สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในไพล

นายสมชาย วรรณชนะ

ปพ.
ส241ก
2536

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....

b12537482

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2536

Induce mutation in *Zingiber purpureum* Rosc.

MR.SOMCHAI WANCHANA

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the
Requirement for the Degree of Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ludkrabang
1993

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในไนล
โดย	นายสมชาย วรรณชนะ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.พวงเพชร พูนทรัพย์
	อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

(อาจารย์อุ่นเรือน ศิริวาณิชกุล) หัวหน้าภาควิชา

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

(ผศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต) ประธานกรรมการ

(ดร.พวงเพชร พูนทรัพย์) กรรมการ

(อาจารย์พนา โลหะทรัพย์ทวี) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในไพล
นักศึกษา	นายสมชาย วรรณชนะ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.พวงเพชร พูนทรัพย์
	อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2536

บทคัดย่อ

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในไพลโดยการแช่ protocorm-like structure ของไพล ในสารละลายโคลชิซินที่มีความเข้มข้น 0 0.1 0.15 และ 0.3 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 2 4 และ 6 ชั่วโมง และโดยการฉายรังสีแกมมา 0 1 3 5 7 และ 9 กิโลแรด บน protocorm-like structure พบว่าการเพิ่มระดับความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารละลายโคลชิซิน และการเพิ่มปริมาณรังสีแกมมา ทำให้อัตรารอดชีวิตของ protocorm-like structure ลดลง และ protocorm-like structure ตายหมดเมื่อได้รับรังสีแกมมา 9 กิโลแรด พบลักษณะที่ผิดปกติในรุ่น M0 M1 และ M2 คือบาง protocorm-like structure จะมีกาบใบหุ้มเป็นสีแดง บางต้นมีขอบใบหยัก ใบสีเหลืองและขอบใบสีเขียว ซึ่งพบใน protocorm-like structure ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมากกว่า protocorm-like structure ที่ได้รับการฉายรังสีแกมมา ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีความสูงและความยาวใบรวมน้อยลง แต่สูงขึ้นในต้นที่ได้รับรังสีแกมมาเมื่อเทียบกับ control ปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อได้รับสารละลายโคลชิซิน 0.1 และ 0.15 เปอร์เซนต์ในรุ่น M0 ส่วน M1 มีแนวโน้มที่มีขนาดปากใบเล็กลง จำนวนปากใบเฉลี่ยต่อพื้นที่จึงเพิ่มขึ้น ส่วนต้น M0 ที่ได้รับผลจากรังสีแกมมามีขนาดของปากใบเล็กลงเมื่อเปรียบเทียบกับ control แต่มีขนาดใหญ่ขึ้นในรุ่น M1 และมีจำนวนปากใบต่อพื้นที่มากขึ้นด้วย

Special Project Title	Induced mutation in *Zingiber purpureum* Rosc.
Name	MR. SOMCHAI WANCHANA
Special Project Advisor	Dr. Poungpet Poonsapaya
	Mr. Anurug Poeaim
Department	Applied Biology
Acadamic Year	1993

Abstract

When protocorm-like structures of *Zingiber purpureum* Rosc. were treated in 0, 0.1,0.15 and 0.3 percent colchicine for 2, 4 and 6 hours, and treated with gamma-ray at 1, 3, 5, 7 and 9 KRad the survival rate decreased compared to the control and all protocorm-like structures died when treated with 9 KRad. Abnormal characteristics such as red leaf sheath, broader leaves, variegated leaves, wrinkle leaf-edge, yellow leaves with green edge were found in M0, M1 and M2. Plant height and total leaf length decreased in protocorm-like structures treated with colchicine but increased in those treated with gamma-ray compared to the control. The stomatal size increased in M0 treated with 0.1 and 0.15 percent colchicine but decreased in M1, which gave rise to more number of stomata per leaf area. M0 treated with gamma-ray had smaller stomata compared to the control but increased in size in M1 with increased in number of stomata per leaf area.

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษ "การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในไพล" สามารถสำเร็จลุล่วงได้ผลดี โดยได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลดังรายนามต่อไปนี้

1. ดร.พวงเพชร พูนทรัพย์ นักวิจัย สถาบันวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม ที่ได้เสียสละเวลากรุณาเป็นที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ให้ความรู้แนวความคิด ให้คำปรึกษาปัญหาต่างๆ และเอกสารประกอบโครงงานพิเศษ กรุณาช่วยในงานออกแบบวางแผนการทดลอง คอยดูแลในการดำเนินขั้นต่างๆ ของการทดลอง และสอนเทคนิคต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง โดยเฉพาะเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สอนวิธีใช้อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ช่วยอำนวยความสะดวกในเรื่องสถานที่ทำการทดลอง ตลอดจนการเดินทางไปฉายรังสีแกมมาที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ช่วยในการวิเคราะห์ผลการทดลองและข้อมูลทางสถิติ ตลอดจนเสียสละเวลาในการอ่านและตรวจทาน แก้ไขโครงงานพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณมากเกินกว่าจะพรรณาได้ที่ ดร.พวงเพชร พูนทรัพย์ ได้ทำการอบรมสั่งสอนแก่ข้าพเจ้าไม่ว่าในเรื่องวิชาการ หรือ มารยาททางสังคม ซึ่งเป็นผลให้ข้าพเจ้าได้มีการพัฒนาความคิดและบุคลิกภาพที่ดีขึ้น

2. อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ที่ได้เสียสละเวลากรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษร่วม ซึ่งช่วยอำนวยความสะดวกต่างๆ และประสานงานทางภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ช่วยในการจัดเตรียมอุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆ ให้ความรู้และเอกสารประกอบโครงงานพิเศษ อันเป็นประโยชน์ต่อการจัดทำโครงงานพิเศษ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณในความกรุณาของอาจารย์เป็นอย่างสูง

3. นักวิจัย ผู้ช่วยนักวิจัย และเจ้าหน้าที่ สถาบันวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม ที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวก ในการจัดหาอุปกรณ์และสารเคมีตลอดการดำเนินการทดลอง จนสามารถบรรลุตามวัตถุประสงค์ได้

4. นางสาวสมหญิง จิตตนูนท์ และน้องๆ ชมรมอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสภาพแวดล้อม ที่ช่วยในการจัดพิมพ์ต้นฉบับของโครงงานพิเศษนี้

สมชาย วรรณชนะ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	4
การกลายพันธุ์	4
สาเหตุที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์	9
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	14
ชนิดของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	14
สูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	15
พัฒนาการของเนื่อเยื่อที่เพาะเลี้ยง	20
ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	21
ไพล	24
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	27
การเตรียมพืชทดลอง	28
การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลายโคลชิซิน	30
การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการฉายรังสีแกมมา	30
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	32
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	64
ภาคผนวก	65
เอกสารอ้างอิง	68

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Linsmaier and Skoog 66

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 การเกิดทอโทเมอไรเซชัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคู่เบสจาก GC ไปเป็น AT 5

รูปที่ 2 การเปลี่ยนคู่ของเบสแบบทรานสเวอร์ชัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคู่เบส C-G ไปเป็น A-T ในโมเลกุล DNA สายใหม่ 6

รูปที่ 3 ลักษณะผลของต้นดอกลำโพงที่เป็นดิพลอยด์ และพวกที่เป็นไตรโซมิกทั้ง 12 โครโมโซม 8

รูปที่ 4 การพัฒนาของเซลล์เป็น embryoid 21

รูปที่ 5 protocorm-like structure ของไพล 29

รูปที่ 6 อัตรารอดชีวิตของ protocorm-like structure (เปอร์เซนต์เทียบกับ control) หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน 0 0.1 0.15 และ 0.3 เปอร์-เซนต์เปรียบเทียบกับ protocorm-like structure ที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน (control) แล้ว เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 33

รูปที่ 7 การเจริญของ protocorm-like structure หลังจากที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 0 0.1 0.15 0.3 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ protocorm-like structure ที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน (control) แล้ว เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 34

หน้า

รูปที่ 8 อัตรารอดชีวิตของ protocorm-like structure (เปอร์เซนต์เทียบกับ control) สายพันธุ์ P30103 (a) P30201 (b) และ P30801 (c) หลังจากได้รับสารละลายโคลชิชิน 0 0.1 0.15 0.3 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 2 4 และ 6 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ protocorm-like structure ที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิชิน (control) แล้ว เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 35

รูปที่ 9 อัตรารอดชีวิตของ protocorm-like structure (เปอร์เซนต์เทียบกับ control) หลังจากได้รับการฉายรังสีแกมมา 1 3 5 7 และ 9 กิโลแรด เปรียบเทียบกับ protocorm-like structure ที่ไม่ได้รับการฉายรังสีแล้ว เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 36

รูปที่ 10 การเจริญของ protocorm-like structure หลังหลังจากได้รับการฉาย รังสีแกมมา 1 3 5 7 และ 9 กิโลแรด เปรียบเทียบกับ protocorm-like structure ที่ไม่ได้รับการฉายรังสีแล้วเป็นเวลา 4 สัปดาห์ 37

รูปที่ 11 การแตกหน่อของ protocorm-like structure (จำนวน protocorm-like structure เฉลี่ยต่อสายพันธุ์) ของรุ่น M0 สายพันธุ์ P30103 (a) P30201 (b) และ P30801 (c) หลังจากได้รับสารละลายโคลชิชิน 0 0.1 0.15 และ 0.3 เปอร์เซนต์ นาน (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมงแล้วเป็นเวลา 4 สัปดาห์ 38

หน้า

รูปที่ 12 การแตกหน่อของ protocorm-like structure (จำนวน protocorm-like structure เฉลี่ยต่อสายพันธุ์) ของรุ่น M1 สายพันธุ์ P30103 (a) P30201 (b) และ P30801 (c) หลังจากได้รับสารละลายโคลชิชิน 0 0.1 0.15 และ 0.3 เปอร์เซนต์ นาน (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมงแล้วเป็นเวลา 4 สัปดาห์ 40

รูปที่ 13 การแตกหน่อของ protocorm-like structure (จำนวน protocorm-like structure เฉลี่ยต่อสายพันธุ์) ของรุ่น M0 สายพันธุ์ P30103 (a) P30201 (b) และ P30801 (c) หลังจากได้รับสารละลายโคลชิชิน 0 0.1 0.15 และ 0.3 เปอร์เซนต์ นาน (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมงแล้วเป็นเวลา 8 สัปดาห์ 41

รูปที่ 14 การแตกหน่อของ protocorm-like structure (จำนวน protocorm-like structure เฉลี่ยต่อสายพันธุ์) ของรุ่น M1 สายพันธุ์ P30103 (a) P30201 (b) และ P30801 (c) หลังจากได้รับสารละลายโคลชิชิน 0 0.1 0.15 และ 0.3 เปอร์เซนต์ นาน (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมงแล้วเป็นเวลา 8 สัปดาห์ 42

รูปที่ 15 การแตกหน่อของ protocorm-like structure (จำนวน protocorm-like structure เฉลี่ยต่อสายพันธุ์) ของรุ่น M0 สายพันธุ์ P30103 P30201 P30801 P30802 หลังจากได้รับการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 1 กิโลแรด เปรียบเทียบกับ protocorm-like structure ที่ได้รับการฉายรังสี 0 กิโลแรด แล้วเป็นเวลา (a)4 และ (b)8 สัปดาห์ 43

หน้า

รูปที่ 16 การแตกหน่อของ protocorm-like structure (จำนวน protocorm-like structure เฉลี่ยต่อสายพันธุ์) ของรุ่น M0 และ M1 สายพันธุ์ P30201 และ P30801 หลังจากได้รับการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 1 กิโลแรด แล้ว เป็นเวลา (a)4 และ (b)8 สัปดาห์ 44

รูปที่ 17 ลักษณะของใบที่ผิดปกติ (a) กาบใบสีแดง (b) ขอบใบหยัก 46

รูปที่ 18 ลักษณะของใบที่ผิดปกติ (a) ใบด่าง (b) ใบสีเหลืองมีขอบใบเขียวและใบมีเส้นใบชัดเจน 47

รูปที่ 19 ความสูงเฉลี่ยของต้นไพล ในรุ่น M0 และ M1 หลังจากได้รับสารละลายโคลชิชิน 0 0.1 0.15 0.3 เปอร์เซนต์ นาน (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมง แล้ว 8 สัปดาห์ 48

รูปที่ 20 ความยาวใบรวมเฉลี่ยของต้นไพล ในรุ่น M0 และ M1 หลังจากได้รับสารละลายโคลชิชิน 0 0.1 0.15 0.3 เปอร์เซนต์ นาน (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมง แล้ว 8 สัปดาห์ 50

รูปที่ 21 ความสูงเฉลี่ย และความยาวใบรวมเฉลี่ยของต้นไพลในรุ่น M0 และ M1 หลังจากได้รับการฉายรังแกมมา 0 และ 1 กิโลแรด แล้ว 8 สัปดาห์ 51

รูปที่ 22 ลักษณะปากใบที่พบในต้นไพล 52

รูปที่ 23 ความยาวเฉลี่ยปากใบของไพลรุ่น M0 หลังจากได้รับสารละลายโคลชิชิน 0 0.1 0.15 0.3 เปอร์เซนต์ (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมง แล้ว 8 สัปดาห์ 53

รูปที่ 24 ความกว้างเฉลี่ยของปากใบของไพลรุ่น M0 หลังจากได้รับสารละลายโคลชิชิน 0 0.1 0.15 0.3 เปอร์เซนต์ (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมง แล้ว 8 สัปดาห์ 54

หน้า

รูปที่ 25 จำนวนปากใบเฉลี่ยต่อตารางเซนติเมตร ของใบไพล รุ่น M0 หลังจากได้รับสารละลายโคลชิชิน 0 0.1 0.15 0.3 เปอร์เซนต์ (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมง แล้ว 8 สัปดาห์ 56

รูปที่ 26 ความยาวเฉลี่ยปากใบของไพลรุ่น M1 ที่เจริญจากรุ่น M0 หลังจากได้รับสารละลายโคลชิชิน 0 0.1 0.15 0.3 เปอร์เซนต์ (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมง แล้ว 8 สัปดาห์ 57

รูปที่ 27 ความกว้างเฉลี่ยปากใบของไพลรุ่น M1 ที่เจริญจากรุ่น M0 หลังจากได้รับสารละลายโคลชิชิน 0 0.1 0.15 0.3 เปอร์เซนต์ (a)2 (b)4 และ (c) 6 ชั่วโมง แล้ว 8 สัปดาห์ 58

รูปที่ 28 จำนวนปากใบเฉลี่ยต่อตารางเซนติเมตร ของใบไพล ของรุ่น M1 ที่เจริญจากรุ่น M0 หลังจากได้รับสาร-ละลายโคลชิชิน 0 0.1 0.15 0.3 เปอร์เซนต์ (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมง แล้ว 8 สัปดาห์ 59

รูปที่ 29 จำนวนปากใบเฉลี่ยต่อตารางเซนติเมตรของใบ (a) ความกว้างเฉลี่ยของปากใบ (b) และความยาวเฉลี่ยของปากใบ (c) ของรุ่น M0 หลังจากได้รับการฉายรังสีแกมมา 0 และ 1 กิโลแรด แล้ว 8 สัปดาห์ 60

รูปที่ 30 จำนวนปากใบเฉลี่ยต่อตารางเซนติเมตรของใบ (a) ความกว้างเฉลี่ยของปากใบ (b) และความยาวเฉลี่ยของปากใบ (c) ของรุ่น M1 ที่เจริญจาก M0 หลังจากได้รับการฉายรังสีแกมมา 0 และ 1 กิโลแรด แล้ว 8 สัปดาห์ 61

