รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : การศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. **โครงการวิจัย** : พัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์
   กิจกรรม : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ในกระทือ

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) :** การฉายรังสีเนื้อเยื่อกระทือให้เกิดการกลายพันธุ์
   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : *In Vitro* Mutation in *Zingiber spectabile* Griff. and *Zingiber zerumbet* Smith. by Irridiation

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวอำไพ สินพัฒนานนท์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน :

นางสาวจีราพร แก่นทรัพย์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสาวนาตยา ดำอำไพ	ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง
นางภุมรินทร์ วณิชชนานันท์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. **บทคัดย่อ**

กระทือเป็นพืชตระกูลขิงอยู่ในสกุล Zingiber ใช้ประโยชน์เป็นอาหาร พืชสมุนไพร และไม้ดอกไม้ประดับ กำลังได้รับความนิยมเป็นไม้ตัดดอก เพราะใบประดับที่เหมือนดอกมีรูปทรงแปลกตา สีสวยงาม แต่มีความหลากหลายน้อย จึงใช้รังสีแกมมาร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสร้างต้นกระทือกลายพันธุ์ เพื่อเพิ่มความหลากหลายและเพิ่มฐานพันธุกรรม ดำเนินการโดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาจากลำต้นเทียมของกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith. และกระทือพิลาส *Zingiber spectabile* Griff. เพิ่มปริมาณยอด จากนั้นนำกระทือที่เพาะเลี้ยงไปฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรังและแบบเฉียบพลัน ตรวจคัดเลือกกระทือในขวดขณะเพาะเลี้ยง พบกระทือพิลาส *Zingiber spectabile* Griff. ที่ได้รับรังสีแกมมาแบบเรื้อรัง 5 Krad เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ให้ลักษณะแตกต่างที่คาดว่าเกิดจากการกลายพันธุ์ไปจากปกติ ได้แก่ ลักษณะใบบิด ใบลาย ใบบิดลาย ใบเขียวเข้ม ใบและต้นเล็กบอบบาง ตรวจสอบการกลายพันธุ์ระดับพลอยดิด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์ ไม่พบการกลายพันธุ์ระดับพลอยดิ และตรวจสอบการกลายพันธุ์ระดับดิพลอยด์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลโดยคัดเลือกไพรเมอร์ที่ประยุกต์มาจาก RAPD และ ISSR ของขิง *Zingiber officinale* 16 ไพรเมอร์ ได้ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างทาง

พันธุกรรมของกระทือ *Zingiber spectabile* Griff. กับ *Zingiber zerumbet* Smith. 6 ไพรเมอร์ นำไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ไปตรวจสอบกับกระทือที่คาดว่าเกิดการกลายพันธุ์ พบว่ากระทือที่มีใบบิดลายเป็นต้นกลายพันธุ์ โดยให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอแตกต่างกับกระทือปกติ เมื่อใช้ไพรเมอร์ชนิด RAPD ที่มีลำดับเบส 5' AGACGGCTCC 3'

6. คำนำ

กระทือเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี จัดอยู่ในอันดับ Zingiberales วงศ์ Zingiberaceae สกุล Zingiber มีลำต้นประเภทเดียวกับไพล หรือขิง ลำต้นเป็นเหง้าอยู่ใต้ดิน สีเหลืองซีดๆ เหง้ามีขนาดใหญ่ เนื้อข้างในสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว แตกแขนงเป็นกอ ใบเดี่ยวออกตรงข้ามเรียงสลับในระนาบเดียวกัน ใบยาวเรียวรูปหอก สีเขียวซ้อนกันเป็นแผงติดต่อกันหุ้มเป็นลำต้นเทียม ก้านช่อดอกแบบตั้งตรงแทงออกมาจากเหง้าใต้ดิน ใบประดับที่มีลักษณะเหมือนส่วนดอกเรียงซ้อนกันแน่นเป็นระเบียบ ดอกโผล่ออกมาจากซอกใบประดับ เมื่อออกดอกแล้วจะเหลือแต่เหง้าใต้ดิน และจะแทงหน่อใหม่ในช่วงฤดูฝน เป็นพรรณไม้ที่มีการขยายพันธุ์ด้วยการแยกหน่อ เจริญเติบโตได้ดีในดินอุดมร่วนซุย

กระทือ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zingiber zerumbet* Smith. มีชื่อเรียกอื่นๆ ว่ากระทือป่า กระทือบ้าน กะแวน กะแอน แฮวดำ เฮียวแดง เฮียวดำ แสมดำ ลำต้นเทียมสูงได้ถึง 1 เมตร ใบกว้าง 3-10 เซนติเมตร ยาว 14-40 เซนติเมตร ก้านช่อดอกยาว 14-45 เซนติเมตร ใบประดับสีเขียวแล้วเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม มี 10-25 ใบ เรียงซ้อนกันแน่นเป็นระเบียบ รูปไข่กลับกว้างหรือเกือบกลม ดอกสีขาวอมเหลือง โคนกลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นหลอด ยาวประมาณ 2.5 เซนติเมตร ปลายแยกเป็น 3 แฉก ผลแบบผลแห้งแตก รูปไข่กลับ ขนาดเล็ก ผิวเรียบ สีแดง ยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร เมล็ดรูปขอบขนาน ค่อนข้างกลม มีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นริ้วสีขาว เมล็ดสีดำเป็นมัน ออกดอกเดือนสิงหาคมถึงกันยายน ติดผลราวเดือนตุลาคม หน่ออ่อน เนื้ออ่อนในลำต้น ช่อดอกอ่อน รับประทานเป็นผักสดได้(ฐานข้อมูลสมุนไพร, 2553 ; วิกิพีเดีย, 2558)

กระทือพิลาส มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zingiber spectabile* Griff. มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามท้องถิ่น ได้แก่ กระทือช้าง กระทือแดง กระทือป่า จะเงาะ ดางเงาะ ดาเงาะ ไพลเหลือง ลำต้นเทียมมีความสูง 2-3 เมตร ใบกว้าง 6-10 ซม. ยาว 30-50 ซม. ใบประดับเรียงซ้อนอัดกันแน่นเป็นช่อสีเหลือง รูปทรงกระบอกแข็ง กว้าง 6-7 ซม. ยาว 10-30 ซม. กลีบรองดอกสีครีม ยาวถึง 3.5 ซม. ผิวเกลี้ยง ดอกเป็นกรวย ยาว 3 ซม. ปลายกว้างถึง 1 ซม. กลีบปาก แยกเป็น 3 แฉก สีม่วงดำมีจุดสีเหลือง ปลายแฉก ตรงกลางเว้าตื้นอ้า เป็น 2 แฉกเล็ก เกสรผู้อันเดียว ก้านสั้น อับเรณูยาว 1.2 ซม. ก้านชูเกสรตัวเมียสีม่วง รังไข่มีขนประปรายสีดำ ผล รูปรีกว้าง 1 ซม. ยาว 3 ซม. พบในมาเลเซีย ในประเทศไทยพบทางภาคใต้ ขึ้นในป่าดงดิบ ริมลำธารหรือชายป่า ที่ระดับความสูงถึง 300 เมตร ออกดอกช่วงเดือนกรกฎาคมถึงพฤศจิกายน ติดผลช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคม เป็นพืชหายาก ปัจจุบัน

นอกจากจะนำมาปลูกเป็นไม้ประดับแล้ว ชาวบ้านในภาคใต้ยังนิยมนำยอดอ่อนมาต้มกินเป็นผักแกล้มอีกด้วย (สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ, 2555 ; Myfirstbrain.com, 2012)

กระทือเป็นพืชที่มีประโยชน์หลายด้าน คือ ใช้เป็นอาหารโดย หน่ออ่อน เนื้ออ่อนในลำต้น และช่อดอกอ่อน นิยมนำมาแกงเผ็ด แกงไตปลา ต้มจิ้มน้ำพริก ผัด ยำ กระทือมีรสชาติเผ็ดร้อนเล็กน้อยและกลิ่นค่อนข้างฉุน ประโยชน์ที่สำคัญ คือ ประโยชน์ทางด้านสมุนไพร ใช้เป็นยาแก้เบื่ออาหาร ยาขับลม แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ จุกเสียด ปวดท้อง บำรุงธาตุ ขับปัสสาวะ เสมหะเป็นพิษ และบำรุงน้ำนม ในเหง้ามีน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา โดยพบว่า zerumbone มีฤทธิ์ต้านการหดเกร็งตัวของลำไส้ และพบว่า zerumbone ยับยั้งการเกิดมะเร็ง และสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มจากเหง้ากระทือ มีฤทธิ์ยับยั้งโปรโตซัวกลุ่ม Giardia จึงมีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้ากระทือมาใช้ในทางเภสัชวิทยาและเวชสำอาง ปัจจุบันกระทือเป็นไม้ตัดดอกเมืองร้อนที่กำลังเป็นที่นิยม เนื่องจากกระทือมีลักษณะเด่นที่ดอกมีสีสันสวยงาม รูปทรงแปลกตามีเอกลักษณ์เฉพาะตัว และมีความคงทน มีอายุการใช้งานนาน เหมาะสำหรับใช้ในการจัดแจกันและจัดช่อดอกไม้ในงานพิธีต่างๆ จึงเป็นที่ต้องการของตลาดไม้ตัดดอก ตลาดต่างประเทศเริ่มให้ความสนใจ มีการส่งกระทือเหลืองไปยังประเทศญี่ปุ่น

Christine Stanly และ Keng Chan Lai (2007) ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์กระทือ โดยเพาะเลี้ยงตาจาก rhizomes ในอาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA และ IBA ปริมาณ 0.5 มก./ล. แต่ละยอดที่เพาะเลี้ยงสามารถเพิ่มปริมาณเฉลี่ยเป็น 3.9 ยอดในอาหารแข็ง และ 6.4 ยอดในอาหารเหลว หลังจากปรับสภาพและย้ายลงดิน ต้นทั้งหมดมีชีวิตรอด

การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสี ทำให้เกิดการกลายและสามารถคัดพันธุ์กลายออกมาได้หลายชนิด เพราะเทคนิคดังกล่าวสามารถช่วยในการแยกส่วนกลาย (mutated sector) ออกจากส่วนปกติในกรณีที่เกิดไคเมอรา แล้วนำไปขยายพันธุ์ต่อไปได้ ดังนั้น จึงเป็นวิธีการที่ช่วยรักษาส่วนกลายไว้ไม่ให้สูญหายไป เพราะการคัดเลือกพันธุ์กลายหรือลักษณะกลายจะเป็นการคัดเลือกในระดับดิพลอยด์ ซึ่งมีเซลล์กลายและเซลล์ปกติเจริญอยู่ด้วยกัน เซลล์กลายมักมีการแข่งขันสู้เซลล์ปกติไม่ได้ จึงมีโอกาสเจริญไปเป็นส่วนยอดและเป็นต้นพืชได้น้อยกว่าเซลล์ปกติ ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะสามารถแยกลักษณะกลายออกมาเลี้ยงได้ เซลล์กลายจึงมีโอกาสเจริญเป็นต้นพืชที่กลายพันธุ์ต่อไป (อรุณี, 2550)

Lamseejan และคณะ (2001) นำยอดอ่อนของปทุมมาพันธุ์พื้นเมืองดอกชมพูในสภาพปลอดเชื้อไปฉายรังสีแกมมาปริมาณ 0, 10, 30, 50, 70, 90 และ 110 เกรย์ พบว่า $LD_{50(30)}$ มีค่าเท่ากับ 28 เกรย์ ทำการย้ายลงอาหารใหม่ จนถึงรุ่น M_1V_4 จึงชักนำให้เกิดรากและนำออกปลูกในเรือนเพาะชำ พบว่า ที่ปริมาณรังสี 30 เกรย์ มีความผันแปรของสีดอกค่อนข้างสูง คือ มีตั้งแต่สีชมพูเข้มจนเกือบขาว

การศึกษาโครโมโซมในเซลล์พืชแต่ละชนิด จะใช้เทคนิคในการตรวจนับจำนวนโครโมโซมที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน อาจมีการดัดแปลงวิธีการในบางขั้นตอนเพื่อให้เหมาะสมกับชนิดของพืชชนิดนั้นๆ โดยมากจะนำเนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายราก ปลายยอด หรือดอกอ่อน มาใช้ในการศึกษา และตรวจนับจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วิธีนี้มีข้อดีคือประหยัด ราคาถูก แต่ก็มีข้อเสียคือ ไม่สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ในทุกเซลล์ เนื่องจากในการนับจำนวนต้องอาศัยเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟส ซึ่งทำได้ยาก และต้องใช้ฝีมือในการเตรียมสไลด์เป็นอย่างดี จึงจะสามารถเห็นโครโมโซมได้ และในพืชที่มีโครโมโซมขนาดเล็กมาก จะมีความลำบากในการนับ วิธีการแก้ไขปัญหาดังกล่าว งานวิจัยทางพืชในปัจจุบันจึงได้มีการนำเอาเทคนิคการตรวจนับจำนวนโครโมโซมโดยใช้เครื่อง Flow cytometry เข้ามาช่วย ซึ่งการวัดด้วยวิธีนี้จะมีความรวดเร็วและแม่นยำสูง

Flow cytometry ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เซลล์ ด้วยการฉายแสงเลเซอร์ลงสู่เซลล์ที่ผ่านการย้อมสารเรืองแสง แล้ววัดการเรืองแสงที่เกิดขึ้นบนผิวเซลล์หรือภายในเซลล์ โดยแต่ละเซลล์จะถูกบีบให้เคลื่อนที่ผ่านเครื่องทีละ 1 เซลล์ หรือเป็นเซลล์เดี่ยวๆ เทคนิคนี้มีความไวสูง และสามารถตรวจวัดเซลล์ได้เป็นจำนวนมากด้วยความรวดเร็ว เครื่องจะทำการแปลสัญญาณแสงที่หักเห และสะท้อนกลับ ออกมาเป็นกราฟ การอ่านผลจะต้องเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน จึงจะสามารถบอกความแตกต่างของตัวอย่างได้ มีการประยุกต์ใช้เทคนิค Flow cytometry ในงานต่างๆ เช่น การตรวจหาความผิดปกติในโครโมโซม การตรวจหาเซลล์มะเร็งเพื่อติดตามผลการรักษา การตรวจหา Autoantibodies บนผิวเซลล์ในโรค Autoimmune ต่างๆ การทดสอบประสิทธิภาพของยาที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เป็นต้น สำหรับงานวิจัยทางพืชได้มีการนำ Flow cytometry มาใช้ในการศึกษาปริมาณ DNA และจำนวนชุดโครโมโซมในพืช โดยนำเนื้อเยื่อจากใบอ่อน ดอก และราก มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ เพื่อทำให้นิวเคลียสหลุดออกมาจากเซลล์ นำนิวเคลียสไปย้อมสารสีเรืองแสง และตรวจวัดปริมาณ DNA โดยใช้เครื่อง Flow cytometry จะพบว่าพืชที่มี 4n จะมีปริมาณ DNA เป็น 2 เท่า ของพืชที่มี 2n (วริศรา, 2558)

RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) เป็นวิธีตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR แบบหนึ่งที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด มีโอกาสที่จะเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ได้หลายตำแหน่ง ทำให้ตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละหลายตำแหน่งพร้อมกัน โดยความแตกต่างจะพบเป็นแบบการปรากฏมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ หลักการของเทคนิค RAPD คือ การใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นเพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม วิธีนี้ริเริ่มโดย William และคณะ โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์เพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แม้ว่าเทคนิค RAPD จะทำได้ง่าย รวดเร็ว และให้ข้อมูลได้มาก แต่ก็มีข้อเสียในเรื่องการทดลองซ้ำ บางครั้งได้ผลที่ต่างจากเดิมเนื่องจาก RAPD มีความไวต่อการเปลี่ยนสภาวะต่าง ๆ จึงต้องระมัดระวังและควบคุมสภาพการทดลองให้คงที่

ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) เป็นวิธีตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณที่อยู่ระหว่างลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) ซึ่งไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ คือลำดับเบสที่มีลักษณะเป็นชุดซ้ำสั้น ๆ ความยาว 1-6 คู่เบสหรือไม่เกิน 10 คู่เบส เรียงตัวต่อกันในทิศทางเดียวกันที่ตำแหน่งหนึ่งอาจมีลำดับเบสซ้ำยาวต่อเนื่องกันได้หลายร้อยคู่เบส มีชื่อเรียกอย่างอื่นคือ SSR (Simple

Sequence Repeat) หรือ STR (Short tandem Repeat) หลักการของเทคนิค ISSR คือ การใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์ เช่น $(CA)_{10}$, $(GAT)_7$ เป็นไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา ใช้ไพรเมอร์เพียงหนึ่งชนิด เช่นเดียวกับการทำ RAPD เนื่องจากลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์กระจายตัวอยู่ทั่วจีโนมและบางตำแหน่งอยู่ใกล้ ๆ กัน ไพรเมอร์ที่ใช้จึงสามารถจับกับดีเอ็นเอได้ทั้ง 2 ทิศทางโดยมีปลาย 3’ เข้าหากัน ซึ่งจะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งดังกล่าวได้ โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา นอกจากนี้ไพรเมอร์ ISSR จะไปจับกับลำดับเบสของไมโครแซทเทลไลท์ชนิดเดียวกันได้หลายตำแหน่ง ทำให้สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละหลายตำแหน่งพร้อมกัน

เอนไซม์ตัดจำเพาะ(restriction enzyme) เป็นเอนไซม์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นใช้สำหรับตัดดีเอ็นเอในตำแหน่งที่มีลำดับเบสจำเพาะ โดยมีจุดประสงค์เพื่อใช้ป้องกันดีเอ็นเอบุกรุกที่ผ่านเข้ามา เอนไซม์ตัดจำเพาะถูกนำไปใช้ในงานด้านชีวโมเลกุลอย่างมากมาย เช่น การตัดต่อยีนในงานพันธุวิศวกรรม รวมถึงการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือยีนเพื่อทดสอบความแตกต่างของลำดับสารพันธุกรรม เป็นต้น

เทคนิค RAPD และเทคนิค ISSR รวมถึงการประยุกต์ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ เป็นเทคนิคที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา ซึ่งข้อมูลลำดับเบสของกระทือยังไม่มีการศึกษาค้นคว้า ดังนั้นจึงเลือกใช้เทคนิควิธีทางชีวโมเลกุลดังกล่าวข้างต้นในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมในกระทือที่ผ่านการฉายรังสี เปรียบเทียบกับกระทือที่ไม่ได้รับการฉายรังสี นอกจากนี้ เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว และได้ข้อมูลปริมาณมาก

การสร้างกระทือพันธุ์ใหม่ที่ให้ลักษณะแตกต่างออกไปและเหมาะสมต่อการค้า จะช่วยเพิ่มมูลค่าของการเป็นไม้ตัดดอก และเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของประเทศ การกลายพันธุ์ทำให้เกิดลักษณะแปลกและใหม่ขึ้น แต่เนื่องจากอัตราการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติค่อนข้างต่ำ จึงมีวิธีช่วยให้อัตราการกลายพันธุ์สูงขึ้นโดยใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ รังสีเป็นสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการเหนี่ยวนำให้พืชกลายพันธุ์ได้สูงขึ้นและรวดเร็วขึ้น และเมื่อร่วมกับนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาช่วย จะสามารถคัดพันธุ์กลายออกจากพันธุ์ปกติได้ดีขึ้น ซึ่งการวิจัยนี้ต้องการฉายรังสีกระทือเพื่อให้เกิดพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะแตกต่างไปจากเดิม และเป็นการเพิ่มฐานพันธุกรรมของกระทือ

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ต้นกระทือพิลาส *Zingiber spectabile* Griff. และกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith.
2. สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ สารที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช
3. เครื่องชั่ง เครื่องชั่งอย่างละเอียด เครื่องกวนสารละลาย เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ตู้อบ ตู้ปลอดเชื้อสำหรับตัดแบ่งเนื้อเยื่อ และเครื่องเขย่า

4. กระบอกตวง เครื่องแก้ว มีดผ่าตัด ปากคีบ ตะเกียงแอลกอฮอล์
5. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 ° C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน
6. ห้องฉายรังสีแกมม่าแบบเรื้อรัง(chronic irradiation) และเครื่องฉายรังสีแกมม่าแบบเฉียบพลัน (acute irradiation) หรือเครื่องมาร์ค 1 (Mark I)
7. เครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์
8. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์
9. เครื่องหมุนเหวี่ยง centrifuge เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (GeneAmp PCR System 9700) เครื่องแยกสารด้วยไฟฟ้า eletrophoresis เครื่อง UV transilluminator (Biorad) และชุดถ่ายภาพ
10. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
11. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
12. ไพรเมอร์และเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่ใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างพันธุ์ของกระทือ

