer

2) นำตัวอย่าง cDNA ตัวอย่างละ 2  $\mu$ L มาผสมรวมกันทำเป็นสารละลาย cDNA mix พร้อมกับคำนวณความเข้มข้นแล้วนำไปเตรียมเป็นสารละลายเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 7 ระดับจำนวน 2 ชุด คือชุดที่ 1 ความเข้มข้น 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.81 และ 3.90 นา

โนกรัม/ไมโครลิตร สำหรับทดสอบยีน DDC และชุดที่ 2 ความเข้มข้น 6.25, 1.25, 0.25, 0.05, 0.01, 0.002 และ 0.0004 นาโนกรัม/ไมโครลิตร สำหรับทดสอบยีน 18S

3) นำส่วนผสมต่าง ๆ มาเตรียมเป็นสารละลาย Master mix จำนวนยี่สิบละ 15 reaction (สำหรับใช้กับ template DNA ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ) ตามสูตรข้างล่าง

	ปริมาตร 1 reaction (ไมโครลิตร)	ปริมาตร 15 reaction (ไมโครลิตร)
EXPRESS SYBR GreenER qPCR	5	75
SuperMix Universal		
10 $\mu$ M forward primer	0.2	3
10 $\mu$ M reverse primer	0.2	3
Template DNA	4	-
RNase-free water	0.6	9
รวมปริมาตรทั้งหมด	10	90

4) ผสม Master mix ตัวอย่างละ 6 ไมโครลิตร กับ template DNA ตัวอย่างละ 4 ไมโครลิตร เข้าด้วยกันใน tube สำหรับ Real time PCR แล้วปั่น centrifuge เล็กน้อยให้ตัวอย่างลงไปนอนที่ก้น tube

5) นำตัวอย่างเข้าเครื่อง Real time PCR และตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่องเป็นดังนี้

Program Name	Cycles	Target ( $^{\circ}$ C)	Hold Time (hh:mm:ss)
Pre-incubation	1	95	00:02:00
Amplification	40	95	00:00:15
		55	00:00:15
		72	00:00:15
Melting Curve	1	95	00:00:05
		65	00:01:00
		97	-

6) นำค่า  $C_T$  ที่วัดได้ของแต่ละตัวอย่างมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า  $\log$  ของปริมาณ DNA กับค่า  $C_T$  และสร้างสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานพร้อมกับแสดงค่า  $r^2$  (coefficient of determination)

7) นำค่า slope ของสมการเส้นตรงมาคำนวณค่า Amplification efficiency (E) จากสูตรข้างล่าง

$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

#### 2.5.5.2 การตรวจปริมาณยีน DDC และ ยีน 18S ในตัวอย่าง cDNA

1) นำตัวอย่าง cDNA ที่สังเคราะห์ได้ทุกตัวมาเตรียมเป็นสารละลายเจือจางของตัวอย่างโดยใช้ RNase-free water เป็นตัวทำละลายให้ได้ความเข้มข้น 125 นาโนกรัม/ไมโครลิตร สำหรับการวิเคราะห์ยีน DDC และเตรียมสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 0.25 นาโนกรัม/ไมโครลิตร อีก 1 ชุดสำหรับการวิเคราะห์ยีน 18S

2) เตรียมสารละลาย Master mix ของยีนทั้งสองตามสูตรข้อ 1.3 ให้เพียงพอปริมาณตัวอย่างโดยทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

3) ผสม Master mix ตัวอย่างละ 6 ไมโครลิตร กับ template DNA ตัวอย่างละ 4 ไมโครลิตร เข้าด้วยกันใน tube สำหรับ Real time PCR แล้วปั่น centrifuge เล็กน้อยให้ตัวอย่างลงไปนอนที่ก้น tube

4) นำตัวอย่างเข้าเครื่อง Real time PCR และตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่องตามข้อ 1.5

5) นำค่า  $C_T$  ที่วัดได้มาคำนวณหาปริมาณการแสดงออกของยีนตามวิธีที่เรียกว่า The Pfaffi Method ตามสูตรดังนี้

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{T, \text{target}}(\text{calibrator} - \text{test})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{T, \text{ref}}(\text{calibrator} - \text{test})}}$$

$E_{\text{target}}$  คือค่า Amplification efficiency ของยีนเป้าหมาย (ยีน DDC)

$E_{\text{ref}}$  คือค่า Amplification efficiency ของ housekeeping gene (ยีน 18S)

$\Delta C_{T, \text{target}}(\text{calibrator} - \text{test})$  เท่ากับ  $C_T$  ของยีนเป้าหมายในกลุ่มควบคุมลบด้วย  $C_T$  ของยีนเป้าหมายในกลุ่มฉายรังสี

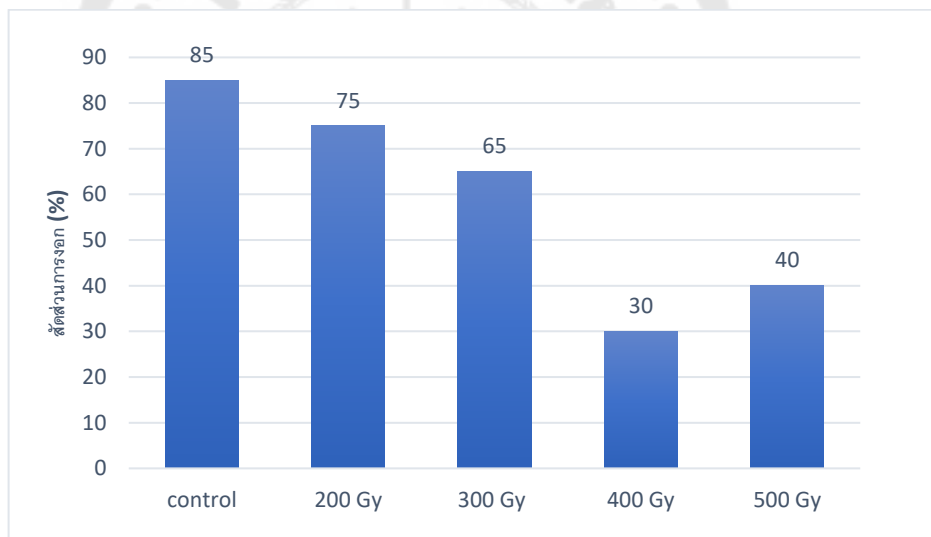
$\Delta C_T, \text{ref}(\text{calibrator} - \text{test})$  เท่ากับ  $C_T$  ของยีน housekeeping gene ใน  
กลุ่มควบคุมลบด้วย  $C_T$  ของ housekeeping gene ในกลุ่มฉายรังสี



## บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย

### 1. ผลของรังสีแกมมาต่อการงอกของเมล็ดหมามุ่ยอินทรีย์บนอาหารสูตร MS

เมล็ดพืชที่ผ่านการล้างและฟอกฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อนำไปเพาะบน Murashige and Skoog (MS) basal medium พบว่าเมล็ดจะเริ่มงอกเมื่อระยะเวลาประมาณ 5 วัน เมื่อดูค่าสัดส่วนการงอก (percent) ของเมล็ด ที่ระยะเวลา 14 วัน พบว่ากลุ่มควบคุมมีการงอกที่ดีที่สุดอยู่ที่ 85% รองลงมาคือกลุ่มที่ได้รับรังสี 200 เกรย์ (กลุ่ม 200 เกรย์) และกลุ่มที่ได้รับรังสี 300 เกรย์ (กลุ่ม 300 เกรย์) มีสัดส่วนการงอกอยู่ที่ 75% และ 65% ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ได้รับรังสี 400 เกรย์ (กลุ่ม 400 เกรย์) และกลุ่มที่ได้รับรังสี 500 เกรย์ (กลุ่ม 500 เกรย์) พบว่ามีสัดส่วนการงอกที่ต่ำคือ 30% และ 40% ตามลำดับ โดยข้อมูลการงอกนี้แสดงเป็นกราฟเปรียบเทียบสัดส่วนการงอกดังภาพที่ 8



ภาพประกอบ 8 กราฟแสดงสัดส่วนการงอกของเมล็ดบนอาหารสูตร MS ที่ระยะเวลา 14 วัน

เมื่อดูลักษณะภายนอกของต้นที่งอกจากเมล็ดที่ระยะเวลา 14 วัน พบว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่ม 200 เกรย์ ลักษณะของต้นที่งอกออกมาจะมีรากจำนวนมาก มีใบเขียวใหญ่ และลำต้นสูงตรง แต่กลุ่ม 300 เกรย์ กลุ่ม 400 เกรย์ และกลุ่ม 500 เกรย์ ต้นที่งอกออกมาจะมีรากน้อย และความสูงของต้นก็จะลดลง ซึ่งลักษณะภายนอกของต้นหมามุ่ยอินทรีย์ที่งอกออกมาจากเมล็ดของ

แต่ละกลุ่มแสดงดังตารางที่ 3 และภาพตัวอย่างต้นหมามูยอินเดียที่ได้จากการเพาะเมล็ดของแต่ละกลุ่มแสดงดังภาพที่ 9 และ ภาพที่ 10