รูปที่ 31 โครโมโซมของไพล 62

บทที่ 1

บทนำ

ไพล (*Zingiber purpureum* Rosc.) เป็นพืชสมุนไพรที่คนไทยรู้จักกันมานาน ลำต้นเป็นเหง้าอยู่ใต้ดิน เป็นพืชล้มลุกใบเลี้ยงเดี่ยว ใช้ทำเป็นยา เช่น ยาแก้ท้องผูก ยาแก้ปวดท้อง ท้องอืดท้องเฟ้อ จุกเสียด ใช้น้ำมันไพลทาแก้ปวดบวม ปัจจุบันมีการนำเหง้าไพลมาสกัดน้ำมันหอมระเหย (volatile oils) เพื่อผสมในตำรับยา โดยมีชื่อทางการค้าว่า ไพลจีซาล (Plygesal) ยาชนิดนี้มีสรรพคุณบรรเทาอาการปวดเมื่อย ปวดบวม จากกล้ามเนื้ออักเสบ เคล็ดยอกฟกช้ำ เนื่องจากไพลที่เกษตรกรปลูกให้ปริมาณน้ำมันไพลต่ำ และมีความแปรปรวนในคุณภาพ ทำให้คุณภาพไม่ได้ตามมาตรฐาน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์ที่ใช้ปลูกให้น้ำมันไพลที่ไม่ได้มาตรฐาน หรือเนื่องจากวิธีการปลูกหรือเก็บเหง้าที่ไม่เหมาะสม การคัดเลือกพันธุ์ไพลเพื่อให้ได้พันธุ์ที่ให้น้ำมันไพลสูง หรือมีคุณภาพดีขึ้น จะเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยแก้ปัญหาการขาดแคลนน้ำมันไพลได้ การคัดเลือกพันธุ์ไพลที่สะดวกและรวดเร็ว สามารถทำได้โดยการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยการแช่ในสารละลายโคลชิซิน ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ ทำให้ได้ต้นพืชที่เป็นโพลีพลอยด์ (polyploid) ต้นที่เป็นโพลี-พลอยด์ ส่วนใหญ่จะเจริญเป็นต้นที่มีขนาดใหญ่กว่าปกติ และให้สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) มากกว่าปกติ และการฉายรังสีแกมมา ซึ่งทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซม ทำให้ได้ต้นไพลที่มีความแตกต่างเกิดขึ้นมากมาย หลังจากเกิดการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แล้ว อาจได้ต้นไพลที่ให้ผลผลิตของน้ำมันไพลสูงขึ้น และคุณภาพดีขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในไพล โดยใช้สารละลายโคลชิชินที่ความเข้มข้น และระยะเวลาในการแช่ต่างกัน

2. เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในไพล โดยใช้รังสีแกมมาที่มีความแรงของรังสีต่างกัน

ขอบเขตของปัญหาพิเศษ

เพิ่มจำนวน protocorm-like structure ของไพลในสูตรอาหารที่เหมาะสมแล้วชักนำให้ protocorm-like structure เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลายโคลชิชิน และรังสีแกมมา และศึกษาลักษณะทางสันฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปจากต้นปกติ

ขั้นตอนในการดำเนินงาน

การดำเนินงานแบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

1. ย้ายเนื้อเยื่อของไพล เพื่อเพิ่มจำนวน protocorm-like structure ในสภาพปลอดเชื้อ

2. ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน protocorm-like structure โดยใช้สารละลายโคลชิชินที่มีความเข้มข้น และระยะเวลาในการแช่แตกต่างกัน และใช้รังสีแกมมาที่มีความแรงของรังสีแตกต่างกัน

3. เลี้ยง protocorm-like structure ของไพล ที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อตรวจสอบผลการเกิดการกลายพันธุ์ในรุ่นแม่และรุ่นลูก

4. ตรวจการกลายพันธุ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เรียนรู้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ตลอดจนการคัดเลือกพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ

2. ได้ต้นไพลที่เป็นโพลีพลอยด์ ซึ่งเมื่อนำไปปลูกลงดินแล้ว อาจให้ปริมาณน้ำมันไพลสูงขึ้น และมีคุณภาพดีกว่าต้นปกติที่ไม่ใช่โพลีพลอยด์

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

การกลายพันธุ์ (mutation)

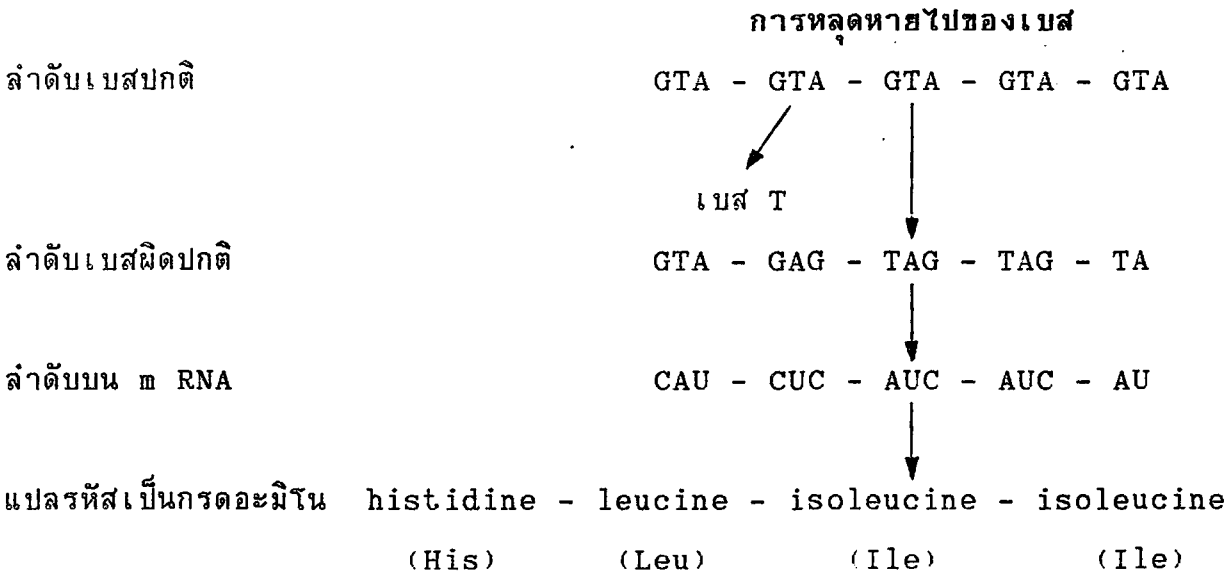
การกลายพันธุ์ คือ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมในเซลล์ การกลายพันธุ์อาจเกี่ยวข้องกับ การสูญหายไปของส่วนของยีน หรือโครงสร้างภายในยีน หรือโมเลกุลของดีเอ็นเอเรียกว่า ยีนมิวเตชัน (gene mutation) หรือพอยต์มิวเตชัน (point mutation) ส่วนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง หรือส่วนประกอบของโครโมโซม หรือจำนวนโครโมโซมในรูปแบบต่างๆกันและสามารถตรวจสอบได้จากกล้องจุลทรรศน์ เรียกว่า โครโมโซมัลมิวเตชัน (chromosomal mutation) (วิสุทธิ์, 2536)

การกลายพันธุ์ของยีน (gene mutation) (สิรนุช, 2536)

การกลายพันธุ์ของยีน เป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของยีนที่เกี่ยวข้องกับนิวคลีโอไทด์เบสเพียงไม่กี่โมเลกุล หรืออย่างน้อยที่สุด 1 โมเลกุล จากจำนวนทั้งหมดประมาณ 10^3-10^5 นิวคลีโอไทด์ การกลายพันธุ์ของยีนแบ่งตามการเกิดได้ 2 ชนิด คือ

1. **การกลายพันธุ์แบบเฟรมชีพ (frameshift mutation)**

การสังเคราะห์โปรตีนแต่ละโมเลกุลเกิดการอ่านรหัสเบส 3 โมเลกุล การเพิ่มหรือการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์จากโมเลกุล DNA เพียง 1 โมเลกุล จะทำให้สร้างโปรตีนได้ผิดไป ดังตัวอย่าง



การเพิ่มเข้ามาของเบส

ลำดับเบสปกติ GTA - GTA - GTA - GTA - GTA

เบส T

ลำดับเบสผิดปกติ GTA - GTT - AGT - AGT - AGT - A

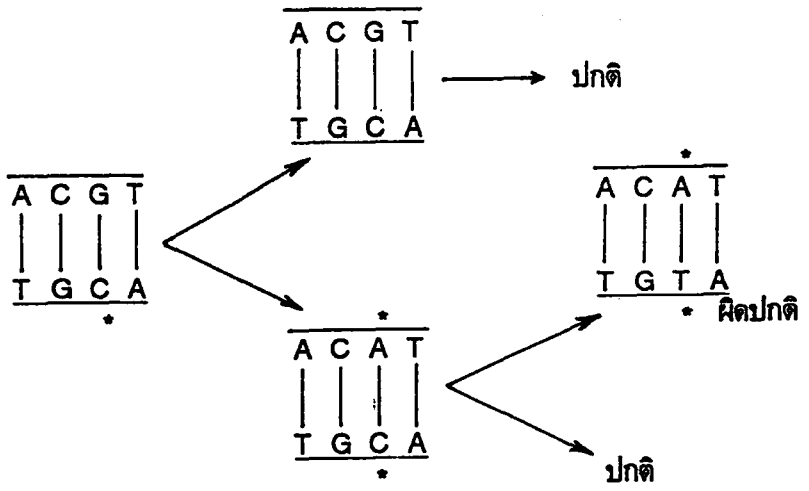
ลำดับบน m RNA CAU - CAA - UCA - UCA - UCA - U

แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน histidine - glutamine - serine - serine - seri

(His) (Gln) (Ser) (Ser) (Se

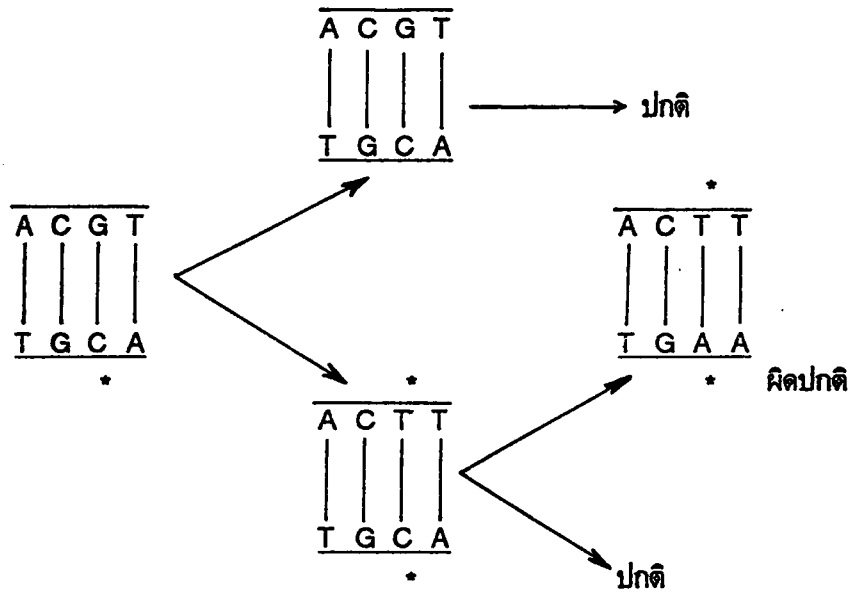
2. เบสชับสติติวชัน (base substitution)

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากการแทนคู่เบส มีการเข้าแทนที่คู่เบสด้วยเบสอื่นในกลุ่มเดียวกันเรียกว่า ทรานชิชัน (transition) เช่น กลุ่มเบสพิวริน (purine) มีเบสอะดินิน (adenine,A) เข้าแทนที่เบสกัวนิน (guanine,G) หรือกลับกันและในกลุ่มของเบสไพริมิดิน (pyrimidine) มีไซโตซิน (cytosine,C) เข้าแทนที่ไทมิน (thymine,T) หรือกลับกัน ตัวอย่างเช่น โมเลกุลของไซโตซิน ซึ่งอยู่ในรูปหมู่อะมิโน ($-NH_2$) มีการเคลื่อนย้ายของไฮโดรเจนอะตอม ทำให้โมเลกุลอยู่ในรูปอิมิโน (=NH) ซึ่งเป็นรูปที่ผิดปกติเรียกว่า ทอโทเมอไรเซชั่น (tautomerization) ปกติไซโตซินจะจับคู่กับกัวนิน แต่เนื่องจากรูปที่ผิดไปทำให้ไซโตซินจับคู่กับอะดินีนแทน ซึ่งทำให้การอ่านรหัสของเบสเปลี่ยนไปด้วย (รูปที่1)



รูปที่ 1 การเกิดทอโทเมอไรเซชัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคู่เบสจาก GC ไปเป็น AT

การเปลี่ยนแปลงอีกรูปหนึ่ง คือ การเปลี่ยนแปลงสลับคู่เบสคนละกลุ่ม เรียกว่า ทรานสเวอร์ชัน (transversion) เช่น มีการเข้าแทนที่คู่ของเบสพิวรินด้วยไพริมิดิน หรือเบสไพริมิดินด้วยเบสพิวริน (AT⇌CG , CG⇌GC , GC⇌TA , AT⇌TA) (รูปที่2)



รูปที่ 2 การเปลี่ยนคู่ของเบสแบบทรานสเวอร์ชัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากคู่เบส C-G ไปเป็น A-T ในโมเลกุล DNA สายใหม่

การกลายพันธุ์ของโครโมโซม

คือ การเปลี่ยนแปลงจำนวนหรือโครงสร้างของโครโมโซม แบ่งเป็น 2 ชนิด

1. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม (changes in the structure of chromosome) (วิสุทธิ์, 2536)

1.1 ดีลีชันหรือดีฟีเชียนซี (deletion, deficiency) คือ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากส่วนหนึ่งส่วนใดของโครโมโซมขาดหายไป

1.2 ดิวพลิเคชัน (duplication) คือ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการมียีนหรือส่วนของโครโมโซมเพิ่มขึ้นมามากกว่าปกติ

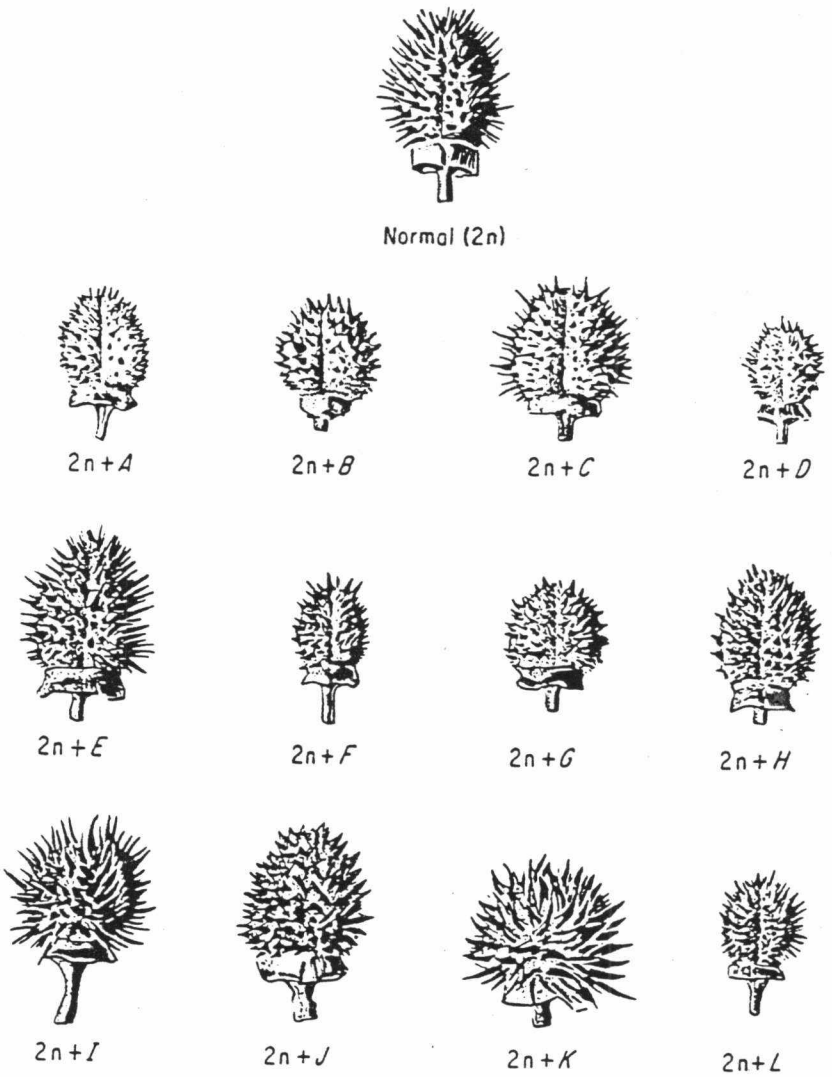
1.3 อินเวอร์ชัน (inversion) คือ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการเปลี่ยนทิศของส่วนของโครโมโซม