- วิธีการ

ก. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระทือ

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างพืช และเตรียมวัสดุ อุปกรณ์ สำหรับงานวิจัย

2. การฟอกฆ่าเชื้อและเตรียมชิ้นส่วนสำหรับเพาะเลี้ยง ใช้ชิ้นส่วนตาจากลำต้นเทียม ใบอ่อนและเมล็ดของกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith. ส่วนกระทือพิลาส *Zingiber spectabile* Griff. ใช้ชิ้นส่วนตาจากลำต้นเทียม โดยนำชิ้นส่วนต่างๆมาทำการตัดส่วนที่ไม่ใช้ในการเพาะเลี้ยง หรือส่วนที่ได้รับความเสียหาย หรือติดโรค ทิ้งไปให้เหลือแต่ชิ้นส่วนที่สมบูรณ์ ล้างทำความสะอาดชิ้นส่วนด้วยการฟอกน้ำสบู่เพื่อชะล้างสิ่งสกปรกที่ติดมากับชิ้นส่วนพืช แล้วล้างน้ำสบู่ออกให้หมด แช่ชิ้นส่วนพืชในเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1-2 นาที เพื่อฆ่าเชื้อโรคในเบื้องต้น จากนั้นนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อดังกล่าวไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารเคมีและเตรียมชิ้นส่วนสำหรับเพาะเลี้ยงบนอาหาร ดังนี้

- ชิ้นส่วนลำต้นเทียม ตัดลำต้นเทียมเป็นท่อนสั้นๆ ใช้ปากคีบจับชิ้นส่วนลำต้นเทียมใส่ในขวดที่มีสารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์เพื่อฟอกฆ่าเชื้อ เติม tween20 1-2 หยดเพื่อลดแรงตึงผิว แล้วนำขวดไปวางบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้คลอร็อกซ์เข้าไปฆ่าเชื้อโรคบนชิ้นส่วนลำต้นเทียมได้ทั่วถึง เมื่อครบเวลานำเข้าตู้ปลอดเชื้อ คีบชิ้นส่วนลำต้นเทียมใส่ในขวดที่มีสารละลายคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เติม tween20 1-2 หยด นำไปวางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 15 20 และ 25 นาที จากนั้นนำเข้าตู้ปลอดเชื้อ คีบชิ้นส่วนลำต้นเทียมใส่ในขวดน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ

เขย่าให้น้ำไปล้างคลอร็อกซ์ออกจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อประมาณ 3-5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตัดชิ้นส่วนที่มีตาติดอยู่ออกมาให้ได้ความยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร เตรียมนำไปเพาะเลี้ยง

- ชิ้นส่วนใบอ่อน นำชิ้นส่วนใบอ่อนมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตัดใบอ่อนขนาดกว้างยาวประมาณ 1 เซนติเมตร เตรียมนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร

- เมล็ดกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith. ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที

3. นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเพื่อชักนำให้เกิดการเจริญเติบโต

4. เมื่อเนื้อเยื่อกระทือมีการเจริญเติบโต นำมาตัดแบ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่เพื่อเพิ่มปริมาณ ทำการตัดแบ่งเนื้อเยื่อและเปลี่ยนอาหารใหม่เพื่อเพิ่มปริมาณไปเรื่อยๆ จนปริมาณเพียงพอต่อการทดลอง จึงนำไปศึกษาเรื่องการฉายรังสี

ข. การฉายรังสีแกมมาในกระทือ

1. การฉายรังสีแกมมาในกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith. และ *Zingiber spectabile* Griff.

- นำกระทือพิลาส *Zingiber spectabile* Griff. ที่เพาะเลี้ยงอยู่ในขวดซึ่งมียอดสูงประมาณ 2-3 เซนติเมตรไปรับรังสีแกมมาแบบเรื้อรัง ในห้องฉายรังสีของศูนย์บริการรังสี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งใช้ต้นกำเนิดรังสีเป็นโคบอลต์-60 ต้นไม้ที่รอรับการฉายรังสีจะถูกวางตามตำแหน่งที่กำหนดระยะทาง เมื่อต้องการฉายรังสี แกมมาคือโคบอลต์-60 จะค่อยๆ ถูกลำเลียงผ่านท่อออกมา ฉายรังสีเรื่อยๆ ตั้งแต่ 20 ชั่วโมงขึ้นไปจนถึงนานหลายวัน ปริมาณความเข้มข้นของรังสีที่กระทือได้รับมี 2 ระดับ คือ 5.12 และ 10.24 Krad

- นำกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith. ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งมียอดอ่อนสูงประมาณ 0.5-0.7 มิลลิเมตรมาฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันด้วยเครื่อง Mark I ซึ่งใช้ต้นกำเนิดรังสีเป็นซีเซียม-137 ฉายรังสีในช่วงเวลาสั้นๆ ในระดับวินาที นาทีหรือชั่วโมง ปริมาณความเข้มข้นของรังสีที่กระทือได้รับมีระดับต่างๆ

1) วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 ซ้ำ

2) นำเนื้อเยื่อกระทือไปฉายรังสีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดำเนินการ 2 การทดลอง

- การทดลองที่ 1 มี 9 สิ่งทดลอง คือ เนื้อเยื่อกระทือได้รับรังสีปริมาณ 0 10 20 30 40 50 60 70 และ 80 Krad
- การทดลองที่ 2 มี 10 สิ่งทดลอง ดังนี้ เนื้อเยื่อกระทือได้รับรังสีปริมาณ 0 1 2 3 4 5 6 7 8 และ 9 Krad

2. หลังจากได้รับรังสีตามระดับความเข้มข้นแล้ว ย้ายยอดกระทือไปเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่

3. ตัดแบ่งเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่ เพื่อให้ชิ้นส่วนเจริญเติบโต ตัดยอดมาเลี้ยงใหม่เรื่อยๆ เพื่อคัดเลือกจนได้ต้นที่คาดว่าเกิดการกลายพันธุ์

ค. การตรวจสอบการกลายพันธุ์

1. การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของเนื้อเยื่อกระทือด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์

ตรวจสอบการกลายพันธุ์ระดับพลอยดีโดยนำใบจากต้นกระทือที่ไม่ได้รับรังสีและจากต้นกระทือที่ได้รับรังสีซึ่งมีใบสีเขียวเข้มกว่าต้นปกติไปวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์(flow cytometer) โดยการใช้ Cystain UV Preciese P : high resolution DNA staining kit ที่ประกอบด้วย Extraction buffer และ Staining buffer ซึ่งใช้สี DAPI ในการย้อมสี DNA มีขั้นตอน ดังนี้

1) นำใบกระทือขนาด 1 กรัม วางบนจานพลาสติก สับด้วยใบมีดที่คมมากให้มีขนาดเล็กประมาณ 0.5 มิลลิเมตรในสาร Extraction buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตรเป็นเวลา 4 นาที
2) กรองสารละลายผ่านตัวกรองขนาด 30 ไมครอน
3) เติมสีย้อม DNA (Staining buffer) 1000 ไมโครลิตร
4) นำสารละลายผ่านตัวกรองขนาด 30 ไมครอนอีกครั้งหนึ่ง
5) นำสารละลายที่ได้ไปวัดด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์

2. ตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุล

2.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอของกระทือได้

การศึกษาไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของกระทือ โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 16 ไพรเมอร์ ประยุกต์มาจาก RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) และ ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) เป็นไพรเมอร์ของขิง (*Zingiber Officinate* Roscoe) ซึ่งเป็นพืชสกุล *zingiber* เช่นเดียวกัน โดยหาข้อมูลลำดับเบสจาก Ashraf *et al*. (2014) สำหรับไพรเมอร์ 1 ถึงไพรเมอร์ 13 และ Mahdi *et al*. (2013) สำหรับไพรเมอร์ 14 ถึงไพรเมอร์ 16 ระบุรายละเอียดของลำดับเบส ดังนี้

ไพรเมอร์	**ชนิด**	**ลำดับเบส (5' -----> 3')**
1	RAPD	AGACGGCTCC
2	RAPD	GAGACCAGAC
3	RAPD	TTAGCGCCCC
4	RAPD	AGGACTGCTC
5	RAPD	GGCTTTAGCC

6	RAPD	TCAAGCTAAC
7	RAPD	CTACGCTCAC
8	RAPD	TCCGCAGTAG
9	RAPD	AGATGGGCAG
10	RAPD	TGGTCGGGTG
11	RAPD	ACCCGACCTG
12	RAPD	GGACCTCTTG
13	RAPD	ACGGAAGCCC
14	ISSR	CATACATACATACATACATA
15	ISSR	GATAGATAGATAGATAGATA
16	ISSR	GACGACGACGACGACGAC

ดำเนินการทดสอบ 16 ไพรเมอร์กับกระทือสองพันธุ์ คือ กระทือพิลาศ *Zingiber spectabile* Griff. และกระทือ *Zingiber zerumbet* (L.) Sm. ดังนี้

2.1.1 สกัดดีเอ็นเอจากใบของกระทือพิลาศ *Zingiber spectabile* Griff. และกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith. โดยใช้ SDS/NaCl Extraction Buffer (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) ซึ่งประยุกต์จาก Kotchoni and Gachomo (2009) มีวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยละเอียดดังนี้

- เก็บใบกระทือมาใส่ในโกร่งจากนั้นเติม SDS/NaCl Extraction Buffer 400 ไมโครลิตร ทำการบดตัวอย่างให้ละเอียด ซึ่ง SDS/NaCl Extraction Buffer 400 ไมโครลิตร เหมาะกับการบดตัวอย่างใบกระทือที่มีน้ำหนักประมาณ 30 มิลลิกรัม
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที
- ดูดน้ำใสส่วนบน supernatant 300 ไมโครลิตรใส่ในหลอด 1.5 ml microtube อันใหม่
- ใส่ isopropanol ที่แช่เย็น 300 ไมโครลิตร และผสมเบา ๆ จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- เทน้ำใสส่วนบน supernatant ทิ้ง
- ใส่ 70% Ethanol 500 ไมโครลิตร
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- เทน้ำใสส่วนบน supernatant ทิ้งด้วยความระมัดระวัง เพื่อไม่ให้ตะกอนดีเอ็นเอหล่นออกไป