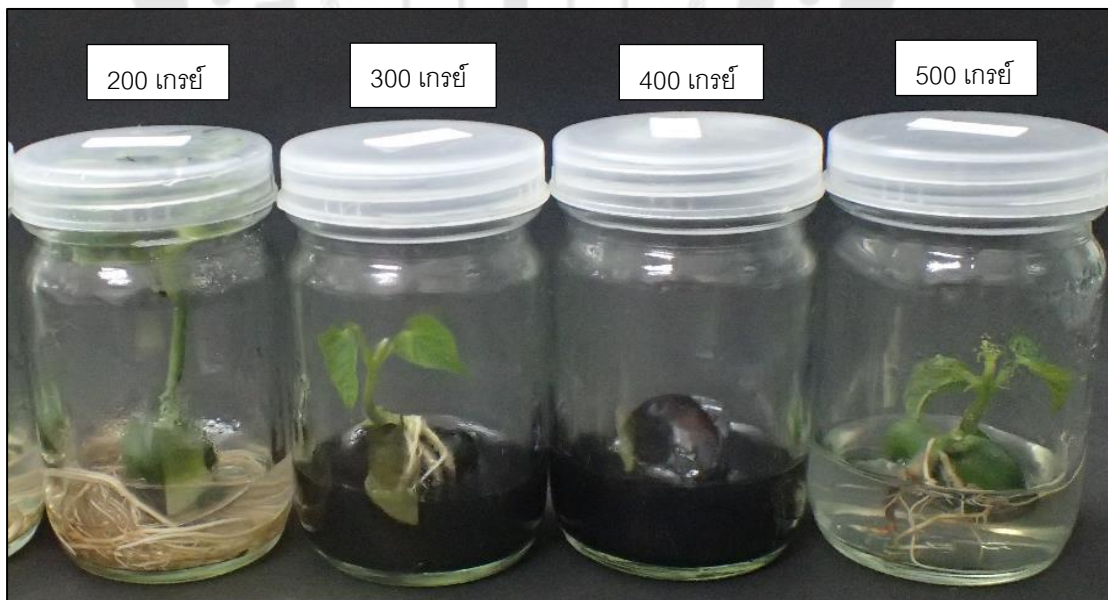
ตาราง 3 แสดงลักษณะภายนอกของต้นที่งอกจากเมล็ดบนอาหารสูตร MS ที่ระยะเวลา 14 วัน

ตัวอย่าง	ลักษณะภายนอกของต้น
กลุ่มควบคุม	มีรากจำนวนมาก ลักษณะใบเขียวใหญ่ ลำต้นตรงสูง
200 เกรย์	มีรากจำนวนมาก ลักษณะใบเขียวใหญ่ ลำต้นตรงสูง
300 เกรย์	มีรากน้อย ลักษณะใบเขียว ความสูงต้นลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม
400 เกรย์	มีรากน้อย ลักษณะใบเขียว ความสูงต้นลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม
500 เกรย์	มีรากน้อย ลักษณะใบเขียว ความสูงต้นลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม





ภาพประกอบ 9 ภาพแสดงต้นหมามูยอินเดียที่ได้จากการเพาะเมล็ดกลุ่ม  
ควบคุม



ภาพประกอบ 10 ภาพแสดงต้นหมามูยอินเดียที่ได้จากการเพาะเมล็ด  
กลุ่ม 200 เกอรัย 300 เกอรัย 400 เกอรัย และ 500 เกอรัย

## 2. ผลของรังสีแกมมาต่อการเจริญของต้นอ่อนหมามุ่มอินเดียบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1.125 มิลลิกรัม/ลิตร

นำต้นที่งอกจากเมล็ดที่อายุ 14 วัน ดังตัวอย่างภาพที่ 9 มาทำการตัดยอดอ่อนไป subculture บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1.125 มิลลิกรัม/ลิตร โดยที่ระยะเวลา 14 วันทำการบันทึกการแตกยอดและลักษณะความผิดปกติของต้น พบว่ากลุ่มควบคุม กลุ่ม 200 เกรย์ และกลุ่ม 300 เกรย์ มีการแตกยอดประมาณ 2-3 ยอด มีลักษณะใบเขียวปกติ และลำต้นตั้งตรง ส่วนกลุ่ม 400 เกรย์ และกลุ่ม 500 เกรย์ นั้นพบว่า มีจำนวนการแตกยอดเพียง 1 ยอด มีใบเหลืองด่าง และได้ต้นที่งอไม่สูง โดยข้อมูลแต่ละกลุ่มแสดงดังตารางที่ 4

ตาราง 4 แสดงการแตกยอดและลักษณะความผิดปกติของต้นอ่อนที่ระยะเวลา 14 วัน

กลุ่มตัวอย่าง	จำนวนการแตกยอด	ลักษณะความผิดปกติ
กลุ่มควบคุม	3±0.8	ลักษณะใบเขียวปกติดี ลำต้นตรง
200 เกรย์	3±1.5	ลักษณะใบเขียวปกติดี ลำต้นตรง มี 1 ต้นที่ใบด่าง
300 เกรย์	2±0.8	ลักษณะใบเขียวปกติดี ลำต้นตรง มี 1 ต้นที่ใบด่าง
400 เกรย์	0.8±0.3	ลักษณะใบเหลืองด่างเป็นส่วนใหญ่ ลำต้นเริ่มงอและไม่สูง การแตกยอดเพียง 1 ยอด
500 เกรย์	1±0.5	ลักษณะใบเหลืองด่างเป็นส่วนใหญ่ ลำต้นเริ่มงอและไม่สูง การแตกยอดเพียง 1 ยอด

ที่ระยะเวลาประมาณ 1 เดือน ของการเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1.125 มิลลิกรัม/ลิตร จะได้ต้นอ่อนสมบูรณ์ดังภาพที่ 11 ซึ่งจะสามารถทำการเก็บตัวอย่างไปทดสอบได้ เฉพาะกลุ่มควบคุม กลุ่ม 200 เกรย์ และกลุ่ม 300 เกรย์ เท่านั้น ส่วนกลุ่ม 400 เกรย์ และกลุ่ม 500 เกรย์ เนื่องจากต้นมีลักษณะแคระแกร็นไม่เจริญ โดยเมื่อทำการวัดน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นอ่อน พบว่ากลุ่ม 200 เกรย์ และกลุ่ม 300 เกรย์ จะมีน้ำหนักรวมของตัวอย่าง (จำนวนกลุ่มละ 8 ตัวอย่าง) มากกว่ากลุ่มควบคุม โดยกลุ่ม 200 เกรย์ จะมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมากที่สุด ทั้งนี้ น้ำหนักของตัวอย่างแต่ละกลุ่มแสดงดังตารางที่ 5



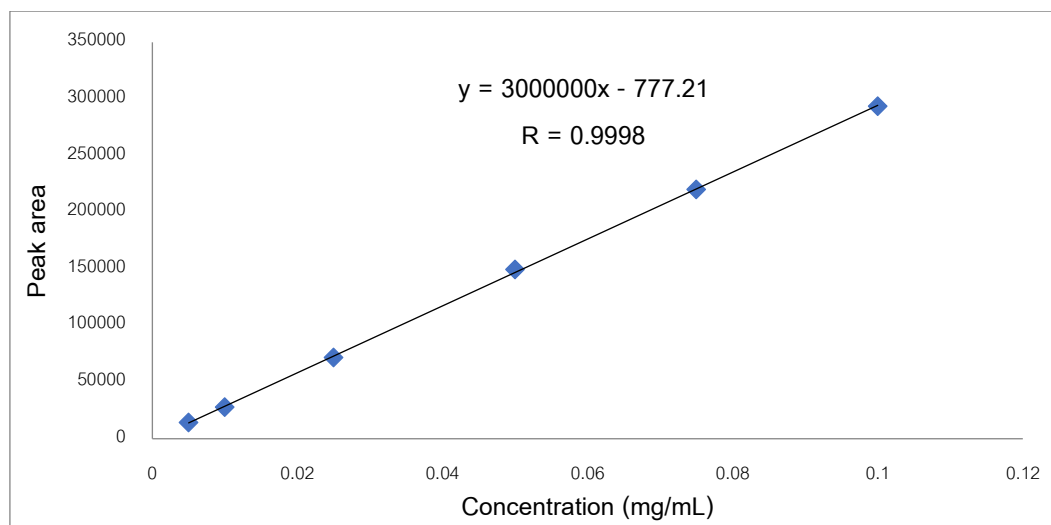
ภาพประกอบ 11 ภาพแสดงต้นหมามูยอินเดียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ตาราง 5 แสดงน้ำหนักของต้นหมามูยอินเดียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

กลุ่ม	น้ำหนักสด (g)	น้ำหนักแห้ง (mg)
กลุ่มควบคุม	1.81	175.23
กลุ่ม 200 เกรย์	3.20	325.22
กลุ่ม 300 เกรย์	2.45	252.55

### 3. ผลของรังสีแกมมาต่อปริมาณสาร L-DOPA ในต้นอ่อนหมามูยอินเดีย

นำตัวอย่างผงแห้งของต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกลุ่ม control กลุ่ม 200 เกรย์ และกลุ่ม 300 เกรย์ มาทำการตรวจวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนาได้และผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีแล้ว ซึ่งจะกล่าวในหัวข้อที่ 2 ของผลการดำเนินการวิจัย โดยจะทำการตรวจวิเคราะห์จำนวนกลุ่มละ 3 ซ้ำ คำนวณหาปริมาณสาร L-DOPA ในตัวอย่างโดยใช้กราฟมาตรฐาน ซึ่งเตรียมโดยใช้สารมาตรฐาน L-DOPA ความเข้มข้นในช่วง 0.005 – 0.1 mg/mL ที่ระดับ 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075 และ 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยกราฟมาตรฐานแสดงดังภาพที่ 12