1.4 ทรานสโลเคชัน (translocation) คือ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการย้ายสลับที่ระหว่างส่วนของโครโมโซมต่างคู่กัน

2. การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม (สิรนุช, 2536)

ปกติพืชมีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ (diploid=2n) เป็นลักษณะจำเพาะและคงที่สำหรับพืชชนิดหนึ่งๆ แต่พืชอาจมีจำนวนโครโมโซมมากกว่าปกติ สาเหตุเกิดจากความผิดปกติในกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) โดยที่โครโมโซมที่เป็นคู่กันคู่ใดคู่หนึ่งไม่แยกจากกันเรียกว่า นอนดิสจังชัน (nondisjunction) หรืออาจเกิดจากการยับยั้งการเคลื่อนที่ของโครโมโซมไปยังขั้วของเซลล์ ในระยะแอนนาเฟส (anaphase) ทำให้เซลล์สืบพันธุ์บางเซลล์มีจำนวนโครโมโซมมากกว่าปกติ และในบางเซลล์มีจำนวนโครโมโซมน้อยลงกว่าปกติ เมื่อมีการผสมพันธุ์กันระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ปกติกับเซลล์สืบพันธุ์ผิดปกติ หรือเซลล์สืบพันธุ์ผิดปกติด้วยกันก็ตามจะทำให้ต้นลูกที่เกิดใหม่มีความผิดปกติในจำนวนโครโมโซม

2.1 แอนยูพลอยดี (aneuploidy) คือปรากฏการณ์ที่มีจำนวนโครโมโซม 1 หรือ 2 โครโมโซมแตกต่างไปจากจำนวนปกติ (2n) เช่น โมโนโซมี (monosomy) = 2n-1, ไทรโซมี (trisomy) = 2n+1, ดับเบิลไทรโซมี (doubletrisomy) = 2n+1+1, เททระโซมี (tetrasomy) = 2n+2, เพนทะโซมี (pentasomy) = 2n+3 เป็นต้น (วิสุทธิ์, 2536) ตัวอย่างเช่น ความผิดปกติเนื่องจากจำนวนโครโมโซมมีผลทำให้ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชเปลี่ยนแปลงไป เช่น การเปลี่ยนแปลงในขนาดของผล และ รูปผิดปกติของผลที่พบในต้นดอกลำโพง (*Datura stramonium*, 2n = 12) ซึ่งมีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้น 1 โครโมโซม (2n+1 = 13) ทำให้เกิดไทรโซมีและการเปลี่ยนแปลงก็ยังขึ้นกับแท่งโครโมโซมที่เพิ่มขึ้นมาอีกด้วย (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ลักษณะผลของต้นดอกล่าโพงที่เป็นดิพลอยด์ และพวกที่เป็นไตรโซมิกทั้ง 12 โครโมโซม (สิรนุช, 2536)

2.2 ยูพลอยดี (euploidy) คือปรากฏการณ์การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมโดยมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นหรือลดลงเป็นชุดจากจำนวนปกติ (2n) ส่วนใหญ่จะทำให้มีการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมมากกว่าสองชุดขึ้นไป ซึ่งเรียกว่า โพลีพลอยดี (polyploidy) เช่น 2n+n = 3n เรียกว่า ทริพลอยด์ (triploid), 2n+2n = 4n เรียกว่าเททระพลอยด์ (tetraploid) เป็นต้น (วิสุทธิ์, 2536)

โพลีพลอยดีเกิดขึ้นได้ 2 แบบ คือ การเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมที่กำเนิดจากสปีชีส์เดียวกัน เรียกว่า ออโตโพลิพลอยดี (autopolyploidy) และการเพิ่มของจำนวนโครโมโซมที่มีต้นกำเนิดมาจากสปีชีส์ต่างกัน เรียกว่า แอลโลโพลิพลอยดี (allopolyploidy)

สิ่งมีชีวิตพวกโพลิพลอยดีส่วนมากจะพบในพืช ซึ่งสามารถมีชีวิตอยู่ได้ดีเหมือนต้นปกติแต่มีลักษณะและขนาดใหญ่มากกว่าพืชพวกดิพลอยด์ธรรมดา (วิสุทธิ์, 2536)

สาเหตุที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์

1. การกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (spontaneous mutation)

การกลายพันธุ์เกิดได้เองตามธรรมชาติและมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อวิวัฒนาการของพืช ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม

1.1 ความถี่ของการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ

ยีนทุกตัวมีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์ได้ แต่ความถี่ของการกลายพันธุ์เป็นคุณสมบัติเฉพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด และในยีนเดียวกันความถี่ของการกลายพันธุ์ยังมีความแตกต่างกัน หากไปอยู่ในจีโนไทพ์ที่ต่างกันออกไปในพืชชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันได้

1.2 ปัจจัยที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ

การกลายพันธุ์ตามธรรมชาติเกี่ยวข้องกับปัจจัยภายในของพืชคือองค์ประกอบทางพันธุกรรมและสภาพทางสรีระ และปัจจัยจากสภาพแวดล้อม คือ อาหาร อุณหภูมิ กัมมันตรังสี ตลอดจนสิ่งก่อการกลายพันธุ์ในสิ่งแวดล้อมที่เกิดเองตามธรรมชาติ

2. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induced mutation)

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เป็นวิธีทำให้พืชปกติเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมอย่างรวดเร็ว

2.1 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี

รังสีที่นิยมใช้เหนี่ยวนำทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืช ได้แก่ รังสีเอกซ์ รังสีแกมมาและรังสีนิวตรอน จัดไว้ในกลุ่มของ ไอออไนซิงเรดิเอชัน (ionizing radiation) รังสีอุลตราไวโอเลต มีอำนาจในการทะลุทะลวงต่ำ มีพลังงานไม่สูงพอที่จะทำให้เกิดไอออไนเซชัน รังสีอุลตราไวโอเลตในช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร เป็นช่วงคลื่นที่กรดนิวคลีอิคดูดกลืนพลังงานจากรังสีอุลตราไวโอเลตได้ดี จึงทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในยีนได้ การใช้รังสีอุลตราไวโอเลตในการชักนำทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชจะมีน้อยกว่า ขอบเขตการใช้มีจำกัดเนื่องจากรังสีอุลตราไวโอเลตไม่สามารถทะลุทะลวงผ่านเนื้อเยื่อพืชที่มีเซลล์ซ้อนกันอยู่เป็นจำนวนมากได้ จำเป็นต้องเลือกฉายเฉพาะอับละอองเรณู หรือเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชที่มีสภาพเป็นเซลเดี่ยวๆ

รังสีแกมมา (gamma-ray)

รังสีแกมมาเกิดจากการสลายตัวของนิวเคลียสของธาตุกัมมันตรังสี ในปฏิกิริยาการสลายตัวของนิวเคลียสของธาตุกัมมันตรังสี ซึ่งมีสภาพไม่เสถียร พยายามปรับตัวให้เข้าสู่สภาพเสถียร โดยการปลดปล่อยพลังงานส่วนเกินออกมาในรูปรังสีแอลฟาหรือรังสีเบตา และติดตามด้วยการสลายตัวให้รังสีแกมมา ธาตุกัมมันตรังสีที่นิยมใช้เพื่อให้รังสีแกมมา คือ โคบอลท์-60 (Cobalt-60) และซีเซียม-137 (Cesium-137) การฉายรังสีแกมมาทำได้ 2 แบบ คือ การฉายรังสีแบบเฉียบพลัน (active irradiation) และการฉายรังสีแบบเรื้อรัง (chronic irradiation)

การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เมื่อได้รับรังสี

เมื่อเซลล์พืชได้รับรังสี รังสีถ่ายพลังงานให้กับโมเลกุลต่างๆของเซลล์ ทำให้โมเลกุลที่ได้รับพลังงานแตกตัวเป็นไอออน (ion) และฟรีแรดิคอล (free radical) ต่างๆ มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลใหม่ มีการทำปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างกันเกิดเป็นโมเลกุลที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ต่างไปจากเดิม เนื่องจากชีวมวลมีหน้าที่ต่างๆ ภายในเปลี่ยนไป ก็จะไปกระทบกระเทือนต่อเซลล์ที่โมเลกุลเหล่านี้ทำหน้าที่อยู่ด้วย ผลที่ได้คือ ถ้าไม่รุนแรง เซลล์ยังคงมีชีวิตอยู่ แต่ความสามารถในการแบ่งเซลล์อาจเปลี่ยนไป เช่น เกิดความล่าช้าในการเข้าสู่การแบ่งเซลล์ (mitotic delay) เกิดการเปลี่ยนแปลงในสารพันธุกรรมที่สามารถส่งต่อไปยังเซลล์ลูกหลานได้ เรียกว่า เกิดการกลายพันธุ์ หรือ ถ้ารุนแรงมาก ทำให้เซลล์ไม่สามารถแบ่งตัวได้ ทำให้เซลล์ตายในที่สุด

2.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี

สารเคมีที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ แบ่งได้ดังนี้

2.2.1 แอลคิเลชัน (alkylation)

สารในกลุ่มนี้จะเข้าทำปฏิกิริยาแอลคิเลชันกับหมู่ฟอสเฟต เบสพิวริน และเบสไพริมิดิน สารในกลุ่มนี้ได้แก่เอทิลมีเทน ซัลโฟเนต (ethyl methanesulphonate หรือ EMS) เอทิลีนอิมิน (ethyleneimine หรือ EI) ไดเอทิลซัลเฟต (diethyl sulphate หรือ dES) เป็นต้น

2.2.2 แอริลเลชัน (arylation)

สารเคมีในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นสารปฏิชีวนะ และ พวกโพลิไซคลิกอะโรเมติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbon) ได้แก่ อะฟลาทอกซิน บี 1 (aflatoxin B_1) เบนซ์(เอ)ไพรีน (benz(a)pyrene) อะเซติลอะมิโนฟลูออรีน (acetylaminofluorene หรือ 2-AF)

2.2.3 อินเทอร์คาเลชัน (intercalation)

สารเคมีในกลุ่มนี้ทำงานโดยแทรกตัวเข้าไปในโมเลกุล DNA สารเคมีในกลุ่มนี้ ได้แก่ แอคติโนมัยซิน ดี (actinomycin D) อะคริดินโอเรนจ์ (acridine orange) อะคริฟลาวิน (acriflavin) เป็นต้น

2.2.4 เบสแอนาลอกอินคอร์พอเรชัน (base analogue incorporation)

สารเคมีในกลุ่มนี้มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับนิวคลีโอไทด์เบส เช่น เบสแอนาลอกของพิวรินมีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบสพิวริน หรือเบสแอนาลอกของไพริมิดินมีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบสไพริมิดิน สารเคมีในกลุ่มนี้จึงสามารถเข้าไปแทนที่เบสจริงได้เมื่อ DNA มีการจำลองตัวเอง สารเคมีในกลุ่มนี้ได้แก่ 5-โบรโมยูเรซิล (5-bromouracil หรือ 5-Bu) เป็นเบสแอนาลอกของไทมิน 2-อะมิโนพิวริน (2-aminopurine) เป็นเบสแอนาลอกของอะดีนินและกัวนิน เป็นต้น

2.2.5 ดีอะมิเนชัน (deamination)

สารเคมีในกลุ่มนี้ มีความสามารถในการย้ายหมู่อะมิโนออกจาก เบสกัวนิน ไทมิน ไซโตซิน และ อะดีนินได้ ทำให้คุณสมบัติในการจับคู่ของเบสต่างไปจากเดิม สารเคมีในกลุ่มนี้ ได้แก่ กรดไนตรัส (nitrous acid หรือ HNO_2) โซเดียมไบซัลไฟต์ (sodium bisulfite) เป็นต้น

2.2.6 เมตะเฟสพอยซัน (metaphase poison)

สารเคมีในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการทำงานคล้ายคลึงกับโคลชิซิน (colchicine) ทำปฏิกิริยาโดย การไปขัดขวางการเกิดของเส้นใยสปินเดิล (spindle fiber)

และขัดขวางการแยกจากกันของโครโมโซม โดยการเข้ารวมตัวกับองค์ประกอบที่เป็น
โปรตีนของไมโครทิวบิวส์ (microtubules) ซึ่งจะมาเป็นเส้นใยสปินเดิล

2.2.7 เอนไซม์อินฮิบิเตอร์ (enzyme inhibitor)

สารเคมีในกลุ่มนี้ ทำงานโดยขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการซ่อมแซม DNA จะไม่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยตรง แต่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยกระบวนการอื่นๆ เช่น ขัดขวางการสังเคราะห์ไทมิน ทำให้เกิดสภาวะขาดแคลนไทมินในการจำลองตัวของ DNA จึงมีเบสอื่นมาแทนที่ จึงเกิดการกลายพันธุ์ได้ สารเคมีในกลุ่มนี้ ได้แก่ คาเฟอีน (caffeine) อะซาเซรีน (azaserine) และ ไฮดรอกซียูเรีย (hydroxyurea)

สารโคลชิซิน (colchicine) มีสูตรโมเลกุล $C_{22}H_{25}NO_6$ เป็นสารแอลคาลอยด์ (alkaloid) สกัดได้จาก หัวหรือเมล็ดของ โครคัส (*Colchicum autumnale*) และ ดองดึง (*Gloriosa superba*) (Chandrasekharan และ Parthasarathy, 1948) มีคุณสมบัติช่วยยับยั้งการเจริญของไมโครทิวบิวส์ของเส้นใยสปินเดิล ในกระบวนการแบ่งเซลล์ ทำให้โครโมโซมคู่เหมือนกันไม่สามารถแยกตัวออกจากกันได้ ทำให้เกิดเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นอีกเท่าตัว จากคุณสมบัติดังกล่าว สามารถใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์พืชให้เป็นพวกโพลีพลอยด์ (polyploid) พืชที่เป็นโพลีพลอยด์มักจะมีลักษณะแตกต่างจากต้นปกติ (ดิพลอยด์) คือ มักมีใบหนาและใหญ่ ดอกใหญ่และสีเข้มกว่า ผล เมล็ด ละอองเกสร และส่วนอื่นๆ ของลำต้นมีขนาดใหญ่กว่า และมีความเป็นหมันมากกว่า (Elliott, 1958)

Chandrasekharan และ Parthasarathy (1948) นำเมล็ดพริก (chilli) แช่ในสารละลายโคลชิซินที่มีความเข้มข้น 0.05-0.4 เปอร์เซนต์ นาน 1-8 วัน พบว่าการแช่ในสารละลายโคลชิซินที่มีความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซนต์ นาน 1 วัน ให้ต้นเททระพลอยด์สูงสุด โดยมีลักษณะผิดปกติคือ ใบหนาและหยาบ ลำต้นและส่วนต่างๆขยายขนาดขึ้น การเจริญเติบโตช้าลง ออกดอกช้าลง ละอองเกสรมีขนาดเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า

Savitsky (1952) นำส่วน hypocotyl ของต้น sugar beet แช่ในสารละลายโคลชิซินที่มีความเข้มข้น 0.3-0.5 เปอร์เซนต์ นาน 5-7 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถชักนำให้เป็นเททระพลอยด์ได้ โดยต้นเททระพลอยด์ มีขนาดหัวใหญ่ขึ้น แต่มีเปอร์เซนต์น้ำตาลต่ำกว่าต้นปกติ

ปิยะดา (2531) ได้ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในขิง โดยการแช่ต้นขิงที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ในสารละลายโคลชิซิน พบว่าสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นเตตราพลอยด์ได้ ซึ่งต้นเตตราพลอยด์มีลักษณะที่ผิดปกติคือ มีลำต้นอ้วน ใบกว้างหนา และมีความยาวปากใบมากกว่าปกติ

2.3 การเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการชักนำให้เกิดแคลลัส เมื่อนำแคลลัสไปเลี้ยงเพื่อพัฒนาไปเป็นต้นพืช พบว่า พืชที่เกิดใหม่มีลักษณะแตกต่างกันออกไป โดยบางลักษณะไม่เคยปรากฏในพันธุ์เดิม และบางลักษณะสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไปได้ แสดงถึงการเกิดการเปลี่ยนแปลงในสารพันธุกรรมขึ้น ลักษณะความแปรปรวนที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เรียกว่า โซมาโคลนอลแวริเอชัน (somaclonal variation) วิธีการนี้สามารถคัดเลือกลักษณะที่ดีไปใช้ประโยชน์ได้

