รายงานการวิจัย

การปรับปรุงพันธุ์หญ้าไนล์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Improvement of Nile Grass (*Acrocras macrum* Stapf) by Tissue Culture

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ผู้ร่วมโครงการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

ผู้ร่วมโครงการวิจัย ศาสตราจารย์ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ

ผู้ร่วมโครงการวิจัย นางสาวจันทกานต์ อรณนันท์

RCH
QH
445
.G74
อ199ก
ค.1

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 116126
วัน,เดือน,ปี -2 พ.ค. 2554

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b.12313964
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการวิจัย การปรับปรุงพันธุ์หญ้าไนล์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Improvement of Nile Grass (*Acrocras macrum* Stapf) by Tissue Culture

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ประจำปีงบประมาณ 2550 ถึง 2552 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 600,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 3 ปี ตั้งแต่ 2550 ถึง 2552

1. หัวหน้าโครงการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 40 %

สถานที่ติดต่อ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

โทร. 02-3298000 ต่อ 6223 โทรสาร 02-3298427

E-mail : kpanurug@kmitl.ac.th

2. ผู้ร่วมโครงการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 20 %

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า

เจ้าคุณทหารลาดกระบัง ถ.ฉลองกรุง เขต ลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

โทรศัพท์ 02-3298000 ต่อ 6268 โทรสาร 02-3298427

Email: poeaim@hotmail.com

3.ผู้ร่วมโครงการวิจัย ศาสตราจารย์ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 20 %

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โทรศัพท์ 02-5625444

Email: fscipdp@ku.ac.th

4. ผู้ร่วมโครงการวิจัย นางสาวจันทกานต์ อรณนันท์ สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 20 %

กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ เขตราชเทวี กรุงเทพฯ

โทรศัพท์ 02-9428716-7 โทรสาร 02-4280200

Email: Jarananant@yahoo.com

คำสำคัญ หญ้าไนล์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แคลลัส และ การเกิดยอดหลายยอด

(Keywords) Nile grass (*Acroceras macrum*) tissue culture callus and multiple shoot

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนตาข้างของหญ้าไนล์ (*Acroceras macrum*) โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีน ไฮโดรคลอไรด์ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลฟา-คีโต กลูตาริก 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร และ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าความเข้มข้นของ BA ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดต่อตาข้างมากที่สุด และย้ายต้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด และสามารถย้ายออกปลูกในกระถางได้สำเร็จ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนม้วนใบอ่อนและตาข้างบนอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีน ไฮโดรคลอไรด์ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลฟา-คีโต กลูตาริก 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร และ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้มากที่สุด และการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย BA 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นของ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำแคลลัสให้เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว และมีการพัฒนาเกิดเป็นยอดได้มากที่สุด และสามารถพัฒนาต่อไปเป็นต้นที่มีระบบยอดและรากที่สมบูรณ์ และสามารถย้ายออกปลูกในกระถางได้สำเร็จ

การชักนำแคลลัสที่ชักนำจากเซลล์แขวนลอยเพื่อให้เกิดการ กลายพันธุ์ โดยการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณ 0-100 เกรย์ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน พบว่า โดยปริมาณรังสีที่ทำให้แคลลัสมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) คือ 70.48 เกรย์ จากนั้นย้ายยอดที่พัฒนามาจากแคลลัสที่รอดชีวิตเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS เพื่อชักนำให้เกิดราก แล้วนำย้ายออกปลูกเพื่อศึกษาเป็นเวลา 45 วัน พบว่า ความสูง และความยาวเฉลี่ยของใบของหญ้าไนล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น และสามารถตรวจพบความแปรปรวนในลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากต้นที่พัฒนาจากแคลลัสที่ได้รับรังสี เช่น ใบเล็ก ลักษณะเตี้ยแคระ และมีการแตกกอมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

Node explants of Nile grass (*Acroceras macrum*) were cultured on solid LS media supplemented with 0.5 1 3 and 5 mg/l BA, 30 g/l sucrose and 2.6 g/l phytagel for 6 weeks. The result showed that concentration of BA 5 mg/l gave the highest average shoots per explant. Shoots were culture on LS medium supplemented with 0.5 mg/l BA gave the highest average for roots. Plantlets were transferred to soil.

Callus induction from young shoot and node were culture on solid LS medium supplemented with 0.1 mg/l BA, 4 mg/l Thiamine-HCl,100 mg/l α-ketoglutaric acid, 30 g/l sucrose, 2.6 g/l Phytagel and 2,4-D in various concentration of 0.5, 1, 3 and 5 mg/l. Maximum callus induction were occurred on the medium supplemented with 1 mg/l 2, 4-D. Plant regeneration induction from calli was culture on LS media supplemented with 0.5, 1, 3 and 5 mg/l of BA, 3% sucrose and 2.6 g/l Phytagel. The results showed that 1 mg/l BA had affected on green spot and plant regeneration. The plantlets were induced roots and transferred to soil.

Induce mutation in suspension were irradiated with gamma ray at the doses of 0-100 Gy. The irradiated callus was subculture onto LS medium supplemented with 1 mg/l BA for 4 months. The results showed that percentage of survival rate of 70.48 Gy gave 50 % survival rate of irradiated callus (LD_{50}). The surviving shoots were transferred onto LS medium for root induction. The surviving plantlets were transplanted into soil containing in pots and grown for 45 days. The result shows that, the average plant height, leaf length decreased was significantly as the irradiation dose increased. Some morphological variation of plantlets such as smaller leaf, dwarf and shoot proliferation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ 1). ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2550 ถึง 2552

2). ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้สถานที่ในการทำวิจัยในครั้งนี้

3). ผู้ร่วมโครงการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ถ.ฉลองกรุง เขต ลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

4). ผู้ร่วมโครงการวิจัย ศาสตราจารย์ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตร

5). ผู้ร่วมโครงการวิจัย นางสาวจันทกานต์ อรณนันท์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ เขตราชเทวี กรุงเทพฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....III
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....IV
กิตติกรรมประกาศ.....V
สารบัญ.....VI
สารบัญตาราง.....VIII
สารบัญภาพ.....IX
บทนำ.....1
ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย.....1
วัตถุประสงค์ของโครงงานงานวิจัย.....2
ขอบข่ายของโครงการวิจัย.....2
ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิด..... 3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ 6

วัสดุอุปกรณ์ วิธีดำเนินการวิจัย และผลการวิจัย..... 7
พืชที่ใช้ในการวิจัย..... 7
เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมี..... 7
1. เครื่องมืออุปกรณ์..... 7
2. สารเคมี..... 8
วิธีการวิจัย..... 9
1. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนข้อให้พัฒนา
เป็นยอดจำนวนมาก 9
2. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนข้อ หรือ
ยอดอ่อนของหญ้าไนล์ ให้พัฒนาเป็นแคลลัส 9
2.1 จากชิ้นส่วนข้อ 9
2.2 ชิ้นส่วนยอดอ่อน 10
2.3 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อชักนำแคลลัสจาก
ชิ้นส่วนของข้อ และชิ้นส่วน ของยอดอ่อนให้พัฒนาเป็นต้นใหม่.....10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

3. การศึกษาค่า LD50 โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าไนล์
โดยการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่าง 11
3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย.....11
3.1.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย
ของหญ้าไนล์ 11
3.1.2 การศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอย.....12
3.1.3 ผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการพัฒนา
ของแคลลัสจากเซลล์แขวนลอย.....13
4. การคัดเลือกสายพันธุ์หญ้าไนล์ที่มีลักษณะพึงประสงค์ เช่น ให้ผลผลิตที่สูงขึ้น..13
4.1 การศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของหญ้าไนล์ที่พัฒนาจาก
เซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆเมื่อปลูกในสภาพธรรมชาติ 13
4.2 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี.....14

ผลการวิจัย 16
1. ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนข้อให้พัฒนา
เป็นยอดจำนวนมาก 16
2. ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนข้อ หรือ
ยอดอ่อนของหญ้าไนล์ ให้พัฒนาเป็นแคลลัส 18
2.1 จากชิ้นส่วนข้อ 18
2.2 ชิ้นส่วนยอดอ่อน 21
2.3 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อชักนำแคลลัสจาก
ชิ้นส่วนของข้อ และชิ้นส่วน ของยอดอ่อนให้พัฒนาเป็นต้นใหม่.....24
3. ผลการศึกษาค่า LD50 โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าไนล์
โดยการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ 27
3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย.....27
3.1.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย
ของหญ้าไนล์ 26
3.1.2 ผลการศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอย.....28
3.1.3 ผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการพัฒนา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของแคลลัสจากเซลล์แขวนลอย.....30
4. ผลการคัดเลือกสายพันธุ์หญ้าไนล์ที่มีลักษณะพึงประสงค์ เช่น ให้ผลผลิตที่สูงขึ้น.32
4.1 ผลการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของหญ้าไนล์ที่พัฒนาจาก
เซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆเมื่อปลูกในสภาพธรรมชาติ 32
4.2 ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี.....37

สรุปผลการทดลอง.....48

บรรณานุกรม.....49
ภาคผนวก ที่ 1.....53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำอาร์เอพีดี....15
2. ผลของ BA ต่อการเกิดยอดจำนวนมากจากส่วนข้อของหญ้าไนล์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์....17
3. การเกิดแคลลัสและเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อ หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 19
4. การเกิดแคลลัสและเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงส่วนยอดอ่อน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์....23
5. ผลของ BA ต่อการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนข้อ และยอดอ่อนหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์....25
6. ผลของ BA ต่อการพัฒนาเป็นต้นของเซลล์แขวนลอยหลังจากเพาะเลี้ยงเป็น เวลา 8 สัปดาห์ 30
7. ผลของรังสีแกมมาต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดและการพัฒนาเป็นต้นของแคลลัสที่ 20 สัปดาห์ หลังได้รับหลังสีแกมมาที่ปริมาณต่างๆ 31
8. ผลของรังสีแกมมาต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหญ้าไนล์ที่พัฒนาจากเซลล์ แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีปริมาณต่างๆ หลังการปลูก 45 วัน 33
9. ค่าเฉลี่ยความสูง ขนาดของใบ และขนาดของลำต้นของหญ้าไนล์ที่พัฒนาจากเซลล์ แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีปริมาณต่างๆ หลังการปลูก 45 วัน 34
10. แสดงการจำแนกตัวอย่างของไพร์เมอร์ทั้งหมด 46
11. แสดงจำนวนไพร์เมอร์ที่สามารถสามาถตรวจสอบความแตกต่าง ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างต้นควบคุมกับต้นตัวอย่างได้ 47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1. ขั้นตอนการชักนำส่วนข้อให้พัฒนาเป็นยอดจำนวนมาก 18
2. การพัฒนาเป็นยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อ บนอาหารที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อ 19
3. ลักษณะการเกิดแคลลัสจากส่วนข้อของหญ้าไนล์หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....21
4. ลักษณะการเกิดแคลลัสจากส่วนยอดอ่อนของหญ้าไนล์.....24
5. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนของยอดอ่อน และชิ้นส่วนของข้อ ให้พัฒนาเป็นต้นใหม่.....26
6. ลักษณะเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์ 27
7. กราฟแสดงระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย โดยวิธีการหาน้ำหนักสด 28
8. กราฟแสดงระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย โดยวิธีการหาน้ำหนักแห้ง 28
9. การพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอย 29
10. ผลของรังสีแกมมาต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดและค่า $LD_{50(140)}$ ของแคลลัสที่ 20 สัปดาห์หลังได้รับหลังสีแกมมาที่ปริมาณต่างๆ 31
11. การพัฒนาของเซลล์แขวนลอยที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ 32
12. ลักษณะหญ้าไนล์ ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสี.....36
13. แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-01.....37
14. แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-02.....38
15. แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-03.....39
16. แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-04.....40
17. แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-06.....41
18. แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-08.....42
19. แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-09.....43
20. แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-10.....44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบันภาครัฐบาลและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องได้ส่งเสริมให้เกษตรกรมาเลี้ยงโคเนื้อและโคนม โดยจัดทำโครงการโคล้านครอบครัวที่แต่ละครอบครัวจะมีการเลี้ยงโคเนื้ออย่างน้อย 5 ตัว ดังนั้นเมื่อสิ้นสุดโครงการจะมีจำนวนโคเนื้อเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 5,000,000 ตัว ซึ่งทางภาครัฐบาลได้มีการจัดเตรียมแปลงพืชอาหารสัตว์ก่อนการเลี้ยงโค เพื่อการเพิ่มผลผลิตต่อพื้นที่ และการเพิ่มคุณค่าทางอาหารของพืชอาหารสัตว์ ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งต่อความสำเร็จของโครงการดังกล่าว และโครงการนี้กำลังได้รับความสนใจจากเกษตรเป็นจำนวนมากและมีการขยายตัวอย่างรวดเร็วในทุกภาคของประเทศไทย ทำให้พืชอาหารสัตว์มีปริมาณไม่เพียงพอสำหรับใช้เลี้ยงสัตว์ แต่จากการดำเนินงานโครงการพัฒนาอาชีพการผลิตพืชอาหารสัตว์เพื่อจำหน่าย โดยกองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ ที่เริ่มดำเนินการมาตั้งแต่ ปี 2545 ทำให้ปัจจุบันมีเกษตรกรจำนวนมากที่หันมาประกอบอาชีพปลูกพืชอาหารสัตว์เพื่อจำหน่ายให้กับผู้เลี้ยงสัตว์ ซึ่งพันธุ์พืชอาหารสัตว์ที่ปลูกจำหน่ายนั้น ได้แก่ หญ้ารูซี (*B. ruziziensis*) หญ้ากินนี (*Panicum maximum*) หญ้าพลิเคทูลัม (*Paspalum plicatulum*) และหญ้าแพงโกลา (*Digitaria eriantha* Steud.) เป็นต้น โดยพืชแต่ละชนิดนั้นจะมีความเหมาะสมต่อสภาพพื้นที่ที่แตกต่างกัน สำหรับพื้นที่ภาคกลางที่มีลักษณะเป็นพื้นที่ลุ่ม นั้น หญ้าแพงโกลา (*Digitaria eriantha*) พันธุ์ A254 ซึ่งนำเข้ามาจากประเทศไต้หวัน เป็นหญ้าที่เหมาะสม และมีวิธีการเพาะปลูกง่าย คล้ายทำนาข้าว เมื่อส่งเสริมให้เกษตรกรที่มีอาชีพทำนาข้าวอยู่เดิมปลูกเพื่อผลิตเป็นเสบียงสัตว์จำหน่ายจึงได้รับการยอมรับจากเกษตรกร จนปัจจุบันมีเกษตรกรให้ความสนใจเข้าร่วมกิจกรรมเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะในจังหวัดชัยนาท สามารถจัดตั้งเป็นสหกรณ์ผลิตเสบียงสัตว์ชัยนาท มีกลุ่มเกษตรกรที่ผลิตหญ้าจำหน่ายที่เป็นสมาชิก จำนวน 9 กลุ่ม โดยมีพื้นที่การผลิตรวมทั้งสิ้น 3,489 ไร่ จำหน่ายในรูปของพืชสด และพืชแห้ง (hay) แต่เนื่องจากหญ้าแพงโกลาเป็นหญ้าที่มีโปรตีนในช่วง 7-10 เปอร์เซ็นต์ และมีผลผลิตน้ำหนักแห้งต่อไร่ประมาณ 8 ตันต่อไร่ต่อปี และเป็นพืชอาหารสัตว์พันธุ์เดียวที่ปลูกในพื้นที่จำนวนมาก เสี่ยงต่อความเสียหายอันอาจเกิดขึ้นได้จากโรคและแมลง ดังนั้น จึงจำเป็นต้องหาพันธุ์พืชอาหารสัตว์ใหม่เพื่อเป็นทางเลือกให้เกษตรกร ซึ่งจากการศึกษาเอกสารต่างๆ พบว่า ปัจจุบันประเทศไต้หวันได้ปรับปรุงพันธุ์หญ้าไนล์ (*Acrocras macrum* Stapf) ได้พันธุ์ใหม่ที่มีศักยภาพในการเป็นพืชอาหารสัตว์ที่ดี และคาดว่าจะทดแทนหญ้าแพงโกลาได้

จากการข้อมูลหญ้าไนล์จากแปลงสาธิตที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ชัยนาท จังหวัดชัยนาท พบว่า หญ้าไนล์ที่อายุ 60 วัน ระยะแทงช่อดอก มีปริมาณโปรตีนประมาณ 13 เปอร์เซ็นต์ มีเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใยชนิด NDF ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อตัดที่อายุ 90 วัน ซึ่งเป็นระยะดอกบาน มีผลผลิตน้ำหนักสดเท่ากับ 5120 กิโลกรัมต่อไร่ หญ้าไนล์มีลำต้นค่อนข้างอวบน้ำกว่าหญ้าแพงโกลา ถ้าสามารถปรับปรุงพันธุ์หญ้าไนล์ให้มีปริมาณโปรตีน และผลผลิตเพิ่มขึ้นก็จะเกิดประโยชน์เป็นอย่างยิ่งกับเกษตรกร ซึ่ง สามารถผลิตหญ้าแห้งคุณภาพดีเพื่อจำหน่ายได้ในราคาตามเกรดคุณภาพดี ก็จะทำให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้น ขณะเดียวกันถ้าเกษตรกรปลูกเองและนำไปใช้เลี้ยงสัตว์ก็จะทำให้ได้ผลผลิตจากสัตว์เพิ่มขึ้น มีรายได้จากผลผลิตสัตว์ เช่น น้ำนม หรือน้ำหนักสัตว์ที่เพิ่มขึ้น เท่ากับต้นทุนการผลิตลดลง เป็นการลดผลกระทบจาก FTA ได้อีกทางหนึ่ง Jeng-Bin และคณะ (2004) ศึกษาการเปรียบเทียบการย่อยของหญ้าไนล์ และหญ้าแพงโกลา ในประเทศไต้หวัน พบว่าหญ้าไนล์ มีการย่อยที่ง่ายกว่าและมีคุณภาพที่สูงกว่าหญ้าแพงโกลา ที่ปลูกในสภาพเดียวกัน และมีแนวโนมที่จะปลูกหญ้าไนล์แทนการปลูกแทนหญ้าแพงโกลาในอนาคตอันใกล้นี้