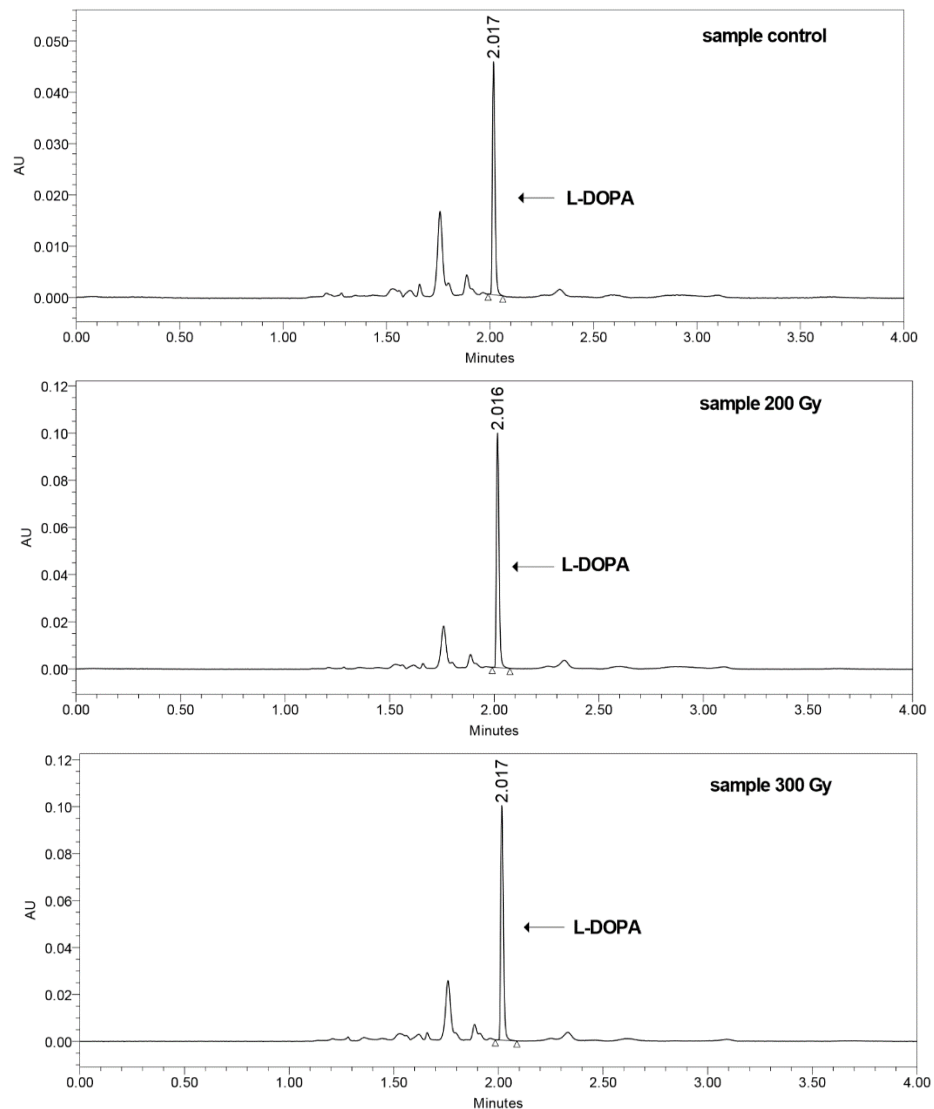


ภาพประกอบ 12 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน L-DOPA

ผลการตรวจวิเคราะห์พบว่าตัวอย่างกลุ่ม 200 เกรย์ และ กลุ่ม 300 เกรย์ มีความเข้มข้นของปริมาณสาร L-DOPA มากกว่ากลุ่ม control อย่างชัดเจนประมาณ 1 เท่าตัว โดยกลุ่ม 200 เกรย์ และ กลุ่ม 300 เกรย์ จะมีค่าความเข้มข้นของสาร L-DOPA ใกล้เคียงกันคือ 1.44 และ 1.49 %w/w ส่วนกลุ่ม control มีค่าความเข้มข้นของสาร L-DOPA เท่ากับ 0.67 %w/w โดยผลการตรวจวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 6 และโครมาโตแกรมของตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มแสดงดังภาพที่ 13

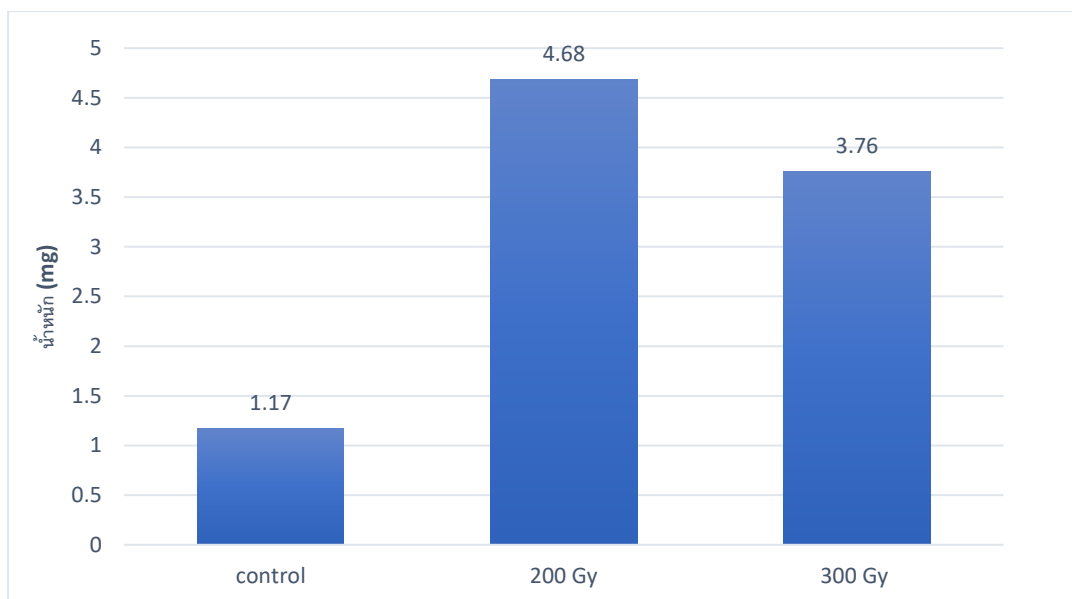
ตาราง 6 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร L-DOPA ในตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ L-DOPA (%w/w)	%RSD (n=3)
กลุ่ม control	0.67	1.38
กลุ่ม 200 เกรย์	1.44	0.89
กลุ่ม 300 เกรย์	1.49	1.58



ภาพประกอบ 13 ภาพแสดงโครมาโตแกรมของตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม

เมื่อดำเนินการปริมาณสาร L-DOPA ทั้งหมดที่ได้จากแต่ละกลุ่มโดยคิดจากปริมาณน้ำหนักรวบรวมและความเข้มข้นของ L-DOPA ในตัวอย่าง จะพบว่ากลุ่ม 200 เกรย์ ได้ปริมาณสาร L-DOPA มากกว่ากลุ่มควบคุมถึง 300% และกลุ่ม 300 เกรย์จะได้สาร L-DOPA มากกว่ากลุ่มควบคุม 220% โดยจะแสดงผลเปรียบเทียบปริมาณ L-DOPA ของแต่ละกลุ่มตัวอย่างดังภาพที่ 14



ภาพประกอบ 14 กราฟแสดงปริมาณ L-DOPA ของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

#### 4. ผลการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สาร L-DOPA ในตัวอย่างต้นอ่อนหมามูยอินเดีย

ดำเนินการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ L-DOPA ในตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยทำการดัดแปลงวิธีการสกัดตัวอย่างจากวิธีของ Hasegawa และคณะ ซึ่งเป็นวิธีการหาปริมาณสาร L-DOPA ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารยาเม็ดและยาแคปซูลหมามูยอินเดีย โดยใช้วิธีการสกัดแบบ ultrasound assisted extraction (UAE) เมื่อได้วิธีการสกัดตัวอย่างที่เหมาะสมแล้วก็ทำการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างก่อนการตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค solid phase extraction (SPE) เพื่อให้ตัวอย่างสารสกัดมีความบริสุทธิ์มากขึ้น ลดสารรบกวนในการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งการตรวจวิเคราะห์จะใช้ระบบ HPLC-DAD ที่ทำการพัฒนาระบบให้มีความเหมาะสมกับตัวอย่าง โดยผลการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สาร L-DOPA ในตัวอย่างต้นอ่อนหมามูยอินเดีย แบ่งได้เป็น วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาได้ และผลการตรวจสอบความถูกต้องวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

##### 4.1 วิธีการตรวจวิเคราะห์สาร L-DOPA ในตัวอย่างต้นอ่อนหมามูยอินเดียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

วิธีการตรวจวิเคราะห์สาร L-DOPA ในตัวอย่างต้นอ่อนหมามูยอินเดียที่พัฒนาได้ มีขั้นตอนดังนี้

#### 4.1.1 การเตรียมตัวอย่างวัตถุบิให้อยู่ในรูปผงแห้ง

นำตัวอย่างต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำนำไปตากผึ่งลมให้แห้งแล้วนำเข้าตู้อบร้อน อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท แล้วนำไปบดให้ละเอียดด้วยครกหิน จากนั้นนำไปผ่านร่บงเบอร์ 180 จะได้ผงแห้งของตัวอย่างดังภาพที่ 15



ภาพประกอบ 15 ภาพแสดงตัวอย่างผงแห้งของต้นหมามุ่ยอินเดีย

#### 4.1.2 วิธีการสกัดตัวอย่างผงแห้ง

ชั่งตัวอย่างผงแห้งจำนวน 10 มิลลิกรัม ใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายผสมเป็น acetonitrile: water: formic acid (50: 50: 1) จำนวน 2 รอบ ๆ ละ 500 ไมโครลิตร ด้วยวิธี ultrasound assisted extraction (UAE) โดยการแช่ในอ่างน้ำความถี่สูงซึ่งมีความถี่ของเครื่องอยู่ที่ 47 กิโลเฮิรตซ์ เป็นเวลา 20 นาที ทำการแยกเก็บส่วนใสแต่ละรอบด้วยวิธีการ centrifuge เมื่อทำการสกัดครบ 2 รอบแล้วให้ทำการล้างตะกอนอีก 2 รอบ ด้วยตัวทำละลายเดิมรอบละ 300 ไมโครลิตร นำส่วนใสทั้งหมดมารวมกันแล้วปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร ด้วย volumetric flask

#### 4.1.3 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดก่อนการตรวจวิเคราะห์

ดำเนินการเตรียมตัวอย่างสารสกัดให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยเทคนิค solid phase extraction (SPE) โดยเลือกใช้ SPE cartridge เป็น Sep-Pak silica ขนาด 500 มิลลิกรัม โดยมีขั้นตอนดังนี้

- 1) Conditioning คือการปรับสภาวะ SPE cartridge ด้วย acetonitrile ปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยระวังไม่ให้ตัว packing bed ของ SPE cartridge แห้ง
- 2) Sample loading คือการใส่ตัวอย่างด้วยการบีบตัวอย่างสารสกัดปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนตัว packing bed ของ SPE cartridge
- 3) Washing คือการชะล้างสารรบกวนออก ด้วยการให้ acetonitrile ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ซึ่งสาร L-DOPA จะยังคงติดอยู่บน packing bed ของ SPE cartridge
- 4) Eluting คือการ elute สาร L-DOPA ออกจากตัว SPE cartridge โดยใช้ตัวทำละลายผสมเป็น methanol: water: formic acid (96: 3.5: 0.5) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ซึ่งสารรบกวนส่วนหนึ่งยังคงติดอยู่บน packing bed ของ SPE cartridge ไม่หลุดลงมาด้วย
- 5) นำสารสกัดที่ elute ออกมาได้ในช่วง 4 ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบไนโตรเจน แล้วละลายกลับด้วยตัวทำละลายผสมเป็น acetonitrile: water: formic acid (50 : 50 : 1) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยจะทำการกรองด้วยหัวกรอง nylon filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ก่อนการฉีดเข้าเครื่อง HPLC