2.4 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธีสอดแทรกของ DNA

กรณีที่มีการสอดแทรกชิ้นส่วนหรือลำดับของ DNA (DNA sequence) เข้าไปในยีน ทำให้การทำงานของยีนเปลี่ยนไป มีผลทำให้ลักษณะทางฟีโนไทป์ ที่ควบคุมเปลี่ยนแปลงไปด้วย การสอดแทรก DNA เข้าไปในยีนทำได้ดังนี้

2.4.1 ทรานสโพสเซเบิลอิลิเม้นต์ (transposable element)

ชิ้นส่วนลำดับของ DNA ที่มีคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวน (replicate) และสามารถแยกตัวเอง (excision) เคลื่อนย้ายไปสอดแทรกลำดับของ DNA เข้าไปในยีนปกติได้ เรียกว่า ทรานสโพซอน (transposon) หรือ ทรานสโพสเซเบิลอิลิเม้นต์ ในพืช ตัวอย่างเช่น การเกิด "variegation" เป็นลักษณะการเกิดจุดด่างเป็นลายสลับสี หรือ กระบนกลีบของดอก ใบ และเมล็ด เช่น แต้มสีบนเมล็ดของข้าวโพด ลักษณะใบลาย ใบด่างในถั่วเหลือง จุดกระหรือด่างบนกลีบของดอกรักเร่ดอกพิทูเนีย เป็นต้น

2.4.2 T-DNA

แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* มี ทีไอพลาสมิด (Ti plasmid) ที่สามารถเข้าไปในนิวเคลียสของเซลล์พืชใบเลี้ยงคู่ได้ ส่วนของทีไอพลาสมิด ที่ส่งเข้าไปในเซลล์พืชเรียกว่า T-DNA เมื่อ T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชแล้วสามารถทำงานได้ โดยทำให้เซลล์พืชสร้างสารโอปิน (opine) ขึ้น เพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ของแบคทีเรียเอง และทำให้เซลล์พืชมีการ

เปลี่ยนแปลงกลายเป็นทรานสฟอร์มเซลล์ (transformed cell) เกิดการเจริญมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนมากกว่าเซลล์ปกติทำให้เกิดก้อนเนื้องอกขึ้น มีลักษณะเป็นปุ่มหรือปม เรียกว่าโรครากปม หรือคราวน์กอล (crown gall discease) เนื่องจาก ทีไอพลาสมิดของแบคทีเรีย สามารถนำส่วนของ T-DNA เข้าไปยังเซลล์พืชและทำให้เกิดการทรานฟอร์เมชั่นได้ จึงมีการใช้ทีไอพลาสมิดเป็นพาหะ (vector) นำยีนที่ต้องการเข้าไปยังเซลล์พืชได้

การปรับปรุงพันธุ์พืช โดยวิธีการผสมพันธุ์จะเป็นไปได้ช้ามาก เนื่องจากต้องอาศัยระยะเวลานาน และเนื่องจากการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีนี้จะต้องรอเมล็ดเพื่อเพาะปลูกและเก็บผลต่อไป ซึ่งรุ่นลูกที่ได้มีความแปรผันทางพันธุกรรมน้อย แต่ในปัจจุบันสามารถทำการปรับปรุงพันธุ์ โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ร่วมกับการใช้สิ่งก่อการกลายพันธุ์ เช่น รังสี สารเคมี เป็นต้น วิธีนี้ทำได้สะดวกและรวดเร็วและได้ต้นพืชที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมได้มาก

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (plant tissue culture)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หมายถึง การนำเอาอวัยวะ (organ) ส่วนหนึ่งส่วนใดของพืชซึ่งเป็นส่วนเนื้อเยื่อเจริญ เช่น ใบ ดอก ราก ตา ข้อ ปล้อง เมล็ดที่กำลังงอก ปลายยอด ส่วนของผล หรือเนื้อเยื่อ (tissue) หรือเซลล์ หรือเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์ที่เรียกว่า โปรโตพลาสต์ (protoplast) มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ (synthetic media) ในสภาพปลอดเชื้อ (aseptic condition) จากเชื้อจุลินทรีย์ ในสภาวะแวดล้อมที่ควบคุมได้ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น และแสงสว่าง

ชนิดของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (จิตรีบุล, 2529)

1. การเพาะเลี้ยงอวัยวะ (organ culture)

เป็นการนำเอาอวัยวะต่างๆของพืชมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ได้แก่ ข้อปล้อง ใบ ปลายยอด ปลายราก ตายอด ตาข้าง รังไข่ ผล และเอมบริโอ

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture)

เป็นการนำเอาเนื้อเยื่อชนิดต่างๆของพืชมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ได้แก่ เนื้อเยื่อแคมเบียม (cambium) เนื้อเยื่อพาเรนไคมา (parenchyma) เนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue)

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture)

เป็นการนำเอาเซลล์เดี่ยวๆ (single cell-culture) หรือ อาจเป็นกลุ่มของเซลล์แขวนลอย (suspension culture) มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ได้แก่ เซลล์พาเรนไคมา ละอองเกสรตัวผู้ ไข่

4. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (protoplast culture)

เป็นการเพาะเลี้ยงเซลที่ปราศจากผนังเซลล์ ทำโดยการใช้เอนไซม์ pectinase และ cellulase มาย่อย middle lamella และ cell wall ออก เหลือแต่เซลล์เมมเบรน (cell membrane) หุ้มล้อมรอบไซโตพลาสซึม (cytoplasm) นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์

สูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (เอื้อพร, 2531)

อาหารสังเคราะห์ที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ต้องเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสม เนื่องจาก เนื้อเยื่อพืชส่วนใหญ่สังเคราะห์อาหารเองไม่ได้ และ มีจำนวนน้อยชนิดที่สามารถขึ้นบนอาหารพื้นฐานได้ สูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ประกอบด้วยอาหารที่พืชสามารถนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สูตรอาหารที่ใช้ในปัจจุบันมีส่วนประกอบพื้นฐาน ดังนี้

1. ธาตุอาหารพวกอนินทรีย์

1.1 ธาตุอาหารหลัก (essential macroelement) เป็นธาตุที่พืชต้องการในปริมาณมากสำหรับการเจริญเติบโต ได้แก่ ไนโตรเจน (N) โปตัสเซียม (K) ฟอสฟอรัส (P) กำมะถัน (S) แคลเซียม (Ca) และมักนีเซียม (Mg)

1.2 ธาตุอาหารรอง (essential microelement) เป็นธาตุที่พืชต้องการในปริมาณต่ำแต่จะขาดไม่ได้ ได้แก่ เหล็ก (Fe) มังกานีส (Mn) สังกะสี (Zn) โบรอน (B) ทองแดง (Cu) โมลิบดินัม (Mo) และโคบอลท์ (Co)

2. น้ำตาล

น้ำตาลเป็นสารประกอบอินทรีย์ เพื่อใช้เป็นแหล่งให้คาร์บอน (C) แก่เนื้อเยื่อ โดยทั่วไปใช้น้ำตาลซูโครส (sucrose) แต่ในบางกรณี อาจใช้น้ำตาลกลูโคส (glucose) โดยความเข้มข้นของน้ำตาลปกติ ประมาณ 20-40 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร หรือ 2-4 เปอร์เซนต์

3. วิตามิน (vitamins)

เนื้อเยื่อพืชต้องการวิตามินสำหรับการเจริญเติบโต ถ้าขาดวิตามิน เนื้อเยื่อจะเจริญได้น้อยหรือไม่เจริญเติบโตเลย วิตามินที่ใช้ต้องละลายน้ำได้ วิตะมินที่สำคัญ

มากที่สุด ได้แก่ ไทอามีน (thiamine) ส่วนวิตามินอื่นๆ เป็นตัวช่วยเสริมการเจริญเติบโต เช่น nicotinic acid, pyridoxine, biotin, myo-inositol เป็นต้น

4. สารเร่งการเจริญเติบโต (growth regulators)

สารเร่งการเจริญเติบโตเป็นสารอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพทางด้านการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ เกี่ยวกับการขยายขนาดของเซลล์และการแบ่งเซลล์ ได้แก่สารในกลุ่มพวกออกซิน (auxin) เช่น indole acetic acid (IAA), indole butyric acid (IBA), α-naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) สารพวกไซโตไคนิน (cytokinin) เช่น kinetin, zeatin, isopentenyl adenine (2ip), benzyl aminopurine (BAP) สารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นๆ เช่น abscissic acid (ABA), gibberellic acid (GA)

สารในกลุ่มออกซิน มีบทบาทช่วยในการขยายตัวของเซลล์ (cell enlargement) ทั้งในด้านกว้างและยาว ทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น ในโปรโตพลาสต์พบว่าออกซินมีส่วนช่วยในการสร้างผนังเซลล์ของพืช

สารในกลุ่มไซโตไคนิน มีบทบาทสัมพันธ์กับการแบ่งเซลล์ (cell division หรือ cytokinesis) ของพืช และการสังเคราะห์สารประกอบประเภทโปรตีน

5. กรดอะมิโน (amino acid)

กรดอะมิโนจะมีผลในช่วงแรกๆ เนื่องจากช่วงแรกๆของการเจริญเติบโต เซลล์อยู่ในสภาพอ่อนแอมาก จึงต้องการสารอาหารที่ใช้ได้ทันทีมากกว่าที่จะสังเคราะห์ขึ้นมาเอง

6. สารประกอบเชิงซ้อนที่ได้มาจากธรรมชาติ ได้แก่

- น้ำมะพร้าว
- น้ำต้นมะเขือเทศ
- น้ำสกัดหัวมันฝรั่ง
- กล้วยบด
- สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)
- สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)

7. ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอยู่ระหว่าง 5.0-6.2 ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3. วุ้น (agar)

วุ้นเป็นตัวทำให้เนื้อเยื่อตั้งอยู่บนอาหารได้ ความเข้มข้นที่ใช้อยู่ระหว่าง 0.5-1.3 เปอร์เซนต์

ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (เอื้อพร, 2531)

1. ส่วนประกอบของอาหาร

อาหารแต่ละสูตรประกอบด้วยแร่ธาตุแตกต่างกันไป เพื่อให้เหมาะสมกับพืชชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น เนื่องจากส่วนประกอบบางชนิดของอาหารมีส่วนเกี่ยวข้องกับ morphogenesis เช่น การใช้ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียอิออนปริมาณมาก จะทำให้เนื้อเยื่อเกิด embryogenesis มากกว่าการเกิด organogenesis, การเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาล 2 เปอร์เซนต์ มีส่วนทำให้เกิด morphogenesis ถ้าเพิ่มเป็น 3 เปอร์เซนต์ จะไปชะงักการเกิดต้น เป็นต้น

2. ความเป็นกรด-ด่างของอาหาร

ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารที่เหมาะสม ก่อนจะเติมวุ้นและอบฆ่าเชื้อ ควรจะอยู่ในช่วง 5.0-6.0 จึงจะทำให้พืชเกิด organogenesis ได้ดี

3. ปริมาตรของอาหาร

ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จะต้องคำนึงถึงปริมาตรของอาหารที่เหมาะสม เนื่องจากถ้าเลี้ยงในอาหารที่น้อยเกินไป จะทำให้อัตราการเจริญเติบโตช้า

4. ชนิดของเนื้อเยื่อ

ควรเลือกเนื้อเยื่อที่มีส่วนของเนื้อเยื่อเจริญอยู่ เช่น ปลายยอด, ปลายรากหรือตา เมื่อนำเอาไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ จะมีโอกาสเจริญเติบโตมากกว่าเนื้อเยื่อที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อถาวร (permanent tissue) แล้วเนื่องจากเนื้อเยื่อเจริญ พร้อมที่จะมีการแบ่งเซลล์และเจริญต่อไป ส่วนเนื้อเยื่อถาวรจะต้องเปลี่ยนกลับไปเป็นเนื้อเยื่อเจริญเสียก่อน จึงจะเจริญเติบโตต่อไปได้

5. ขนาดของชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง

ขนาดของชิ้นส่วนพืช มีความสำคัญต่อการเกิด morphogenesis โดยชิ้นส่วนขนาดใหญ่มีโอกาสอยู่รอดมากกว่าชิ้นส่วนขนาดเล็ก แต่ชิ้นส่วนขนาดใหญ่มีโอกาสติดเชื้อจุลินทรีย์มากกว่าชิ้นส่วนขนาดเล็ก

6. ลักษณะทางพันธุกรรม (genetic factor)

การเกิดเป็นยอดและ/หรือรากนั้น ขึ้นกับชนิดของพืช พืชบางชนิดอาจจะเกิดเป็นยอดและรากได้ง่าย ในขณะเดียวกันพืชอีกชนิดหนึ่งเกิดขึ้นได้ยากแม้เลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม ขบวนการเกิดเป็นยอดและ/หรือราก จะผ่านขบวนการ organogenesis หรือ embryogenesis ขึ้นกับชนิดของพืชด้วย

7. สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators)

ขบวนการเกิด morphogenesis ของเนื้อเยื่อพืช ขึ้นอยู่กับความสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ อัตราส่วนของออกซินต่อไซโตไคนิน ถ้าอัตราส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินมีอยู่ในอัตราส่วนที่เหมาะสม เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นต้นและรากที่สมบูรณ์ แต่ถ้าอัตราส่วนของออกซินมากกว่าไซโตไคนินเนื้อเยื่อจะเจริญเป็นก้อนแคลลัสและราก แต่ถ้ามีปริมาณออกซินน้อยแต่มีไซโตไคนินมาก ทำให้เนื้อเยื่อเจริญเป็นยอดมาก ความสมดุลของออกซินและไซโตไคนินมีความสำคัญมากในการควบคุม morphogenesis ของเนื้อเยื่อที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เป็นที่เชื่อกันว่าความสมดุลของออกซินและไซโตไคนินที่เติมลงในอาหารสังเคราะห์นี้ มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับปริมาณฮอร์โมนที่อยู่ภายในชิ้นเนื้อเยื่อ เช่น ชิ้นเนื้อเยื่อมีฮอร์โมนชนิดใดชนิดหนึ่งมาก ก็อาจจะมีความต้องการสารเร่งการเจริญเติบโต (growth regulators) ชนิดนั้นในอาหารต่ำ นอกจากนี้ยังมีสารที่มีความสำคัญในการควบคุมการเกิด morphogenesis อีก เช่น จิบเบอริลริน (gibberellin), แอบไซซิคแอสิด (abscissic acid) และ เอทธิลีน (ethylene) เป็นต้น

8. เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อ

การฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์บนผิวของเนื้อเยื่อพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีความสำคัญต่อการเจริญของเนื้อเยื่อพืชด้วย เพราะการใช้น้ำยาฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์นอกจากทำลายจุลินทรีย์ต่างๆแล้ว ยังมีโอกาสทำลายเนื้อเยื่อได้ถ้าใช้เวลานานเกินไป แต่การฟอกฆ่าเชื้อเป็นเวลาสั้น ทำให้กำจัดเชื้อจุลินทรีย์ไม่หมด จึงต้องศึกษาถึงเนื้อเยื่อพืชนั้นว่าเป็นแบบใด ควรใช้เวลาฟอกฆ่าเชื้อเร็วหรือช้าจึงจะเหมาะสม

9. การถ่ายเนื้อเยื่อ

การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้เจริญสมบูรณ์นั้น ต้องมีการถ่ายหรือย้ายเนื้อเยื่อ (subculture) ลงในอาหารใหม่ทุก 2-8 สัปดาห์แล้วแต่ชนิดของพืชและอาหารที่ใช้เลี้ยง การย้ายเนื้อเยื่อลงอาหารใหม่หลายๆครั้ง ทำให้ความสามารถในการเกิด morphogenesis ของเนื้อเยื่อนั้นลดลงหรือขาดไป ซึ่งสาเหตุยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเกิดจากสาเหตุใด อาจเป็นไปได้ที่เนื้อเยื่อเกิดมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดโครโมโซมขึ้น

10. การเติมสารตั้งต้นของวิธีทางชีวสังเคราะห์

การเติมสารตั้งต้น (precursor) ของวิธีทางชีวสังเคราะห์ (biosynthetic pathway) ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะทำให้เนื้อเยื่อสามารถผลิตสารที่ต้องการได้มากขึ้น