การสร้างสายพันธุ์ใหม่ของหญ้าไนล์สามารถทำได้โดยการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสี สามารถผลิตพืชอาหารสัตว์ได้มากขึ้นและเป็นพืชที่มีคุณค่าทางอาหารสัตว์สูง ซึ่งเมื่อสัตว์ได้รับอาหารที่มีปริมาณและคุณค่าทางโภชนะที่เพียงพอกับความต้องการของร่างกายแล้ว ก็จะทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ได้รับผลผลิตจากสัตว์เพิ่มขึ้นทำให้เกษตรกรผู้ผลิตพืชอาหารสัตว์จำหน่ายและเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ต่างก็มีรายได้เพิ่มขึ้น

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำยอดอ่อน ให้เป็นยอดหลายๆยอด และศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำยอดอ่อนให้กลายเป็นต้นใหม่
2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำตาข้างของหญ้าไนล์ ให้เจริญ เป็นแคลลัส และศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้กลายเป็นต้นใหม่
3. ศึกษาค่า LD50 โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าไนล์โดยการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ
4. คัดเลือกสายพันธุ์หญ้าไนล์ที่มีลักษณะพึงประสงค์ เช่น ลักษณะของต้นที่เล็กลง ให้ผลผลิตที่สูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำปลายยอด ให้เป็นยอดหลายๆยอด และพัฒนาเป็นต้นอ่อน ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำตาข้างของหญ้าไนล์ เพื่อชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นใหม่ ศึกษาค่า LD50 โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าไนล์โดยการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆในแคลลัส หรือต้นอ่อน และคัดเลือกสายพันธุ์หญ้าไนล์ที่มีลักษณะพึงประสงค์ในแปลงทดลอง เช่น ลักษณะของต้นที่เล็กลง ให้ผลผลิตที่สูงขึ้น

ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิด

หญ้าไนล์ มีถิ่นกำเนิดอยู่ที่อาฟาริกาใต้ ใบมีสีเขียวเข้ม ช่อดอกอ่อนยาว 15-25 เซนติเมตร โครโมโซม 2n = 36 และ Oliveira และคณะ (1973) และ Shaug และคณะ (1999) ศึกษาในหญ้าไนล์ที่เป็นพืชอาหารสัตว์ พบว่าเป็นพืช C3 Wilson และ Hacker (1987) ศึกษาทางด้านกายภาพของใบที่ตัดขวางในหญ้าที่เป็น C_3 และ C_4 สภาพที่เป็นหน้าร้อนและหน้าหนาวพบว่าพืชมีความแตกต่างกันตามฤดูกาล ในพืชที่เป็น C_4 และจะมีขนาดของมีโซฟิวที่น้อยกว่า C_3

ในการปรับปรุงพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหญ้าไนล์ยังไม่มีปรากฏในรายงานวิจัย แต่การปรับปรุงพันธุ์ในหญ้าสายพันธุ์ๆ อื่นๆ มีรายงานดังนี้

Asano. (1989); Asano และคณะ (1996); และ Tanpo และคณะ (1997) สามารถชักนำเมล็ดหญ้าสายพันธุ์ Zoysiagrass โดยชักนำให้เป็นแคลลัส และชักนำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

Lajonchere และคณะ (1993) เพาะเลี้ยงส่วนของยอดอ่อนของหญ้าพันธุ์ *P. maximum* Jacq. Cv. Likoni บนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน และ 2,4-D เพาะเลี้ยงในที่มืด พบว่าสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดเป็น Embryogenic callus ที่มีขนาดใหญ่คืออาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 10 เปอร์เซ็นต์ และ 2,4 – D ปริมาณ 2-7 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิด Embryogenic callus ที่ดีที่สุดคือ อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 5 เปอร์เซ็นต์ 2,4–D 2 – 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรพัฒนาแคลลัสเป็นต้นอ่อนได้ดีที่สุดคือ อาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ศิริลักษณ์ (2540) สามารถชักนำให้ช่อดอกอ่อนของหญ้าแฝกเกิดแคลลัสได้โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4–D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม เป็นเวลา 30 วัน และเพิ่มปริมาณได้เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4–D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม ในสภาพที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 60 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จันทกานต์ (2544) ได้เพาะเลี้ยงส่วนม้วยใบอ่อน ของหญ้าเนเปียร์แคระ *(Pennisetum purpureum* cv. Mott) พบว่าอาหารสูตรที่เหมาะกับการชักนำให้เกิดแคลลัส คือ อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 5 เปอร์เซ็นต์ 2,4–D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสแบบผสมระหว่าง friable callus กับ compact callus ได้สูงสุดคือ 67.5 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้เมื่อเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 5 เปอร์เซ็นต์ 2,4–D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ธนภักษ์ (2545) รายงานว่าสามารถชักนำเมล็ดของหญ้าอะตราตัม *(Paspalum atratum)* ให้เกิดเป็นยอดจำนวนมากได้โดยเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ ดิริฎา (2545) ทดลองนำหญ้ารูซี่ *(Brachiaria ruziziensis* Germain and Everard) มาชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถที่จะชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้ดีที่สุด คือ จำนวนยอดเฉลี่ยต่อต้นเท่ากับ 7.49 ยอด

Chen และคณะ (1997) ได้ทำการปรับปรุงพันธุ์หญ้าแพงโกลาพันธุ์ A254 โดยการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนติน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสแล้วจึงย้ายไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ casein hydrolysate 0.5 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 13 เดือน จากนั้นจึงชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยนำเซลล์แขวนลอยไปเลี้ยงในสารละลาย EMS เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารใหม่เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นอ่อน ซึ่งสามารถคัดเลือกต้นที่มีลักษณะใหม่ได้รวม 10 ต้น (TC1-TC10) จากจำนวนทั้งหมด 202 ต้น โดยมีลักษณะต่างๆ เช่น TC2, TC4 และ TC8 มีลำต้นตรง ใบมีลักษณะบางและมีไหลเล็กน้อย TC7 และ TC9 มีลักษณะลำต้นเลื้อยมากกว่า A254 เป็นต้น

Yu-Ye Wu และคณะ (2005) ได้นำเมล็ดของหญ้า perennial ryegrass มาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ชักนำให้เกิดการงอกของแคลลัสในสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 9 มิลลิกรัมต่อลิตร และมอลโตส 30 กรัมต่อลิตร และนำไปวางในที่มืดที่อุณหภูมิ 24±1 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายยอดสีขาว และราก แยกแคลลัสออกจากเมล็ดและย้ายลงไปใน อาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และมอลโตส 30 กรัมต่อลิตร ในที่มืดประมาณสัปดาห์ที่ 4-12 ทำการ ย้ายแคลลัส ที่พัฒนามาจากเมล็ด ลงไปใน อาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร 6-BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ที่แสง จากนั้นย้ายแคลลัสที่มีสีเขียว ลงในอาหารที่ชักนำรากสูตร MS ที่มีซูโครส 20 กรัมต่อลิตร phytagel 0.8 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Poeaim และคณะ (2004) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเมล็ดของหญ้า *Zoysia* บนอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร thiamine-HCl 4 มิลลิกรัมต่อลิตร α-ketoglutaric 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 3 เปอร์เซ็นต์ และ เจลไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในที่มืดเป็นเวลา 35 วัน คัดเลือกคอมแพคแคลลัส มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่ชักนำให้กลายเป็นต้น ที่ประกอบด้วย BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 3 เปอร์เซ็นต์ และ เจลไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าการเกิดคอมแพคแคลลัส และการเจริญเป็นต้นใหม่ขึ้นกับสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง

Poeaim และคณะ (2005) ศึกษาการเพาะเลี้ยงปลายยอด *Zoysia minima* และ *Z. japonica*, var. Miyako and Himeno บนอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 0.1 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร thiamine-HCl 4 มิลลิกรัมต่อลิตร α-ketoglutaric 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 3 เปอร์เซ็นต์ และ เจลไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในที่มืด คัดเลือกคอมแพคแคลลัส มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 3 เปอร์เซ็นต์ และ เจลไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าสามารถชักนำให้เจริญเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้

อนุรักษ์ และคณะ (2549) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้ารูซี่ (*Brachiaria ruziziensis*) สามารถชักนำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ และสามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหญ้า bermudagrass (*Cynodon* spp) ได้สำเร็จ (Poeaim และคณะ, 2006)

อนุรักษ์ และคณะ (2548) ศึกษาการย้ายยีนในไมโครแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาพแขวนลอยของหญ้าสายพันธุ์ "ยูคิกิรุชิ" (*Zoysia japonica*) ด้วยเครื่องยิงอนุภาค โดยใช้อนุภาคของทองคำขนาด 1.6 ไมโครเมตร เคลือบพลาสมิด pBI 221 ที่มีส่วนประกอบของยีนกัส ทำการศึกษาผลของความดันที่ใช้ในการยิงอนุภาคที่ระดับ 900 1,100 และ 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และ ระยะทาง ระหว่างไมโครแคลลัสกับตำแหน่งที่ยิง 9 12 และ 15 เซนติเมตร นำไมโครแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร LS ที่ชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ที่ผ่านการย้ายยีนแล้ว มาเพาะเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีแสง เป็นระยะเวลา 2 วัน ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพการย้ายยีนด้วยวิธีกัสเอสเส จากการนับการเกิดจุดสีน้ำเงิน (blue spots) บนไมโครแคลลัส ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และศึกษาความสามารถในการพัฒนาเป็นต้น จากการตรวจสอบการเกิดจุดเขียว (green spot) ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน พบว่าความดันที่ 900 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และระยะทางที่ 15 เซนติเมตร เกิดจุดสีน้ำเงิน และจุดเขียวได้มากที่สุดคือ 199 จุด และ 51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Takahiro และคณะ (2005) ได้ทดลองนำเมล็ดของหญ้า bahiagrass *(Paspalum notatum* Flu¨gge cv. Pensacola) มาทำการเพาะเลี้ยงในจานแก้วที่รองด้วยกระดาษกรอง ที่เติมอาหารเหลว สูตร MS 5 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส สามารถชักนำให้เกิด กลุ่มเซลล์แคลลัส ย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้

Zhang และคณะ (2007) การเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนและตาข้างของหญ้าแพรก (bermudagrasses) โดยใช้พืชทิพพลอยด์ เช่น TifSport, TifEagle และ Tift97-4 และพืช เตตระพลอยด์ เช่น Tift93-132, Tift93-135, Tift93-156 และ Tift93-157 เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 1-1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร โพรลีน 1.16 กรัมต่อลิตร พบว่าการเจริญของแคลลัส 4 ชนิดคือ แคลลัสชนิดที่ 1 มีลักษณะขนอ่อนนุ่ม และแคลลัสที่ยังไม่ก่อตัวจะมีสีขาว แคลลัสชนิดที่ 2 มีลักษณะกลมใสและแข็ง แคลลัสชนิดที่ 3 มีลักษณะใสอัดกันแน่น และสามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอได้ แคลลัสชนิดที่ 4 มีลักษณะทึบแสงสีขาว และอัดกันแน่น แคลลัสชนิดที่ 3 และ 4 มีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอและสามารถพัฒนาต่อไปเป็นต้นใหม่ได้ ในอาหารที่เติมเจลไรท์ 2 กรัมต่อลิตร และวุ้น 5 กรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาการเกิดแคลลัสและเพิ่มอัตราการเกิดแคลลัสให้อัดกันแน่นขึ้น การเพาะเลี้ยงแคลลัส TifSport ในอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.5-4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้มากขึ้นจาก 6.7 เปอร์เซ็นต์ ถึง 40 เปอร์เซ็นต์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ชัยนาท จังหวัดชัยนาท กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กลุ่มวิเคราะห์อาหารสัตว์และพืชอาหารสัตว์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์จะเป็นส่วนหนึ่งที่มีแหล่งข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงปลายยอด ให้เป็นยอดหลายๆยอด และพัฒนาเป็นต้นอ่อน และได้สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำตาข้างของหญ้าไนล์เพื่อชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส และได้สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นใหม่

2. ได้ข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์หญ้าสายพันธุ์อื่นๆ ในอนาคต การวิจัยนี้จะช่วยสนับสนุนการวิจัยทางเทคโนโลยีชีวภาพของพืช ช่วยสานต่องานทางด้านพันธุศาสตร์ การปรับปรุงพันธุ์พืช และ พันธุวิศวกรรมให้ครบวงจร สามารถนำข้อมูลเหล่านี้ไปใช้ในการเรียน การสอน สำหรับนักศึกษาระดับปริญญาตรี และปริญญาโท และปริญญาเอก

3. เกษตรกรที่เพาะปลูกหญ้าไนล์ และเกษตรกรที่เลี้ยงโคจะได้ประโยชน์โดยตรงกับงานวิจัยนี้เป็นอย่างมาก

4. ได้สายพันธุ์ใหม่ของหญ้าไนล์ที่ผลผลิตที่เพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัสดุอุปกรณ์ วิธีการดำเนินการวิจัย และผลการวิจัย

พืชที่ใช้ในการวิจัย

หญ้าไนล์ (*Acroceras macrum*) ได้รับจาก กลุ่มวิเคราะห์อาหารสัตว์และพืชอาหารสัตว์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชอาหารสัตว์ จ. ชัยนาท

เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องมืออุปกรณ์

1 เครื่องฉายรังสีแกมมา Gamma Irradiator Mark I ใช้ธาตุซีเซียม 137 (Cs 137) เป็นแหล่งกำเนิดรังสีแกมมา

2 เครื่องชั่งแบบละเอียด (blance)

3 เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH meter)

4 เตาอบไมโครเวฟ (microwave)

5 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave)

6 ตู้อบความร้อน (hot air oven)

7 ตู้ปลอดเชื้อ (larminar air flow)

8 เครื่องเขย่า (sheaker)

9 เครื่องปั๊มสูญญากาศ (vaccum suction)

10 กระดาษกรอง (filter papers)

11 โถดูดความชื้น (desicator)

12 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาดต่างๆ (tissue culture flask)

13 ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)

14 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (plate)

15 ปากคีบ (forcept)

16 มีดผ่าตัด (blades)

17 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol lamp)

18 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

19 กล้องสเตอริโอ (stereo microscope)

20 กล้องถ่ายรูปดิจิตอล (digital camera)

21 กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

22 เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

23 เครื่องกำเนิดแสงยูวี (UV transiluminator)

24 เครื่องมือวัดหาค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

25 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycle)

26 เครื่องเขย่าผสมสารละลาย (Vortex mixer)

27 หลอดทดลอง (microcentrifuge tube) ขนาดต่างๆ เช่น 0.2, 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร

28 ชุดไมโครปิเปตต์ (micropipette set) ขนาดต่างๆ

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร LS

2.2 สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ เช่น โซเดียมไฮโปรคลอไรด์ คลอร็อกซ์ และ สารเปียกใบ (tween-20)

2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เช่น 2,4-D , BA และ BAP เป็นต้น

2.4 แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์

2.5 ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ *Qiagen*

2.6 ชุดเอนไซม์ *Tag* DNA polymerase

2.7 สารละลาย Mix dNTPs

2.8 สารละลาย 1X TBE Buffer, 10X TBE Buffer

2.9 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (marker) ขนาด 100 คู่เบส และ 1 กิโลเบส

2.10 สีย้อม (loading dye)

2.11 เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide)

2.12 อะกาโรสเจล (agarose gel)

2.13 ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)

2.14 สารละลาย EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetate)

2.15 น้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionize water)

2.16 ไพรเมอร์ (Operon Technologies Inc)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการวิจัย

1. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนข้อให้พัฒนาเป็นยอดจำนวนมาก

ตัดชิ้นส่วนข้อของหญ้าไนล์มาล้างด้วยน้ำสะอาด นำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารเปียกใบจำนวน 1-2 หยด เขย่าเป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที นำชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว วางลงบนกระดาษกรองที่ปลอดเชื้อ ตัดปลายทั้งสองข้างของชิ้นเนื้อเยื่อออก ให้เหลือขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS (Linsmaier Skoog, 1965) ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร อาหารทุกสูตรปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 30 วัน วางแผนการวิจัยแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆละ 5 ชิ้น เมื่อเวลาผ่านไป 6 สัปดาห์ ทำการบันทึกจำนวนและความยาวของยอดและรากที่เกิดขึ้นต่อตาข้าง

2. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนข้อ หรือ ยอดอ่อนของหญ้าไนล์ให้พัฒนาเป็นแคลลัส