#### 4.1.4 สภาวะของระบบ HPLC

งานวิจัยนี้ดำเนินการพัฒนาระบบ HPLC จากวิธีของ Tushar Dhanani และคณะ ซึ่งใช้ในการตรวจสอบสาร L-DOPA ในตัวอย่างเมล็ดหมามูยอินเดีย ทำให้ได้ระบบ HPLC ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างต้นอ่อนของหมามูยอินเดีย ดังนี้

เครื่อง HPLC : Acquity Ultra Performance LC (UPLC) ของบริษัท Waters

Column: Luna Omega Polar C18 (150x2.1 mm, 1.6  $\mu$ m)

Column temperature: 35 °C

Mobile phase: 0.1% formic acid ในน้ำ: methanol (94.6: 5.4) ระบบ isocratic

Flow rate: 0.25 mL/min

Injection volume: 1  $\mu$ L

Detector: PDA detector ที่ 280 nm

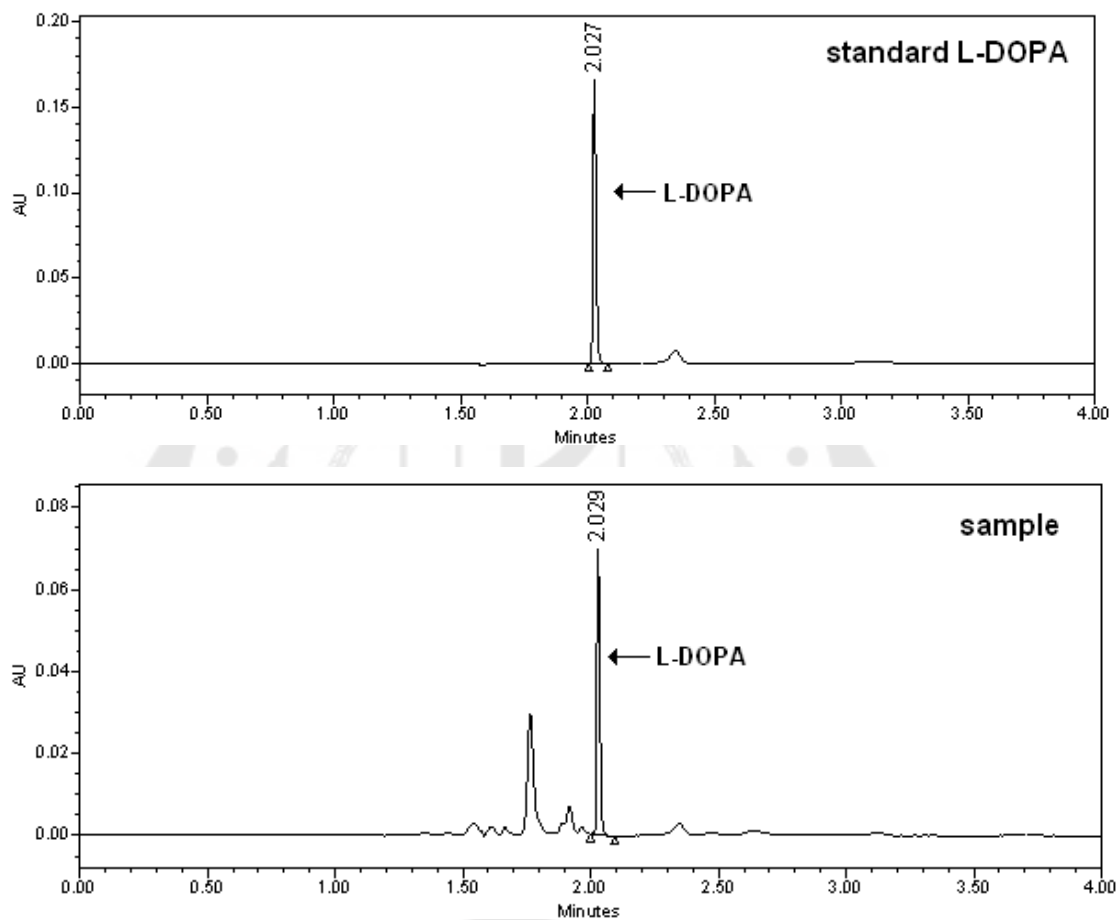
#### 4.2 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ของวิธีที่พัฒนาได้ เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาได้มีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องเชื่อถือได้ โดยผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีมีดังนี้



#### 4.2.1 ความจำเพาะเจาะจงของวิธี (specificity)

ทำการตรวจสอบความจำเพาะของวิธี (specificity) โดยการเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน L-DOPA กับของตัวอย่าง ซึ่งพบว่ามีพีคของ L-DOPA ตรงกันที่ค่า retention time 2.027 นาที โดยพีคที่ได้ไม่มีการรบกวนจากพีคของสารอื่นแต่อย่างใดดังภาพที่ 16

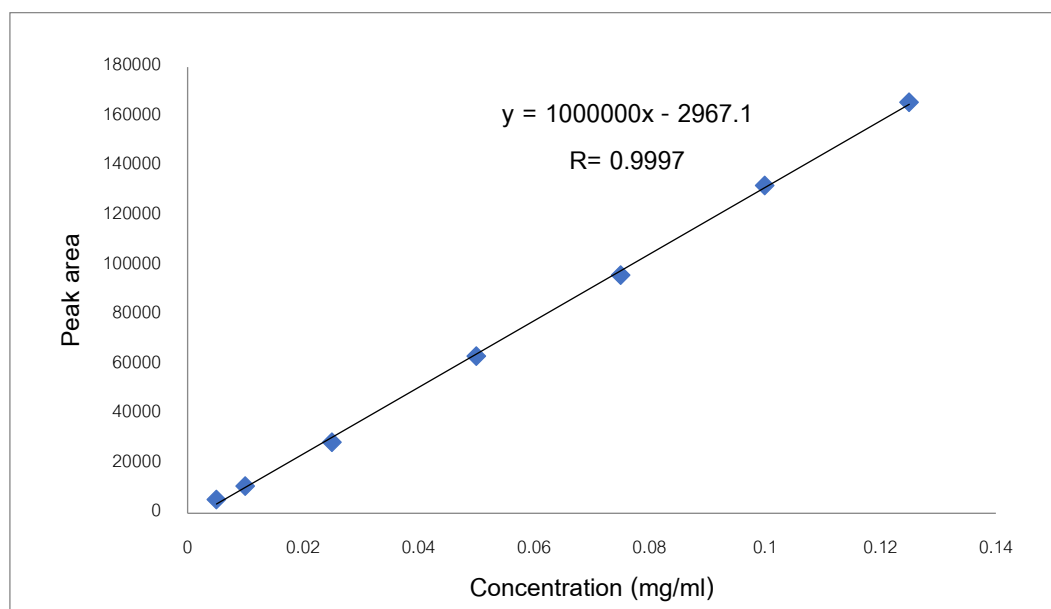


ภาพประกอบ 16 ภาพแสดงการเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน L-DOPA และของตัวอย่าง

#### 4.2.2 ความเป็นเส้นตรงของวิธี (linearity)

ทดสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีโดยการเติมสารมาตรฐาน L-DOPA ลงในตัวอย่าง จำนวน 6 ระดับ ในช่วงความเข้มข้น 0.01 – 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ตามวิธีระดับละ 1 ซ้ำ เมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับ peak area ที่ได้ พบว่า

ในช่วงความเข้มข้น 0.01 – 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นี้ได้กราฟเส้นตรงโดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ (correlation coefficient, R) เท่ากับ 0.9997 ดังภาพที่ 17



ภาพประกอบ 17 กราฟแสดงความเป็นเส้นตรงของวิธีการตรวจวิเคราะห์

#### 4.2.3 ความเที่ยงของวิธี (precision)

ทดสอบความเที่ยงของวิธีในรูปแบบของค่า repeatability และ ค่า intermediate precision โดยการทดสอบค่า repeatability นั้นทำโดยการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันจำนวน 6 ซ้ำภายในวันเดียวกัน พบว่าค่า %RSD ของผลการตรวจวิเคราะห์เท่ากับ 1.89 ส่วนค่า intermediate precision ทำการทดสอบโดยการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันวันละ 6 ซ้ำอีกจำนวน 2 วัน พบว่าค่า %RSD ของผลการตรวจวิเคราะห์ทั้ง 3 วัน เท่ากับ 2.46 ทั้งนี้ผลการทดสอบความเที่ยงของวิธีแสดงดังตารางที่ 7

ตาราง 7 แสดงผลการทดสอบความเที่ยงของวิธีการตรวจวิเคราะห์

	วันที่ 1 (n=6)	วันที่ 2 (n=6)	วันที่ 3 (n=6)
Repeatability			
%Dry weight of L-DOPA (Mean± SD)	1.87±0.02	1.90±0.03	1.82±0.03
%RSD	1.03	1.61	1.89
Intermediate precision			
%Dry weight of L-DOPA (Mean± SD)	1.87±0.05		
%RSD	2.46		

#### 4.2.4 ความแม่นยำของวิธี (accuracy)

ทำการทดสอบความแม่นยำของวิธีโดยการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างจำนวน 3 ระดับคือ 0.04, 0.08 และ 0.12 mg/mL ระดับละ 3 ซ้ำ แล้วทำการตรวจวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างตามวิธีที่พัฒนาได้ คำนวณหาค่า %recovery ของ L-DOPA โดยผลการทดสอบพบว่าค่า %recovery อยู่ในช่วง 89 – 92% ดังตารางที่ 8

ตาราง 8 แสดงผลการทดสอบค่า %recovery ของวิธี

Concentration after add standard (mg/mL)	Concentration found (mg/mL)	%Recovery	%RSD (n=3)
0.04	0.0364	91.04	1.04
0.08	0.0705	88.16	0.18
0.12	0.1104	92.04	2.32