11. **สภาวะแวดล้อมภายนอก** (ไพบูลย์, 2524)

สภาวะแวดล้อม ได้แก่ แสง (light) และ อุณหภูมิ (temperature) มีผลต่อ morphogenesis ของเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยง

11.1 **แสง** พืชหลายชนิดต้องการความมืดในการเกิดรากหรือยอด เมื่อนำเนื้อเยื่อเหล่านี้มาเลี้ยงบนอาหารเทียม และพืชหลายชนิดต้องการแสงในการเกิดยอดหรือราก การให้แสงแก่เนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนั้น มิได้มีจุดมุ่งหมาย เพื่อให้เนื้อเยื่อใช้แสงปรุงอาหาร (photosynthesis) แต่เพื่อช่วยการเกิด morphogenesis มากกว่า การให้แสงแก่เนื้อเยื่อขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังนี้

11.1.1 **คุณภาพของแสง (light quality)** จากการทดลอง พบว่า แสงสีแดง (red light) และ แสงสีน้ำเงิน (blue light) มีความสำคัญต่อการชักนำให้เกิดยอดของพืชหลายชนิด ในขณะที่แสงฟาร์-เรด (far-red light) มักทำให้ชะงักการเกิดยอดลง

11.1.2 **ความเข้มของแสง (light intensity)** โดยปกติในการเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชเริ่มแรก จะให้ความเข้มข้นแสงที่ต่ำ คือ ประมาณ 100 กำลังเทียน หรือต่ำกว่า เพื่อให้เกิดตายอด (shoot primodium) จากนั้นจึงค่อยเพิ่มความเข้มแสงเป็น 300-1000 กำลังเทียน เพื่อช่วยให้ ตายอดเจริญ (shoot development) ได้ดี

11.1.3 **ระยะเวลาการให้แสง (light duration)** ปกติจะให้แสงแก่เนื้อเยื่อพืชประมาณ 16 ชั่วโมง และมีช่วงมืด 8 ชั่วโมง ซึ่งช่วยในการเกิด morphogenesis ได้ในพืชหลายชนิด หรือเก็บเนื้อเยื่อไว้ในที่มีแสงตลอด 24 ชั่วโมง

11.2 **อุณหภูมิ** การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทั่วไป มักจะใช้อุณหภูมิคงที่ประมาณ 25 องศาเซลเซียส แต่มีพืชอีกหลายชนิดที่ยังไม่ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งอาจเป็นเพราะอุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่จำกัดความสำเร็จนี้

พัฒนาการของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง

การพัฒนาการของเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ มีการเจริญเติบโตและพัฒนาการต่อไปได้ 3 แบบ

1. callus formation (ประศาสตร์, 2536)

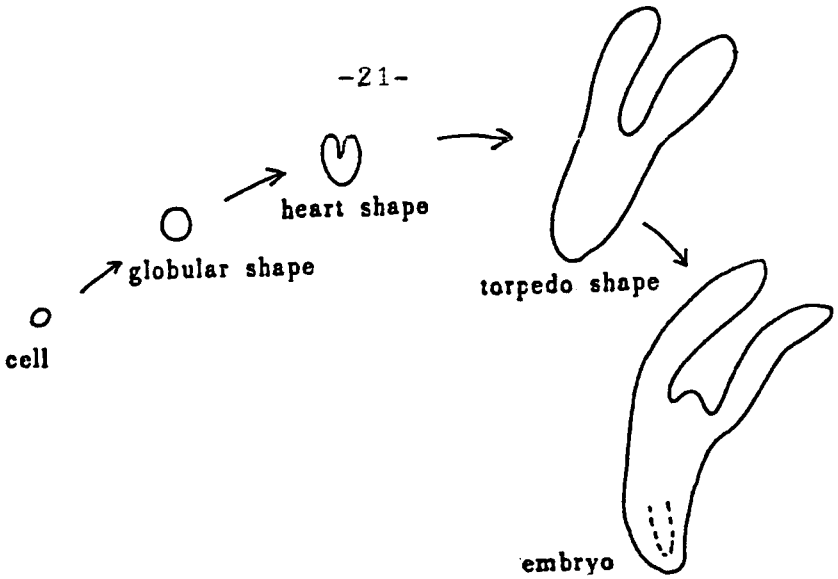
แคลลัส (callus) หมายถึง เซลล์ประเภทพาเรนไคมา (parenchyma cells) ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะ หรือเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ มีขนาดต่างๆกัน มีรูปร่างไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีเปอร์เซนต์ของแวคคิวโอล (vacuole) สูงแบ่งเป็นแคลลัสที่เซลล์เกาะตัวกันแน่นเรียกว่า compact callus และแคลลัสที่เซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆเรียกว่า friable callus ภายในเซลล์ของแคลลัสส่วนใหญ่จะไม่มีรงควัตถุ (pigment) มีส่วนน้อยที่มีสีเขียวเนื่องจากคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) สีเหลืองเพราะแคโรทีนอยด์ (carotenoid) และฟลาโวนอยด์ (flavonoid) สีม่วงเพราะมีแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ปริมาณและชนิดของรงควัตถุขึ้นอยู่กับชนิดของพืชสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม

2. organogenesis

organogenesis เกิดจากการรวมตัวกันของกลุ่มเซลล์แคลลัสที่อยู่ใกล้กันกลายเป็น meristematic cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็ก แวคคิวโอล (vacuole) เล็ก และไซโตพลาสซึมเข้มข้น มีการแบ่งตัวในอัตราสูง เรียกกลุ่มเซลล์เหล่านี้ว่า meristemoids ซึ่งจะเจริญต่อไปเป็นจุดเริ่มต้นของยอดหรือราก (shoot or root primodium) การเกิดยอด ราก หรืออวัยวะอื่นๆ เกิดขึ้นเป็นอิสระไม่ขึ้นต่อกันขึ้นอยู่กับว่า เนื้อเยื่อหรือเซลล์ได้รับสิ่งกระตุ้นให้เจริญเป็นอะไร

3. embryogenesis

embryogenesis คือ การเกิดยอด, ราก และอวัยวะอื่นๆ โดยเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาเหมือนการพัฒนาของไข่หลังได้รับการผสม กล่าวคือ เซลล์จะแบ่งตัวและเจริญเป็น proembryo, globular-shaped embryo, heart-shaped embryo, torpedo-shaped embryo จนกระทั่งเป็น embryo (รูปที่ 4) ซึ่งจะเจริญไปเป็นยอดและรากพร้อมกัน โดยปลายข้างหนึ่งของ embryo จะเจริญเป็นยอดอีกด้านหนึ่งเป็นราก



รูปที่ 4 การพัฒนาของเซลล์เป็น embryoid (ไพบูลย์, 2524)

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (จิตรีบุล, 2527)

1. ด้านการเกษตร

1.1 การขยายพันธุ์พืช (clonal propagation)

1.1.1 การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction)

คือ การนำเอาชิ้นส่วนของพืชมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์แล้วทำให้เกิดเป็นต้นและราก หรือ การชักนำให้ชิ้นส่วนของพืชเกิดเป็นแคลลัสแล้วพัฒนาไปเป็น organogenesis หรือ embryogenesis ก็จะได้ต้นใหม่ที่เหมือนต้นเดิมทุกประการในปริมาณมากและเวลาจำกัด ปัจจุบัน นำวิธีนี้ไปใช้ทางการค้าและได้รับผลสำเร็จเป็นอย่างมากในพืชเศรษฐกิจ ไม้ดอก ไม้ประดับ ไม้ผล ผัก และไม้ยืนต้น

1.1.2 การผลิตต้นอ่อนในแบบ artificial seed จาก somatic embryoid

นิยมใช้กับพืชผักทางการเกษตร เช่น มะละกอ ตามปกติในธรรมชาติจะมีทั้งต้นตัวผู้และต้นตัวเมีย ต้นกระเทย ถ้านำเนื้อเยื่อ somatic cell ของต้นตัวเมียที่พันธุ์ดีมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ก็จะได้ somatic embryoid ที่ดี นับว่าเป็น artificial seed ที่จะได้ต้นตัวเมียทั้งหมดเมื่อนำไปปลูก

1.1.3 การเลี้ยงเอมบริโอที่อ่อนแอ หรือไข่ที่ได้รับการผสมแล้วในพืชบางชนิดที่มักจะร่วงหรือเจริญได้ไม่เต็มที่ในธรรมชาติ

เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมก็จะได้ต้นอ่อนเกิดขึ้น เช่น การเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ มะพร้าวกะทิ เป็นต้น

1.2 การปรับปรุงพันธุ์พืช (crop improvement)

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถใช้ปรับปรุงพันธุ์ได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของการทำว่า จะปรับปรุงพันธุ์ทางด้านใด

1.2.1 การสร้างพืชที่มีจำนวนชุดของโครโมโซมต่างไปจากปกติ เช่น การผลิตต้นพืชที่มีโครโมโซมเพียงชุดเดียว (haploid plant) ได้จากการเพาะเลี้ยงไข่ (egg) หรือละอองเกสรตัวผู้ (pollen) ใช้ในการสร้างสายพันธุ์ที่มีโครโมโซม 2 ชุดที่เหมือนกันทุกประการ (homozygous chromosome) โดยใช้สารโคลชิซีนกระตุ้นมีประโยชน์มากในการคัดเลือกพันธุ์และผสมพันธุ์ต่อไป การผลิตต้นพืชที่มีโครโมโซม 3 ชุด (triploid plant) จากเนื้อเยื่อเอนโดสเปิร์ม (endosperm) ทำให้ผลที่ได้ไม่มีเมล็ด ในพืชไม้ดอกไม้ประดับ พบว่า ต้นที่มีจำนวนโครโมโซมมากกว่า 2 ชุดมักจะให้ดอกใหญ่ ใบหนา และสวยกว่าต้นปกติ

1.2.2 การถ่ายละอองเกสรและการผสมเกสรในหลอดทดลอง (testtube pollination and fertilization)

พืชบางชนิดมีการถ่ายละอองเกสรโดยธรรมชาติเกิดขึ้นได้ยาก การนำมาเลี้ยงในอาหารและให้เกิดขบวนการดังกล่าวในหลอดทดลองในสภาพที่ปลอดเชื้อและมีความชื้นสูง จะช่วยให้การผสมเกสรเป็นไปได้ง่ายขึ้น

1.2.3 การแยกความแปรปรวนของเนื้อเยื่อ

เนื้อเยื่อที่อยู่ติดกันในพืชบางชนิดมีความแตกต่างกัน เรียกว่า chimera เมื่อนำเนื้อเยื่อชนิดนี้มาเลี้ยงจะได้ต้นที่มีความแตกต่างกัน เช่น สับปะรดด่าง บอนสี และคาร์เนชั่น เป็นต้น

1.2.4 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

การชักนำเนื้อเยื่อพืชในหลอดทดลองให้กลายพันธุ์ได้โดยรังสีชนิดต่างๆ เช่น รังสีแกมมา รังสีเอกซ์ รังสีอุลตร้าไวโอเลต รังสีเบต้า หรือใช้สารเคมีเช่น colchicine, ethylmethane sulfonate (EMS), diethyl sulfate (DES), ethylimine (EI) เป็นต้น ทำให้ได้ต้นที่มีลักษณะแตกต่างไปจากต้นเดิม

1.2.5 การผสมพันธุ์โดยใช้โปรโตพลาสต์

การนำเอาโปรโตพลาสต์ของพืชที่ต่างวงศ์, สกุล หรือชนิดกันมารวมกันเรียกว่า protoplast fusion ทำให้ได้ต้นพืชที่มีลักษณะตามต้องการได้

1.2.6 การผลิตต้นพืชที่ต้านทานต่อเชื้อโรคและสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์หรือเซลล์พืช ในอาหารที่มีสารพิษ (toxin) ของเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อคัดเลือกแคลลัสที่มีความต้านทานต่อเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี แล้วนำมาชักนำให้กลายเป็นต้นที่สมบูรณ์ ก็จะได้ต้นที่ต้านทานโรคได้ ถ้าต้องการให้ทนต่อยาฆ่าแมลง, ทนเค็ม, ทนกรด ก็ทำในทำนองเดียวกัน หากแต่เปลี่ยนสารที่ใช้ในการคัดเลือก

1.3 การผลิตพืชที่ปราศจากโรคไวรัส

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (meristem culture) เนื้อเยื่อเจริญซึ่งมีขนาด 0.1-0.5 มิลลิเมตร จะปราศจากไวรัส แม้ว่า เนื้อเยื่อเจริญ จะอยู่บนต้นที่เป็นไวรัสก็ตาม เมื่อนำส่วนนี้มาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็ได้ต้นพืชที่ปราศจากไวรัส นอกจากนี้แล้ว การใช้อุณหภูมิสูงเข้าช่วย (thermotherapy) คือ ปลูกต้นไม้ไว้ที่อุณหภูมิสูงประมาณ 35 องศาเซลเซียส 30 วันก่อนนำ เนื้อเยื่อเจริญ มาเพาะเลี้ยงพืชจะแข็งแรงดี มีการยืดตัวของยอดได้รวดเร็ว ช่วยให้ เนื้อเยื่อเจริญ ไม่มีไวรัสเข้าไปเจริญได้ทัน

1.4 การเก็บรักษาพันธุ์พืช (plant preservation)

การเก็บรักษาพันธุ์พืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด แต่เมล็ดบางเมล็ดเป็นหมัน (sterile) เมล็ดบางชนิดมีเชื้อโรคอาศัยอยู่ในเมล็ด (seed-borne pathogen) เมล็ดบางชนิดเป็น heterozygous อาจได้ลักษณะที่ไม่เหมือนแม่พันธุ์ เมล็ดบางชนิดมีอายุสั้นอาจตายก่อนนำไปปลูก เมล็ดจะสูญเสียอัตราการงอกเมื่อเก็บไว้นานขึ้น ฉะนั้นการเก็บรักษาพันธุ์ในรูปเมล็ดจึงไม่ดีเท่าที่ควร สำหรับพืชที่ขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศมักเก็บรักษาพันธุ์โดยการปลูก ซึ่งสิ้นเปลืองที่ดินและแรงงาน เนื่องจากเซลล์พืชมีคุณสมบัติ totipotent โดยธรรมชาติ ฉะนั้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับการใช้อุณหภูมิต่ำจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาพันธุ์พืช ทั้งพืชที่กำลังจะสูญพันธุ์และพืชที่มีลักษณะดี ซึ่งทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ ที่มีขนาด 0.1-0.5 มิลลิเมตร เก็บไว้ในสภาพปกติหรือมีอุณหภูมิต่ำกว่าปกติเล็กน้อย เพื่อให้เซลล์มีการเจริญเติบโตที่ช้าลง วิธีนี้เป็นการเก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ในช่วงเวลาไม่นาน ถ้าเก็บรักษาสายพันธุ์ไว้ในช่วงเวลานานโดยเก็บเนื้อเยื่อไว้ที่อุณหภูมิต่ำมากๆ เพื่อหยุดเมตาบอลิซึม (metabolism) ในเซลล์โดยเซลล์ไม่ตาย เช่นการเก็บเนื้อเยื่อไว้ในไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส) เนื้อเยื่อจะไม่มีการเจริญเติบโต เมื่อต้องการปลูกก็นำเนื้อเยื่อมาละลายเพาะเลี้ยงจนเป็นต้นที่สมบูรณ์ จะได้ต้นพืชที่ปกติตามลักษณะเดิม ไม่มีการกลายพันธุ์

2. ด้านเภสัชกรรม

2.1 การผลิตสารที่เป็นยารักษาโรค ซึ่งเป็นสารพวก secondary metabolite จากพืชสมุนไพร เช่น อัลคาลอยด์ (alkaloid) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) แทนนิน (tannin) ลิกนิน (lignin) และ น้ำมันหอมระเหย ทำได้โดยนำเซลล์ของพืชสมุนไพรมาเพาะเลี้ยง จากนั้น ทำให้เซลล์พืชเกิดความเครียด

(stress) เพื่อให้เซลล์พืชสร้างสาร secondary metabolite ออกมา เช่น การผลิตสารนิโคติน (nicotin) จากยาสูบ การผลิตแอลคาลอยด์ที่ใช้รักษาโรคเบาหวานจากมะระ และ ผลิตแอลกอฮอล์ที่ใช้ลดความดันโลหิตจากระย่อม ปัญหาที่พบคือ เซลล์พืชที่เลี้ยงไม่มากพอ เนื่องจาก เซลล์พืชสร้างสารพวก secondary metabolite มากๆ แล้วจะยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เอง เซลล์ที่เพาะเลี้ยงจะผลิตสาร secondary metabolite ต่ำกว่าเซลล์พืชจากต้นปกติ

2.2 การผลิตสารที่นำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ ได้แก่ การผลิตเอนไซม์ เช่น เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase enzyme)จากแครอท เป็นต้น

2.3 การผลิตสีย้อมที่นำมาใช้ประโยชน์ทางยาและอาหาร โดยผลิตสารจำพวก anthocyanin จากพืชได้สีต่างๆ เช่น ม่วง แดง เป็นต้น และโดยการเลี้ยงเซลล์พืชที่มีความสามารถผลิตสารดังกล่าวได้ แล้วนำมาสกัดเอาสีออกมาใช้ประโยชน์

3. ด้านวิทยาศาสตร์

เพิ่มพูนความรู้ในการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ในสาขาต่างๆ ได้แก่ ทางสรีรวิทยา (physiology) พันธุศาสตร์ (genetics) ชีวเคมี (biochemistry) และ โรคพืช (plant pathology) เช่น การศึกษาถึงอิทธิพลของสารที่ส่งเสริมและยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช ศึกษารูปร่างและลักษณะของโครโมโซมเมื่อเกิดการกลายพันธุ์ ศึกษาขั้นตอนต่างๆในทางชีวเคมีของพืช เช่น การสร้างสารต่างๆ ศึกษาขั้นตอนการแพร่ระบาดของโรคพืช เนื้อเยื่อพืช เป็นต้น

ไพล *Zingiber purpureum* Rosc.(Syn.***Z.cassumunar*** Roxb.)