2.1 จากชิ้นส่วนข้อ

คัดเลือกและตัดชิ้นส่วนข้อของหญ้าไนล์มาล้างด้วยน้ำสะอาด นำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารเปียกใบจำนวน 1-2 หยด เขย่าเป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที นำชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว วางลงบนกระดาษกรองที่ปลอดเชื้อ ตัดปลายทั้งสองข้างของชิ้นเนื้อเยื่อออก ให้เหลือขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยในแต่ละสูตรประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลฟา-คีโต กลูตาริก ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีน ไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร อาหารทุกสูตรปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เพาะเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส วางแผนการวิจัยแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 4 ซ้ำๆ ละ 20 ชิ้น โดยทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 30 วัน เมื่อระยะเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ ทำการบันทึกจำนวนและลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นแล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์

2.2 ชิ้นส่วนยอดอ่อน

ตัดชิ้นส่วนข้อของหญ้าไนล์มาล้างด้วยน้ำสะอาด นำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารเปียกใบจำนวน 1-2 หยด เขย่าเป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที นำชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว วางลงบนกระดาษกรองที่ปลอดเชื้อ ตัดปลายทั้งสองข้างของชิ้นเนื้อเยื่อออกให้เหลือขนาดประมาณ 0.5 เซ็นติเมตร นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร อาหารทุกสูตรปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก จากนั้นนำส่วนยอดอ่อนที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ มาตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยในแต่ละสูตรประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลฟา-คีโต กลูตาริก ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร อาหารทุกสูตรปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เพาะเลี้ยงส่วนยอดอ่อนในสภาวะมืด ควบคุมอุณหภูมิที่ 25-28 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 30 วัน วางแผนการวิจัยแบบ CRD ทำการทดลอง 4 ซ้ำๆ ละ 20 ชิ้น เมื่อเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ บันทึกจำนวนและลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นแล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ และนำแคลลัสที่ได้ไปตรวจสอบลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน

2.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนของข้อ และชิ้นส่วนของยอดอ่อนให้พัฒนาเป็นต้นใหม่

2.3.1 นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของข้อ บนอาหารสูตรที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 2.1 อายุ 60 วัน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร อาหารทุกสูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เพาะเลี้ยงในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 30 วัน วางแผนการวิจัยแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 20 ชิ้น เมื่อเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ บันทึกจำนวนแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นต้น

2.3.2 นำแคลลัสที่ได้จาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของยอดอ่อน บนอาหารสูตรที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 2.2 อายุ 60 วัน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร อาหารทุกสูตรปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เพาะเลี้ยงในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 30 วัน วางแผนการวิจัยแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 20 ชิ้น เมื่อเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ บันทึกจำนวนแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นต้น

3. ศึกษาค่า LD50 โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าไนล์โดยการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ

3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

3.1.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์

นำแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนข้อของหญ้าไนล์ที่เพาะเลี้ยงอยู่บนอาหารเหลวสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแบ่งเซลล์ของแคลลัสมา 0.7 กรัม นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลฟา-คีโตกลูตาริก ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการแยกเซลล์โดยใช้ช้อนโลหะกดให้เซลล์แยกออกจากกัน โดย เซลล์จะหลุดออกเป็นขนาดเล็กๆ จากนั้น เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์ ในแต่ระยะเวลาคือ 0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 และ 30 วัน ตามลำดับ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ในแต่ละช่วงระยะเวลาเมื่อเพาะเลี้ยงถึงระยะเวลาตามกำหนด ทำการกรองเซลล์แขวนลอย เพื่อชั่งหาน้ำหนักสดและชั่งน้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.1.1 หาน้ำหนักกระดาษกรองขนาด 90 มิลลิเมตร ให้คงที่ โดยนำกระดาษกรองมาใส่ในจานแก้ว แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 108 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ บันทึกน้ำหนักโดยการชั่งกระดาษกรอง (A)

3.1.1.2 นำแผ่นกระดาษกรองวางลงบนกรวยกรอง (bucher funnel) แล้วนำไปต่อกับ ขวดรูปชมพู่เพื่อที่จะทำการกรองในระบบสุญญากาศด้วยปั๊มสุญญากาศ

3.1.1.3 เทน้ำกลั่นผ่านกระดาษกรอง ทำการกรองในระบบสุญญากาศ รอจนกระทั่งน้ำกลั่นหยุดไหลผ่านกระดาษกรอง แล้วนำกระดาษกรองที่เปียกไปชั่งน้ำหนัก บันทึกน้ำหนัก (B)

3.1.1.4 เปลี่ยนกระดาษแผ่นใหม่ แล้วจึงทำการกรองเซลล์แขวนลอยด้วยระบบสุญญากาศ ล้างเซลล์ที่อาจติดค้างอยู่ภายในขวดรูปชมพู่ด้วยน้ำกลั่น ชั่งน้ำหนักเซลล์และกระดาษกรอง บันทึกน้ำหนัก (C)

3.1.1.5 กระดาษที่มีเซลล์อยู่ไปอบที่อุณหภูมิ 108 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์

3.1.1.6 นำกระดาษกรองที่มีเซลล์ที่อบแห้งแล้ว ไปชั่งหาน้ำหนักแห้ง โดยเครื่องชั่งที่มีทศนิยม 4 ตำแหน่ง บันทึกผลน้ำหนัก (D)

3.1.1.7 นำค่าเฉลี่ยของทั้ง 2 ขวดที่ได้มาเขียนกราฟ และหาสมการความสัมพันธ์ของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งกับระยะเวลา

3.1.1.8 ค่าน้ำหนักสด (fresh weight) = (C)-(B)

ค่าน้ำหนักแห้ง (dry weight) = (D)-(A)

3.1.2 การศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอย

นำเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงตามการทดลองที่ 3.1.1 อายุ 4 สัปดาห์ ที่ผ่านการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 2 สัปดาห์ มาวางบนกระดาษกรองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อซับน้ำให้แห้ง ย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลฟา-คีโต กลูตาริก ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นย้ายแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร อาหารทุกสูตรปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 30 วัน วางแผนการวิจัยแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 20 ชิ้น เมื่อเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ บันทึกจำนวนแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นต้น และจำนวนยอดทั้งหมดที่เกิดขึ้น

3.1.3 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการพัฒนาของแคลลัสจากซลล์แขวนลอย

นำแคลลัสที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยง อายุ 4 สัปดาห์ ย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เพาะเลี้ยง แคลลัส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนนำไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณต่างๆ คือ 0 20 40 60 80 และ 100 เกรย์ ตามลำดับ โดยใช้เครื่องฉายรังสีแกมมา (รุ่น Mark I มีซีเซียม 137 เป็นต้นกำเนิดรังสี ของศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ ฯ) จากนั้นชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็น กรดเป็นด่างเท่ากับ 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 สัปดาห์ วางแผนการวิจัยแบบ CRD กำหนดให้ปริมาณรังสีเป็นทรีทเมนต์ แต่ละทรีทเมนต์ มี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 30 แคลลัส หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 สัปดาห์ บันทึกผลการวิจัยโดยนับจำนวนแคลลัสที่อยู่รอดที่ปริมาณรังสีแต่ละอัตรา เพื่อหาปริมาณรังสีที่ทำให้แคลลัสมีอัตราการอยู่รอด 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50})

4. คัดเลือกสายพันธุ์หญ้าไนล์ที่มีลักษณะพึงประสงค์ เช่น ให้ผลผลิตที่สูงขึ้น

4.1 ศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของหญ้าไนล์ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆเมื่อปลูกในสภาพธรรมชาติ

นำต้นหญ้าไนล์ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในแต่ละอัตราคือ 0 20 40 60 80 และ 100 เกรย์ ตามลำดับ ที่มียอดและรากที่สมบูรณ์ ย้ายออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยนำออกจากขวดเพาะเลี้ยง ลงปลูกในกระถางพลาสติกขนาด 3 นิ้ว โดยใช้วัสดุปลูกเป็น พีทมอส และ เพอร์ไรต์ อัตราส่วน 3:1 รดน้ำแล้วคลุมด้วยถุงพลาสติกใส ปิดปากถุงเพื่อรักษาระดับความชื้น วางในที่ร่มเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อให้ต้นกล้าได้ปรับสภาพ จากนั้นนำถุงพลาสติกใสออกและย้ายต้นกล้าลงปลูกในถุงพลาสติกดำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 นิ้ว โดยใช้วัสดุปลูกเป็น ดิน ผสมกาบมะพร้าวสับ ในอัตราส่วน 3:1 วางในที่ร่มเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์เพื่อให้ต้นกล้าแข็งแรงก่อนนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ นำต้นหญ้าไนล์ไปเพาะเลี้ยงในสภาพธรรมชาติ เป็นเวลา 30 วัน ทำการตัดหญ้า หลังจากนั้น 45 วัน ทำการบันทึกผลลักษณะต่างๆ เช่น ความสูงของต้น ความกว้างและความยาวของใบ ขนาดของลำต้น โดยการวัดทั้งหมดจะทำการสุ่มวัด 10 ซ้ำ จากแต่ละต้นแล้วหาค่าเฉลี่ย

4.2 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

คัดเลือกโคลนที่มีลักษณะที่แตกต่างไปจากต้นควบคุมที่แยกได้จากการทดลองที่ 4.1 และต้นควบคุมมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit (*Qiagen*) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพร์เมอร์ (Operon Technologies Inc) จำนวน 10 ไพร์เมอร์ (ตารางที่ 1) องค์ประกอบของปฏิกิริยา ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ดังนี้มีดือ 200 นาโนกรัม DNA template, 10X PCR buffer, 1.25 มิลลิโมล dNTP Mix, 20 มิลลิโมล primer, 1 *unit Taq*-Polymerase โดยปฏิกิริยามีสภาวะ ดังนี้ ขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปฏิกิริยาจำนวน PCR 45 รอบ ประกอบด้วยขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ทำตามด้วยขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ในอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ระยะเวลา 30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำอาร์เอพีดี

ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPA-04	AATCGGGCTG
OPA-05	AGGGGTCTTG
OPA-06	GGTCCCTGAC
OPA-07	GAAACGGGTG
OPA-08	GTGACGTAGG
OPA-09	GGGTAACGCC
OPA-10	GTGATCGCAG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิจัย

1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนข้อให้พัฒนาเป็นยอดจำนวนมาก

จากการนำส่วนข้อของหญ้าไนล์ (ภาพที่ 1 ก และ ข) ไปทำการฟอกฆ่าเชื้อแล้วไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าบริเวณส่วนข้อของหญ้าไนล์สามารถพัฒนา (ภาพที่ 1 ค) และ เกิดเป็นยอดจำนวนมากได้ แสดงให้เห็นว่า BA มีผลในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก เนื่องจาก BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน มีผลโดยตรงในการชักนำเนื้อเยื่อให้เกิดยอด โดยจะไปกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์และเกิดตายอด (Krishnamoorthy, 1981) โดยที่ระดับความเข้มข้นของ BA สูงมากขึ้น จำนวนยอดต่อตาข้างก็จะเพิ่มสูงขึ้น จากการทดลองพบว่า จำนวนยอดต่อตาข้างที่พัฒนาจากส่วนข้อบนอาหารสูตรต่างๆ จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2) (ภาพที่ 1 ง) โดยอาหารสูตรที่สามารถชักนำส่วนข้อของหญ้าไนล์ให้เกิดยอดได้มากที่สุดคือ อาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 5.4 ยอดต่อตาข้าง (ภาพที่ 2 ก) สอดคล้องกับการทดลองของ กมลพรรณ และคณะ (2535) รายงานว่า BA มีผลให้แฝกหอมแตกยอดเพิ่มขึ้น โดย BA 10 ไมโครโมลต่อลิตร จะชักนำให้สร้างยอดใหม่จำนวนมากที่สุดคือ 10 ยอดต่อต้น

การเจริญเติบโตของยอดและราก พบว่าในกลุ่มที่มีจำนวนของยอดมาก ความยาวของยอดจะลดลง ส่วนในกลุ่มที่มีจำนวนของยอดน้อยความยาวของยอดจะมากขึ้น จึงทำให้ยอดที่เลี้ยงในอาหารที่มี BA ความเข้มข้นที่ต่ำ จะมีความยาวของยอดมากกว่าที่เลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้นที่สูงกว่า จากการทดลองพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงส่วนตาข้างของหญ้าไนล์บนอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีการเจริญเติบโตของยอดดีที่สุด โดยมีความยาวของยอดเฉลี่ยเท่ากับ 9.41 เซนติเมตร (ตารางที่ 2) (ภาพที่ 1 ง) และที่ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีการเจริญเติบโตของยอดดีที่สุด โดยมีความยาวของยอดเฉลี่ยเท่ากับ 9.32 เซนติเมตร (ตารางที่ 2) (ภาพที่ 1 ง) เนื่องจากความเข้มข้นของ BA จะมีผลไปลดอิทธิพลของออกซินที่สร้างที่ปลายยอด ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการยืดยาวของเซลล์ ความยาวของยอดจึงลดลงเมื่อได้รับ ความเข้มข้นของ BA ที่สูงขึ้น (Vieitze และคณะ1983 ; Taiz และ Zeiger 1991)

การเกิดราก พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงตาข้างของหญ้าไนล์บนอาหารที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้นสูง จะทำให้การเกิดรากนั้นลดลง โดยอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

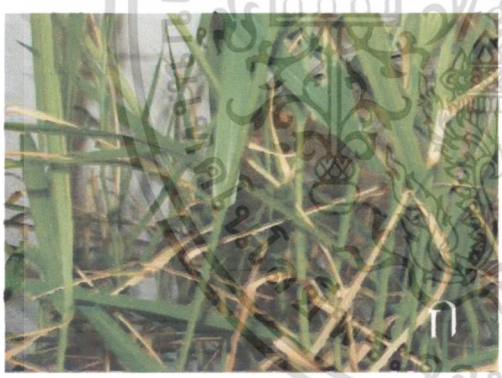
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

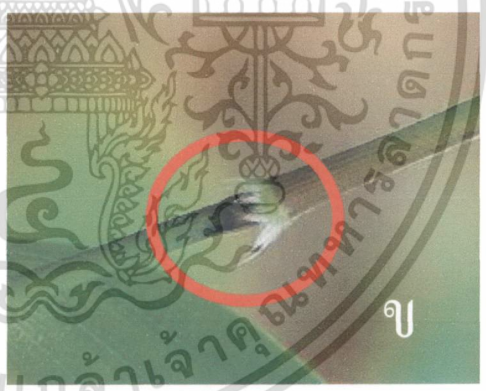
ต่อลิตร จะมีการพัฒนาของรากได้ดีที่สุดโดยจะเกิดรากได้ 3.66 รากต่อตาข้าง และมีความยาวของราก เฉลี่ยมากที่สุดคือ 4.60 เซนติเมตร (ตารางที่ 2) จากนั้นย้ายต้นที่สมบูรณ์จากขวดเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 2 ข) ออกมาลงปลูกในกระถาง (ภาพที่ 2 ค)

ตารางที่ 2. ผลของ BA ต่อการเกิดยอดจำนวนมากจากส่วนข้อของหญ้าไนล์หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

BA (มก/ล.)	จำนวนข้อที่เพาะเลี้ยง	จำนวนยอดทั้งหมด	จำนวนยอดต่อข้อ	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม.)	จำนวนรากทั้งหมด	จำนวนรากต่อข้อ	ความยาวรากเฉลี่ย (ซม.)
0.5	15	26	1.73^{d} 1/	9.41^{ab}	52	3.66^{a}	4.60 ^{a}
1	15	42	2.8^{c}	9.32^{ba}	44	2.93^{b}	4.21 ^{b}
3	15	59	3.93^{b}	7.56 ^{c}	32	2.33^{cd}	2.74^{c}
5	15	81	5.4^{a}	5.50 ^{d}	25	1.66 ^{dc}	0.78 ^{d}

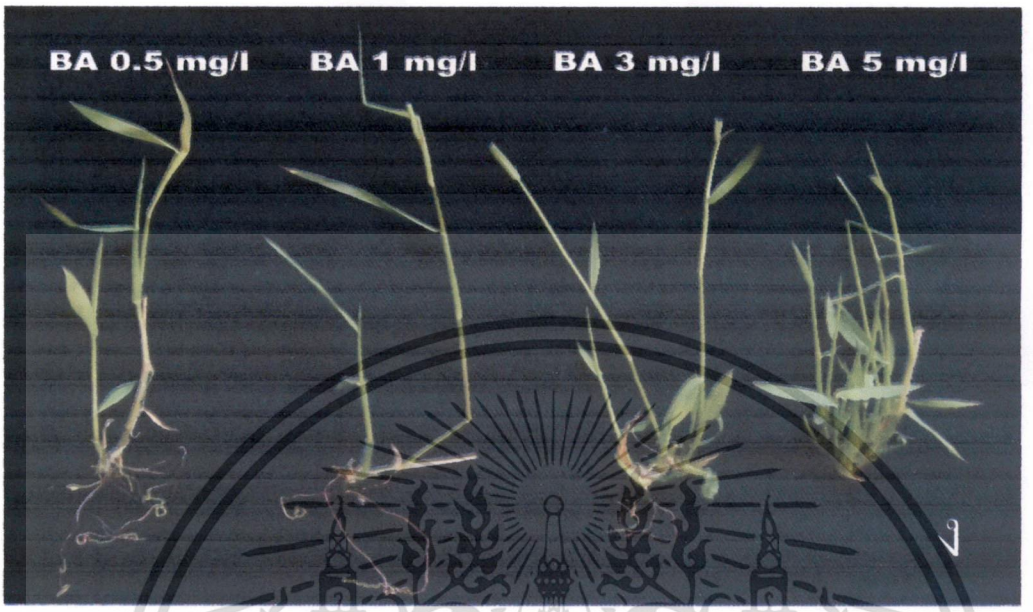
1/ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05





เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

116126



ภาพที่ 1. ขั้นตอนการชักนำส่วนข้อให้พัฒนาเป็นยอดจำนวนมาก

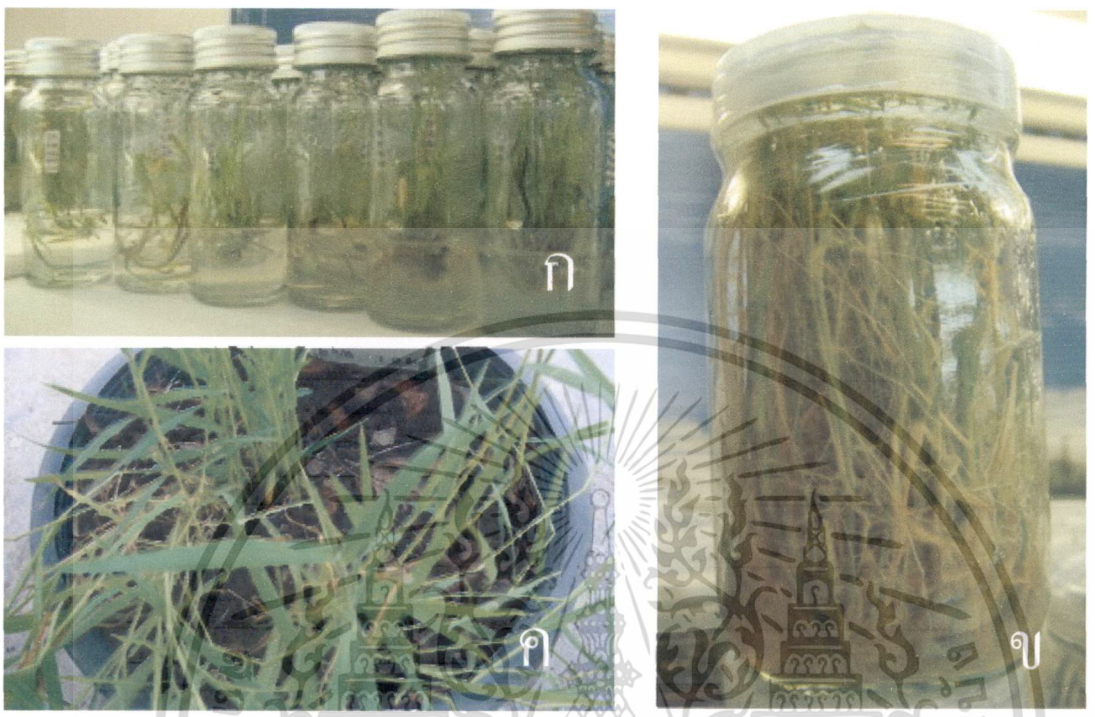
ก. ลักษณะของต้นของหญ้าไนล์

ข. ลักษณะของข้อของหญ้าไนล์ที่ใช้ในการทดลอง

ค. ลักษณะของข้อมีการพัฒนาในอาหาร

ง. การพัฒนาเป็นยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2. การพัฒนาเป็นยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อบนอาหารที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และย้ายออกปลูก

ก. การพัฒนาเป็นยอด หลังเพาะเลี้ยง 10 สัปดาห์

ข. การพัฒนาเป็นต้นที่มีรากที่สมบูรณ์ หลังเพาะเลี้ยง 15 สัปดาห์

ค. ย้ายต้นที่สมบูรณ์ลงในกระถางพลาสติกหลังเพาะเลี้ยงประมาณ 20 สัปดาห์

2. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนข้อ หรือ ยอดอ่อนของหญ้าไนล์ให้พัฒนาเป็นแคลลัส

2.1 จากชิ้นส่วนข้อ

จากการนำส่วนข้อของหญ้าไนล์มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน อาหารทุกสูตรสามารถชักนำข้อให้พัฒนาเป็นแคลลัสได้โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 41.25-61.25 เปอร์เซ็นต์ โดยอาหารสูตรที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้พัฒนาเป็นแคลลัสได้มากที่สุดเท่ากับ 61.25 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

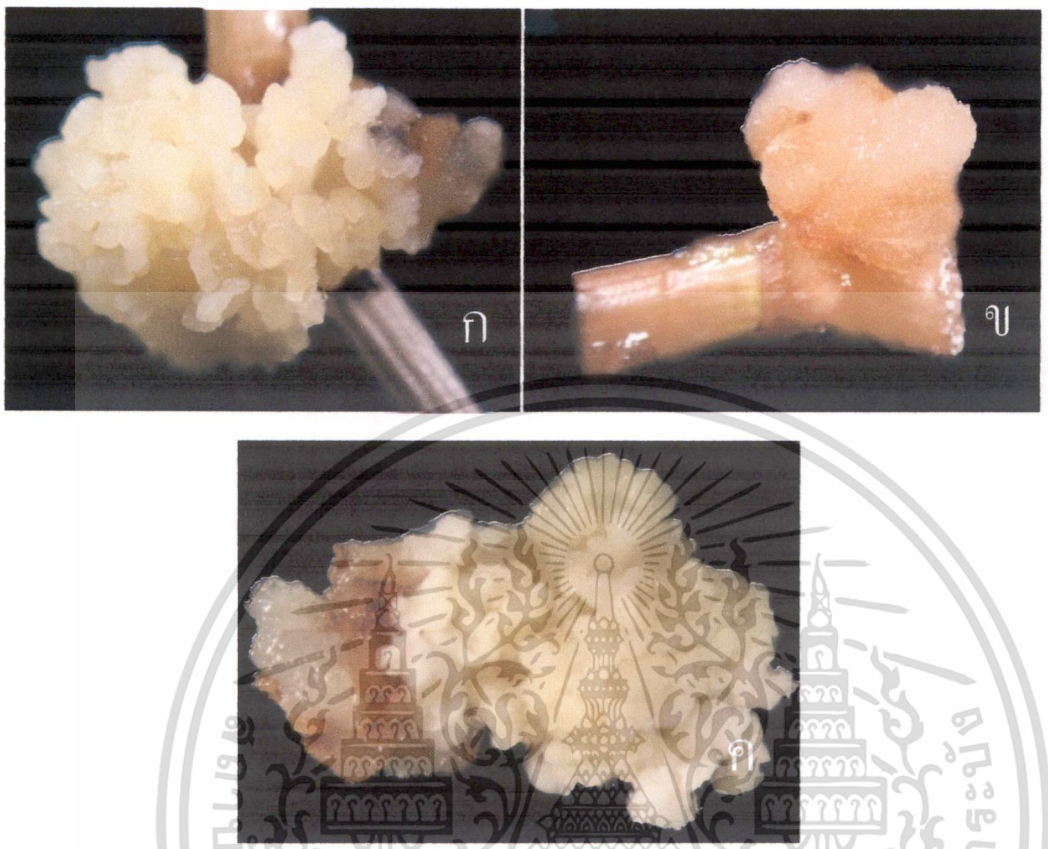
2.1) ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นมีสองลักษณะคือ ลักษณะเป็นสีขาวขุ่นอมเหลือง เซลล์เกาะกันค่อนข้างแข็ง ซึ่งเป็นลักษณะของเอ็มบริโอจีนิค (ภาพที่ 3 ก) และลักษณะเป็น นอล-เอ็มบริโอจีนิค คือมีสีขาวใส ฉ่ำน้ำ เซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆ (ภาพที่ 3 ข) หรือลักษณะที่มีทั้งเอ็มบริโอจีนิค และนอล-เอ็มบริโอจีนิค อยู่ในแคลลัสเดียวกัน (ภาพที่ 3 ค) จากการทดลองพบว่า อาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้พัฒนาเป็นเอ็มบริโอจีนิคได้มากที่สุดเท่ากับ 48 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) สอดคล้องกับการทดลองของ Patnaik และคณะ (1997) ที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนข้อของหญ้า palmarosa (*Cymbopogon martinii*)โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นเอ็มบริโอจีนิค และนอล-เอ็มบริโอจีนิค ส่วนการทดลองของ Li และคณะ (2009) รายงานว่าสามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสจากเมล็ดของหญ้า indiangrass ได้ดีที่สุดเท่ากับ 54.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 3 การเกิดแคลลัสและเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อ หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

2,4-D (มก/ล.)	จำนวนชิ้น	จำนวนที่พัฒนาเป็นแคลลัส (%) ส่วนข้อ	จำนวนที่เกิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส (%) ส่วนข้อ
0.5	80	33(41.25)^{c} [1/]	15(18.75)^{c}
1	80	49(61.25)^{a}	36(45)^{a}
3	80	43(53.75)^{ab}	26(32.5)^{b}
5	80	39(48.75)^{bc}	17(21.25)^{c}

[1/] ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3. ลักษณะการเกิดแคลลัสจากส่วนข้อของหญ้าไนล์หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

ก. เอ็มบริโอจีนิคแคลลัส

ข. นอล-เอ็มบริโอจีนิคแคลลัส

ค. แคลลัสแบบผสมแบบเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส และนอล-เอ็มบริโอจีนิคแคลลัส

2.2 ชิ้นส่วนยอดอ่อน

จากการนำส่วนข้อของหญ้าไนล์ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ตาข้างสามารถพัฒนาเกิดเป็นยอดจำนวนมากได้ จากนั้นนำยอดอ่อนที่ได้มาตัดเป็นชิ้นๆ ขนาดประมาณ 0.5 เซ็นติเมตร (ภาพที่ 4 ก) แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส จากการทดลองพบว่า ยอดอ่อนสามารถพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสได้ 8.75 -

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

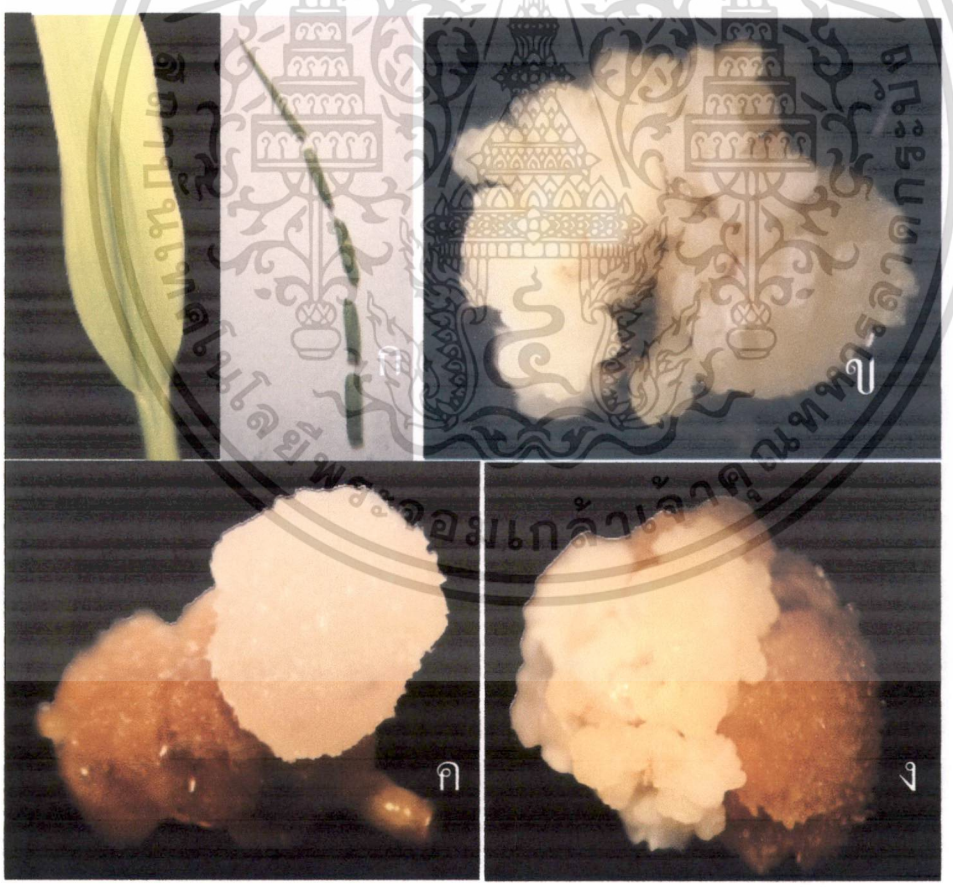
27.50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตรที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดเท่ากับ 27.50 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นมีสองลักษณะคือ เอ็มบริโอจีนิคแคลลัส (ภาพที่ 4 ข) และลักษณะเป็น นอล-เอ็มบริโอจีนิคแคลลัส (ภาพที่ 4ค) และภาพที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (ภาพที่ 4 ฉ) หรือลักษณะที่มีทั้งเอ็มบริโอจีนิค และนอล-เอ็มบริโอจีนิคแคลลัส อยู่ในแคลลัสเดียวกัน (ภาพที่ 4 ง) และภาพที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (ภาพที่ 4 จ) จากการทดลองพบว่า อาหารแข็งสูตร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้พัฒนาเป็นเอ็มบริโอจีนิคได้มากที่สุดเท่ากับ 13.75 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) ซึ่งมีผลสอดคล้องกับการทดลองของ Poeaim และคณะ (2005) รายงานว่าสามารถชักนำปลายยอดของหญ้า *zoysia sp.* ให้เกิดแคลลัสและเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสได้ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และต่อมา Dhandapani และคณะ(2008) รายงานว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนช่อดอกอ่อนและส่วนข้อของหญ้า zoysia (*Zoysia matrella L. Merr.*) โดยชิ้นส่วนทั้งสองมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสไม่แตกต่างกัน แต่ส่วนช่อดอกอ่อนสามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสได้ดีกว่าส่วนข้อ และเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนช่อดอกอ่อนสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ดีกว่าเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนข้อ Evan และคณะ (1981) รายงานว่า 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์หญ้าเพื่อใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงแคลลัสขึ้นอยู่กับลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น เช่นแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันแน่น (compact callus) จะประกอบด้วยเซลล์ที่มีขนาดเล็ก มีสีขาวหรือเหลืองอ่อนจะมีแนวโน้มพัฒนาเป็นเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส ซึ่งมีความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นได้ดี ส่วนแคลลัสที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม (friable callus) ซึ่งจะมีแนวโน้มในการพัฒนาเป็นนอล-เอ็มบริโอจีนิคแคลลัส ซึ่งมีความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นได้ลดลง ส่วน (Ketchum และคณะ 1987) Redway Vasil และคณะ (1990) รายงานว่าการใช้ BA ความเข้มข้นต่ำๆ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติมโตในกลุ่มออกซิน สามารถช่วยในการชักนำให้เกิดแคลลัสในพืชวงศ์หญ้าได้ดีขึ้น Behrend และ Mateles (1976) รายงานว่า แอลฟา-คีโต กลูตาเรท มีส่วนเกี่ยวข้องในขบวนการ ammonia assimilation เป็นกระบวนการที่แอมโมเนียถูกเปลี่ยนไปเป็นโปรตีนหรือสารประกอบ อินทรีย์ในโตรเจนอื่นๆ สามารถกระตุ้นการเกิดและการเจริญเติบโต ในช่วงแรกของ somatic embryo สอดคล้องกับ การทดลองของ Asano และคณะ(1996) ที่รายงานว่า แอลฟา-คีโต กลูตาเรท สามารถช่วยให้เกิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสได้มากขึ้นในหญ้า *Zoysia japonica* (Japanese lawn grass) โดยจะไปกระตุ้น α -keto acid dehydrogenase complex ทำให้ผลผลิตของ ATP มากขึ้นในขบวนการ citric acid cycle

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

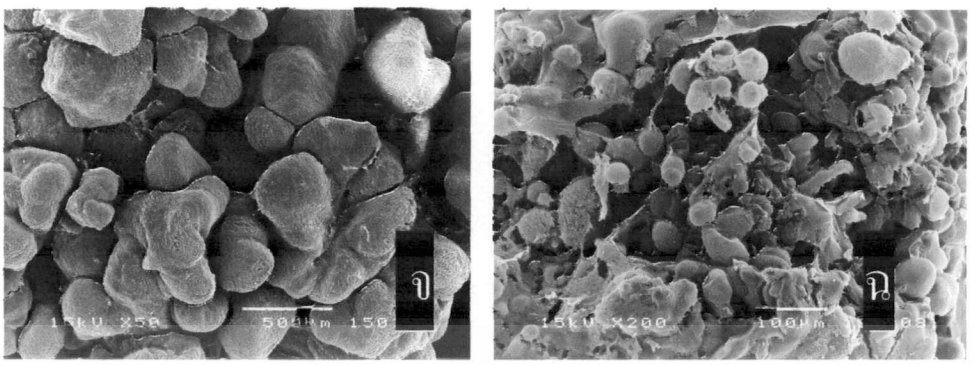
ตารางที่ 4. การเกิดแคลลัสและเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงส่วน ยอดอ่อน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