#### 4.2.5 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD)

ค่า LOD ของวิธีมีค่าเท่ากับ 0.003 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ค่า signal – to – noise เท่ากับ 3:1

#### 4.2.6 ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

ค่า LOQ ของวิธีนี้มีค่าเท่ากับ 0.005 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ค่า signal – to – noise เท่ากับ 10:1

### 5. ผลการตรวจวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีนเป้าหมาย

แบ่งผลการตรวจวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีนเป้าหมาย ตามขั้นตอน ดังนี้

#### 5.1 ผลการคัดเลือกยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร L-DOPA

จากการศึกษาข้อมูลพบว่ามียางานการวิจัยของ Susheel Kumar Singh และคณะ<sup>(30)</sup> ทำการศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์หมามูยอินเดียโดยใช้รังสีแกมมา เพื่อต้องการให้ได้ปริมาณสาร L-DOPA ในเมล็ดที่สูงขึ้นพร้อมกับลดปริมาณเข็มพิษบนฝัก ซึ่งจะทำการศึกษาการแสดงออกของ ยีน dopadecarboxylase gene ควบคู่กับการศึกษาปริมาณสาร L-DOPA ในเมล็ดด้วย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกยีนเป้าหมายเป็นยีน dopadecarboxylase gene (DDC) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยน L-DOPA เป็น dopamine และเลือก housekeeping gene เป็นยีน 18s โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ยีน DDC ตามข้อมูลงานวิจัยของ Susheel Kumar Singh และคณะ และทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน 18s โดยใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูลลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโน (Gen Bank) ของ NCBI ทำให้ได้ไพรเมอร์ของยีนทั้งสองดังข้อมูลดังตารางที่ 9

ตาราง 9 แสดงไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ส่วนหนึ่งของยีน DDC และยีน 18S

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	ปริมาณ G และ C (%)	Tm (°C)	
DDC	เซนส์ไพรเมอร์	CAA-GTT-GGG-AAG-GAG-AAG-ATA-GG	47.8	50.2
	แอนติเซนส์ไพรเมอร์	CAA-TGG-TCC-CAC-AGG-ATC-A	52.6	58.0
18s	เซนส์ไพรเมอร์	CCT-TCG-GGA-TCG-GAG-TAA-TG	55.0	62.0
	แอนติเซนส์ไพรเมอร์	AGC-CCC-CAA-CTT-TCG-TTC-TT	50.0	60.0

#### 5.2 ผลการสกัด RNA ทั้งหมด (total RNA) จากตัวอย่างต้นอ่อนหมามูยอินเดีย

ดำเนินการสกัด total RNA จากตัวอย่างต้นอ่อนหมามูยอินเดียทั้งหมด 15 ตัวอย่าง (กลุ่ม control กลุ่ม 200 เกรย์ และกลุ่ม 300 เกรย์ กลุ่มละ 5 ตัวอย่าง) โดยนำตัวอย่างที่สกัดได้ไป

ตรวจสอบความบริสุทธิ์และตรวจวัดปริมาณโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260, 280 และ 320 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer ผลการตรวจวัดแสดงดังตารางที่ 10

ตาราง 10 แสดงผลการตรวจวัดคุณภาพของ total RNA

ตัวอย่าง	RNA purity (corr.)	RNA concentration (corr.) (ng/ $\mu$ L)	Raw data		
			260	280	320
Control#1	2.16	188.83	1.44	0.78	0.00
Control#2	2.20	266.06	1.54	0.84	0.00
Control#3	2.10	182.89	1.62	0.89	0.02
Control#4	2.13	473.99	1.48	0.81	0.01
Control#5	2.19	491.64	1.51	0.83	0.04
200 Gy#1	2.18	305.46	1.36	0.75	0.02
200 Gy#2	2.17	799.81	1.32	0.73	0.03
200 Gy#3	2.17	305.99	1.33	0.74	0.03
200 Gy#4	2.17	1055.63	1.46	0.79	0.00
200 Gy#5	2.13	203.62	1.49	0.81	0.00
300 Gy#1	2.02	178.2	1.43	0.78	0.02
300 Gy#2	2.18	294.2	1.48	0.80	0.01
300 Gy#3	2.15	195.7	1.30	0.73	0.04
300 Gy#4	2.12	303.34	1.60	0.87	0.02
300 Gy#5	2.16	588.4	1.26	0.70	0.02

### 5.3 ผลการสังเคราะห์ cDNA จาก template RNA

จาก template RNA ตัวอย่างละ 500 ng เมื่อผ่านขั้นตอนการสังเคราะห์ เป็น cDNA แล้ว นำไปตรวจวัดความบริสุทธิ์และความเข้มข้นอีกครั้งด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer ได้ผลดังตารางที่ 11

ตาราง 11 แสดงผลการตรวจวัดคุณภาพของ cDNA

ตัวอย่าง	DNA purity (corr.)	ssDNA concentration (corr.) (ng/ $\mu$ L)	Raw data		
			260	280	320
Control#1	1.85	949.25	0.23	0.11	0.00
Control#2	1.84	1011.55	0.34	0.16	0.01
Control#3	1.85	1051.51	0.24	0.12	0.02
Control#4	1.84	971.56	0.61	0.29	0.01
Control#5	1.87	969.67	0.58	0.29	0.03
200 Gy#1	1.83	884.02	0.4	0.2	0.02
200 Gy#2	1.83	851.31	1.01	0.47	0.01
200 Gy#3	1.83	853.41	0.4	0.2	0.02
200 Gy#4	1.84	964.59	1.34	0.63	0.02
200 Gy#5	1.85	981.63	0.28	0.15	0.03
300 Gy#1	1.85	928.04	0.22	0.11	0.00
300 Gy#2	1.85	970.82	0.39	0.19	0.02
300 Gy#3	1.82	833.57	0.26	0.13	0.02
300 Gy#4	1.85	1047.44	0.4	0.13	0.02
300 Gy#5	1.83	813.40	0.76	0.37	0.03

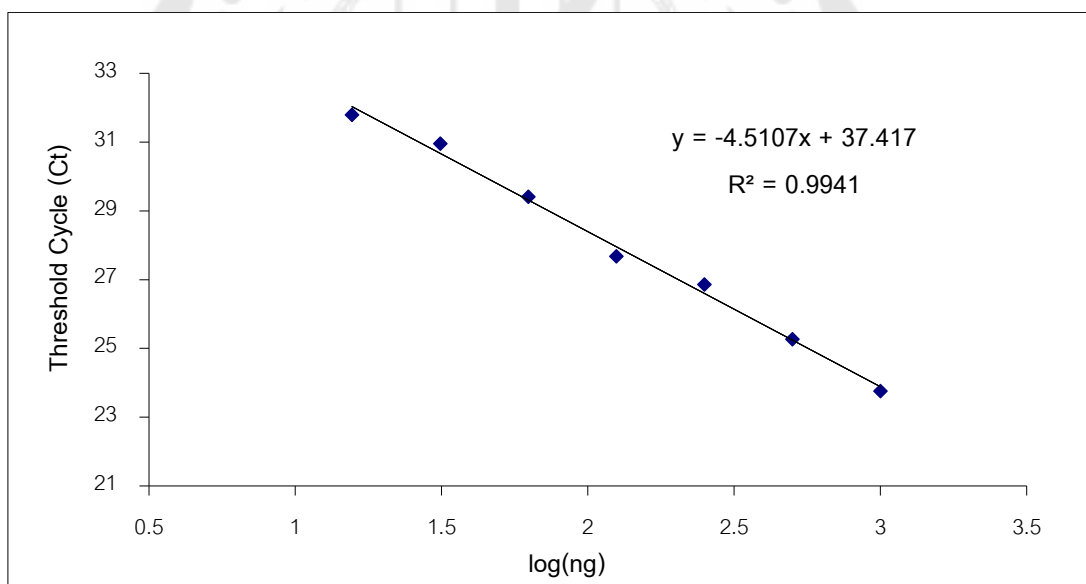
#### 5.4 ผลการหาค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยา PCR (Amplification efficiency,E) ของไพรเมอร์

##### 5.4.1 ค่า amplification efficiency ของไพรเมอร์ ยีน DDC

ผลการทดสอบพบว่าไพรเมอร์ของยีน DDC สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จาก cDNA ต้นแบบ ที่ปริมาณต่าง ๆ ในช่วง 15.625 – 1000 นาโนกรัม ได้ โดยมีค่า  $C_T$  (threshold cycle) ที่ได้แสดงดังตารางที่ 12 และได้กราฟมาตรฐานระหว่างค่า log ของปริมาณ DNA กับค่า  $C_T$  ดังภาพที่ 18 โดยจากค่า slope ของสมการเส้นตรงที่ได้คือ -4.5107 สามารถคำนวณหาค่า amplification efficiency (E) ของไพรเมอร์ ยีน DDC ได้เท่ากับ 1.67

ตาราง 12 แสดงผลปฏิบัติการ Real time PCR ของไพรเมอร์ของยีน DDC

cDNA input (ng)	C <sub>T</sub>
15.625	31.79
31.25	30.95
62.5	29.16
125.0	27.68
250.0	26.86
500.0	25.26
1000.0	24.29



ภาพประกอบ 18 กราฟมาตรฐานระหว่างค่า  $\log$  ของปริมาณ DNA กับ  
ค่า C<sub>T</sub> ของการทดสอบไพรเมอร์ของยีน DDC