ชื่อพื้นเมือง

ภาคเหนือ	ปูลอย,ปูเลย
ภาคกลาง	ว่านไฟ
เงี้ยว,แม่ฮ่องสอน	มิ้นสะล่าง

วงศ์ Zingiberaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหิดล, 2529)

ไพลเป็นพืชล้มลุก ลำต้นเป็นเหง้าขนาดใหญ่อยู่ในดิน เปลือกนอกสีน้ำตาลแกมเหลือง เนื้อในมีสีเหลือง มีกลิ่นเฉพาะ แทงหน่อหรือลำต้นเทียมขึ้นเป็นกอ ประกอบด้วยกาบลำต้นเทียมสูงพ้นดินขึ้นมา 80-150 เซนติเมตร

ใบ เป็นชนิดใบเดี่ยว ออกเรียงสลับกันเป็นสองแถว รูปขอบขนานแกมรูปหอก

เกลี้ยงๆ เนื้อใบค่อนข้างบาง เรียบ ขอบใบจะห้อยลู่ลง ปลายใบสอบ โคนใบสอบแคบ และจะเป็นกาบหุ้มลำต้นเทียม ตรงช่วงต่อระหว่างตัวใบกับกาบจะหักโค้งเป็นข้อศอก

ดอก สีขาว ออกรวมกันเป็นช่อ รูปเห็ดหรือรูปกระบองโบราณ ซึ่งแทงขึ้นมาจากเหง้า ชูก้านสูงขึ้นมา 20-30 เซนติเมตร ทุกดอกมีกาบสีเขียวปนแดงเรื่อๆ รูปโค้งๆห่อรองรับ กาบจะปิดแน่นเมื่อดอกยังอ่อนอยู่ และจะขยายอ้าให้เห็นดอกในภายหลัง กลีบดอกและกลีบรองกลีบดอกมีอย่างละ 3 กลีบ อุ้มน้ำโคนกลีบ ดอกม้วนห่อ ส่วนปลายกลีบผายกว้างออก เกสรตัวผู้มี 6 อัน

ผล กลม แข็ง โต มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร

นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์

ถิ่นกำเนิดของไพล ยังไม่มีหลักฐานทราบแน่ชัด แต่พบปลูกกันทั่วไปในแถบทวีปเอเชีย เช่น อินเดีย มาเลเซีย อินโดนีเซีย และไทย คนไทยนิยมปลูกไว้ตามบ้านเรือน ชอบดินเหนียวปนทรายที่มีอินทรีย์วัตถุมาก การระบายน้ำดี ไม่ชอบน้ำขังแฉะ แสงแดดพอควร

สรรพคุณในตำรายาไทย (ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหิดล, 2529)

เหง้า ขับระดู ขับโลหิตร้าย แก้อาเจียน แก้ปวดฟัน แก้โลหิตออกทางปาก ทางจมูก แก้อาเจียนเป็นโลหิต ขับลมในลำไส้ ขับลม แก้บิด เป็นยาระบาย แก้เด็กเป็นไข้สูง ตัวสั่น ตาเหลือก แก้ข้อเท้าแพลง กดประสาทหัวใจ แก้เลือดกำเดาออกทางจมูก แก้บวดบวม แก้เคล็ดยอก แก้เหน็บชา แก้โรคผิวหนัง ป้องกันการติดเชื้อ ทำให้แผลหายเร็วเป็นพิเศษ ดูดหนอง สมานแผล

ต้น แก้ธาตุพิการ แก้อุจจาระพิการ

ใบ แก้ไข้ แก้ปวดเมื่อย แก้ครั่นเนื้อครั่นตัว

ดอก ขับโลหิต กระจายเลือดเสีย แก้เลือด ช่วยกระจายเลือด ทำลายโลหิตเสีย ขับระดูประจำเดือน แก้เลือดกำเดา แก้ครั่นเนื้อครั่นตัว แก้ปวดเมื่อยตามร่างกาย

การขยายพันธุ์พืชในวงศ์ Zingiberaceae ทำได้โดยการใช้เหง้า (rhizome) ซึ่งต้องตัดเหง้าที่สมบูรณ์ มีขนาดใหญ่ อวบอ้วน ปราศจากโรคและแมลง และมีการเก็บรักษาที่ถูกต้อง การขยายพันธุ์วิธีนี้เป็นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ทำให้ได้สายพันธุ์คงที่ แต่ทำได้ช้า การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นอีกวิธีที่เป็น

การขยายพันธุ์ที่ไม่อาศัยเพศ ซึ่งวิธีนี้นำมาใช้ในการขยายพันธุ์ ให้ได้ปริมาณมากและรวดเร็วกว่า (Hosoki และ Sagawa, 1977, Reghunath และ Bajaj, 1992 และ Poonsapaya และ Kraisintu, 1993) เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้สามารถใช้ในการปรับปรุงและคัดเลือกพันธุ์ เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ดีและเหมาะสมต่อการเพาะปลูกได้

Hosoki และ Sagawa (1977) ได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการขยายพันธุ์ขิง และได้ต้นขิงที่มีความแปรปรวนต่ำ และวิธีนี้ยังสามารถทำให้เหง้า (rhizome) ของขิง มีคุณภาพดีได้ โดยการใช้สารอาหารที่แตกต่างกัน (Ikeda และ Tanabe, 1989) ได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ขิง โดยการใช้สารก่อการกลายพันธุ์ (ปิยะดา, 2531)

Poonsapaya และ Kraisintu (1993) ได้ทำการขยายพันธุ์ไพล โดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่าเมื่อนำยอดไพล (*Zingiber purpureum* Rosc.) มาเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) ที่เหมาะสมจะชักนำให้เกิดการแตกยอดใหม่ได้ โดยผ่านการเจริญมาจาก protocorm-like structure

เหง้าไพลมีน้ำมันหอมระเหย (essential oil) ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดเมื่อย ปวดบวมจากกล้ามเนื้ออักเสบ เคล็ดขัดยอก ฟกช้ำ (Wasuwat, 1984) ปัจจุบันทางองค์การเภสัชกรรม นำน้ำมันไพลมาเป็นส่วนผสมในตำรับยามีชื่อว่า "ครีมไพลจีซาล" (Plygesal cream) แต่ในปัจจุบันประสบปัญหาการขาดแคลนน้ำมันไพล ทั้งนี้เนื่องมาจากโดยธรรมชาติแล้วไพลให้ปริมาณน้ำมันไพลต่ำ และถ้าเก็บเหง้าไพลในระยะที่ต้นไพลยังอ่อนอยู่แล้วจะทำให้ได้ น้ำมันไพลที่มีคุณภาพไม่ได้มาตรฐาน ตามที่องค์การเภสัชกรรมกำหนดไว้ ทำให้นำน้ำมันไพลมาใช้ผลิตยาไม่ได้ ถ้าสามารถพัฒนาพันธุ์ไพลที่ให้ปริมาณน้ำมันไพลสูงและมีคุณภาพได้มาตรฐานก็จะเป็นผลดีต่ออุตสาหกรรมการผลิตยา ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ไพลโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ร่วมกับการใช้สารโคลชิซินและรังสีแกมมา จะส่งผลให้เกิดการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ปริมาณน้ำมันไพลสูงหรือให้น้ำมันไพลที่มีคุณภาพดีขึ้นได้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์และสารเคมี

1.พืชทดลอง

protocorm-like structure ของไพล (*Zingiber purpureum* Rosc)

ขนาดความสูงประมาณ 0.5±0.2 เซนติเมตร

2.สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใช้เกลือซึ่งเป็นธาตุอาหารหลัก (macronutrients) และ ธาตุอาหารรอง (micronutrients) ชนิด AR (analytical reagent) ตามสูตร Linsmaier and Skoog (1965) ดูภาคผนวก

2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators)

BAP (6-benzylaminopurine)

2.3 สารอินทรีย์

น้ำตาลซูโครส

2.4 สารที่ใช้ปรับ pH

2.4.1 โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล

2.4.2 กรดไฮโดรลิก 0.1 นอร์มอล

2.5 สารที่ทำให้อาหารแข็งตัว

วุ้นผง (agar)

2.6 สีย้อมโครโมโซม

2.6.1 8-ไฮดรอกซีควิโนลิน (8-hydroxyquinoline) 0.002 นอร์มอล

2.6.2 กรดอะซิติก 45 เปอร์เซนต์

2.6.3 เอธิลแอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซนต์

2.6.4 อะซิโตคาร์มีน (acetocarmine)

2.7 สารฆ่าเชื้อในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ

เอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์

2.8 โคลชิซิน (colchicine)

3. อุปกรณ์

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ บิกเกอร์ ปิเปต กระบอกตวง ขวดสำหรับเก็บ stock ขวดวัดปริมาตร เป็นต้น

3.2 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นขวดแก้วสำหรับใส่อาหารพร้อมฝาพลาสติกทนความร้อน ขนาดเล็ก กลาง และใหญ่

3.3 อุปกรณ์สำหรับตัดเนื้อเยื่อ เช่น มีดผ่าตัด ปากคีบ พร้อมถาดใส่เพื่อใช้ในการนึ่งฆ่าเชื้อ

3.4 สไลด์ และกระจกปิดสไลด์

3.5 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish) พร้อมกล่องใส่

3.6 ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ (laminar air flow cabinet)

3.7 เครื่องฉายแกมมาเตอร์ (gammator irradiation unit)

3.8 เครื่องชั่งหยาบ (ทศนิยม 2 ตำแหน่ง) และเครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)

3.9 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)

3.10 เตาสำหรับต้มอาหาร

3.11 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3.12 กล้องจุลทรรศน์ compound microscope

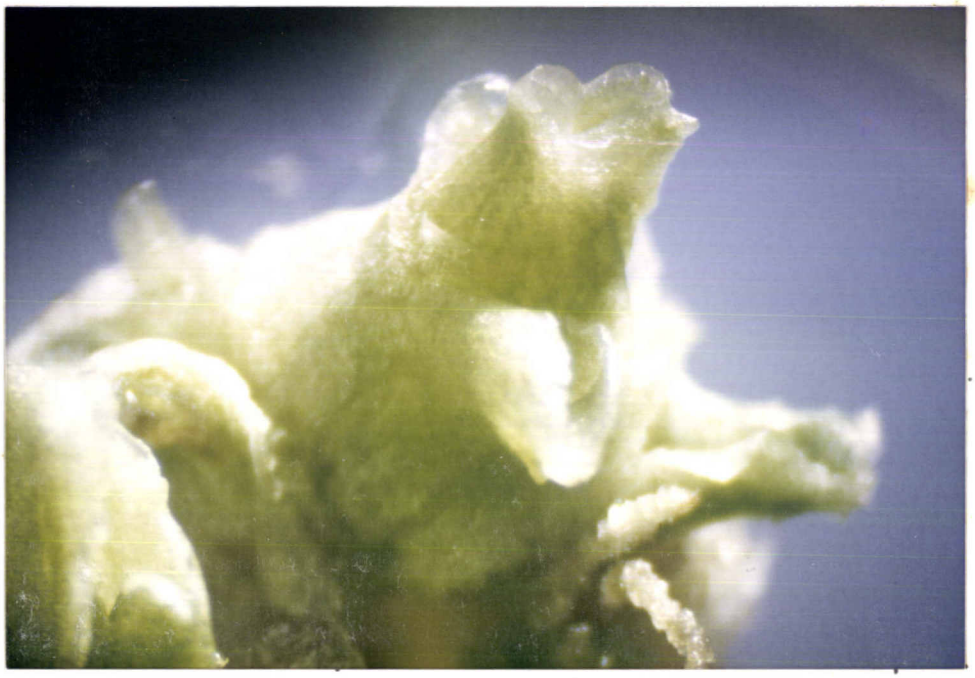
4. **ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ** มีชั้นที่มีแสงสว่างโดยหลอด fluorescent Philips TL 40W/33 cool white ตลอด 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส

วิธีการทดลอง

1.การเตรียมพืชทดลอง

ย้ายไพลเพิ่มจำนวน protocorm-like structure (รูปที่ 5)

นำชิ้นส่วนของไพลมาตัดส่วนที่ตายออกและแยก protocorm-like structure ย้ายลงขวดซึ่งมีอาหารแข็งสูตร Linsmaier and Skoog (1965) ที่มีน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และวุ้น 1 เปอร์เซนต์ pH 5.5 (Poonsapaya and Kraisintu, 1993) เลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อจน protocorm-like structure มีขนาด 0.5-1.0 เซนติเมตร และมีจำนวนมากเพียงพอต่อการทดลองต่อไป



รูปที่ 5 Protocorm-like structure ของไพล (24X)

2.การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลายโคลชิซิน

2.1 การเตรียมสารละลายโคลชิซิน

ชั่งสารโคลชิซิน 20 30 และ 60 มิลลิกรัมโดยเครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด ละลายด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร จะได้สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.10 0.15 และ 0.30 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ กรองสารละลายโคลชิซิน โดยใช้เยื่อกรอง ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ในภาชนะที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2.2 นำ protocorm-like structure ของไพล แช่ในสารละลายโคลชิซินที่มีความเข้มข้น 0 0.10 0.15 และ 0.30 เปอร์เซนต์ตามลำดับ อีกส่วนหนึ่งนำมาเลี้ยงลงในอาหารแข็งสูตร LS ที่มีน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้น 1 เปอร์เซนต์ pH 5.5 เพื่อใช้เป็น protocorm-like structure เปรียบเทียบกับที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซิน

2.3 เก็บ protocorm-like structure จากสารละลายโคลชิซินทุก 2 4 และ 6 ชั่วโมงตามลำดับ ลงเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร LS ที่มีน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร และ BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้น 1 เปอร์เซนต์ pH 5.5 นำไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.4 เก็บผลการทดลองทุก 4 สัปดาห์ พร้อมกับเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใหม่ และแยก protocorm-like structure รุ่นลูกซึ่งมีขนาด 0.3-0.5 เซนติเมตร ออกจากต้นแม่

3.การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการฉายรังสีแกมมา (gamma-ray)

3.1 นำ protocorm-like structure ที่มีขนาด 0.5-1.0 เซนติเมตร ที่อยู่ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ วางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบน turntable ใส่เข้าใน irradiation chamber และฉายรังสีแกมมา 0 1 3 5 7 และ 9 กิโลแรด

3.2 นำ protocorm-like structure ที่ถูกฉายรังสีแล้ว เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่มีน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และวุ้น เปอร์เซนต์ pH 5.5 เลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.3 เก็บผลการทดลองทุก 4 สัปดาห์ พร้อมกับเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใหม่และแยก protocorm-like structure รุ่นลูกซึ่งมีขนาดประมาณ 0.3-0.5 เซนติเมตร ออกจากต้นแม่