- ดูดน้ำส่วนที่เหลือออกให้หมด รอให้แห้ง จากนั้นใส่น้ำ (nuclease-free) 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอ

2.1.2 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพ และวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณปรับความเข้มข้นให้เท่ากัน ตัวอย่างละ 50 ng/µl

2.1.3 ทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ของขิงที่จัดเตรียมไว้ ซึ่งการผสมสารเพื่อทำปฏิกิริยา PCR มีส่วนประกอบ ดังนี้

สารเคมี	**ปริมาณที่ใช้ใน ปริมาตรรวม 20 µl**	**ความเข้มข้นสุดท้าย Final concentration**
10X *Taq* buffer with KCl	2 µl	1X
10 mM dNTP mix	0.4 µl	0.2 mM for each
10 µM primer	0.8 µl	0.4 µM
Taq DNA polymerase (5 U/µl)	0.2 µl	1U
25 mM $MgCl_2$	1.2 µl	1.5 mM
DNA (50 ng/µl)	2 µl	100 ng
Water, nuclease-free	13.4 µl	-
ปริมาตรรวม	**20 µl**	

จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR โดยมีอุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา ดังนี้

สำหรับไพรเมอร์ 1 ถึงไพรเมอร์ 13

<u>ขั้นที่ 1</u>	94 องศาเซลเซียส	3 นาที
<u>ขั้นที่ 2</u>	94 องศาเซลเซียส	30 วินาที
	50 องศาเซลเซียส	3 นาที
	72 องศาเซลเซียส	2 นาที
	ทำซ้ำจำนวน 40 รอบ	
<u>ขั้นที่ 3</u>	72 องศาเซลเซียส	5 นาที

สำหรับไพรเมอร์ 14 ถึงไพรเมอร์ 16

<u>ขั้นที่ 1</u>	94 องศาเซลเซียส	2 นาที
<u>ขั้นที่ 2</u>	94 องศาเซลเซียส	20 วินาที
	45 องศาเซลเซียส	30 วินาที สำหรับไพรเมอร์ 14 และ 15
	55 องศาเซลเซียส	30 วินาที สำหรับไพรเมอร์ 16
	72 องศาเซลเซียส	30 วินาที
	ทำซ้ำจำนวน 40 รอบ	

<u>ขั้นที่ 3</u> 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

2.1.4 เมื่อจบปฏิกิริยา PCR ทำการตรวจสอบผลโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์สำหรับไพรเมอร์ 1 ถึงไพรเมอร์ 13 และเจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์สำหรับไพรเมอร์ 14 ถึงไพรเมอร์ 16 ย้อมด้วยเอธิเดียมโบร์ไมด์ และนำไปส่องดูด้วยเครื่อง UV transilluminator

2.1.5 คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอของกระทือได้ รวมถึงให้ความแตกต่างระหว่างกระทือ *Zingiber spectabile* Griff. และ *Zingiber zerumbet* Smith.

2.2 การตรวจสอบการกลายพันธุ์ของกระทือโดยใช้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกแล้ว

2.2.1 สกัดดีเอ็นเอจากใบของกระทือที่ไม่ได้รับการฉายรังสี (control) และที่ผ่านการฉายรังสีซึ่งคาดว่าเกิดการกลายพันธุ์ ตามวิธีการข้อ 2.1.1 กระทือที่ผ่านการฉายรังสีซึ่งคาดว่าเกิดการกลายพันธุ์มีลักษณะต่าง ๆ ดังนี้ ใบหงิก ใบลายขวาง ต้นเล็ก ใบหงิกลาย และใบเขียวเข้ม

2.2.2 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพ และวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณปรับความเข้มข้นให้เท่ากัน ตัวอย่างละ 50 ng/µl

2.2.3 ทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ที่คัดเลือกแล้วว่าสามารถจับกับดีเอ็นเอของกระทือได้ รวมถึงให้ความแตกต่างระหว่างกระทือพิลาศ *Zingiber spectabile* Griff. และกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith. จำนวน 6 ไพรเมอร์ ดังนี้ ไพรเมอร์ 1 ไพรเมอร์ 3 ไพรเมอร์ 10

ไพรเมอร์ 11 ไพรเมอร์ 13 และไพรเมอร์ 16 ตามวิธีการข้อ 1.3

2.2.4 เมื่อจบปฏิกิริยา PCR ทำการตรวจสอบผลโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์สำหรับไพรเมอร์ชนิด RAPD และความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์สำหรับไพรเมอร์ชนิด ISSR ย้อมด้วยเอธิเดียมโบร์ไมด์ และนำไปส่องดูด้วยเครื่อง UV transilluminator

2.2.5 วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกระทือที่ไม่ได้รับการฉายรังสี (control) และกระทือที่ผ่านการฉายรังสีและคาดว่าเกิดการกลายพันธุ์

2.3 การทดสอบการกลายพันธุ์ของกระทือโดยการประยุกต์ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

2.3.1 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอกระทือที่ไม่ได้รับการฉายรังสี (control) และกระทือที่ผ่านการฉายรังสีซึ่งคาดว่าเกิดการกลายพันธุ์ โดยทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ต่าง ๆ ที่คัดเลือกแล้ว

2.3.2 นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR (PCR product) ที่ได้ มาทำการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 7 ชนิด ดังนี้

ชนิดที่	ชื่อ	ลำดับเบสจำเพาะ	Buffer ที่เหมาะสม	อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา
1	*Bam*HI	G/GATCC	CutSmart Buffer(NEB)	37°C
2	*Sac*I	GAGCT/C	CutSmart Buffer(NEB)	37°C
3	*Spe*I	A/CTAGT	CutSmart Buffer(NEB)	37°C
4	*Xba*I	T/CTAGA	CutSmart Buffer(NEB)	37°C
5	*Eco*RI	G/AATTC	NEBuffer 2.1(NEB)	37°C
6	*Hind*III	A/AGCTT	NEBuffer 2.1(NEB)	37°C
7	*Sma*I	CCC/GGG	CutSmart Buffer(NEB)	25°C

NEB: New England Biolabs (UK) Ltd

Buffer มีส่วนประกอบดังต่อไปนี้

CutSmart Buffer (1X)

50 mM Potassium Acetate

20 mM Tris-acetate

10 mM Magnesium Acetate

100 µg/ml BSA

pH 7.9 ที่อุณหภูมิ 25°C

NEBuffer 2.1 (1X)

50 mM NaCl

10 mM Tris-HCl

10 mM $MgCl_2$

100 µg/ml BSA

pH 7.9 ที่อุณหภูมิ 25°C

โดยใช้เอนไซม์แต่ละชนิด ปริมาณ 1U ต่อหนึ่งหน่วยปฏิกิริยา ซึ่งมีปริมาตรรวม 25 µl

2.3.3 เมื่อจบปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำการตรวจสอบผลโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์สำหรับกรณีที่เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ RAPD ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกรณีที่เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ISSR ย้อมด้วยเอธิเดียมโบร์ไมด์ และนำไปส่องดูด้วยเครื่อง UV transilluminator

2.3.4 วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกระทือที่ไม่ได้รับการฉายรังสี (control) และกระทือที่ผ่านการฉายรังสีที่คาดว่าเกิดการกลายพันธุ์

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลาทำการทดลอง ตุลาคม 2554 – กันยายน 2558

สถานที่ทำการทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ก. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระทือ

หลังจากฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนลำต้นเทียมของกระทือพิลาส *Zingiber spectabile* Griff. และกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith. แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าได้ชิ้นส่วนปลอดเชื้อ 15.4 และ 9.5 เปอเซ็นต์ตามลำดับ ชิ้นส่วนตาสามารถเจริญเป็นยอดและรากได้(ภาพที่ 1) ตัดแบ่งยอดเป็นท่อนๆ มีตาติดอยู่ ไปเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตรเดิม ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงเกิดยอดได้ตั้งแต่ 0 – 4 ยอด เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะได้จำนวนยอดเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ต้นจะเตี้ยและเล็กกว่า ต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตจะต้นใหญ่แข็งแรง ดำเนินการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณยอดให้เพียงพอต่อการทดลองฉายรังสี

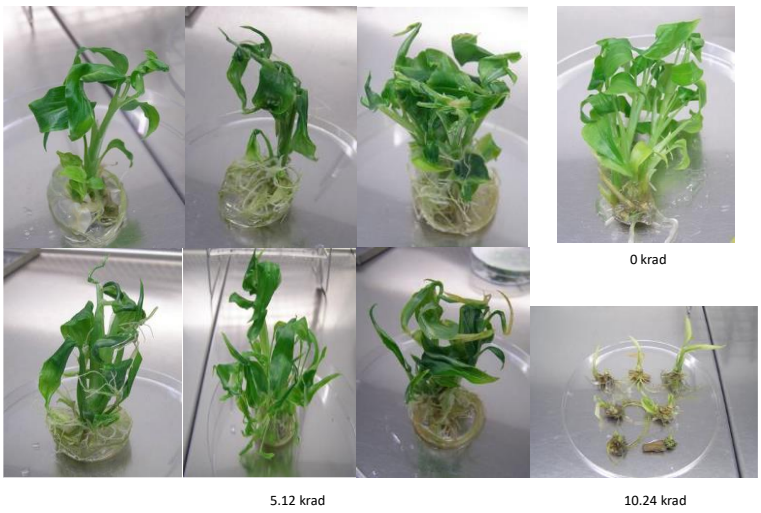
ชิ้นส่วนใบ และเมล็ดของกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith. เกิดเชื้อปนเปื้อนหมด นักวิจัยหลายท่านมีความเห็นตรงกันว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตระกูลขิง ชิ้นส่วนเกิดเชื้อปนเปื้อนสูงมาก และเป็นสาเหตุให้ประสบความสำเร็จยาก (Saensouk, 2011)

ภาพที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาจากลำต้นเทียมของกระทือพิลาสเกิดเป็นยอด และตัดแบ่งเนื้อเยื่อเพิ่มปริมาณได้