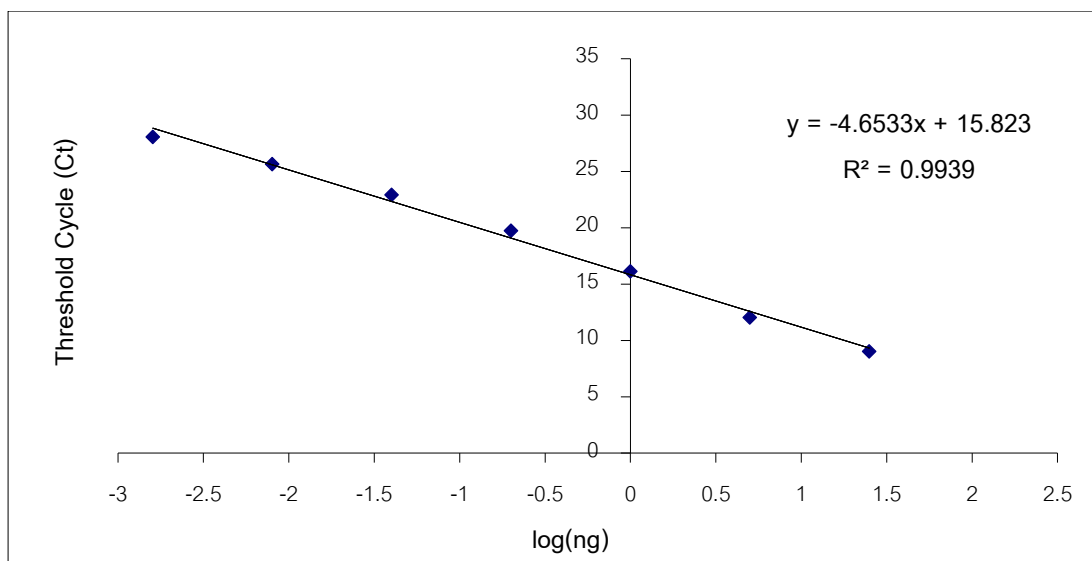
#### 5.4.2 ค่า amplification efficiency ของไพรเมอร์ ยีน 18S

ผลการทดสอบพบว่า primer ของยีน 18S สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จาก cDNA ต้นแบบ ที่ปริมาณต่าง ๆ ในช่วง 0.0016 – 25 ng ได้ โดยมีค่า  $C_T$  ที่ได้แสดงดังตารางที่ 13 และได้กราฟมาตรฐานระหว่างค่า log ของปริมาณ DNA กับค่า  $C_T$  ดังภาพที่ 19 โดยจากค่า slope ของสมการเส้นตรงที่ได้คือ -4.6533 สามารถคำนวณหาค่า amplification efficiency (E) ของไพรเมอร์ ยีน 18S ได้เท่ากับ 1.64

ตาราง 13 แสดงผลปฏิกิริยา Real time PCR ของไพรเมอร์ของยีน 18S

cDNA input (ng)	$C_T$
0.0016	28.06
0.0080	25.64
0.0400	22.91
0.2000	19.72
1.0000	16.13
5.0000	12.04
25.0000	9.03





ภาพประกอบ 19 กราฟมาตรฐานระหว่างค่า log ของปริมาณ DNA กับค่า  $C_T$  ไพรเมอร์ของยีน 18S

### 5.5 ผลการตรวจปริมาณยีน DDC และ ยีน 18S ในตัวอย่าง cDNA

ตัวอย่าง cDNA ของทั้งกลุ่ม control กลุ่ม 200 เกรย์ และกลุ่ม 300 เกรย์ ทั้ง 15 ตัวอย่าง ถูกนำมาทำปฏิกิริยา Real time PCR เพื่อหาปริมาณยีน DDC และยีน 18S ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยการหาปริมาณยีน DDC จะใช้ตัวอย่าง cDNA ตัวอย่างละ 500 นาโนกรัม ส่วนยีน 18S จะใช้ตัวอย่าง cDNA ตัวอย่างละ 1 นาโนกรัม โดยค่า  $C_T$  ที่ได้ของแต่ละตัวอย่างและแต่ละยีนแสดงในตารางที่ 14 พบว่าค่า  $C_T$  เฉลี่ยของกลุ่ม control ของยีน DDC เท่ากับ 26.49 และค่า  $C_T$  เฉลี่ยของกลุ่ม control ของยีน 18S จะได้เท่ากับ 18.06 ซึ่งค่า  $C_T$  เฉลี่ยของกลุ่ม control นี้ จะนำไปใช้ร่วมกับค่า amplification efficiency (E) ของไพรเมอร์แต่ละยีนที่หาได้ในข้อ 4.4 เพื่อนำไปคำนวณอัตราส่วนการแสดงออกของยีน DDC (ค่า ratio) ของตัวอย่างแต่ละตัวของกลุ่ม 200 เกรย์ และกลุ่ม 300 เกรย์ ตามวิธี The Pfaffi Method ซึ่งค่า ratio ที่ได้นี้จะหมายถึงสัดส่วนปริมาณการแสดงออกของยีนในตัวอย่างเทียบกับค่าเฉลี่ยของกลุ่ม control โดยค่า ratio ที่คำนวณได้ของตัวอย่างกลุ่ม 200 เกรย์ เท่ากับ 0.52 1.39 0.32 0.22 และ 3.78 และค่า ratio ของตัวอย่างกลุ่ม 300 เกรย์ เท่ากับ 0.83 1.47 2.41 0.58 และ 1.61 ดังแสดงในตารางที่ 14 ซึ่งจะพบว่า ratio ที่ได้ของตัวอย่างในกลุ่มเดียวกันนั้น มีทั้งที่ให้ผลการแสดงออกของยีน DDC มากกว่ากลุ่ม control คือ

ตัวอย่างที่ให้ค่า ratio น้อยกว่า 1.0 และมีตัวอย่างที่ให้ผลการแสดงออกของยีน DDC น้อยกว่ากลุ่ม control คือตัวอย่างที่ให้ค่า ratio มากกว่า 1.0 อยู่รวมกันในทั้งสองกลุ่มตัวอย่าง

ตาราง 14 แสดงผลการตรวจปริมาณยีน DDC และยีน 18s ในตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ยีน 18S					ยีน DDC					Ratio
	C <sub>T</sub> 1	C <sub>T</sub> 2	C <sub>T</sub> 3	ค่าเฉลี่ย C <sub>T</sub>	ΔC <sub>T</sub>	C <sub>T</sub> 1	C <sub>T</sub> 2	C <sub>T</sub> 3	ค่าเฉลี่ย C <sub>T</sub>	ΔC <sub>T</sub>	
Control 1	20.04	18.57	17.32	18.64		29.73	28.43	28.93	29.03		
Control 2	19.21	17.51	17.62	18.11		29.28	28.56	28.98	28.94		
Control 3	17.33	20.32	18.52	18.72		25.85	24.32	25.09	25.09		
Control 4	18.54	18.84	19.71	19.03		24.72	25.35	25.13	25.07		
Control 5	15.89	15.67	15.79	15.78		24.9	24.25	23.77	24.31		
ค่าเฉลี่ยกลุ่ม control				18.06					26.49		
200 Gy 1	19.25	17.96	17.59	18.27	-0.21	27.59	27.74	28.55	27.96	-1.47	0.52
200 Gy 2	19.58	18.38	18.96	18.97	-0.91	26.29	26.83	27.06	26.73	-0.24	1.39
200 Gy 3	18.06	16.83	17.9	17.6	0.46	-	28.21	28.27	28.24	-1.75	0.32
200 Gy 4	17.65	18.02	20.06	18.58	-0.52	30.05	30.23	29.42	29.9	-3.41	0.22
200 Gy 5	17.89	18.02	17.87	17.93	0.13	23.60	23.66	24.03	23.76	2.72	3.78
300 Gy 1	17.28	18.19	17.34	17.60	0.46	26.32	27.01	25.89	26.41	0.08	0.83
300 Gy 2	19.3	19.11	19.96	19.46	-1.40	27.16	27.46	26.63	27.08	-0.60	1.47
300 Gy 3	18.86	18.67	19.96	19.16	-1.10	25.59	26.54	25.39	25.84	0.65	2.41
300 Gy 4	18.49	19.26	19.39	19.03	-0.97	28.26	28.04	29.15	28.48	-2.00	0.58
300 Gy 5	17.21	17.45	18.95	17.87	0.19	25.02	25.19	25.92	25.38	1.11	1.61

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้สามารถพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สาร L-DOPA ในตัวอย่างต้นอ่อนหาม่มุ่ยอินเดียวได้ โดยประกอบด้วยขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างให้อยู่ในรูปผงแห้ง การสกัดตัวอย่างผงแห้งด้วยวิธี ultrasound assisted extraction (UAE) โดยตัวทำละลายผสมคือ acetonitrile: water: formic acid (50 : 50 : 1) การเตรียมตัวอย่างสารสกัดที่ได้ให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยเทคนิค solid phase extraction โดยใช้ SPE cartridge เป็นชนิด silica และสุดท้ายทำการตรวจวิเคราะห์ผ่านระบบ HPLC ที่เหมาะสมซึ่งจะประกอบด้วยเครื่อง HPLC เป็น Acquity Ultra Performance LC (UPLC) โดยจะทำการแยกสารผ่านคอลัมน์ Luna Omega Polar C18 (150x2.1 mm, 1.6  $\mu$ m) ด้วย mobile phase ที่เป็นระบบ isocratic ประกอบด้วย 0.1% formic acid ในน้ำ และ methanol ในอัตราส่วน 94.6 : 5.4 ตามลำดับ โดยมีอัตราการไหลเท่ากับ 0.25 มิลลิลิตร/นาที และตรวจวัดด้วย PDA detector ที่ 280 นาโนเมตร พบว่าวิธีนี้มีขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) เท่ากับ 0.003 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) พบว่าในช่วงความเข้มข้นของ L-DOPA ที่ 0.01 – 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความเป็นเส้นตรงโดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ (correlation coefficient, R) เท่ากับ 0.9997 ความเที่ยงของวิธี (precision) ของวิธีนี้พบว่าค่า repeatability และค่า intermediate precision มีค่า %RSD เท่ากับ 1.89 และ 2.46 ตามลำดับ ความแม่นยำของวิธี (accuracy) แสดงโดยค่า % recovery ของการเติมสารมาตรฐาน 3 ระดับพบว่าค่า % recovery อยู่ในช่วง 88.16 – 92.04 % ซึ่งจากผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี สรุปได้ว่าวิธีดังกล่าวนี้มีความไวและมีความจำเพาะสามารถนำไปใช้ตรวจสาร L-DOPA ในตัวอย่างต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้อย่างถูกต้องเชื่อถือได้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ plantlets จากกลุ่มตัวอย่างเมล็ดหาม่มุ่ยอินเดียวที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณต่าง ๆ คือกลุ่มควบคุม กลุ่ม 200 เกรย์ กลุ่ม 300 เกรย์ กลุ่ม 400 เกรย์ และกลุ่ม 500 เกรย์ นั้นเบื้องต้นพบว่ารังสีแกมมามีผลต่อการงอกของเมล็ดหาม่มุ่ยอินเดียวบนอาหารสูตร MS โดยเมล็ดกลุ่มควบคุมสามารถงอกได้ดีมีสัดส่วนการงอกอยู่ที่ 85% แต่เมล็ดที่ได้รับรังสีแกมมาจะมีสัดส่วนการงอกที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเมล็ดกลุ่ม 200 เกรย์