2,4-D (มก/ล.)	จำนวนชิ้น	จำนวนที่พัฒนาเป็นแคลลัส (%) ส่วนยอดอ่อน	จำนวนที่เกิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส (%) ส่วนยอดอ่อน
0.5	80	15(18.75)[b]	5(6.25)[ab]
1	80	22(27.50)[a]	11(13.75)[a]
3	80	11(13.75)[bc]	3(3.75)[b]
5	80	7(8.75)[c]	2(2.5)[b]

[1/] ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4. ลักษณะการเกิดแคลลัสจากส่วนยอดอ่อนของหญ้าไนล์หลัง

ก. ลักษณะของยอดอ่อนในสภาพปลอดเชื้อและตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5 เซนติเมตร

ข. เอ็มบริโอจีนิคแคลลัส

ค. นอลเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส

ง. แคลลัสแบบผสมระหว่างเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสและนอล-เอ็มบริโอจีนิคแคลลัส

จ. ลักษณะเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่ดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

ฉ. ลักษณะนอลเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่ดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

2.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนของข้อ และชิ้นส่วน ของยอดอ่อนให้พัฒนาเป็นต้นใหม่

จากการนำเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส อายุ 4 สัปดาห์ จากข้อ 2.1 และ 2.2 ที่พัฒนาจากส่วนข้อและส่วนยอดอ่อนของหญ้าไนล์มาชักนำให้พัฒนากลายเป็นต้นบนอาหารสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาประมาณ 4 สัปดาห์ พบว่า เอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนข้อและส่วนยอดอ่อนสามารถพัฒนาเกิดเป็นกลุ่มเซลล์สีเขียว (ภาพที่ 5 ก) และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ กลุ่มเซลล์สีเขียวสามารถพัฒนาเป็นยอดได้ (ภาพที่ 5 ข) โดยเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 -10 สัปดาห์ (ภาพที่ 5 ค) พบว่าเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนข้อสามารถพัฒนาเป็นต้นได้บนอาหารทุกสูตรคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนยอดอ่อนพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นอยู่ในช่วง 68.33-100 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5) และสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ที่มีระบบรากที่สมบูรณ์ ในระยะเวลา 15 สัปดาห์ (ภาพที่ 5 ง) และย้ายออกปลูกลงในกระถ่างในสภาพธรรมชาติ (ภาพที่ 5 จ และ ฉ) สอดคล้องกับการทดลองของ Lu และคณะ (2006) รายงานว่าสามารถชักนำเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสของหญ้า Bermuda ให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

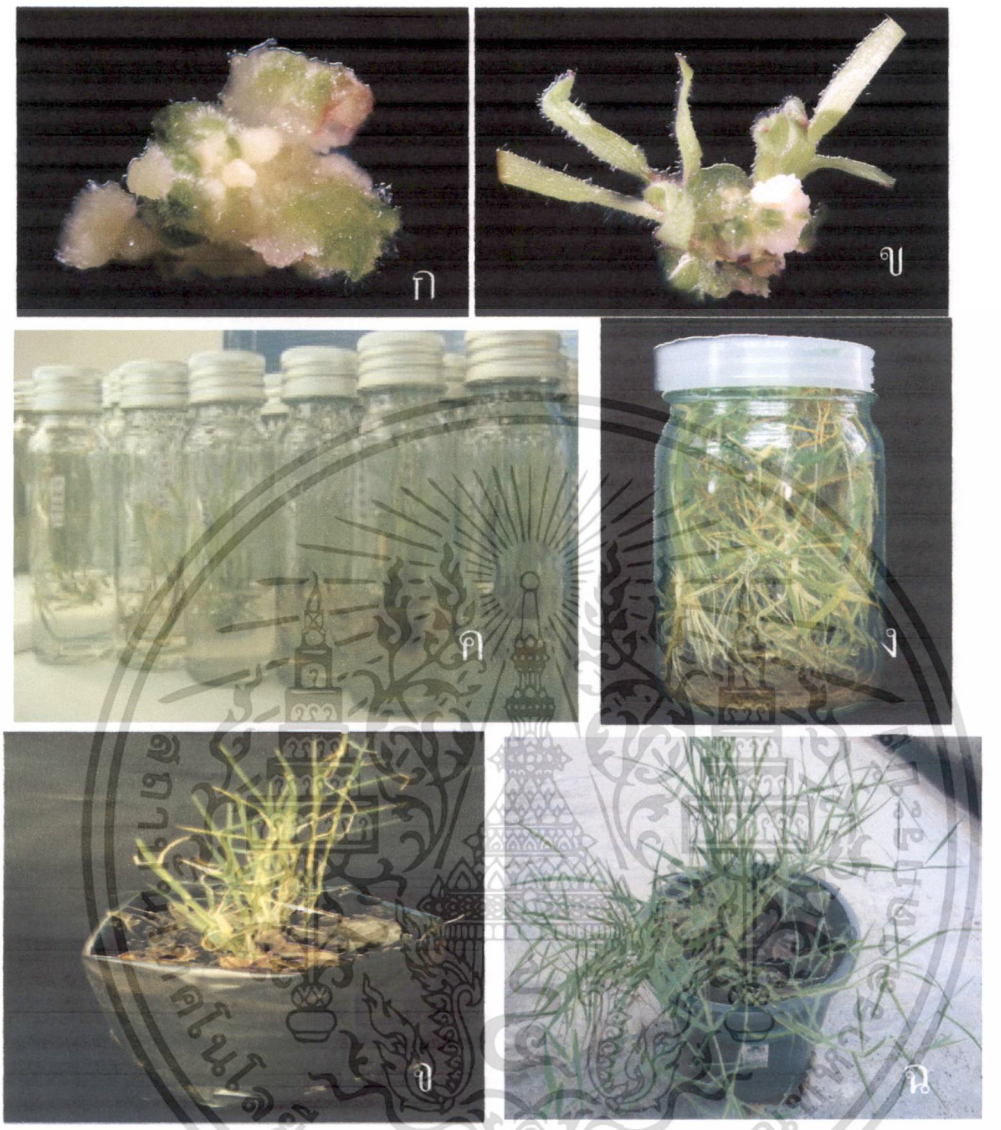
97 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วย BA 4.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนงานวิจัยของ Dhandapani และคณะ(2008) รายงานว่าเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสของหญ้า zoysia (*Zoysia matrella L. Merr.*) ที่พัฒนาจากส่วนช่อดอกอ่อนสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ดีกว่าเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนของข้อ โดยมีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์เท่ากับ 82 และ 67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วย BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3

ตารางที่ 5 ผลของ BA ต่อการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนข้อ และยอดอ่อนหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

BA (มก/ล.)	จำนวนเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยง	จำนวนเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาเป็นต้น (%)	
		ส่วนข้อ	ส่วนยอดอ่อน
0.5	60	60(100)[a] [1/]	41(68.33)[b]
1	60	60(100)[a]	48(80)[ab]
3	60	60(100)[a]	59(98.33)[a]
5	60	60(100)[a]	60(100)[a]

[1/] ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนของยอดอ่อน และชิ้นส่วนของข้อ ให้พัฒนาเป็นต้นใหม่

ก. เอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นจุดเขียว หลังเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์

ข. เอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นยอด หลังเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์

ค. เอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นยอด หลังเพาะเลี้ยง 10 สัปดาห์

ง. เอ็มบริโอจีนิคแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นที่มีรากที่สมบูรณ์หลังเพาะเลี้ยง 15 สัปดาห์

จ. ย้ายต้นที่สมบูรณ์ลงในถุงพลาสติกหลังเพาะเลี้ยงประมาณ 18 สัปดาห์

ฉ. ย้ายต้นที่สมบูรณ์ลงในกระถางพลาสติกหลังเพาะเลี้ยงประมาณ 20 สัปดาห์

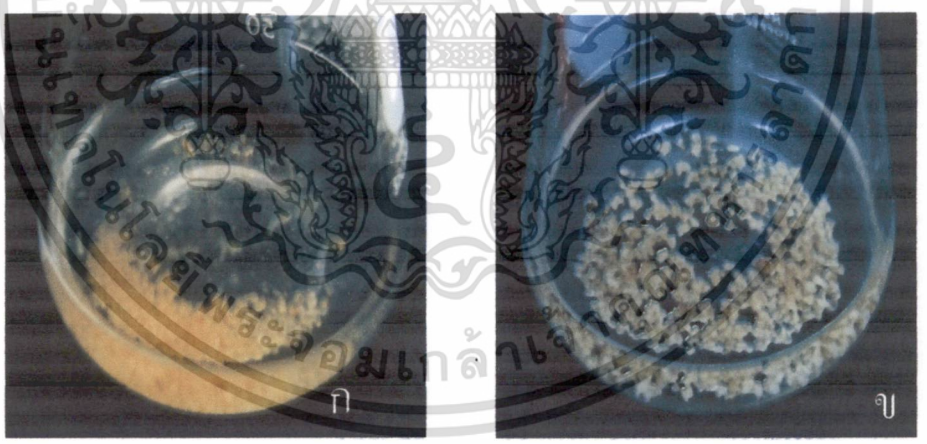
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลการศึกษาค่า LD50 โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าไนล์โดยการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ

3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

3.1.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์

จากศึกษาหาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย ง่าย (ภาพที่ 6 ก) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของหญ้าในระยะเวลาต่างๆ พบว่าลักษณะของเซลล์แขวนลอยจะเกาะกันเป็นกลุ่มเล็กๆ มีลักษณะแข็ง แยกออกจากกันได้ง่าย (ภาพที่ 6 ข) สอดคล้องกับการทดลองของ Lu และคณะ (2006) ที่สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยจากเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสของหญ้า bermudagrass (*Cynodon transvaalensis x C. dactylon*) จากการทดลองพบว่าเซลล์แขวนลอยสามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เมื่อนำผลที่ได้จากการหาน้ำหนักแห้งและน้ำหนักสดมาเขียนกราฟการเจริญ พบว่าเซลล์แขวนลอยที่การเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 6-18 วัน โดยจะมีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มมากขึ้น 8-9 เท่า (ภาพที่ 7 และ 8)

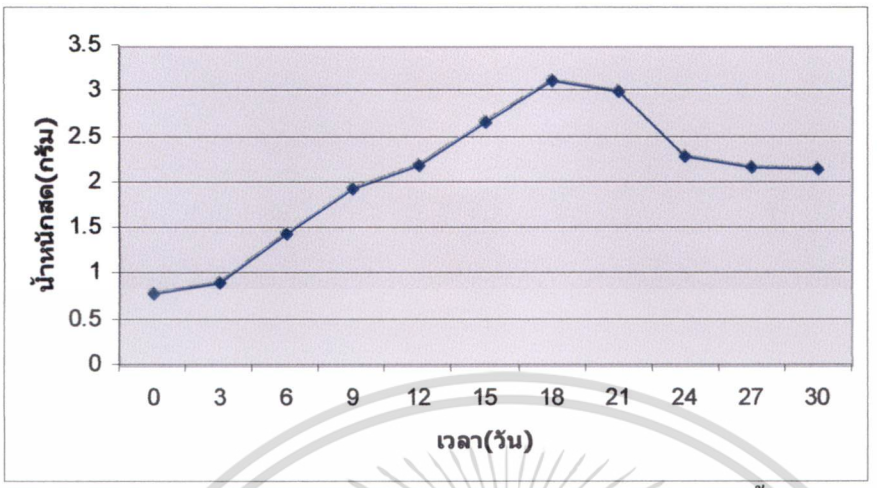


ภาพที่ 6. ลักษณะเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์

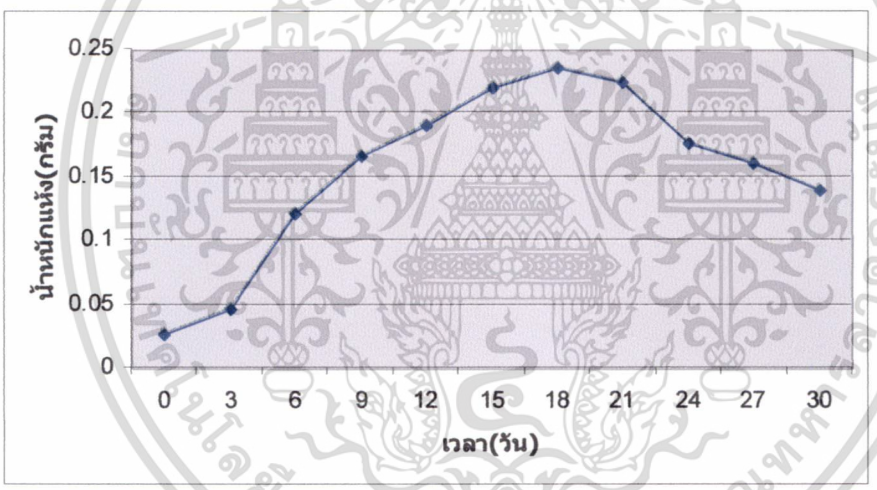
ก. เซลล์แขวนลอยเมื่อเริ่มทำการเพาะเลี้ยง

ข. เซลล์แขวนลอยหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 7. กราฟแสดงระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย โดยวิธีการหาน้ำหนักสด



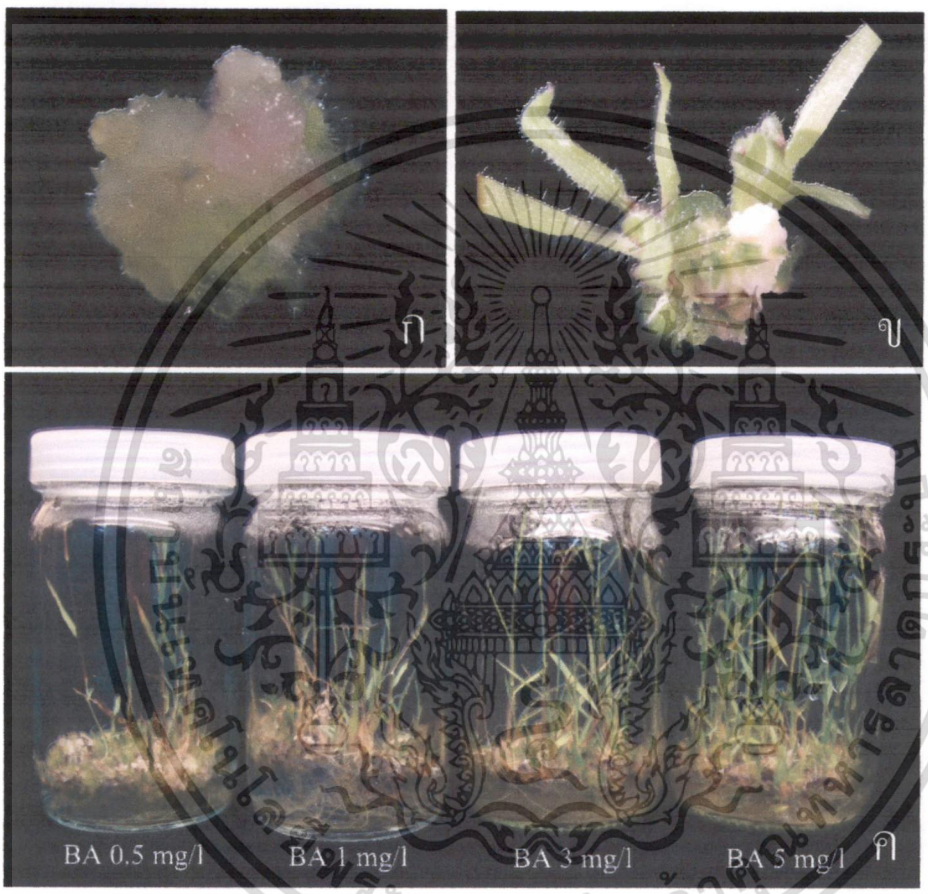
ภาพที่ 8. กราฟแสดงระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย โดยวิธีการหาน้ำหนักแห้ง

3.1.2 ผลการศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอย

การนำเซลล์แขวนลอย อายุ 4 สัปดาห์ ที่ผ่านการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงจะมีขนาดใหญ่ขึ้น และสามารถพัฒนาเกิดเป็นจุดเขียวบนอาหารทุกสูตรอาหาร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4-6 สัปดาห์ (ภาพที่ 9 ก) พบว่าเซลล์แขวนลอยที่เกิดจุดเขียวสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ (ภาพที่ 9 ข) โดยที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเซลล์แขวนลอยสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ 63.33 - 90 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6) (ภาพที่ 9 ค) โดยอาหารสูตร LS ที่เติม BA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้สูงสุดถึง 90 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการทดลองของ Lu และคณะ(2006) ที่สามารถชักนำเซลล์แขวนลอยของหญ้า triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensis x C. dactylon*) ที่พัฒนาจากส่วนข้อให้พัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดีที่สุดบนอาหารที่ประกอบด้วย BA 4.8 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นเท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 9. การพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอย

ก. เซลล์แขวนลอยที่พัฒนาเป็นจุดเขียวเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ข. เซลล์แขวนลอยที่พัฒนาเป็นยอดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ค. เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 10 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 ผลของ BA ต่อการพัฒนาเป็นต้นของเซลล์แขวนลอยหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

BA (มก/ล.)	จำนวนเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยง	จำนวนเซลล์แขวนลอยที่พัฒนาเป็นต้น (%)
0.5	60	38(63.33)^{d} 1/
1	60	44(73.33)^{c}
3	60	49(81.66)^{b}
5	60	54(90)^{a}