ข. การฉายรังสีแกมมาในกระทือ

- หลังจากนำเนื้อเยื่อกระทือพิลาสไปฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรังที่ระดับความเข้มข้น 5.12 และ 10.24 Krad ผลไม่มีต้นกระทือตาย กระทือที่ได้รับรังสีในระดับ 5.12 Krad ส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตดี และพบว่ามีลักษณะที่ผิดปกติเกิดขึ้น คือ ใบยาวบิดม้วน ใบด่าง ใบสีเขียวเข้ม (ภาพที่ 2) นำยอดกระทือที่ได้รับรังสีมาตัดแบ่งเนื้อเยื่อเลี้ยงบนอาหารใหม่ให้ตาเจริญเกิดเป็นยอดใหม่ เพื่อให้ส่วนของเนื้อเยื่อที่ได้รับรังสีแสดงลักษณะกลายออกมาให้คัดเลือกได้ พบเนื้อเยื่อกระทือที่ได้รับรังสีเจริญในลักษณะแตกต่างกัน ได้แก่ เนื้อเยื่อไม่มีการเจริญ มีการเจริญแตกยอดเล็กน้อยแล้วหยุดชะงักหรือตาย ต้นแคระแกรน ต้นมีขนาดต่างๆ กัน เล็กบอบบางมากไปจนถึงต้นขนาดใหญ่ ใบเล็ก ใบขนาดใหญ่ ใบยาวบิดม้วน ใบลาย ใบสีเขียวเข้ม และต้นที่มีลักษณะเหมือนปกติ คัดทิ้งกระทือที่ไม่ต้องการ คือ ต้นที่เจริญเกิดยอดแล้วแคระแกรน เหลือง ชิ้นส่วนที่ไม่มีการเจริญ ต้นไม่สมบูรณ์แข็งแรง ตัดแบ่งยอดกระทือที่เหลือเลี้ยงบนอาหารใหม่อีกครั้ง พบกระทือที่มีลักษณะ ใบบิดม้วนแต่ไม่บิดม้วนมากเหมือนตอนแรก ใบลาย ใบบิดลาย ใบเขียวเข้ม ต้นใหญ่ ต้นเล็กบอบบาง ลักษณะต่างๆ ที่ต้องคัดทิ้งดังกล่าวข้างต้น และยอดกระทือส่วนมากมีลักษณะค่อนไปทางปกติ คัดเลือกยอดกระทือที่คาดว่าอาจจะเกิดการกลายพันธุ์ ได้แก่ ต้นใหญ่ใบใหญ่เขียวเข้ม ใบบิดม้วน ใบลาย ใบบิดลาย ต้นและใบเล็กบอบบาง (ภาพที่ 3) มาตัดแบ่งเนื้อเยื่อเลี้ยงบนอาหารใหม่และนำใบไปตรวจสอบการกลายพันธุ์ต่อไป

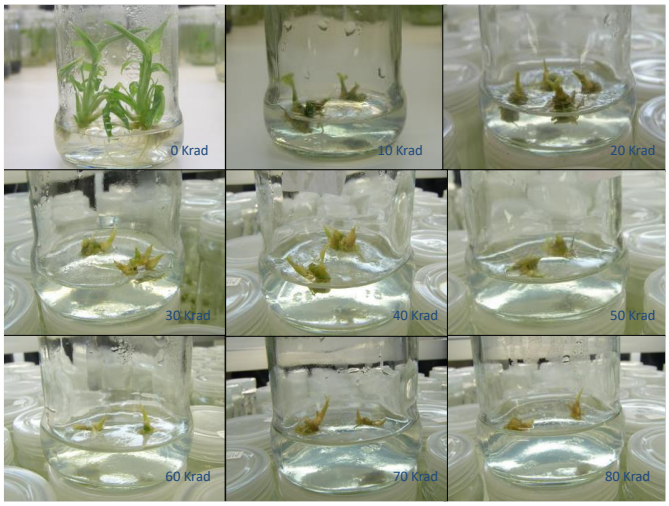
ส่วนกระทือที่ฉายรังสีที่ระดับ 10.24 Krad เกิดอาการเหลือง มีการเจริญเติบโตช้า และต้นแคระแกรน (ภาพที่ 2) และเมื่อนำยอดมาตัดแบ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่ ส่วนใหญ่ไม่เจริญหรือเจริญแต่แคระแกรนผิดปกติ ต้นไม่สมบูรณ์แข็งแรง



ภาพที่ 2 ต้นกระทือพิลาสแสดงลักษณะผิดปกติหลังจากได้รับรังสีแกมมาแบบเรื้อรังที่ความเข้มข้น 5.12 และ 10.24 Krad เปรียบเทียบกับกระทือปกติที่ไม่ได้รับรังสี

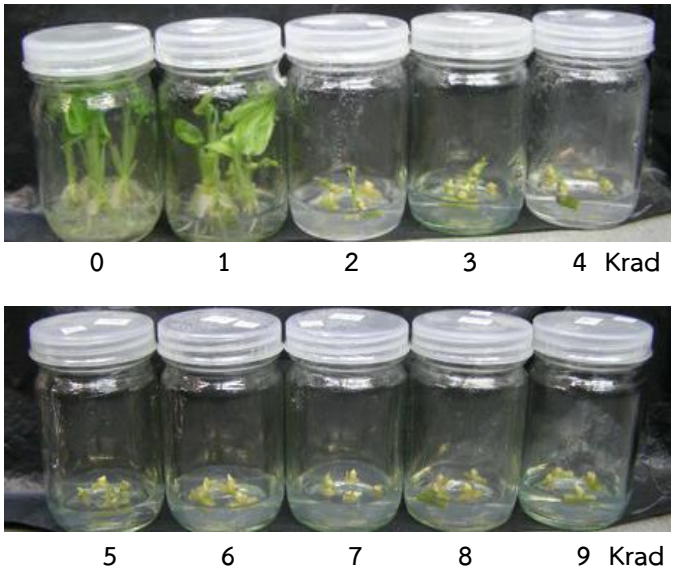
ภาพที่ 3 ลักษณะที่คาดว่าเกิดการกลายพันธุ์จากการที่ได้รับรังสีแกมมาในกระทือพิลาส

- เมื่อนำเนื้อเยื่อกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith. ไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ระดับความเข้มข้น 0 10 20 30 40 50 60 70 และ 80 Krad วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 ซ้ำ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงต่อ พบว่าเนื้อเยื่อที่ได้รับปริมาณรังสีสูง 70 และ 80 Krad จะมีอาการเหลืองตั้งแต่สัปดาห์แรก และเนื้อเยื่อที่ได้รับปริมาณรังสีอื่นๆ ก็จะทยอยมีอาการเหลืองตามมาในสัปดาห์ที่2 และสัปดาห์ที่3 ยกเว้นเนื้อเยื่อที่ได้รับรังสีปริมาณ 10 และ 20 Krad ยังคงมีสีเขียวเป็นปกติ แต่ต่อมาก็เหลืองและตายไป (ภาพที่ 4) ต่อมาได้ตัดแบ่งเนื้อเยื่อกระทือที่ได้รับรังสีไปเลี้ยงบนอาหารใหม่ พบว่าเนื้อเยื่อกระทือไม่มีการเจริญเติบโตและเหลืองตายไป แสดงว่ารังสีแบบเฉียบพลันที่ใช้มีอัตราสูงเกินไปทำให้เนื้อเยื่อกระทือตาย จึงดำเนินการทดลองใหม่อีกครั้ง โดยลดความเข้มข้นของรังสีลง



ภาพที่ 4 ผลของรังสีแกมมาความเข้มข้น 0 – 80 Krad ที่มีต่อเนื้อเยื่อกระทือ

ในการทดลองใหม่ วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 ซ้ำ เนื้อเยื่อกระทือได้รับรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน ปริมาณ 0 1 2 3 4 5 6 7 8 และ 9 Krad หลังจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อกระทือที่ได้รับรังสีได้ 2 เดือน พบว่า การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกระทือที่ได้รับรังสีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เนื้อเยื่อกระทือที่ไม่ได้รับรังสี มีการเจริญเติบโตแข็งแรงดี ในขณะที่เนื้อเยื่อกระทือที่ได้รับรังสีมีการเจริญเติบโตน้อยลงสัมพันธ์กับปริมาณรังสีที่ เพิ่มขึ้น(ภาพที่ 5) ชิ้นส่วนที่ไม่มีการเจริญหรือตายจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มสูงขึ้น(ตารางที่ 1 และภาพ กราฟ) ปริมาณรังสีตั้งแต่ 6 กิโลแรดขึ้นไปทำให้เนื้อเยื่อกระทือมีเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ย 93.75 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ ปริมาณรังสี 2 - 4 กิโลแรด ทำให้เนื้อเยื่อกระทือตายเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การตายใกล้เคียง 50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นปริมาณรังสีที่ 2 กิโลแรดจึงเป็นปริมาณรังสีที่เหมาะสมต่อการทำให้เกิดอัตราการกลายพันธุ์สูง กว่าปริมาณรังสีที่ระดับอื่นๆ



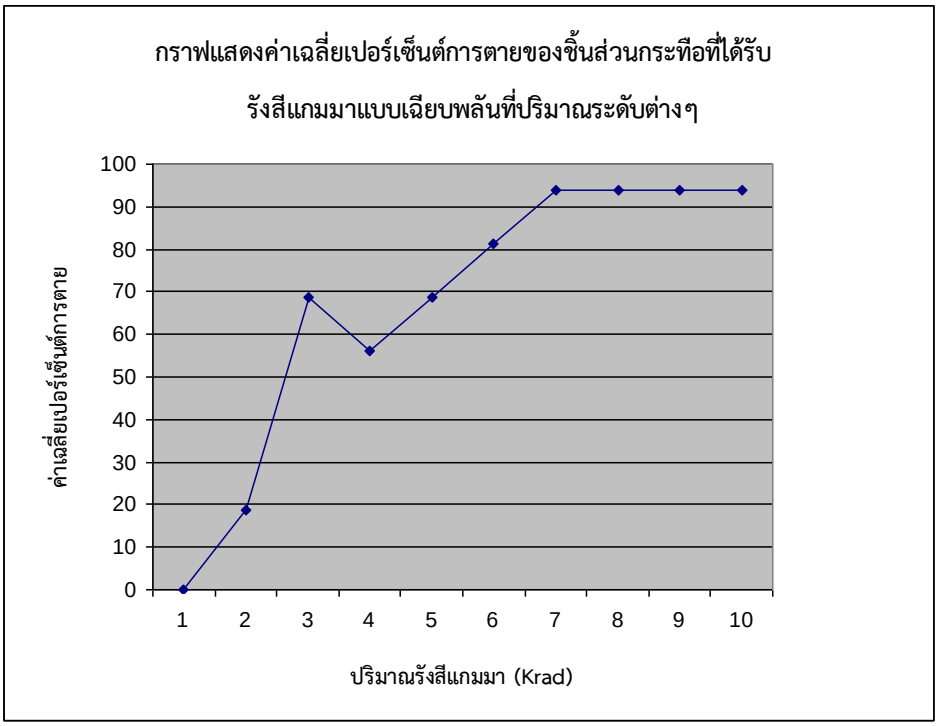
ภาพที่ 5 การเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อกระทือที่แตกต่างกันหลังจากได้รับรังสีในปริมาณ 0-9 Krad