และกลุ่ม 300 เกรย์ จะมีสัดส่วนการงอกต่ำกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อยคืออยู่ที่ 75% และ 65% ตามลำดับ แต่กลุ่ม 400 เกรย์ และ 500 เกรย์ จะมีสัดส่วนการงอกที่ต่ำมากคือมีค่าเพียง 30% และ 40% ตามลำดับเท่านั้น รังสีแกมมายังมีผลต่อต้นอ่อนที่งอกออกมาจากเมล็ด โดยพบว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่ม 200 เกรย์ จะได้ต้นอ่อนที่มีลักษณะสมบูรณ์คล้ายกันคือมีรากจำนวนมาก ลักษณะใบเขียวใหญ่ และลำต้นตรงสูง แต่กลุ่ม 300 เกรย์ กลุ่ม 400 เกรย์ และ 500 เกรย์ จะพบลักษณะที่ผิดปกติคือมีรากจำนวนน้อย และความสูงต้นลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อนำส่วนยอดอ่อนจากต้นที่งอกจากเมล็ดในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง ไปทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1.125 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่ารังสีแกมมาจะส่งผลต่อการเจริญของต้นอ่อนที่เกิดจากยอดอ่อนนี้ โดยกลุ่มควบคุม กลุ่ม 200 เกรย์ และกลุ่ม 300 เกรย์ สามารถทำการเพาะเลี้ยงจนได้ต้นอ่อนที่สมบูรณ์ โดยมีการแตกยอดอยู่ที่ 2-3 ยอด แต่กลุ่ม 400 เกรย์ และ 500 เกรย์ พบว่ามีการแตกยอดเพียง 1 ยอด และได้ต้นที่มีลักษณะแคระแกร็น ไม่สามารถทำการเก็บตัวอย่างไปทดสอบต่อไปได้ เมื่อทำการวัดน้ำหนักตัวอย่างต้นอ่อนสมบูรณ์ที่ได้ พบว่ากลุ่ม 200 เกรย์ จะมีน้ำหนักแห้งของตัวอย่างมากที่สุดโดยมากกว่ากลุ่มควบคุม 85% รองลงมาคือกลุ่ม 300 เกรย์ จะมีน้ำหนักแห้งมากกว่ากลุ่มควบคุม 44% และจากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร L-DOPA ในตัวอย่างต้นอ่อน ทำให้ทราบว่ารังสีแกมมาที่มีผลต่อปริมาณสาร L-DOPA ในต้นอ่อน โดยกลุ่มที่ได้รับรังสี คือกลุ่ม 200 เกรย์ และกลุ่ม 300 เกรย์ นั้นจะมีความเข้มข้นของ L-DOPA ใกล้เคียงกันคือ 1.44% และ 1.49% ตามลำดับ ขณะที่กลุ่มควบคุมจะมีความเข้มข้นของ L-DOPA เพียง 0.67% ซึ่งเมื่อพิจารณาความสามารถในการสร้างสาร L-DOPA ของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง โดยคิดปริมาณ L-DOPA ทั้งหมดจากน้ำหนักตัวอย่างและความเข้มข้นของ L-DOPA ที่ได้ พบว่าตัวอย่างกลุ่ม 200 เกรย์ จะมีความสามารถในการสร้างสาร L-DOPA ได้มากที่สุด โดยมีปริมาณสารสูงกว่ากลุ่มควบคุมถึง 300% รองลงมาคือกลุ่ม 300 เกรย์ จะมีปริมาณสาร L-DOPA มากกว่ากลุ่มควบคุม 220%

ผลการศึกษางานของยีน DDC ซึ่งทำการศึกษาคู่กับการศึกษาปริมาณสาร L-DOPA พบว่าในตัวอย่างกลุ่มเดียวกันทั้งกลุ่ม 200 เกรย์ และกลุ่ม 300 เกรย์ นั้น จะพบทั้งตัวอย่างที่ให้ผลการแสดงออกของยีน DDC มากกว่ากลุ่มควบคุม รวมทั้งมีตัวอย่างที่ให้ผลการแสดงออกของยีน DDC น้อยกว่ากลุ่มควบคุมด้วย ซึ่งไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน ดังนั้นจากข้อมูลที่ได้นี้สามารถสรุปผลการทดลองได้ว่าเมล็ดพืชที่ฉายรังสีแกมมา 200 เกรย์ และ 300 เกรย์ จะมีความสามารถในการสร้างสาร L-DOPA ในต้นอ่อน ได้สูงขึ้นเมื่อเทียบกับเมล็ดที่ไม่ผ่านการฉายรังสี แต่ยังไม่สามารถสรุปผลการเพิ่มปริมาณสาร L-DOPA นี้ว่าเกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานของ

ของยีน DDC เนื่องจากตัวอย่างต่าง ๆ ในแต่ละกลุ่มให้ผลทั้งเพิ่มและลดการแสดงออกของยีนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

### อภิปรายผลการวิจัย

วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาได้นี้สามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้เป็นอย่างดีโดยพบวาระยะเวลาในการฉีดตัวอย่าง (runtime) ใช้เวลาเพียง 4 นาทีและพีคของสาร L-DOPA ในตัวอย่างสารสกัด ออกมาที่ระยะเวลาเพียง 2.029 นาที ซึ่งถือว่าเร็วที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีการตรวจวิเคราะห์ L-DOPA ในงานวิจัยอื่น ๆ โดยสาเหตุส่วนหนึ่งเป็นเพราะเครื่อง HPLC ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นชนิด UPLC ซึ่งจะมีประสิทธิภาพสูงกว่าระบบ HPLC ทั่วไป ในแง่ของความเร็วในการตรวจวิเคราะห์ อีกปัจจัยหนึ่งเป็นเพราะวิธีการตรวจวิเคราะห์นี้มีขั้นตอนการเตรียมสารสกัดให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นก่อนการตรวจวิเคราะห์โดยใช้ SPE ซึ่งพบว่าสามารถสกัดสารรบกวนออกไปได้มากโดยสังเกตได้จากขั้นตอนการ washing สารออกจาก SPE cartridge ด้วย acetonitrile จะเห็นส่วนหนึ่งของสารสกัดเป็นแถบสีเขียวหลุดออกมาโดยที่ตัวสาร L-DOPA ยังคงติดอยู่และจะออกมาในขั้นตอน eluting เท่านั้น ทำให้สารสกัดสุดท้ายมีความสะอาดมากขึ้น ช่วยทำให้คอลัมน์แยกสารได้ง่ายขึ้นและลดการอุดตันของคอลัมน์ได้ แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มขั้นตอนนี้พบว่าจะทำให้ค่า %recovery ลดลง ทั้งนี้เนื่องจากสาร L-DOPA นั้นมีความคงตัวต่ำถ้าอยู่ในสภาพที่มีความเป็นด่าง เจอความร้อนหรือแสง จะถูกออกซิเดชันได้ง่าย<sup>(31)</sup> ดังนั้นในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสารสกัดนี้จะต้องรักษาภาวะความเป็นกรดของตัวทำละลายที่ใช้ในการ eluting รวมทั้งควบคุมอุณหภูมิและระยะเวลาที่จะให้ในการทำให้ตัวอย่างสารสกัดที่ได้จากการ eluting นี้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบไนโตรเจน เพื่อรักษาค่า %recovery ของวิธีไม่ให้ต่ำกว่า 90%

ผลของรังสีแกมมาต่ออาการของเมล็ดบนอาหารสูตร MS พบว่าเมล็ดพืชเมื่อได้รับรังสีแกมมาจะมีสัดส่วนการงอกที่ลดลง โดยมีแนวโน้มเป็นไปตามปริมาณรังสีที่ได้รับ คือยิ่งได้รับรังสีปริมาณสูง สัดส่วนการงอกก็จะยิ่งน้อยลง ซึ่งก็จะพบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยส่วนใหญ่ที่พบว่าการได้รับรังสีในขนาดที่สูงมักจะให้ผลในการยับยั้งการงอก<sup>(11)</sup> แต่ก็เป็นที่น่าสังเกตว่าในกลุ่ม 400 เกรย์ และ 500 เกรย์ ที่แม้ว่าทั้งสองกลุ่มนี้จะมีสัดส่วนการงอกที่ต่ำมากเป็นไปตามแนวโน้มของปริมาณรังสีที่ได้รับ แต่เมื่อเปรียบเทียบกันเองของทั้งสองกลุ่มแล้ว กลับพบว่ากลุ่ม 500 เกรย์ มีสัดส่วนการงอกสูงกว่ากลุ่ม 400 เกรย์ โดยจากการพิจารณาแล้วพบว่าค่าความแตกต่างของสัดส่วนการงอกของทั้งสองกลุ่มนี้ต่างกันเพียงเล็กน้อยประกอบกับทั้งสองกลุ่มมีค่าสัดส่วนการงอกที่ต่ำมาก การที่

จะยืนยันผลในส่วนนี้ น่าจะต้องมีการทำการทดลองเพิ่มเติมโดยการเพิ่มปริมาณตัวอย่างเมล็ดรวมทั้งคัดเลือกตัวอย่างเมล็ดที่มีความสมบูรณ์ใกล้เคียงกัน