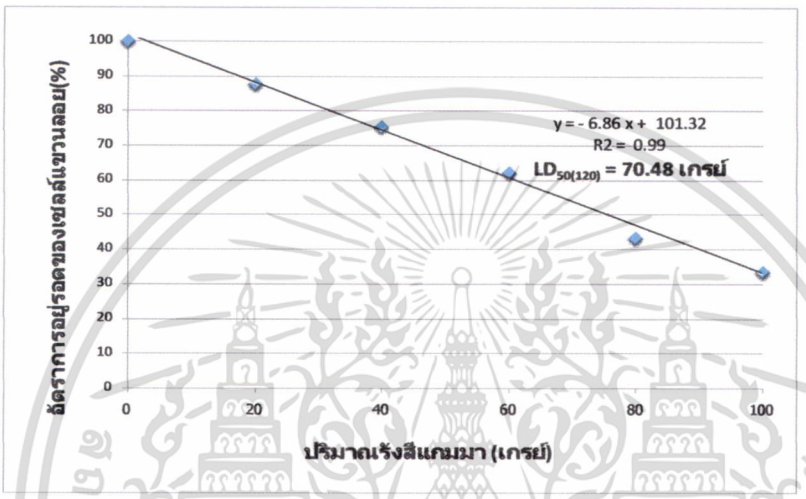
1/ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3.1.3 ผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการพัฒนาของแคลลัสจากเซลล์แขวนลอย

จากการนำแคลลัสที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์ อายุ 4 สัปดาห์ไปฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสีต่างๆ แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 สัปดาห์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 7) โดยแคลลัสที่ไม่สามารถอยู่รอดได้ จะเปลี่ยนเป็นสีดำและตายในที่สุด (ภาพที่ 11 ค) ผลดังกล่าวนี้อาจเกิดจากที่รังสีได้สร้างความเสียหายให้กับโครโมโซมและองค์ประกอบอื่นๆ ในไซโตพลาสซึม ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ (Gual, 1977) การทดลองนี้พบว่าปริมาณรังสีที่ทำให้แคลลัสของหญ้าไนล์ตายเป็นจำนวน 50 เปอร์เซ็นต์ ($LD_{50(140)}$) มีค่าเท่ากับ 70.48 เกรย์ (ภาพที่ 10) ค่า LD_{50} ที่ได้จากการทดลองนี้มีค่าค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับหญ้าชนิดอื่นเช่น แคลลัสของหญ้าเนเปียร์แดระมีค่า LD_{50} เท่ากับ 10.6 เกรย์ (จันทกานต์, 2544) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากปริมาณรังสีที่มีผลทำให้พืชมีอัตราการตายเป็นจำนวน 50 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น ขนาดของนิวเคลียส จำนวนและขนาดของโครโมโซม ปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดต่อเซลล์ เป็นต้น (Sparrow และคณะ 1963) นอกจากนี้ยังพบว่าการพัฒนาเป็นต้นของแคลลัสของหญ้าไนล์จะลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้นเช่นกัน (ตารางที่ 7) (ภาพที่ 11 ง) ส่วนจำนวนยอดทั้งหมดจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น โดยแคลลัสที่ได้รับรังสีปริมาณ 80 เกรย์ จะสามารถพัฒนาเกิดยอดได้จำนวนมากที่สุด บางรายงานกล่าวว่ารังสีที่ปริมาณต่ำๆ จะช่วยในการพัฒนาเป็นยอดจากชิ้นส่วนพืชหรือแคลลัสดีขึ้น แต่การทดลองนี้ ปริมาณรังสีที่สูงถึง 80 เกรย์ สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเกิดยอดได้จำนวนมากที่สุด อาจมีสาเหตุเนื่องจากรังสีมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินและเอนไซม์ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกี่ยวข้องกับการสร้างยอดภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อ (Pandey และคณะ 1978) โดยต้นที่พัฒนามาจากแคลลัสที่รอดชีวิตจากการฉายรังสีแกมมานี้ สามารถพบความแปรปรวนในลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ต้นเตี้ยแคระแกร็น (ภาพที่ 11 ก) และต้นที่มีใบกว้างกว่าปกติ (ภาพที่ 11 ข) ต้นที่ผิดปกติมากเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปจะตายในที่สุด เนื่องจากเซลล์ที่ได้รับรังสีอาจมีการแบ่งเซลล์ สามารถมีชีวิตอยู่ได้ระยะหนึ่งหลังได้รับรังสีแล้วจึงตาย (อรุณี, 2530)



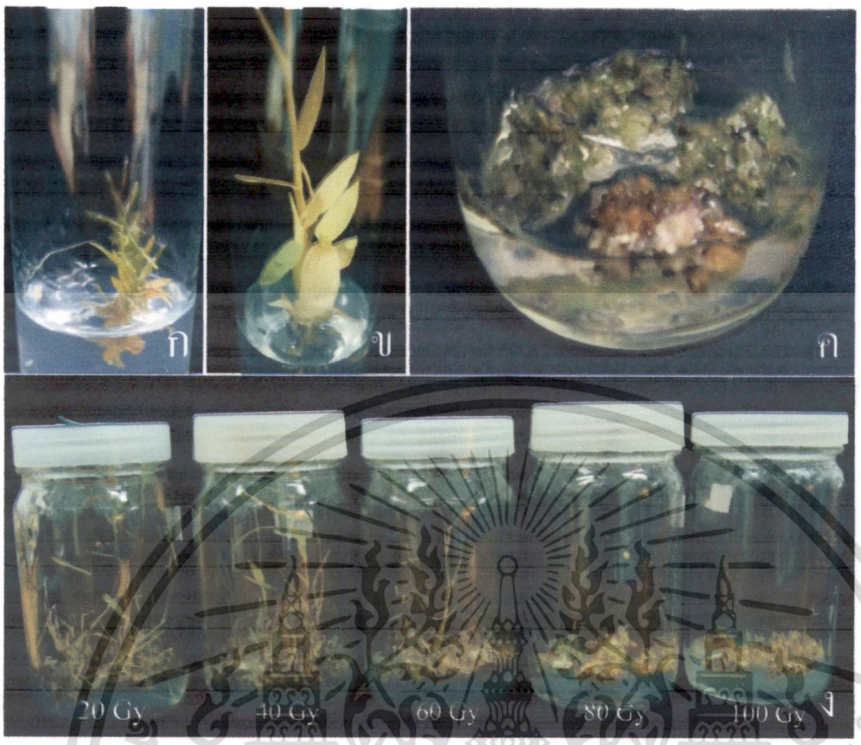
ภาพที่ 10 ผลของรังสีแกมมาต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดและค่า $LD_{50(140)}$ ของแคลลัสที่ 20 สัปดาห์หลังได้รับหลังสีแกมมาที่ปริมาณต่างๆ

ตารางที่ 7 ผลของรังสีแกมมาต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดและการพัฒนาเป็นต้นของแคลลัสที่ 20 สัปดาห์หลังได้รับหลังสีแกมมาที่ปริมาณต่างๆ

ปริมาณรังสี (เกรย์)	จำนวนแคลลัส (ชิ้น)	ความอยู่รอด (%)	การพัฒนาเป็นต้น (%)	จำนวนยอดทั้งหมด	จำนวนยอดต่อแคลลัสที่รอดชีวิต
0	90	100 [a 1/]	75.55 [a]	106	1.55 [d]
20	90	87.77 [b]	65.55 [b]	104	1.75 [c]
40	90	75.55 [c]	58.88 [bc]	101	1.90 [c]
60	90	62.21 [d]	51.10 [cd]	95	2.06 [b]
80	90	43.33 [e]	45.55 [de]	107	2.56 [a]
100	90	35.55 [f]	38.14 [e]	41	1.20 [e]

[1/] ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 11 การพัฒนาของเซลล์แขวนลอยที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณต่าง

ก. ลักษณะต้นเตี้ยแคระแกรนที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ได้รับรังสีปริมาณ 10 เกรย์

ข. ลักษณะต้นที่ใบกว้างกว่าปกติที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ได้รับรังสีปริมาณ 10 เกรย์

ค. เซลล์แขวนลอยที่ไม่สามารถรอดชีวิตจะเปลี่ยนเป็นสีดำและตายในที่สุด

ง. การพัฒนาเป็นต้นของเซลล์แขวนลอยที่ได้รับปริมาณรังสีต่างๆ

4. ผลการคัดเลือกสายพันธุ์หญ้าไนล์ที่มีลักษณะพึงประสงค์

4.1 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของหญ้าไนล์ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ เมื่อออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

จากการนำหญ้าไนล์ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีปริมาณต่างๆ (ภาพที่ 12 ก และ ข) ย้ายออกปลูกในสภาพธรรมชาติเป็นเวลา 45 วัน (ภาพที่ 12 ค) บางต้นมีการออกดอก (ภาพที่ 12 ง) หลังจากทำการตัดหญ้า พบว่าการเจริญเติบโตทั้งในด้านความสูงและขนาดของใบของหญ้าไนล์ที่พัฒนามาจากเซลล์แขวนลอยที่ได้รับรังสีปริมาณต่างๆ กัน คือ 0 20 40 60 80 และ 100 เกรย์ มีแนวโน้มลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น พบว่าความสูงเฉลี่ย ความกว้างและความยาวเฉลี่ยของใบของหญ้าไนล์ ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ได้รับการฉายรังสีแกมมาปริมาณ ต่าง ๆ นั้น มีความแตกต่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทำการวัดขนาด (ภาพที่ 12 จ และ ฉ) ขณะที่ขนาดลำต้นเฉลี่ยจะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ปริมาณรังสีแกมมา 100 เกรย์ นั้นกลุ่มต้นหญ้าจะมีความสูงเฉลี่ยของต้นต่ำที่สุด คือเท่ากับ 37.93 เซนติเมตร ส่วนความยาวของใบนั้นพบว่า ปริมาณรังสีที่ 60 เกรย์ มีความยาวของใบสั้นที่สุด คือเท่ากับ 10.62 เซนติเมตร และความกว้างของใบนั้นพบว่าปริมาณรังสีที่ 80 เกรย์ ความกว้างของใบจะเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับต้นที่พัฒนาจากแคลลัสที่ไม่ได้รับรังสี สอดคล้องกับการทดลองของ ธนภักษ์ (2545) ที่รายงานว่าหญ้าอะตราตัมที่ได้รับปริมาณรังสีเพิ่มขึ้นจะทำให้ค่าเฉลี่ยความสูงของต้นลดลงเช่นกัน และการกลายพันธุ์ในลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาในขนาดของลำต้นได้มีรายงาน เช่น สรายุทธ์ (2551) สามารถคัดเลือกหญ้ากินนีสีม่วงที่พัฒนาจากเมล็ดที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา ที่มีลำต้นขนาดเล็กลง และแตกกอมากกว่าต้นควบคุม

ตารางที่ 8 ผลของรังสีแกมมาต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหญ้าไนล์ที่พัฒนาจากเซลล์

ปริมาณรังสี (เกรย์)	ความสูงต้น (ซม.)	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	ขนาดลำต้น (ซม.)	จำนวนต้นที่บันทึก
0	43.52 ^{ab} 1/	12.88 ^{a}	0.41 ^{b}	0.10 ^{a}	15
20	47.61 ^{a}	12.95 ^{a}	0.40 ^{b}	0.10 ^{a}	15
40	43.94 ^{ab}	12.54 ^{a}	0.43 ^{ab}	0.11 ^{a}	15
60	40.42 ^{bc}	10.62 ^{b}	0.41 ^{b}	0.15 ^{a}	15
80	39.41 ^{bc}	11.57 ^{ab}	0.45 ^{a}	0.10 ^{a}	15
100	37.93 ^{c}	10.82 ^{b}	0.42 ^{b}	0.09 ^{a}	15

แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีปริมาณต่างๆ หลังการปลูก 45 วัน

1/ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากการคัดเลือกลักษณะความแปรปรวนทางสัณฐานวิทยาของต้นหญ้าไนล์ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ได้รับรังสีปริมาณต่างๆ คือ 0 20 40 60 80 และ 100 เกรย์ ตามลำดับ สามารถคัดเลือกลักษณะของ ความสูงของต้น และขนาดของใบ ซึ่งคำนึงถึงการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการนำมาทำหญ้าแห้ง โดยต้นที่มีขนาดลำต้นเล็ก จะสามารถนำมาผลิตหญ้าแห้งได้ดี เนื่องจากนำมาทำแห้งได้ง่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรืออาจมีลักษณะใบเล็กมีระยะห่างระหว่างข้อปล้องน้อยกว่า จะทำให้มีสัดส่วนใบเพิ่มมากขึ้น จากการทดลองสามารถคัดเลือกออกมาได้ 9 โคลน ได้แก่โคลนที่ 0405 0407 0608 0612 0613 0614 0615 0807 และ 1004 และต้นควบคุม (control) คือหญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสี โดยเมื่อนำข้อมูลต่างๆ มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ตัวอย่างทั้ง 9 โคลน มีความสูงเฉลี่ย ขนาดของใบ และขนาดของลำต้น ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 8) โดยโคลนที่ 0613 และ 0614 จะมี ความสูงเฉลี่ย ขนาดของใบ และขนาดของลำต้นต่ำที่สุด (ภาพที่ 12 ช ซ และ ฌ) ส่วนโคลนที่ 0807 จะมีความกว้างของใบและขนาดของลำต้นที่ใหญ่กว่าต้นควบคุม (ตารางที่ 9) (ภาพที่ 12 ช และ ซ)

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยความสูง ขนาดของใบ และขนาดของลำต้นของหญ้าไนล์ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีปริมาณต่างๆ หลังการปลูก 45 วัน

ตัวอย่างที่	โคลน	ความสูงของต้น (ซม.)	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	ขนาดลำต้น (ซม.)
1	Control	45.35^{a} 1/	13.75^{a}	4.26^{cd}	1.196^{ab}
2	0405	34.90^{b}	9.5^{cd}	3.92^{def}	0.90^{b}
3	0407	36.95^{b}	9.15^{d}	3.58^{e}	0.88^{b}
4	0608	35.6^{b}	10.55^{bc}	4.76^{b}	1.06^{bc}
5	0612	38.75^{b}	11^{b}	4.35^{c}	1.05^{c}
6	0613	20.40^{d}	5.35^{f}	3.06^{f}	0.75^{a}
7	0614	28.30^{c}	7.45^{e}	3.78^{ef}	0.75^{a}
8	0615	36.50^{b}	10.30^{bcd}	4.14^{cde}	0.97^{cd}
9	0807	37.45^{b}	11^{b}	5.16^{a}	1.24^{a}
10	1004	29.15^{c}	6.9^{e}	3.81^{ef}	0.92^{cd}

1/ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

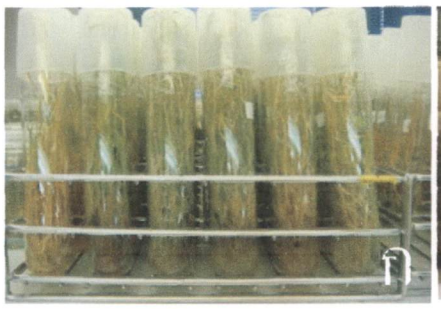
หมายเหตุ

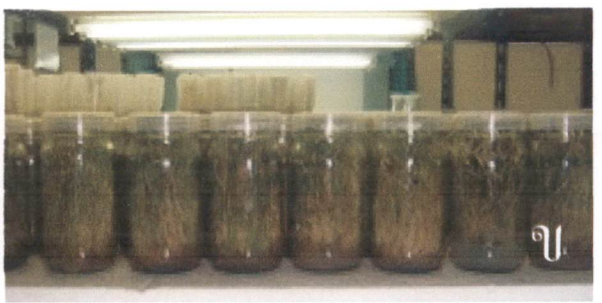
control หญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสี

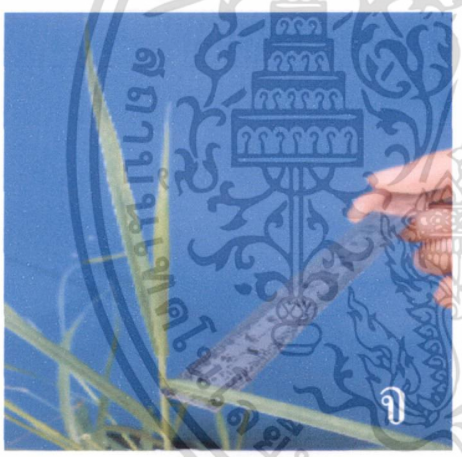
xx-- ตัวเลข 02 04 06 08 10 แทนปริมาณรังสีแกมมา เท่ากับ 20 40 60 80 100 เกรย์ ตามลำดับ

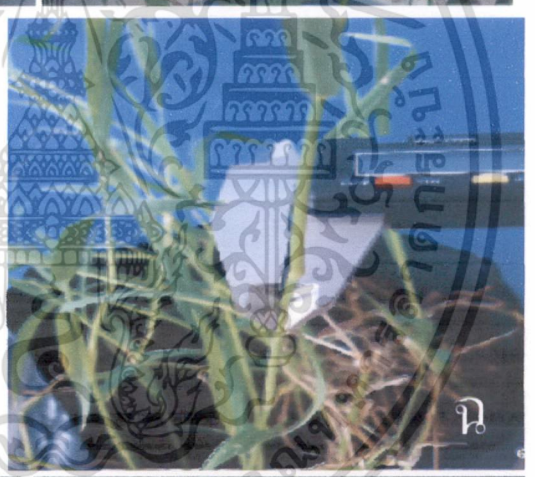
--xx โคลนที่

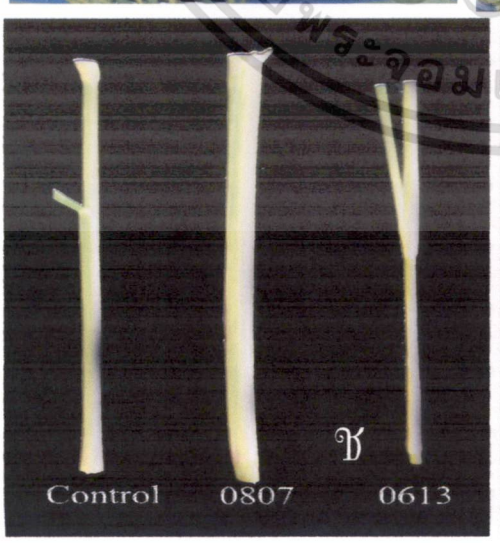
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