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนกระทือที่ได้รับรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน ปริมาณเข้มข้นระดับต่างๆ หลังจากได้รับรังสีและเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

ปริมาณรังสีแกมม่า (กิโลแรด)	ค่าเฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์การตาย)
0	0.00 a
1	18.75 b
2	68.75 cd
3	56.25 c
4	68.75 cd
5	81.25 de
6	93.75 e
7	93.75 e
8	93.75 e
9	93.75 e

CV = 18.1

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT



เมื่อได้ผลการศึกษาปริมาณรังสีที่เหมาะสมต่อเนื้อเยื่อกระทือ คือ ปริมาณ 2 Krad แล้ว จึงนำเนื้อเยื่อกระทือที่เพาะเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณไว้ไปฉายรังสีในปริมาณที่เหมาะสมดังกล่าว จากนั้นนำเนื้อเยื่อกระทือที่ได้รับรังสีย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่ เนื้อเยื่อเติบโตช้ามาก ได้ตัดชิ้นส่วนย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้มีการเจริญเติบโต แต่เนื้อเยื่อไม่มีการเจริญทางยอด แต่กลับมีลักษณะคล้ายเหง้าเล็กๆ สีเหลืองปนน้ำตาลอ่อน บางชิ้นส่วนเพิ่มจำนวน บางชิ้นส่วนมีขนาดใหญ่ขึ้น บางชิ้นส่วนไม่มีการเปลี่ยนแปลง ย้ายชิ้นส่วนดังกล่าวไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS สูตร MS ที่มีธาตุอาหารเป็นสองเท่า และสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ในระดับต่างๆ ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเกิดเป็นแคลลัสในทุกสูตรอาหาร แต่ยังไม่พบการเจริญเป็นยอด

ค. การตรวจสอบการกลายพันธุ์

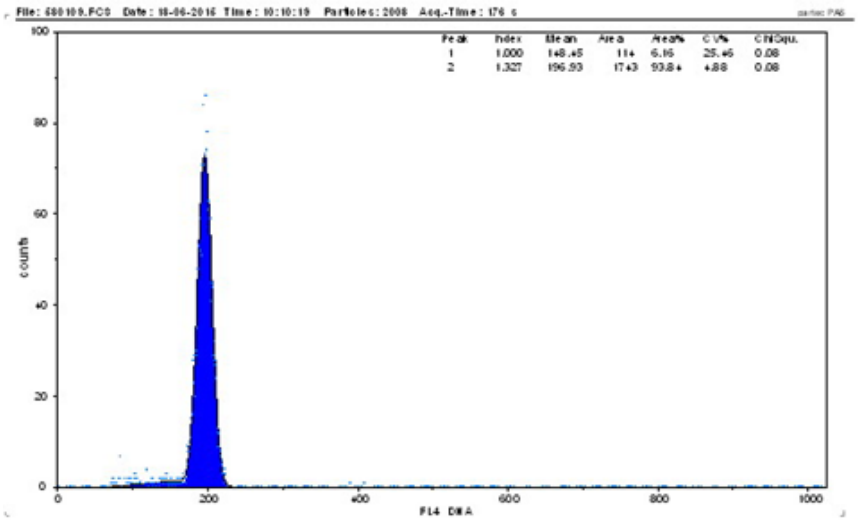
1. การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของเนื้อเยื่อกระทือด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์

ตรวจสอบการกลายพันธุ์ของต้นกระทือพิลาสในระดับพลอยดี โดยนำใบจากต้นกระทือพิลาสที่ไม่ได้รับรังสีและจากต้นกระทือพิลาสที่ได้รับรังสีซึ่งมีต้นใหญ่และใบสีเขียวเข้มกว่าต้นปกติ ไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์ (flow cytometer) โดยการใช้ Cystain UV Preciese P : high resolution DNA staining kit ที่ประกอบด้วย Extraction buffer และ Staining buffer ซึ่งใช้สี DAPI ในการย้อมสี DNA มีขั้นตอน ดังนี้

1) นำใบกระทือพิลาสขนาด 1 กรัม วางบนจานพลาสติก สับด้วยใบมีดที่คมมากให้มีขนาดเล็กประมาณ 0.5 มิลลิเมตรในสาร Extraction buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตรเป็นเวลา 4 นาที
2) กรองสารละลายผ่านตัวกรองขนาด 30 ไมครอน
3) เติมสีย้อม DNA (Staining buffer) 1000 ไมโครลิตร
4) นำสารละลายผ่านตัวกรองขนาด 30 ไมครอนอีกครั้งหนึ่ง
5) นำสารละลายที่ได้ไปวัดด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์

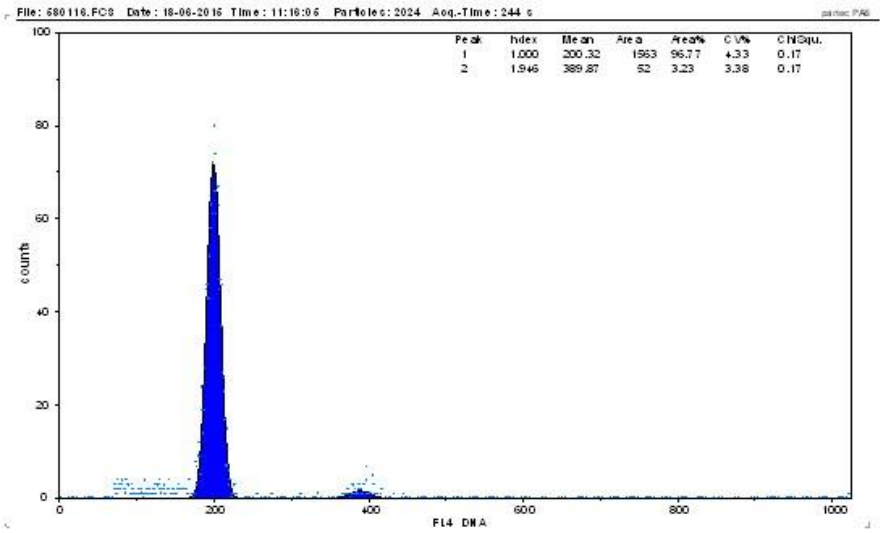
ผลการตรวจวิเคราะห์ ไม่พบต้นกระทือพิลาสที่มีปริมาณดีเอ็นเอเป็นโพลีพลอยด์ โดยปริมาณดีเอ็นเอของต้นกระทือพิลาสที่ไม่ได้รับรังสีซึ่งมีระดับพลอยดีเป็นดิพลอยด์ 2n = 2x จะมีกราฟสูงสุดที่ตำแหน่ง 200 (ภาพที่ 6) และตัวอย่างต้นกระทือพิลาสที่มีใบสีเขียวเข้มกว่าปกติที่นำไปวิเคราะห์ก็ให้กราฟสูงสุดที่ตำแหน่ง 200 เช่นกัน แต่มีบางตัวอย่างให้กราฟที่ตำแหน่ง 400 เป็นพื้นที่เล็กน้อยอยู่ด้วย (ภาพที่ 7) ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอของต้นที่เป็นเตตราพลอยด์จะมีตำแหน่งกราฟสูงสุดที่ 400 แสดงว่าเนื้อเยื่อกระทือพิลาสที่ได้รับรังสีแกมมาเกิดไคเมอราขึ้น คือเนื้อเยื่อบางส่วนเกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่า เมื่อเนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตขึ้น เซลที่เป็นดิพลอยด์จะมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าเตตราพลอยด์ จึงเจริญได้มากกว่าและเบียดบังเซลเตตราพลอยด์ ทำให้ต้นกระทือพิลาสกลับมาเป็นดิพลอยด์ตามปกติ

Control



ภาพที่ 6 แสดงภาพกราฟของกระทือพิลาสที่ไม่ได้รับรังสีแกมม่าวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์ มีปริมาณดีเอ็นเอสูงสุดที่ตำแหน่ง 200

Sample 8



ภาพที่ 7 ภาพกราฟของกระทือพิลาสที่ได้รับรังสีแกมม่าวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์ มีปริมาณดีเอ็นเอสูงสุดที่ตำแหน่ง 200 และมีปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 400 เป็นพื้นที่เล็กน้อย

2. ศึกษาเทคนิคการตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุล

2.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอของกระทือได้

การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนกระทือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี ค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ในงานวิจัยนี้ มีค่าเฉลี่ย OD260/OD280 เท่ากับ 1.72 (ตารางที่ 2) สามารถนำไปใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR สำหรับการตรวจหาสายพันธุ์ (genotyping) และการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (sequencing) ได้ การสกัดดีเอ็นเอจากใบของกระทือโดยใช้ SDS/NaCl Extraction Buffer ซึ่งประยุกต์จาก Kotchoni and Gachomo (2009) เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว ไม่มีส่วนผสมของสารเคมีอันตราย (hazardous reagent) เช่น คลอโรฟอร์ม ลดค่าใช้จ่ายของสารเคมีและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน งานวิจัยด้านชีวโมเลกุลในพืชกระทือมีน้อยมาก งานวิจัยนี้มีการใช้ SDS/

NaCl Extraction Buffer ในการสกัดดีเอ็นเอจากกระทือเป็นครั้งแรก ในปี ค.ศ. 2011 Ghosh และคณะได้ศึกษาการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางดีเอ็นเอของขิง ว่านไฟ และกระทือ โดยใช้เทคนิค Amplified fragment length polymorphism (AFLP) ซึ่งใช้ plant DNA extraction kit (Qiagen) ในการสกัดดีเอ็นเอจากพืชดังกล่าว ในปี ค.ศ. 2013 Ashraf และคณะ รวมถึง Mahdi และคณะได้ศึกษาความหลากหลายของขิงในประเทศอินเดีย และประเทศมาเลเซีย ตามลำดับ ซึ่งงานวิจัยทั้งสองใช้วิธี CTAB ในการสกัดดีเอ็นเอจากขิง

ตารางที่ 2 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบของกระทือโดยใช้ SDS/NaCl Extraction Buffer