4. การเก็บผลการทดลอง

4.1 หาอัตรารอดชีวิตของ protocorm-like structure ที่ถูกแช่ในสารละลายโคลชิซินและที่ถูกฉายรังสี

4.2 นับจำนวน protocorm-like structure ที่เพิ่มขึ้นจาก protocorm-like structure เดิม

4.3 ตรวจสอบการกลายพันธุ์ โดยศึกษาจาก

4.3.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น สี ขนาดของลำต้น และ ใบ

4.3.2 ศึกษาจำนวนโครโมโซม (chromosome)

นำต้นไพลที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ มาตัดปลายรากเวลา 10.30-11.00 นาฬิกา ล้างวุ้นที่ติดมากับรากด้วยน้ำกลั่นจนรากสะอาด แช่รากใน 8-ไฮดรอกซีควิโนลิน ที่มีความเข้มข้น 0.002 นอร์มอล เก็บไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำรากเปลี่ยนลงในสารละลายที่ประกอบด้วย กรดอะซิติก และเอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ ในอัตราส่วน 1:1 เก็บไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 17 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย เอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ นำมาย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 1 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นเปลี่ยนลงในสารละลายกรดอะซิติก 45 เปอร์เซนต์ เก็บไว้ในตู้เย็น 30 นาที จึงคีบรากออกมาวางบนสไลด์ ใช้มีดตัดให้เหลือเฉพาะปลายรากที่มีความยาวประมาณ 2-3 มิลลิเมตร หยดสีอะซิโตคาร์มีน 1 หยด ลนไฟอ่อนๆ จากตะเกียงแอลกอฮอล์ ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำสไลด์วางบนกระดาษซับ ใช้กระดาษซับอีกแผ่น วางบนสไลด์ ใช้นิ้วหัวแม่มือกดบนกระดาษซับให้ทั่วสไลด์ เพื่อให้เซลล์ของรากอยู่ในระนาบเดียวกัน และซับสีส่วนที่ไม่ต้องการ นำไปตรวจนับจำนวนโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์ compound microscope

4.3.3 ศึกษาขนาดของปากใบ (stomata)

ทำการลอกผิวใบด้านล่างของใบ วางบนสไลด์ หยดน้ำกลั่นหนึ่งหยดแล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ compound microscope วัดความยาวและความกว้างของปากใบ โดยใช้ ocular micrometer หาค่าเฉลี่ยจาก 10 stomata และนับจำนวนปากใบโดยใช้ indexed square หาค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. อัตรารอดชีวิตของ protocorm-like structure

1.1 ผลของสารละลายโคลชิซิน

protocorm-like structure ที่แช่ในสารละลายโคลชิซินที่มีความเข้มข้น 0 0.1 0.15 และ 0.3เปอร์เซนต์ มีอัตรารอดชีวิตลดลงตามลำดับในทุกสายพันธุ์ (P30201 P30103 และ P30801) และมีค่า LD_{50} ประมาณ 0.075 เปอร์เซนต์ และ 0.125 เปอร์เซนต์ ใน P30801 และ P30201 ตามลำดับ (รูปที่ 6) และอัตรารอดชีวิตของ protocorm-like structure จะลดลงเมื่อแช่ลงในสารละลายโคลชิซิน 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ ในทุกสายพันธุ์ (P30103 P30201 และ P30801) (รูปที่ 7 และ 8)

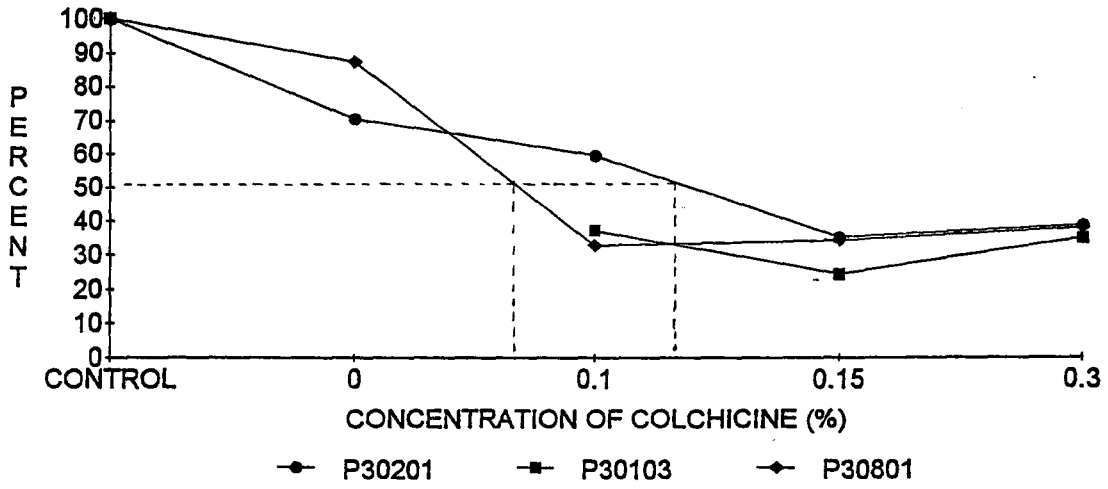
1.2 ผลของรังสีแกมมา

อัตรารอดชีวิตของ protocorm-like structure ที่ได้รับการฉายรังสีแกมมา ปริมาณ 1 3 5 7 และ 9 กิโลแรด ลดลงตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ protocorm-like structure ที่ไม่ได้รับการฉายรังสี (รูปที่ 9) โดยมีค่า LD_{50} ประมาณ 2 กิโลแรด และ protocorm-like structure ตายหมดเมื่อได้รับการฉายรังสีปริมาณ 9 กิโลแรด (รูปที่ 10) ซึ่งมีผลรุนแรงกว่าผลของสารละลายโคลชิซิน

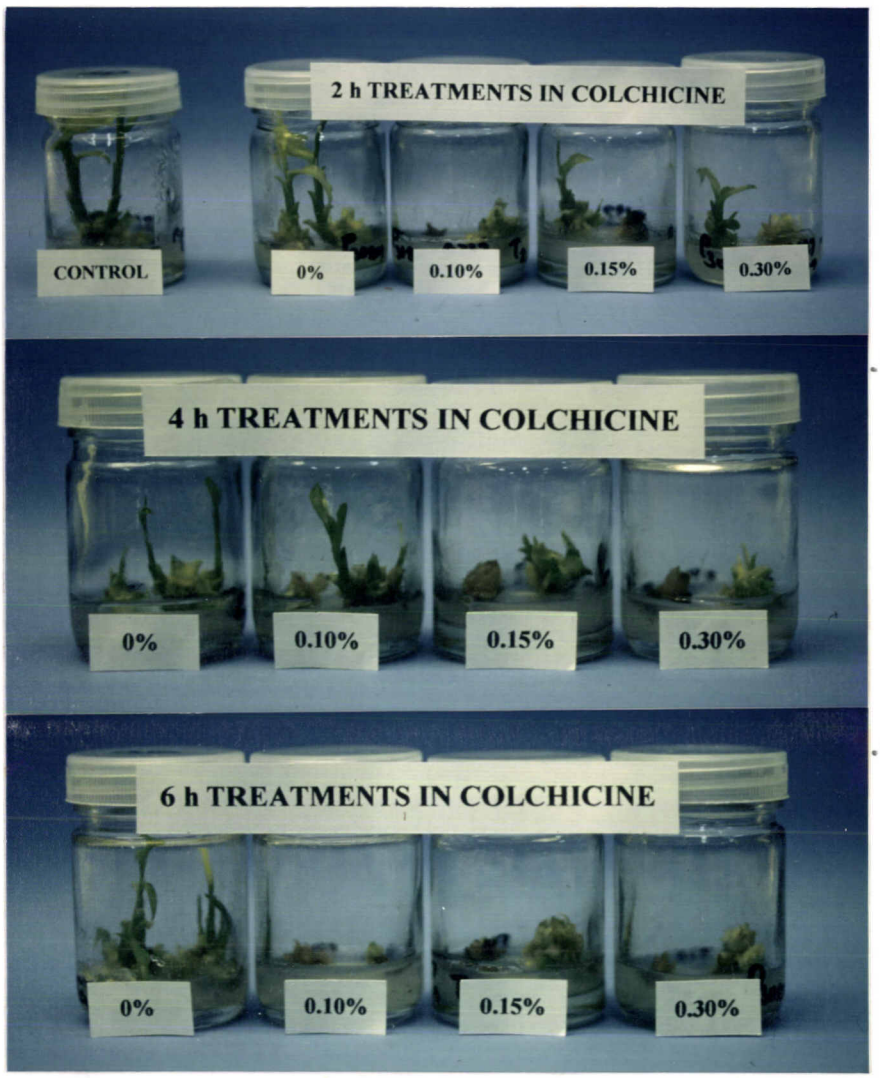
2. การเจริญของ Protocorm-like structure

2.1 ผลของสารละลายโคลชิซิน

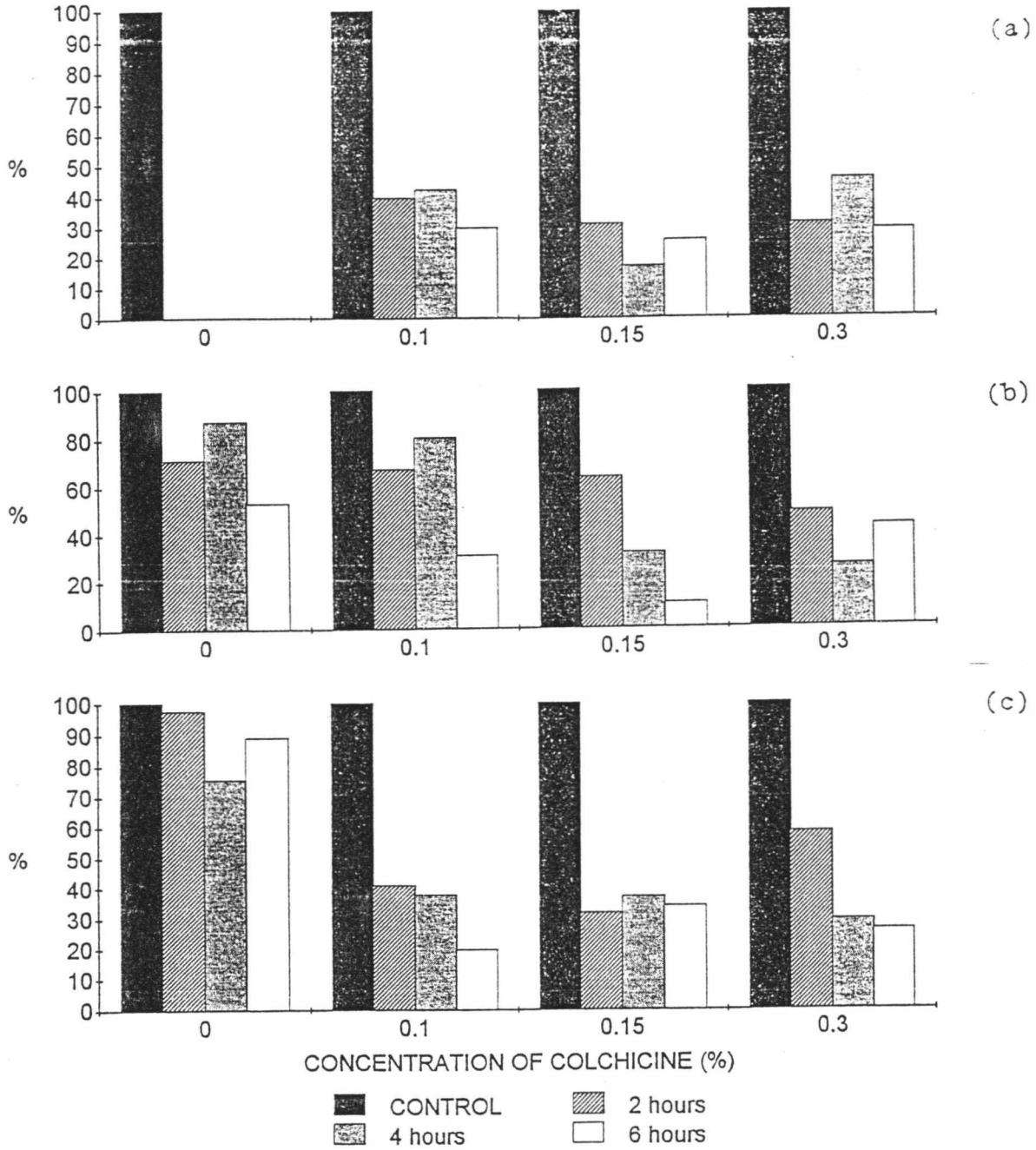
การแตกหน่อของ protocorm-like structure โดยเฉลี่ยในทุกสายพันธุ์ลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินเพิ่มขึ้นตามลำดับ และจะลดลงเมื่อแช่ในสารละลายโคลชิซินนานขึ้น (รูปที่ 11) ทั้งนี้เนื่องจากผลของสารละลายโคลชิซินซึ่งมีอันตรายต่อเซลล์พืช โดยมีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญได้ สารละลายโคลชิซินมีผลต่อการแตกหน่อของสายพันธุ์ P30201 โดยสายพันธุ์นี้จะมีการแตกหน่อมากเมื่อแช่



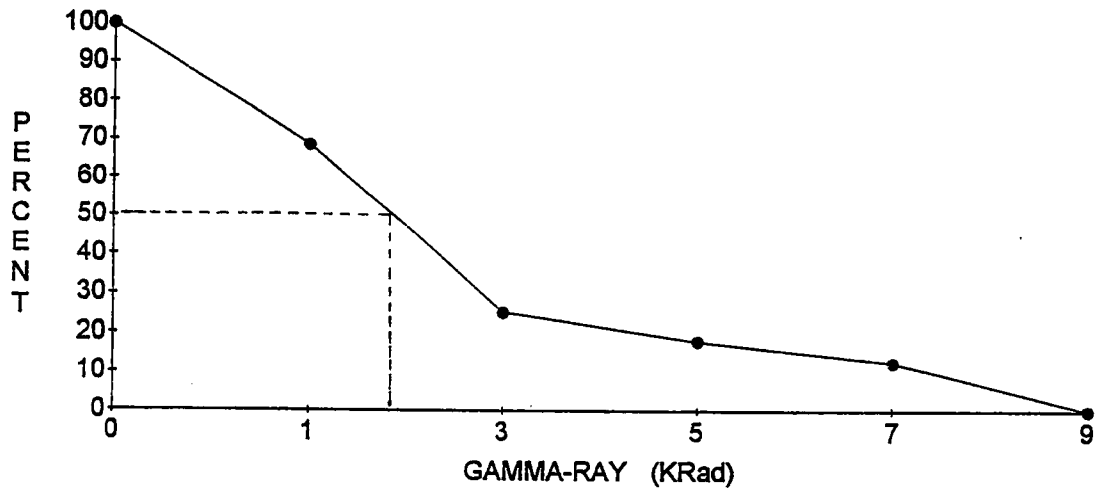
รูปที่ 6 อัตรารอดชีวิตของ protocorm-like structure (เปอร์เซนต์เปรียบเทียบกับ control) หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน 0 0.1 0.15 0.3 เปอร์เซนต์ เปรียบเทียบกับ protocorm-like structure ที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน (control) แล้ว เป็นเวลา 4 สัปดาห์