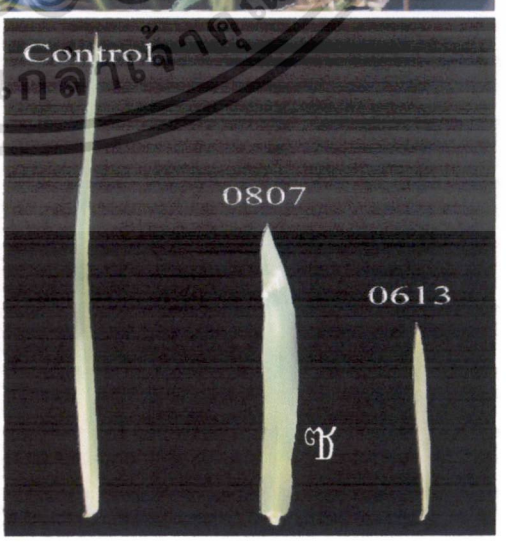




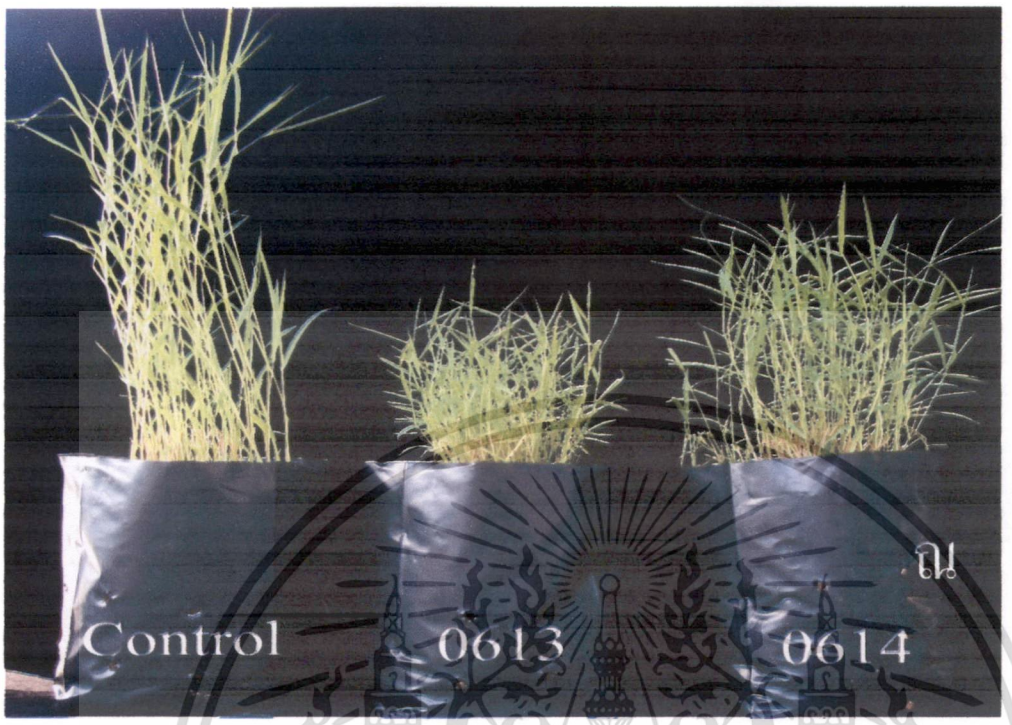








เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 12 ลักษณะหญ้าไนล์ (M_1V_3) ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสี

ก. ต้นหญ้าไนล์ที่เจริญในหลอดทดลองผ่านจากการฉายรังสีระดับต่างๆ อายุ 10-12 สัปดาห์

ข. ต้นหญ้าไนล์ที่เจริญในขวดจากการฉายรังสีระดับต่างๆ อายุ 10-12 สัปดาห์

ค. ลักษณะของของหญ้าไนล์ที่เจริญเติบโตแตกต่างกัน

ง. ลักษณะของดอกหญ้าไนล์

จ. การวัดขนาดของใบ

ฉ. การวัดขนาดลำต้น

ช. ลักษณะของลำต้นที่แตกต่างจากต้นควบคุม

ซ. ลักษณะของใบที่แตกต่างจากต้นควบคุม

ฌ. ลักษณะของความสูงของหญ้าไนล์ต้นควบคุมเทียบกับต้นที่เกิดการกลายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2. ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

เมื่อทำการคัดเลือกโคลนที่มีลักษณะที่แตกต่างไปจากต้นควบคุมที่แยกได้จากการทดลองที่ 4.1 และต้นควบคุมมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่าจากไพร์เมอร์ที่ใช้จำนวน 10 ไพร์เมอร์ มี 8 ไพร์เมอร์ ได้แก่ OPA-01 , OPA-02 , OPA-03 , OPA-04 , OPA-06 , OPA-08 , OPA-09 , OPA10 ที่สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันระหว่างต้นควบคุมและต้นที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสี โดยตัวอย่าง 1 คือ หญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีเป็นต้นควบคุม และตัวอย่างที่ 2-10 คือหญ้าไนล์ที่ผ่านการฉายรังสี (ภาพที่ 13-20)

ภาพที่ 13 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-01

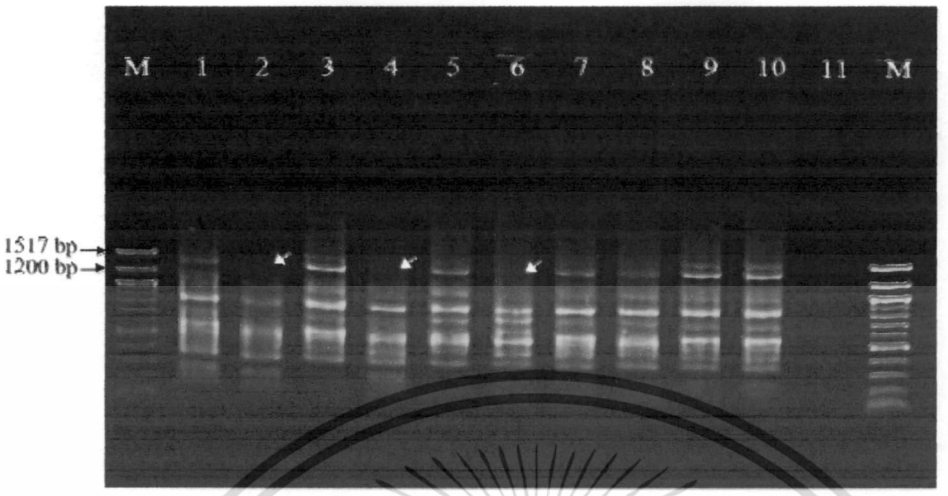
ตัวอย่างที่ 1 ดีเอ็นจากหญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีที่ใช้เป็นต้นควบคุม

ตัวอย่างที่ 2-10 ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ได้รับรังสี

ตัวอย่างที่ 11 ไม่ใส่ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างที่ M ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 14 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-02

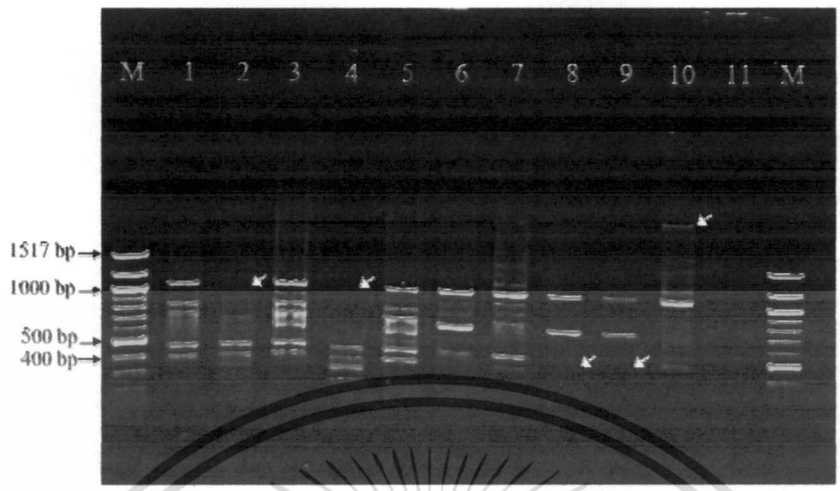
ตัวอย่างที่ 1 ดีเอ็นจากหญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีที่ใช้เป็นต้นควบคุม

ตัวอย่างที่ 2-10 ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ได้รับรังสี

ตัวอย่างที่ 11 ไม่ใส่ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างที่ M ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 15 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-03

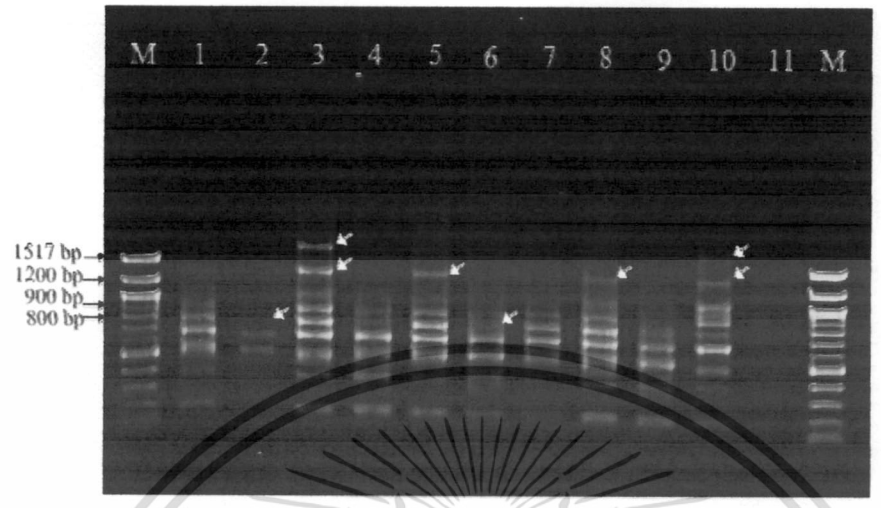
ตัวอย่างที่ 1 ดีเอ็นจากหญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีที่ใช้เป็นต้นควบคุม

ตัวอย่างที่ 2-10 ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ได้รับรังสี

ตัวอย่างที่ 11 ไม่ใส่ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างที่ M ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 16 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-04

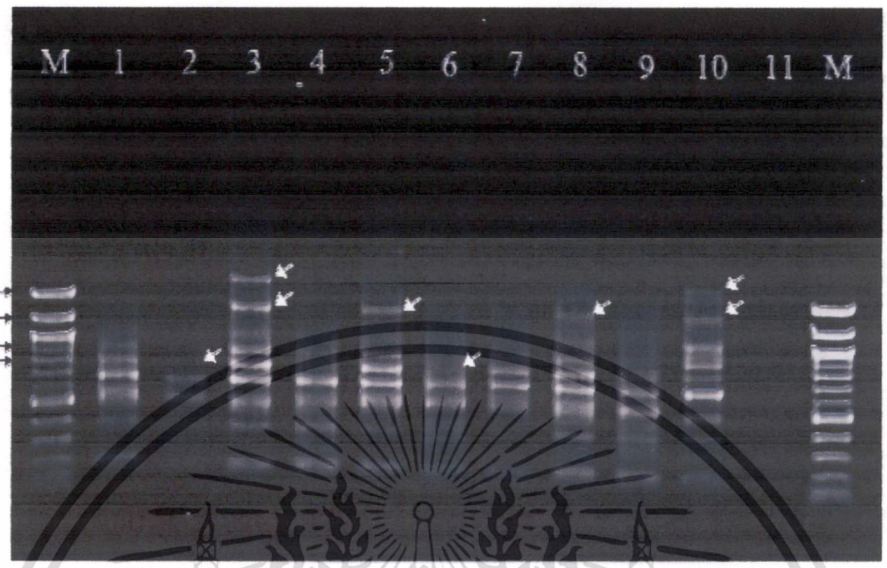
ตัวอย่างที่ 1 ดีเอ็นจากหญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีที่ใช้เป็นต้นควบคุม

ตัวอย่างที่ 2-10 ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ได้รับรังสี

ตัวอย่างที่ 11 ไม่ใส่ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างที่ M ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 17 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-06

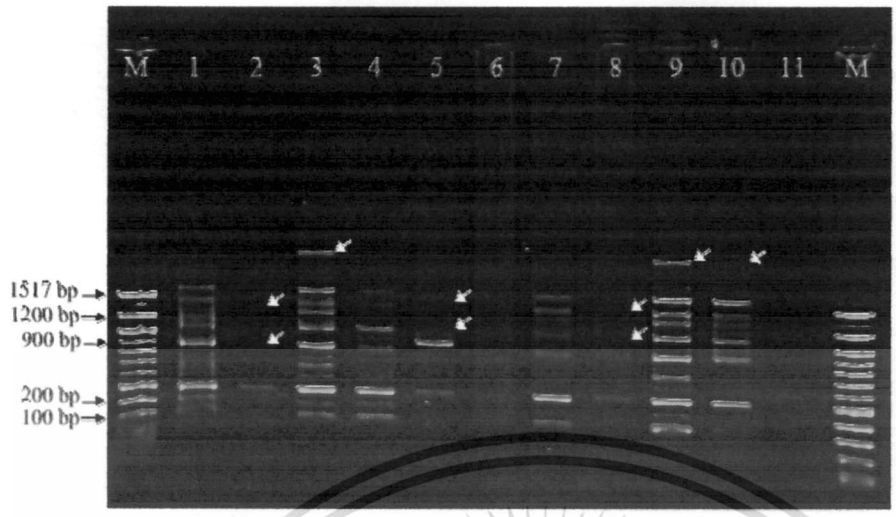
ตัวอย่างที่ 1 ดีเอ็นจากหญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีที่ใช้เป็นต้นควบคุม

ตัวอย่างที่ 2-10 ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ได้รับรังสี

ตัวอย่างที่ 11 ไม่ใส่ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างที่ M ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 18 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-08

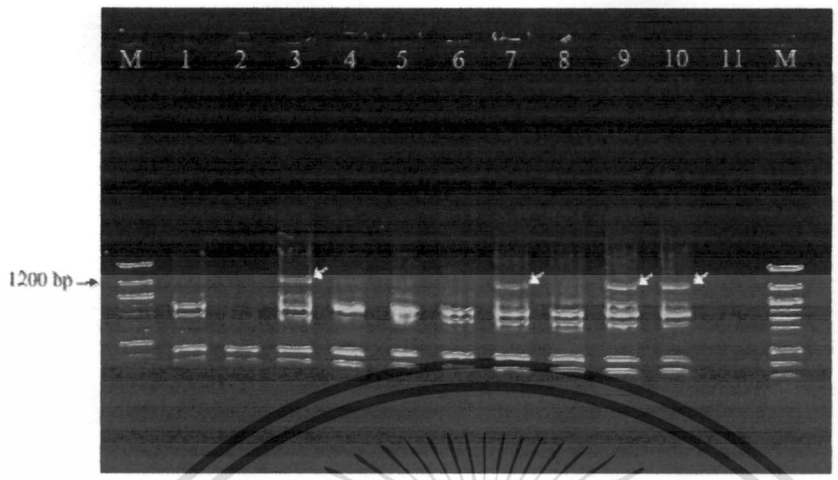
ตัวอย่างที่ 1 ดีเอ็นจากหญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีที่ใช้เป็นต้นควบคุม

ตัวอย่างที่ 2-10 ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ได้รับรังสี

ตัวอย่างที่ 11 ไม่ใส่ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างที่ M ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 19 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-09

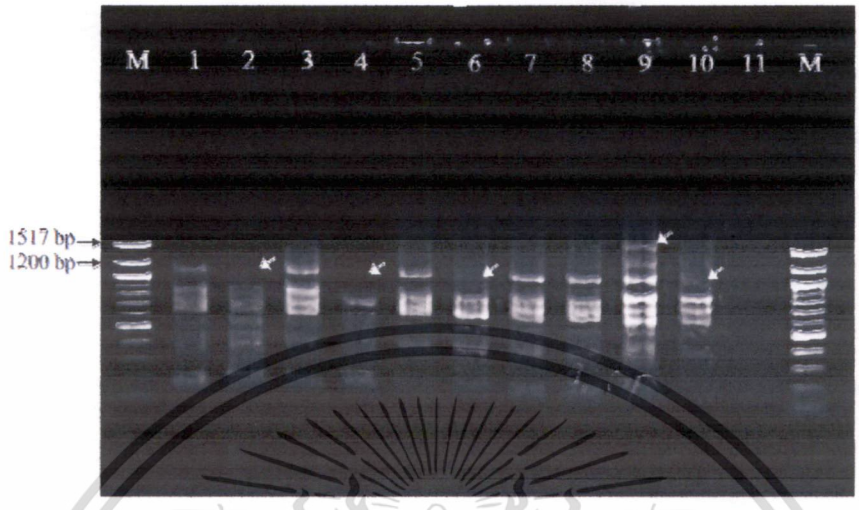
ตัวอย่างที่ 1 ดีเอ็นจากหญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีที่ใช้เป็นต้นควบคุม