การสกัดดีเอ็นเอ	ชื่อตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/µl)	ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (OD260/OD280)
ครั้งที่ 1	1. กระทือพันธุ์ต้นใหญ่ (พันธุ์พิลาศ)	248.6	1.553
	2. กระทือพันธุ์ต้นเล็ก (พันธุ์พื้นเมือง)	226.2	1.638
ครั้งที่ 2	3. control-1	120.7	1.712
	4. ใบบิด-1	132.2	1.708
	5. ใบด่างลาย-1	356.1	1.68
ครั้งที่ 3	6. control-2	203.5	1.811
	7. control-3	163.1	1.725
	8. ใบลาย-2	299.8	1.775
	9. ใบลาย-3	322.3	1.684
	10. ต้นเล็ก-1	248.4	1.717
	11. ต้นเล็ก-2	193.9	1.722
	12. ใบบิดลาย-1	307.7	1.724

	13. ใบบิดลาย-2	351.6	1.666
	14. ใบเขียวเข้ม-1	282.2	1.738
	15. ใบเขียวเข้ม-2	240.7	1.779
ครั้งที่ 4	16. control-4	300.8	1.736
	17. control-5	364.9	1.783
	18. ใบบิด-2	259.8	1.721
	19. ใบบิด-3	308.5	1.737
ค่าเฉลี่ย		259.5	1.716

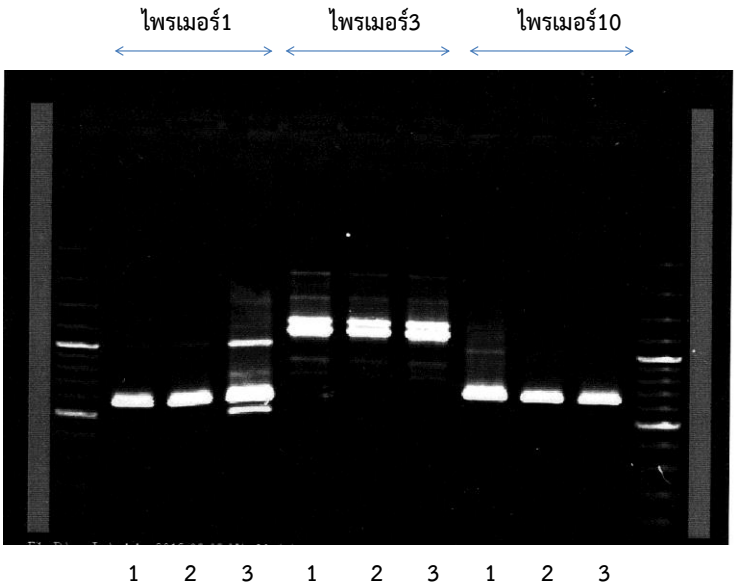
หลังจากนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์แต่ละไพรเมอร์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) และวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์โดยนำไปแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยอากาโรสเจล (agarose gel) พบว่าไพรเมอร์ของขิง (*Zingiber Officinate* Roscoe) ที่นำมาคัดเลือก สามารถจับกับดีเอ็นเอของกระทือพิลาส (*Zingiber spectabile* Griff.) รวมถึงให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกระทือพิลาส *Zingiber spectabile* Griff. และ *Zingiber zerumbet* Smith. มีจำนวน 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ 1 ไพรเมอร์ 3 ไพรเมอร์ 10 ไพรเมอร์ 11 ไพรเมอร์ 13 และไพรเมอร์ 16 แสดงว่า 6 ไพรเมอร์นี้มีศักยภาพในการแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์กระทือได้

2.2 การตรวจสอบการกลายพันธุ์ของกระทือพิลาสโดยใช้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกแล้ว

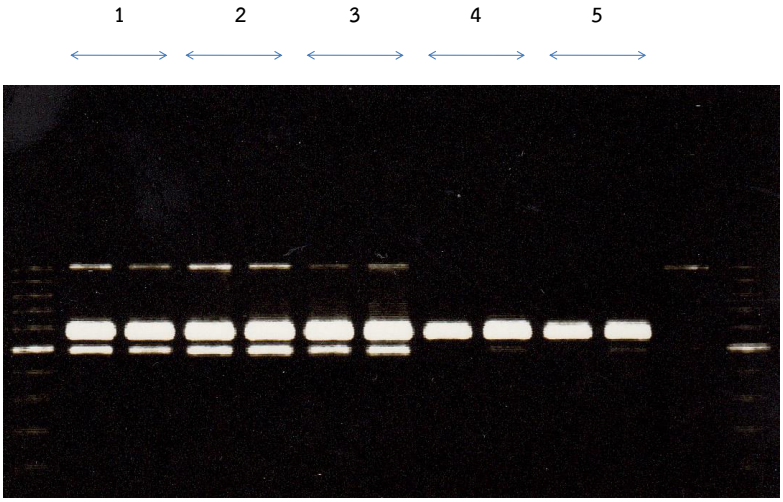
จากการนำไพรเมอร์ที่คัดเลือกแล้ว 6 ไพรเมอร์ไปตรวจสอบต้นกระทือปกติกับกระทือที่คาดว่าจะเกิดการกลายพันธุ์จากรังสี ซึ่งมี 5 ลักษณะ ได้แก่ ใบบิดม้วน ใบลาย ใบบิดลาย ใบเขียวเข้ม ต้นและใบเล็กผอมบาง เป็นตัวอย่างในการตรวจสอบ ผลการศึกษาพบว่า ไพรเมอร์อันดับที่ 1 ให้แถบดีเอ็นเอของกระทือปกติแตกต่างกับกระทือที่มีใบลาย ใบบิดลาย และใบเขียวเข้ม(ภาพที่ 8 และ 9) ในขณะที่ไพรเมอร์อันดับที่ 11 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกระทือปกติกับกระทือใบบิดม้วนได้(ภาพที่ 10) เมื่อนำดีเอ็นเอจากใบกระทือที่สกัดไว้มาตรวจสอบซ้ำ ได้ผลการตรวจสอบเหมือนเดิม แต่เมื่อตรวจสอบอีกครั้งด้วยดีเอ็นเอที่สกัดจากใบที่ได้จากยอดใหม่ที่มาจากการตัดแบ่งเนื้อเยื่อยอดที่ตรวจแล้วว่าให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันกับกระทือปกติ พบว่ามีเพียงกระทือใบบิดลายที่ยังคงให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกับกระทือปกติ ส่วนกระทือที่มีต้นและใบเล็กบอบบางไม่พบรูปแบบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอกับกระทือปกติ

นั่นคือ ต้นกระทือที่มีใบบิดม้วนเป็นต้นกลายพันธุ์ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ 1 ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกระทือปกติกับกระทือกลายพันธุ์ใบบิดลาย โดยมีแบบแผน(pattern) การเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในบางตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่ง 500 bp และ 1000 bp ในกระทือปกติปรากฏแถบดีเอ็นเอ 3 แถบที่ตำแหน่ง 500 bp 600 bp และ 1000 bp แต่ในกระทือกลายพันธุ์ใบบิดลาย ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว คือ 600 bp และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอตำแหน่ง 500 bp และ 1000 bp ดังกล่าว(ภาพที่ 11) ทำให้สามารถวิเคราะห์ได้ว่า ในกรณีกระทือกลายพันธุ์ใบบิดลายนี้การฉายรังสีทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสตรงตำแหน่งที่ไพรเมอร์ 1 (5’ AGACGGCTCC 3’)

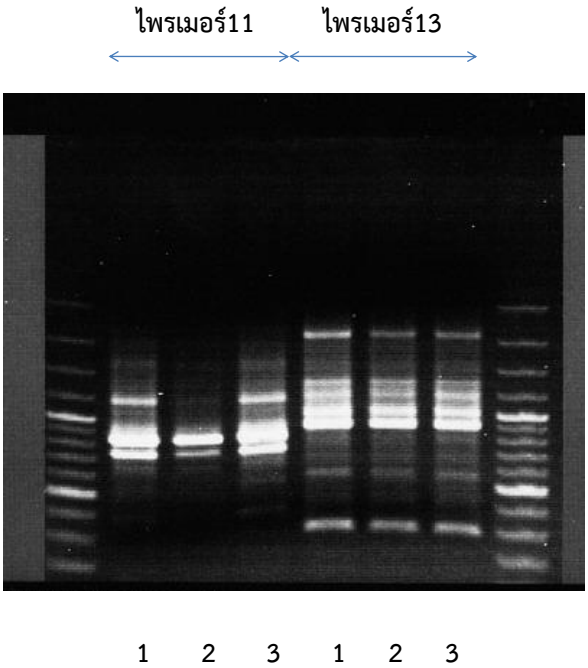
สามารถจับได้ ส่งผลให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งนั้นได้ และสรุปได้ว่า การฉายรังสีแกมมาส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ในกระทือพิลาส ซึ่งสังเกตการเปลี่ยนแปลงได้จากทั้งลักษณะภายนอกและลักษณะทางพันธุกรรมจากการทดสอบโดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุล



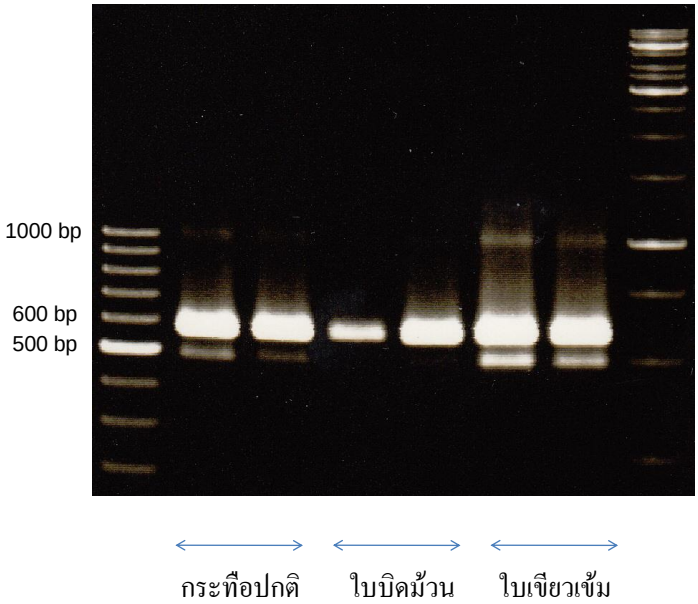
ภาพที่ 8 แสดงแถบดีเอ็นเอของกระทือใบลายที่แตกต่างจากกระทือปกติเมื่อใช้ไพรเมอร์อันดับที่1 ตัวเลขด้านล่างภาพแสดงตัวอย่างกระทือ 1 กระทือปกติ 2 กระทือใบบิดม้วน 3 กระทือใบลาย