สำหรับผลของรังสีแกมมาด้านอื่น ๆ พบว่าที่ความแรงของรังสีแกมมา 200 เกรย์ และ 300 เกรย์ ทำให้การเจริญของต้นอ่อนหามาุ่มยอินเดียดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ฉายรังสีโดยดูจากน้ำหนักพืชที่ได้มากกว่า แต่ที่ความแรง 400 เกรย์ และ 500 เกรย์ นั้นจะได้ต้นที่แคระแกร็นไม่เจริญ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยเกี่ยวกับการฉายรังสีแกมมาอื่น ๆ ว่าที่รังสีแกมมาความแรงต่ำ ๆ จะมีผลช่วยกระตุ้นการเจริญแต่ที่ความแรงสูงเกินไปจะยับยั้งการเจริญของพืชได้<sup>(11, 13)</sup> สำหรับผลของรังสีแกมมาต่อความสามารถในการสร้างสาร L-DOPA พบว่าวิธีการนี้สามารถเพิ่มความสามารถในการสร้างสาร L-DOPA ได้ชัดเจน โดยให้สาร L-DOPA มากกว่ากลุ่ม control สูงสุดถึง 300% (ในกลุ่ม 200 เกรย์) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Upendra Kumar และคณะ<sup>(32)</sup> ที่สามารถทำการกระตุ้นให้ต้นอ่อนต้นหามาุ่มยอินเดียสร้างสาร L-DOPA มากขึ้นไปอยู่ที่ 0.42% (w/w) โดยมากกว่ากลุ่ม control เพียง 16.67% จากการเติม NaCl ในอาหารสูตร MS เป็นตัวกระตุ้น แต่การใช้รังสีแกมมาในงานวิจัยนี้พบว่าได้ค่าความเข้มข้นของ L-DOPA สูงสุดอยู่ที่ 1.49% w/w (ในกลุ่ม 300 เกรย์) และยิ่งมากกว่ากลุ่ม control ถึง 122%

สำหรับกลไกของรังสีแกมมาในการเพิ่มความสามารถในการสร้างสาร L-DOPA ในงานวิจัยนี้ไม่สามารถสรุปได้ว่ามีผลจากการยับยั้งการทำงานของยีน dopadecarboxylase gene เหมือนงานวิจัยของ Susheel Kumar Singh และคณะ<sup>(30)</sup> เนื่องจากผลการทดสอบมีทั้งเพิ่มและลดการทำงานของยีนนี้เมื่อเทียบกับกลุ่ม control ซึ่งไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน ดังนั้นมีความเป็นไปได้ที่ผลของการเพิ่มปริมาณสาร L-DOPA นี้ น่าจะเกี่ยวข้องกับเอนไซม์อื่นในขั้นตอนกระบวนการก่อนที่จะเกิดเป็นสาร L-DOPA ซึ่งมีอยู่หลายขั้นตอนด้วยกันซึ่งจะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

### ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาการทำงานของยีนอื่นเพิ่มเติมเพื่อที่จะได้ทราบกลไกที่แน่ชัดของรังสีแกมมาในการเพิ่มความสามารถในการสร้างสาร L-DOPA ในต้นอ่อนในงานวิจัยนี้ และแม้ว่าในงานวิจัยนี้จะสามารถเพิ่มปริมาณสาร L-DOPA ได้อย่างชัดเจนในต้นอ่อน แต่เมื่อเทียบกับปริมาณ L-DOPA ที่มีอยู่ในเมล็ดซึ่งมีอยู่ 3.1-6.1% แล้ว ทำให้วิธีการนี้จะยังไม่สามารถทดแทนวิธีการปลูกแบบดั้งเดิมได้อย่างคุ้มค่า จำเป็นต้องทำการศึกษาต่อยอดเพิ่มเติมก่อน เช่น การศึกษาปริมาณสารในต้นอ่อนรุ่นต่อไปที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชรุ่นแรก หรือการศึกษาปริมาณสารใน

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแบบแคลัสแทนการสร้างเป็นต้นอ่อน เป็นต้น เพื่อที่จะพัฒนาเป็นวิธี  
ทดแทนวิธีการปลูกได้อย่างคุ้มค่าต่อไป







## บรรณานุกรม

1. Ingle PK. L-DOPA bearing plants. Nat Prod Rad 2003;2(3):126-33.
2. Patil SA, Apine OA, Surwase SN, Jadhav JP. Biological sources of L-DOPA: An alternative approach. Advances in Parkinson's Disease. 2013;2(3):81-7.
3. Wi SG, Chung BY, Kim J-S, Kim J-H, Baek M-H, Lee J-W, et al. Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants. Micron. 2007;38(6):553-64.
4. Chinnasamy K, Thangamani C. Amazing bean *Mucuna pruriens*: A comprehensive review. Journal of Medicinal Plants Research. 2014;8(2):138-43.
5. นันทวัน บุญยะประภัสร์, อรุณช โชคชัยเจริญพร. สมุนไพรพื้นบ้าน. กรุงเทพฯ: บริษัท ประชาชน จำกัด; 2543.
6. Hussian G, Manyam BV. *Mucuna pruriens* proves more effective than L-DOPA in Parkinson's disease animal model. Phytotherapy Research. 1997;11(6):419-23.
7. Katzenschlager R, Evans A, Manson A, Patsalos PN, Ratnaraj N, Watt H, et al. *Mucuna pruriens* in Parkinson's disease: a double blind clinical and pharmacological study. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry. 2004;75(12):1672-7.
8. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RE, editors. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 9th ed. The United States of America: The McGraw-Hill company; 1996.
9. Sigma-aldrich. 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine-Product information 2017 [cited 2017 10 October]. Available from: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/d9628pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/d9628pis.pdf).
10. อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์. การกลายพันธุ์ : เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2550.
11. Jan S, Parween T, Siddiqi TO, Mahmooduzzafar. Effect of gamma radiation on morphological, biochemical, and physiological aspects of plants and plant products. Environmental Reviews. 2012;20(1):17-39.
12. Mattson MP. Hormesis defined. Ageing Research Reviews. 2008;7(1):1-7.

13. Lokesha R, Vasudeva R, Shashidhar HE, Reddy ANY. Radio-sensitivity of *Bambusa arundinacea* to gamma rays. *Journal of Tropical Forest Science*. 1994;6(4):444-50.
14. Kumagai J, Katoh H, Kumada T, Tanaka A, Tano S, Miyazaki T. Strong resistance of *Arabidopsis thaliana* and *Raphanus sativus* seeds for ionizing radiation as studied by ESR, ENDOR, ESE spectroscopy and germination measurement: Effect of long-lived and super-long-lived radicals. *Radiation Physics and Chemistry*. 2000;57(1):75-83.
15. Gunckel JE. IV. The Effects of Ionizing Radiation on Plants: Morphological Effects. *The Quarterly Review of Biology*. 1957;32(1):46-56.
16. Momiyama M, Koshiha T, Furukawa K, Kamiya Y, Satô M. Effects of  $\gamma$ -irradiation on elongation and indole-3-acetic acid level of maize (*Zea mays*) coleoptiles. *Environ Exp Bot*. 1999;41:131-43.
17. Le Caer S. Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H<sub>2</sub> Production under Ionizing Radiation. *Water*. 2011;3:235-53.
18. Chung BY, Lee YB, Baek MH, Kim JH, Wi SG, Kim JS. Effects of low-dose gamma-irradiation on production of shikonin derivatives in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon* S. *Radiation Physics and Chemistry*. 2006;75(9):1018-23.
19. Young Kim M, Jae Im S, Hye Kim J, Kim I-J, Lee H, Lee D, et al. Changes in the phenolic composition of citrus fruits and leaves prepared by gamma irradiation of budsticks. *Life Science Journal*. 2012;9(3):1281-5.
20. Jan S, Parween T, O. Siddiqi T, Mahmooduzzafar n. Gamma radiation effects on growth and yield attributes of *Psoralea corylifolia* L. with reference to enhanced production of psoralen. *Plant Growth Regul*. 2010;64:163-71.
21. S Abdel-Hady M, M Okasha E, S A Soliman S, Talaat M. Effect of Gamma Radiation and Gibberellic Acid on Germination and Alkaloid Production in *Atropa belladonna* L. *Aust J Basic Appl Sci*. 2008;2(3):401-5.
22. แม้น อมรสิทธิ์, และคณะ. หลักการและเทคนิควิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. กรุงเทพฯ: บริษัท ชวนพิมพ์ 50 จำกัด; 2555.
23. Maeda H, Dudareva N. The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2012;63:73-105.

24. Herrmann KM. The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *The Plant cell*. 1995;7(7):907-19.
25. Tzin V, Galili G. New Insights into the Shikimate and Aromatic Amino Acids Biosynthesis Pathways in Plants. *Mol Plant*. 2010;3(6):956-72.
26. Schenck C, Chen S, Siehl D, A Maeda H. Non-plastidic, tyrosine-insensitive prephenate dehydrogenases from legumes. *Nat Chem Biol*. 2014;11(1):52-7.
27. Ricardo Soares A, Marchiosi R, Siqueira-Soares R, Lima R, dos Santos W, Ferrarese-Filho O. The role of L-DOPA in plants. *Plant Signal Behav*. 2014;9(3):e28275.
28. กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. พันธุวิศวกรรม เทคโนโลยีของฉันทน์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2557.
29. Faisal M, Siddique I, Anis M. An efficient plant regeneration system for *Mucuna pruriens* L. (DC.) using cotyledonary node explants. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 2006;42(1):59-64.
30. Singh SK, Yadav D, Lal RK, Gupta MM, Dhawan SS. Inducing mutations through  $\gamma$ -irradiation in seeds of *Mucuna pruriens* for developing high L-DOPA-yielding genotypes. *International Journal of Radiation Biology*. 2017;93(4):426-32.
31. Zhou Y, Alany R, Chuang V, Wen J. Studies of the Rate Constant of L-DOPA Oxidation and Decarboxylation by HPLC. *Chromatographia*. 2012;75(11-12):597-606.
32. Kumar U, Kumar I, Priyanka, Yerramilli V. In vitro Production of L-DOPA In Tissue Cultures of *Mucuna pruriens* L. *VegetosVegetos*. 2011;24(1):111-3.



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายเดชมงคล วิจิสุนทร
วัน เดือน ปี เกิด	15 พฤษภาคม 2522
สถานที่เกิด	จันทบุรี
วุฒิการศึกษา	เภสัชศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	1/654 ซ.รัตนธิเบศร์1 ถ.รัตนธิเบศร์ ต.บางกระสอบ อ.เมือง จ.นนทบุรี 11000