ตัวอย่างที่ 2-10 ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ได้รับรังสี

ตัวอย่างที่ 11 ไม่ใส่ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างที่ M ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 20 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-10

ตัวอย่างที่ 1 ดีเอ็นจากหญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีที่ใช้เป็นต้นควบคุม
ตัวอย่างที่ 2-10 ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ได้รับรังสี
ตัวอย่างที่ 11 ไม่ใส่ดีเอ็นเอ
ตัวอย่างที่ M ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

จากภาพที่ 13-20 เป็นภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ 8 ไพร์เมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างหญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีแกมมาที่ใช้เป็นต้นควบคุม (ตัวอย่างที่ 1) และหญ้าไนล์ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ (ตัวอย่างที่ 2-10)

ไพร์เมอร์ OPA-01 (ภาพที่ 13) สามารถแยกความต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ 3 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 2,6 และ 9 โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาด 1000 คู่เบส ขาดหายไป

ไพร์เมอร์ OPA-02 (ภาพที่ 14) สามารถแยกความต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ 3 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 2,4 และ 6 โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1200 คู่เบส ขาดหายไป

ไพร์เมอร์ OPA-03 (ภาพที่ 15) สามารถแยกความต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ 5 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 2,4 โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1000 คู่เบส ขาดหายไป และตัวอย่างที่ 8,9 โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400,500 คู่เบส ขาดหายไป ส่วนในตัวอย่างที่ 10 จะมีแถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่กว่า 1500 คู่เบสเพิ่มขึ้นมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไพร์เมอร์ OPA-04 (ภาพที่ 16) สามารถแยกความต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ 6 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 2,6 โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาด 700,800 คู่เบส ขาดหายไป ส่วนตัวอย่างที่ 3,10 จะมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1200,1500 คู่เบส เพิ่มขึ้นมา และตัวอย่างที่ 5,8 โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1200 คู่เบส เพิ่มขึ้นมา

ไพร์เมอร์ OPA-06 (ภาพที่ 17) สามารถแยกความต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ 6 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 2 โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900,1000,1200,1500 คู่เบส ขาดหายไป และตัวอย่างที่ 5,8 จะมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1000,1200,1500 ขาดหายไป ส่วนตัวอย่างที่ 3,9,10 จะมีแถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่กว่า 1500 คู่เบส เพิ่มขึ้นมา

ไพร์เมอร์ OPA-08 (ภาพที่ 18) สามารถแยกความต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ 4 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 3,7,9,10 โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาด 1200 คู่เบส เพิ่มขึ้นมา

ไพร์เมอร์ OPA-09 (ภาพที่ 19) สามารถแยกความต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ 4 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 2,6,10 โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1000 คู่เบส ขาดหายไป ส่วนตัวอย่างที่ 9 จะมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1500 คู่เบส เพิ่มขึ้นมา

ไพร์เมอร์ OPA-10 (ภาพที่ 20) สามารถแยกความต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ 4 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 2,6,10 โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1000 คู่เบส ขาดหายไป ส่วนตัวอย่างที่ 9 จะมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1500 คู่เบส เพิ่มขึ้นมา

ไพร์เมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างได้สามารถสรุปดังตารางที่ 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 แสดงการจำแนกตัวอย่างของไพร์เมอร์ทั้งหมด

ไพร์เมอร์	ตัวอย่างที่แยกได้	แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น (bp)	แถบดีเอ็นเอที่หายไป (bp)
OPA-01	2		1000
	6		1000
	9		1000
OPA-02	2		ประมาณ 1200
	4		ประมาณ 1200
	6		ประมาณ 1200
OPA-03	2		ประมาณ 1000
	4		ประมาณ 1000
	8		ประมาณ 400,500
	9		ประมาณ 400,500
	10	ขนาดใหญ่กว่า 1500	
OPA-04	2		700,800
	3	ประมาณ 1200,1500	
	5	ประมาณ 1200	
	6		700,800
	8	ประมาณ 1200	
	10	ประมาณ 1200,1500	
OPA-06	2		ประมาณ 900,1000,1200,1500
	3	ขนาดใหญ่กว่า 1500	
	5		ประมาณ 1000,1200,1500
	8		ประมาณ 1000,1200,1500
	9	ขนาดใหญ่กว่า 1500	
	10	ขนาดใหญ่กว่า 1500	
OPA-08	3	1200	
	7	1200	
	9	1200	
	10	1200	
OPA-09	2		ประมาณ 1000
	4		ประมาณ 1000
	6		ประมาณ 1000
	9	ประมาณ 1500	
	10		ประมาณ 1000
OPA-10	3	ประมาณ 1200,1500	
	5	ประมาณ 1200,1500	
	7	ประมาณ 1200,1500	
	9	ประมาณ 1200,1500	
	10	ประมาณ 1200,1500	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 10) พบว่าไพร์เมอร์ทั้ง 8 ตัวนี้สามารถจำแนกความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ได้ทั้ง 9 ตัวอย่าง โดยไพร์เมอร์ที่สามารถจำแนกตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบจากต้นควบคุมได้มากที่สุดคือ ไพร์เมอร์ OPA-04 และ OPA-06 สามารถจำแนกได้ถึง 6 ตัวอย่าง และพบว่าตัวอย่างที่ 2 9 และ 10 มีไพร์เมอร์ที่สามารถนำมาใช้ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้มากที่สุดคือ 6 ไพร์เมอร์ ส่วนตัวอย่างที่ 7 มีไพร์เมอร์ที่สามารถนำมาใช้ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้น้อยที่สุดคือ 2 ไพร์เมอร์(ตารางที่ 10) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของสรายุทธ์ (2551) ที่สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ของหญ้ากินนีสีม่วง ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาที่ 400 เกรย์ โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ 34 ไพรเมอร์ พบว่ามี 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPB2 OPB12 OPF1 และ OPF5 ที่แสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ ดีเอ็นเอระหว่างโคลนที่กลายพันธุ์และต้นควบคุม

ตารางที่ 11 แสดงจำนวนไพร์เมอร์ที่สามารถสามาถตรวจสอบความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างต้นควบคุมกับต้นตัวอย่างได้

ตัวอย่างที่	โคลน	ไพร์เมอร์ที่สามารถตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้
2	0405	OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-06, OPA-09
3	0407	OPA-04, OPA-06, OPA-08, OPA-10
4	0608	OPA-02, OPA-03, OPA-09
5	0612	OPA-04, OPA-06, OPA-10
6	0613	OPA-01, OPA-02, OPA-04, OPA-09
7	0614	OPA-08, OPA-10
8	0615	OPA-03, OPA-04, OPA-06
9	0807	OPA-01, OPA-03, OPA-06, OPA-08, OPA-04, OPA-10
10	1004	OPA-03, OPA-04, OPA-06, OPA-08, OPA-09, OPA-10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนตาข้างของหญ้าไนล์ บนอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีน ไฮโดรคลอไรด์ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลฟา-คีโต กลูตาริก 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร และ BA ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า มีค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดต่อตาข้างมากที่สุด 5.4 ยอดต่อตาข้าง และย้ายต้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากที่สมบูรณ์ และสามารถย้ายออกปลูกในธรรมชาติได้สำเร็จ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนม้วนใบอ่อนและตาข้างบนอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีน ไฮโดรคลอไรด์ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลฟา-คีโต กลูตาริก 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร และ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าส่วนม้วนใบอ่อนและตาข้างสามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้มากที่สุด และการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้มีการพัฒนาเกิดเป็นยอดได้มากที่สุด และสามารถพัฒนาต่อไปเป็นต้นที่มีระบบยอดและรากที่สมบูรณ์ และสามารถย้ายออกปลูกในในธรรมชาติได้สำเร็จ

การชักนำแคลลัสที่ชักนำจากเซลล์แขวนลอยเพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณ 0-100 เกรย์ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน พบว่า โดยปริมาณรังสีที่ทำให้แคลลัสมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) คือ 70.48 เกรย์ จากนั้นย้ายยอดที่พัฒนามาจากแคลลัสที่รอดชีวิตเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS เพื่อชักนำให้เกิดราก แล้วนำย้ายออกปลูกเพื่อศึกษาเป็นเวลา 45 วัน พบว่า สามารถคัดเลือกลักษณะของ ความสูงของต้น และขนาดของใบ ซึ่งคำนึงถึงการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการนำมาทำหญ้าแห้ง โดยต้นที่มีขนาดลำต้นเล็ก จะสามารถนำมาผลิตหญ้าแห้งได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กมลพรรณ นามวงศ์พรหม, มาลี ณ นคร, วงจันทร์ วงศ์แก้วและวีระชัย ณนคร. 2535. "การขยายท่อนพันธุ์แฝกหอมในหลอดทดลอง." หน้า 725-729. ในรายงานการประชุมวิชาการครั้งที่ 30. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จันทกานต์ อรณนันท์. 2544. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าเนเปียร์แคระโดยรังสีแกมมากับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดิริฏา มานะวิบูรย์. 2545. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้ารูซี่โดยรังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธนภักษ์ อินยอด. 2545. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าอะตราตรัมโดยรังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริลักษณ์ สุวรรณจิตร. 2540. การคัดเลือกหญ้าแฝกทนเค็มในสภาพหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สรายุทธ์ ไทยเกื้อ เอนก โตภาคงาม และ จิรวัฒน์ สนิทชน. 2551. การใช้รังสีแกมมาเหนี่ยวนำให้หญ้ากินนีสีม่วงกลายพันธุ์ : การตรวจสอบการกลายพันธุ์จากลักษณะปรากฏและลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. แก่นเกษตร 36 (ฉบับพิเศษ) : หน้า 108-116.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ยาสุชิ มัสสุดะ และ ทัสสุโร มุระตะ 2548 การศึกษาผลของความดันและ ระยะทางจากเครื่องยิงอนุภาคต่อไมโครแคลลัสที่เพาะเลี้ยงจากเซลล์แขวนลอยของหญ้าสายพันธุ์ "ยูคิกิรุชิ" (*Zoysia japonica*) วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ปีที่ 36 ฉบับที่ 5-6 954-957 น.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ศรัณย์ สุขวัฒน์ และ สุวิชา ฮั้งตระกูล. 2549. การเจริญเป็นต้นใหม่ของหญ้ารูซี่ (*Brachiaria ruziziensis*) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 37:909-912.

อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์. 2550. การกลายพันธุ์: เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

Asano, Y. 1989. Somatic embryogenesis and protoplast culture in Japanese lawngrass (*Zoysia japonica*), Plant Cell Rep. 8, 141-143.

Asano, Y., H. Katsumoto, D. Inokuma, S. Kaneko, Y. Ito, A. Fujiie. 1996. Cytokinin and thiamine requirements and stimulative effects of riboflavin and α-ketoglutaric acid on embryogenic callus induction from seeds of Zoysia japonica seed. J. Plant Physiol. 149 : 413-417.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Behrend, J., R.I. Mateles. 1976. Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. II. Role of organic acids during growth on ammonia. Plant Physiol. 58 : 510-512.

Chen, C.S., S.M. Wang and Y.K. Cheng. 1997. Morphological and RAPD variations of regenerant derived from cell suspension culture of pangolagrass. International Grass Congress XVIII, June 8-9, 1997, Saskachewan, Wininpeg, Manitoba and Saskatoon. P.4-15 – 4-16.

Dhandapani, M. Hong, S.B. Aswath, C.R. and Kim, D.H. 2008. Regeneration of *zoysia* grass (*Zoysia matrella* L. Merr.) cv. Konhee from young inflorescences and stem nodes. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 44: 8-13.

Evans, D.A., C. E. Flick, and W. R. Sharp.1981. Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. In: Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture. T. A Thorpe, Ed. Academic Press, NY. p. 45-113

Gaul, H. 1977. Plant Injury and Lethality Manual on Mutation Breeding, 2nd. International Atomic Energy Agency, Vienna

Jeng, B.L. Mei-Chu, L. Shyh-Rong, C. and Su. F.H.H. 2004. Comparison of digestibility and metabolizable energy between nilegrass and pangola grass. Proceedings of the 4th International Crop Science Congress Brisbane, Australia, 26 Sep –1 Oct 2004

Krishnamoorthy, H.N. 1981. Plant Growth Substance. Tata McGraw-Hill Publishing Co., Ltd., New Delhi.

Ketchum, J.L.F., O.L.Gamborg, G.E. Hanning. and N.W. Nabors. 1987. Tissue culture for Crop Project. Dept. Botany, Colorado State Univ.,Fort Collins,Colorado. 87p.

Lajonchere, G., A.R. Mesa, M. Prieto and O. Toral. 1993. Somatic embryogenic and plant regeneration from apical meristems of *Panicum maximum* Jacp. CV. Likoni. PAS. FOR. 16:3201 – 3206.

Li, Y.H., Junping. G. and Shui-zhang, F. 2009. High frequency in vitro embryogenic callus induction and plant regeneration from indiangrass mature caryposis. Scientia Horticulturae. 119 : 306-309.

Linsmaier, E.M. and Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18: 100-127.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lu, S. Wang, Z. Peng, X. Guo, Z. Zhang, G. and Han, L. 2006. An efficient callus suspension culture system for triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* x *C. dactylon*) and somaclonal variations. Plant Cell Tiss Organ Cult. 87: 77-84.

Oliveira, B., Faria ,P.R., Souto, S.M., Carneiro, A.M., Dobereiner, J. and Aronovich, S. 1973. "Identification of tropical grasses with the C4 pathway of photosynthesis from leaf anatomy." Pesquisa Agrope Cuaria Brasileira. 8 : 267-271.

Pandey, K.N., Saharwal, P.S. and Kemp, T.R. 1978. Cell division factor (cytokinins) from irradiated plant tissue. Nature. 271 : 449-450.

Patnaik, J. S.Sahoo. and B.K. Debata. 1997. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cell suspension culture of palmarosa grass (*Cymbopogon martinii*). Plant cell Reports. 16 : 430-468.

Poeaim, A. Matsuda, Y. and Murata, T. 2005. Callus formation and plant regeneration from shoot tip of *Zoysis sp*. Proceedings of the school of agriculture. Kyushu Tokai University. 24: 29-36.

Poeaim, A. Matsuda, Y. Inoue, T. Shigeyasu, T. and Murata, T. 2004. Optimization of callus induction and plant regeneration from seed explants of *Zoysia* sp. J Jpn Soc. Turfgrass Sci. 31: 3-10.

Poeaim, A., O. Chonvanich, and S. Amnuaypanich. 2006. Plant regeneration from somatic embryogenesis in Bermudagrass. International Conference on Applied Science (ICAS-2006) Vientiane, 5-7 November. Loa. 296-300.

Redway, F.A. and V.Vasil. 1990. Identification of callus types for long-term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor. Appl.Genet. 79(5) : 609-617.

Shaug SP, Lo KD and Lin JB. 1999. Effects of cutting stages on forage yield and quality of nilegrass. Taiwan Livestock Res. 32, 219-226.

Sparrow, A.H., Schairer, L.A. and Sparrow, R.C. 1963. Reletionship between nuclear volumes, chromosome number,and relative radio-sensitivities. Science. 141 : 163-166.

Tanpo, H., H. Toyoda and T. Kako. 1997. Callus induction and plant regeneration in Zoysia grass (*Zoysia japonica*) Steud., J. Jpn. Soc. Turfgrass Sci. 23, 27-30..

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yu-Ye W., Qi-Jun C. , Min C. , Jia C. and Xue-Chen W. 2005. Salt-tolerant transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) obtained by Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of the vacuolar Na+/H+ antiporter gene , Plant Science. 169: 65–73.

Taiz, L., and Zeiger, E., 1991, Plant Physiology. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.California.

Vieitez, A.M., A. Ballester, M.L. Vieitez and E. Vieitez. 1983. "In vitro plant regeneration of mature chestnut." J. Hort. Sci. 58 : 457-468.

Wilson, J.R. and Hacker, J.B. 1987. Comparative digestibility and anatomy of some sympatric C_3 and C_4 aridzone grasses. Aust. J. Agric. Res. 38: 287-295.

Zhang, S., Hanna, W. and Ozias-Akins, P. 2007. Comparison of callus induction and plant regeneration from different explants in triploid and tetraploid turf-type bermudagrasses, Plant Cell Tiss Organ Cult 90: 71–78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร LS (Linsmaier และ Skoog, 1965)

Stock	ส่วนประกอบ	Linsmaier และ Skoog (1965) (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เตรียม 1000 มิลลิลิตร (กรัม)
Stock 1	NH_4NO_3	1,650	33
	KNO_3	1,900	38
	$MgSO_4.7H_2O$	370	7.4
	KH_2PO_4	170	3.4
Stock 2	$CaCl_2.2H_2O$	440	44
Stock 3	H_3BO_3	6.2	6.2
	KI	0.83	0.83
	$NaMoO_4.2H_2O$	0.25	0.25
	$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.025
Stock 4	$MnSO_4.4H_2O$	22.3	22.3
	$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	8.6
	$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.025
Stock 5	Na_2EDTA	37.25	3.725
	$FeSO_4.7H_2O$	27.85	2.785
Stock 6	Inositol	100	10
	Thiamine HCL	0.4	0.04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้