ภาพที่ 9 แสดงแถบดีเอ็นเอของกระทือใบบิดลาย และใบเขียวเข้ม ที่แตกต่างจากกระทือปกติ เมื่อใช้ไพรเมอร์อันดับที่1 ตัวเลขแสดงตัวอย่างกระทือ 1 กระทือปกติ 2 กระทือใบลาย 3 กระทือต้นเล็กบอบบาง 4 กระทือใบบิดลาย 5 กระทือใบเขียวเข้ม



ภาพที่ 10 แสดงแถบดีเอ็นเอของกระทือใบบิดม้วนที่แตกต่างจากกระทือปกติเมื่อใช้ไพรเมอร์อันดับที่11 ตัวเลขด้านล่างภาพแสดงตัวอย่างกระทือ (1) กระทือปกติ (2) กระทือใบบิดม้วน (3) กระทือใบลาย



ภาพที่ 11 แสดงแถบดีเอ็นเอของกระทือใบบิดลายที่แตกต่างจากกระทือปกติเมื่อใช้ไพรเมอร์อันดับที่1 ทำปฏิกิริยา PCR

2.3 การทดสอบการกลายพันธุ์ของกระทือโดยการประยุกต์ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ 1 ไพรเมอร์ 3 ไพรเมอร์ 10 ไพรเมอร์ 11 ไพรเมอร์ 13 และไพรเมอร์ 16 จากในการทดสอบการกลายพันธุ์ของกระทือโดยการประยุกต์ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ จำนวน 7 ชนิด ซึ่งแบ่งเป็น 4 ชุด ได้แก่ *Bam*HI-*Sac*I, *Spe*I-*Xba*I, *Eco*RI-*Hind*III และ *Sma*I โดยแบ่งตามชนิด buffer ที่เหมาะสมและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาที่เหมือนกัน เพื่อเป็นการประหยัดสารเคมี วัสดุอุปกรณ์และเวลาในการทดลอง ซึ่งได้ทำการทดสอบกับผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR (PCR product) ผลการทดลอง ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกระทือปกติ และกระทือที่มีลักษณะผิดปกติทั้งห้าชนิด ภายหลังปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำให้สามารถวิเคราะห์ได้ว่า ในกระทือที่มีลักษณะผิดปกติที่นำมาทดสอบ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสภายในบริเวณที่ถูกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ตรงตำแหน่งที่เป็นลำดับเบสจำเพาะที่เอนไซม์ตัดจำเพาะทำการตัด ส่งผลให้มีแบบแผน (pattern) ของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกับกระทือปกติ

อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสของกระทือที่มีลักษณะผิดปกติ อาจเกิดในตำแหน่งอื่น ดังเช่น ในกรณีของกระทือใบบิดลาย มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสตรงตำแหน่งที่ไพรเมอร์ 1 (5’ AGACGGCTCC 3’) สามารถจับได้ นอกจากนี้อาจมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในตำแหน่งอื่นที่ไม่ได้มีการทดสอบ

การตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล โดยใช้ไพรเมอร์จากขิง ซึ่งพบว่า ให้รูปแบบดีเอ็นเอในครั้งแรกแตกต่างกับกระทือปกติ แต่ในการใช้ดีเอ็นเอจากใบอ่อนที่ได้จากกระทือที่ตัดแบ่งเนื้อเยื่อมาจากกระทือที่ตรวจสอบครั้งแรก ไม่พบความแตกต่าง อาจเป็นเพราะต้นที่ตรวจสอบครั้งแรกเป็นไคเมอรา ในการนำใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอเป็นการสุ่มจากต้นในกลุ่มลักษณะที่คาดว่าเกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งในกลุ่มลักษณะเดียวกันยังมีหลายต้น ต้นที่ไม่ได้ตรวจสอบ เนื่องด้วยข้อจำกัดในเรื่องงบประมาณและเวลา อย่างไรก็ตาม ได้ย้ายต้นที่คาดว่าเกิดการกลายพันธุ์เหล่านี้ปลูกลงดินไว้ในเรือนเพาะชำ(ภาพที่ 12) เพื่อย้ายลงปลูกในแปลงทำการศึกษาคุณลักษณะต่อไป

ภาพที่ 12 ต้นกระทือที่ได้รับรังสีแกมมาความเข้มข้น 5.12 Krad ย้ายปลูกลงดิน

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. ได้กระทือกลายพันธุ์ เป็นการเพิ่มพันธุ์ใหม่ และเพิ่มฐานพันธุกรรมของกระทือ
2. ชิ้นส่วนตาจากต้นเทียมของกระทือพิลาสสามารถชักนำให้เกิดยอดและรากได้ด้วยอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตทุกสูตรที่เพาะเลี้ยง ยอดที่ได้นำมาตัดแบ่งเนื้อเยื่อเพิ่มปริมาณได้
3. รังสีแกมมาแบบเรื้อรังความเข้มข้น 5.12 Krad สามารถชักนำให้กระทือเกิดการกลายพันธุ์ได้ ซึ่งสังเกตการเปลี่ยนแปลงได้จากทั้งลักษณะภายนอกและลักษณะทางพันธุกรรมจากการทดสอบโดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุล ส่วนรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันความเข้มข้น 2 Krad เป็นระดับที่ทำให้จำนวนเนื้อเยื่อกระทือตาย 50 เปอร์เซ็นต์
4. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อช่วยคัดแยกชิ้นส่วนเนื้อเยื่อกระทือที่เกิดการกลายพันธุ์อย่างถาวรออกจากส่วนที่เป็นไคเมอราได้
5. เครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์นำมาใช้ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอระดับพลอยดีในกระทือได้ ซึ่งเป็นการตรวจสอบที่ง่าย รวดเร็ว และแม่นยำ เมื่อเทียบกับการตรวจสอบโดยการนับจำนวนโครโมโซมแบบเดิม
6. วิธีชีวโมเลกุล RAPD และ ISSR สามารถใช้ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมในกระทือได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. กระทือกลายพันธุ์จะส่งมอบให้หน่วยงานของสถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตรดำเนินการศึกษาคุณลักษณะต่างๆ ต่อไป เพื่อใช้เป็นพันธุ์ใหม่หรือเป็นแหล่งพันธุกรรม
2. ได้ข้อมูลเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการขยายพันธุ์กระทือ หรือในงานวิจัยที่ต้องการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมด้วย
3. ได้ข้อมูลวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบของกระทือ สามารถนำไปเป็นตัวอย่างในการสกัดดีเอ็นเอจากใบของกระทือ พืชตระกูลขิง และพืชอื่น ๆ โดยใช้ SDS/NaCl Extraction Buffer ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว ไม่มีส่วนผสมของสารเคมีอันตราย ลดค่าใช้จ่ายของสารเคมีและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ รวมถึงดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี
4. สามารถนำไพรเมอร์จากงานวิจัยนี้ ไปใช้ในการจำแนกพันธุ์กระทือและพืชสกุล *zingiber*

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

12. เอกสารอ้างอิง :

ฐานข้อมูลสมุนไพร. 2553. กระทือ. สืบค้นจาก : http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=200 [15 กรกฎาคม 2558].

วริศรา สุวรรณ. 2558. การใช้ Flow Cytometry ในการศึกษาโครโมโซมในเซลล์พืช. สืบค้นจาก:

http://www.e-manage.mju.ac.th/acticleDetail.aspx?qid=356&blog=true (15/9/ 2558)

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2558. กระทือ. สืบค้นจาก : https://th.wikipedia.org/wiki/กระทือ [15 กรกฎาคม 2558].

สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน). 2555. กระทือพิลาส. สืบค้นจาก: http://www.thaibiodiversity.org/Life/LifeDetail.aspx?LifeID=879 [11 สิงหาคม 2555].

อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์. 2550. การกลายพันธุ์ : เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 279 หน้า

Ashraf Kamran, Altaf Ahmad, Anis Chaudhary, Mohd. Mujeeb, Sayeed Ahmad, Mohd. Amir, N. Mallick. 2014. Genetic diversity analysis of Zingiber Officinale Roscoe by RAPD. collected from subcontinent of India. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 21:159–165.

Cervelli, R., and T. Senaratna. 1995. Economic analysis of automated embryogenesis. Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht. The Netherlands. 1995 : 29-64.

Christine Stanly, and Chan Lai, Keng . 2007. Micropropagation of *Curcuma zedoaria* Roscoe and *Zingiber zerumbet* Smith.. *Biotechnology*, 6 (4) : 555-560.

Ghosh S., P.B. Majumder and S. Sen Mandi. 2011. Species-specific AFLP markers for identification of *Zingiber officinale*, *Z. montanum* and *Z. zerumbet* (Zingiberaceae) *Genetics and Molecular Research*. 10(1):218-229.

Harith Jameel Mahdi, Retno Andayani and Ishak Aziz. 2013. Determination of Phylogenetic and Molecular Characteristics of Three Malaysian Ginger Cultivars (*Zingiber officinale* Roscoe) Using Microsatellite DNA. *Tropical Life Sciences Research*. 24(2):65–76.

Lamseejan, S., P. Jompook, A. Wongpiyasatid, P. Kwanthammachart and R. Meesat. 2001. Improvement of ornamental plants through induced mutation. Pp. 19-20. *In* FAO/IAEA Seminar on Mutation Techniques and Molecular Genetics for Tropical and Subtropical Plant Improvement in Asia and the Pacific Region. Makati City, The Philippines.

Loyola-Vasgas, V. M. and F. Vazquez-Flota. 2006. Methods in Molecular Biology, vol. 318. Plant cell Culture Protocols, 2 ed. Humana Press, Inc., Totowa, NJ. 246 p.

Myfirstbrain.com. 2012. กระทือช้าง. Retrieved August 11, 2012,

from http://www.myfirstbrain.com/student_view.aspx?ID=61668

Simeon O. Kotchoni and Emma W. Gachomo. 2009. A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies. *Plants Molecular Biology Reports.* 36 (6) : 1633-1636.

Sultana A., L. Hassan, S. D. Ahmad, A. H. Shah, F. Batool, M. A. Islam, R. Rahman and S. Moonmoon. 2009. In Vitro regeneration of ginger using leaf, shoot tip and root explants. Pak. J. Bot., 41 (4) : 1667-1676