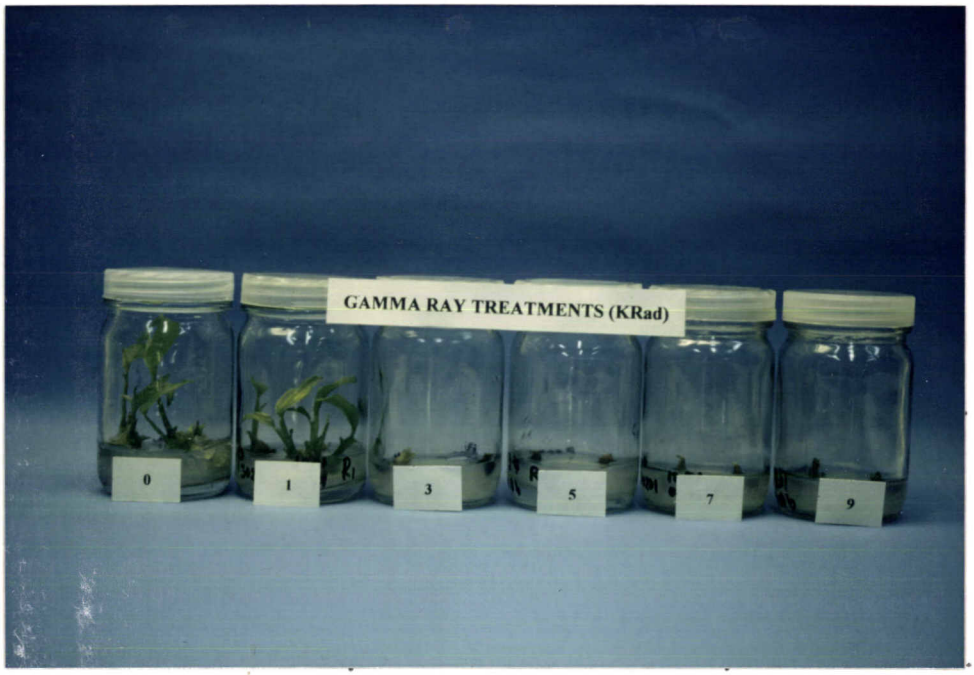
รูปที่ 7 การเจริญของ protocorm-like stucture หลังจากได้รับสารละลายโคชิชิน 0 0.1 0.15 0.3 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา (a) 2 (b) 4 และ (c) 6 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ protocorm-like stucture ที่ไม่ได้รับสารละลายโคชิชิน (control) แล้วเป็นเวลา 4 สัปดาห์



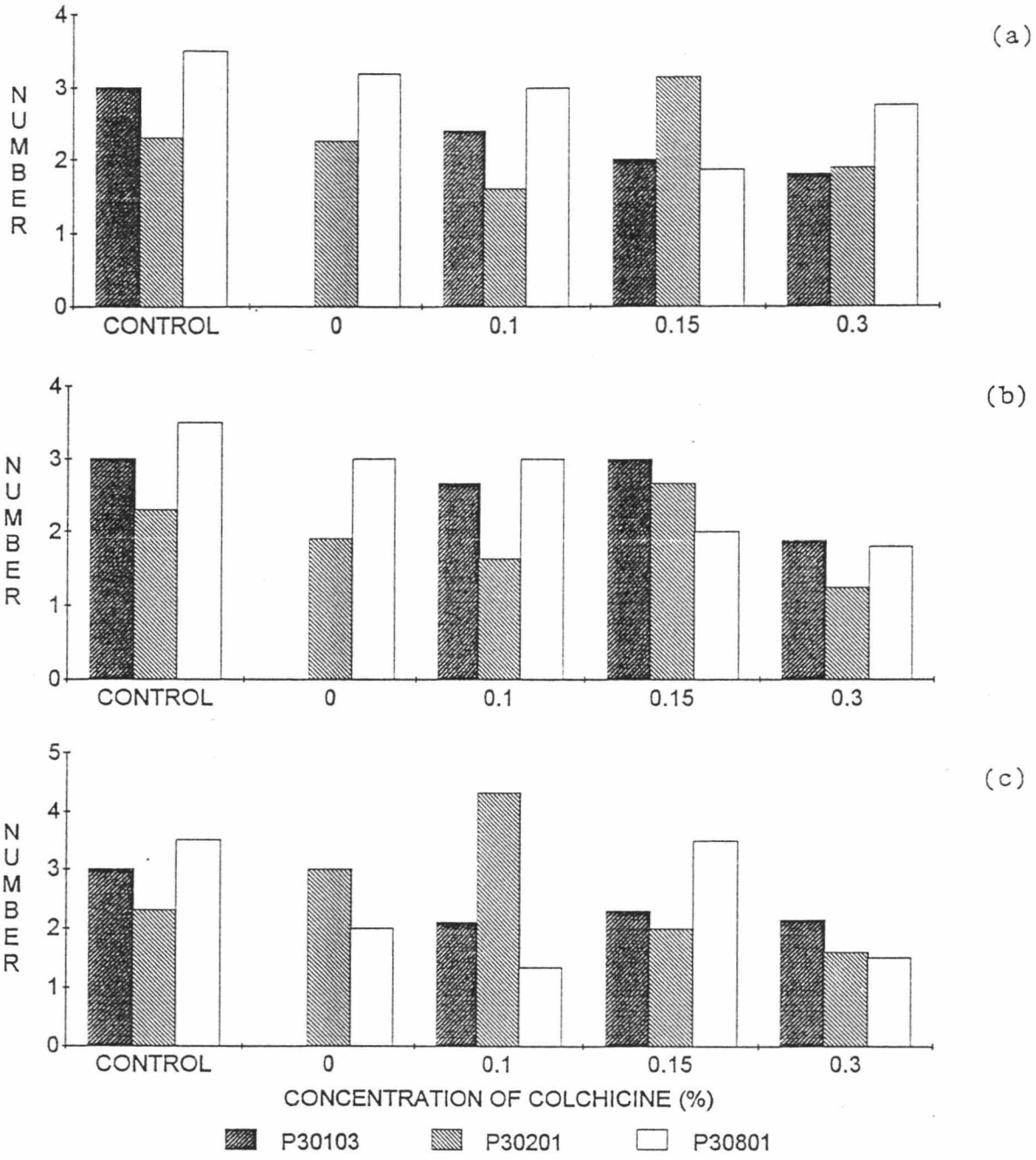
รูปที่ 8 อัตรารอดชีวิตของ protocorm-like structure (เปอร์เซนต์เปรียบเทียบกับ control) สายพันธุ์ P30103 (a) P30201 (b) และ P30801 (c) หลังจากได้รับสารละลายโคลชิชิน 0 0.1 0.15 0.3 เปอร์เซนต์ เปรียบเทียบกับ protocorm-like structure ที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิชิน (control) แล้วเป็นเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 9 อัตรารอดชีวิตของ protocorm-like structure (เปอร์เซนต์เปรียบเทียบกับ control) หลังจากได้รับการฉายรังสีแกมมา 1 3 5 7 และ 9 กิโลแรด เปรียบเทียบกับ protocorm-like structure ที่ไม่ได้รับการฉายรังสี แล้วเป็นเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 10 การเจริญของ Protocorm-like structure หลังจากได้รับการฉายรังสีแกมมา 1 3 5 7 และ 9 กิโลแรด เปรียบเทียบกับ Protocorm-like structure ที่ไม่ได้รับการฉายรังสี แล้วเป็นเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 11 การแตกหน่อของ protocorm-like structure (จำนวน protocorm-like structure เฉลี่ยต่อสายพันธุ์) ของรุ่น M0 สายพันธุ์ P30103 P30201 และ P30801 หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน 0 0.1 0.15 และ 0.3 เปอร์เซนต์ นาน (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมง แล้ว เป็นเวลา 4 สัปดาห์

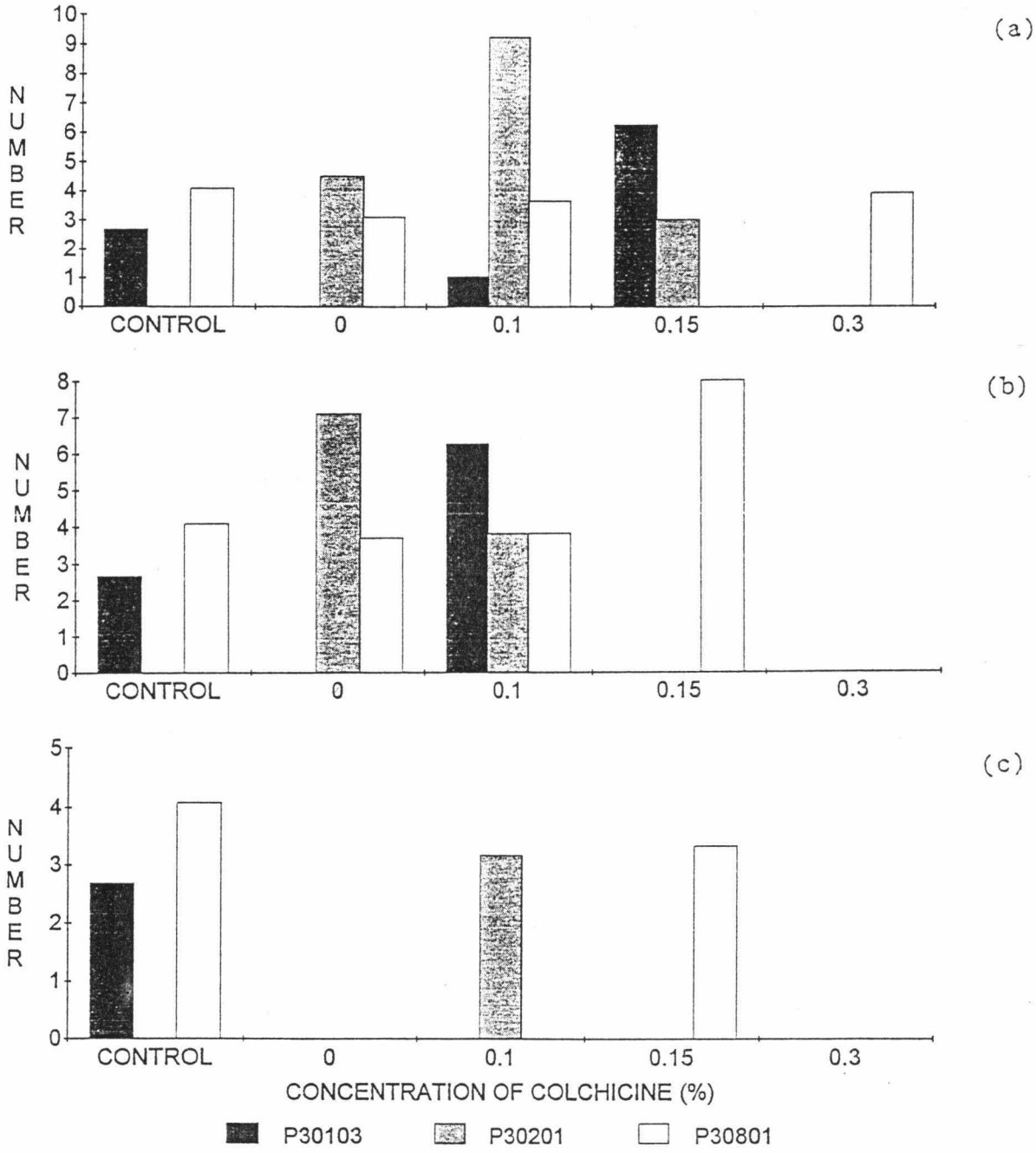
protocorm-like structure ในสารละลายโคลชิชินที่มีความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 หรือ 4 ชั่วโมง และเมื่อแช่ในสารละลายโคลชิชินที่มีความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เทียบกับ control ซึ่งไม่ได้รับสารละลายโคลชิชิน และเมื่อแช่ protocorm-like structure ในน้ำ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารละลายโคลชิชินที่ระดับดังกล่าว มีผลต่อการแตกหน่อของสายพันธุ์นี้มากกว่าสายพันธุ์อื่น

เมื่อย้าย protocorm-like structure ที่ได้จากการเลี้ยงมาแล้ว 4 สัปดาห์ (M1) ลงในอาหารใหม่ การแตกหน่อไม่สม่ำเสมอในทุกสายพันธุ์และมีการแตกหน่อน้อย และ protocorm-like structure ที่ได้รับสารละลายโคลชิชิน มีแนวโน้มการแตกหน่อมากกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิชิน (control) (รูปที่ 12)

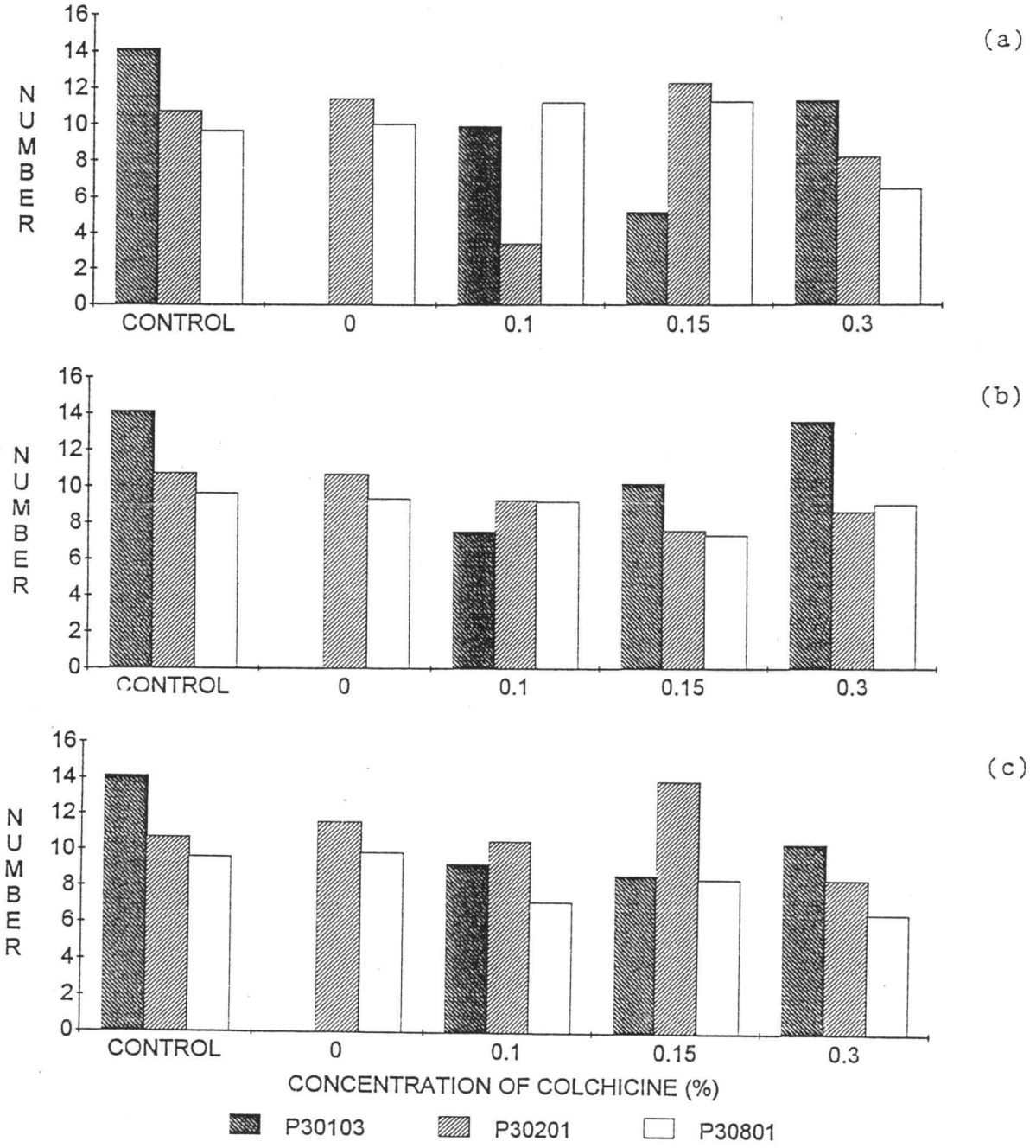
เมื่อเลี้ยง M0 ต่อไป การแตกหน่อจะเพิ่มขึ้นในทุกสายพันธุ์ และทุกความเข้มข้นของสารละลายโคลชิชิน (รูปที่ 13) โดยเฉพาะสายพันธุ์ P30201 ซึ่งมีการแตกหน่อมากกว่า control ใน protocorm-like structure ซึ่งได้รับสารละลายโคลชิชิน 0.15 เปอร์เซนต์เป็นเวลา 2 และ 6 ชั่วโมง และการแตกหน่อของรุ่น M1 ที่ได้จาก protocorm-like structure ที่ได้รับสารละลายโคลชิชิน ก็ยังคงมีแนวโน้มการแตกหน่อมากกว่า control (รูปที่ 14) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอันตรายของสารละลายโคลชิชิน ที่มีต่อเซลล์พืชลดลง และสารละลายโคลชิชินที่ความเข้มข้นน้อยมีผลกระตุ้นการแตกหน่อของ protocorm-like structure

2.2 ผลของรังสีแกมมา

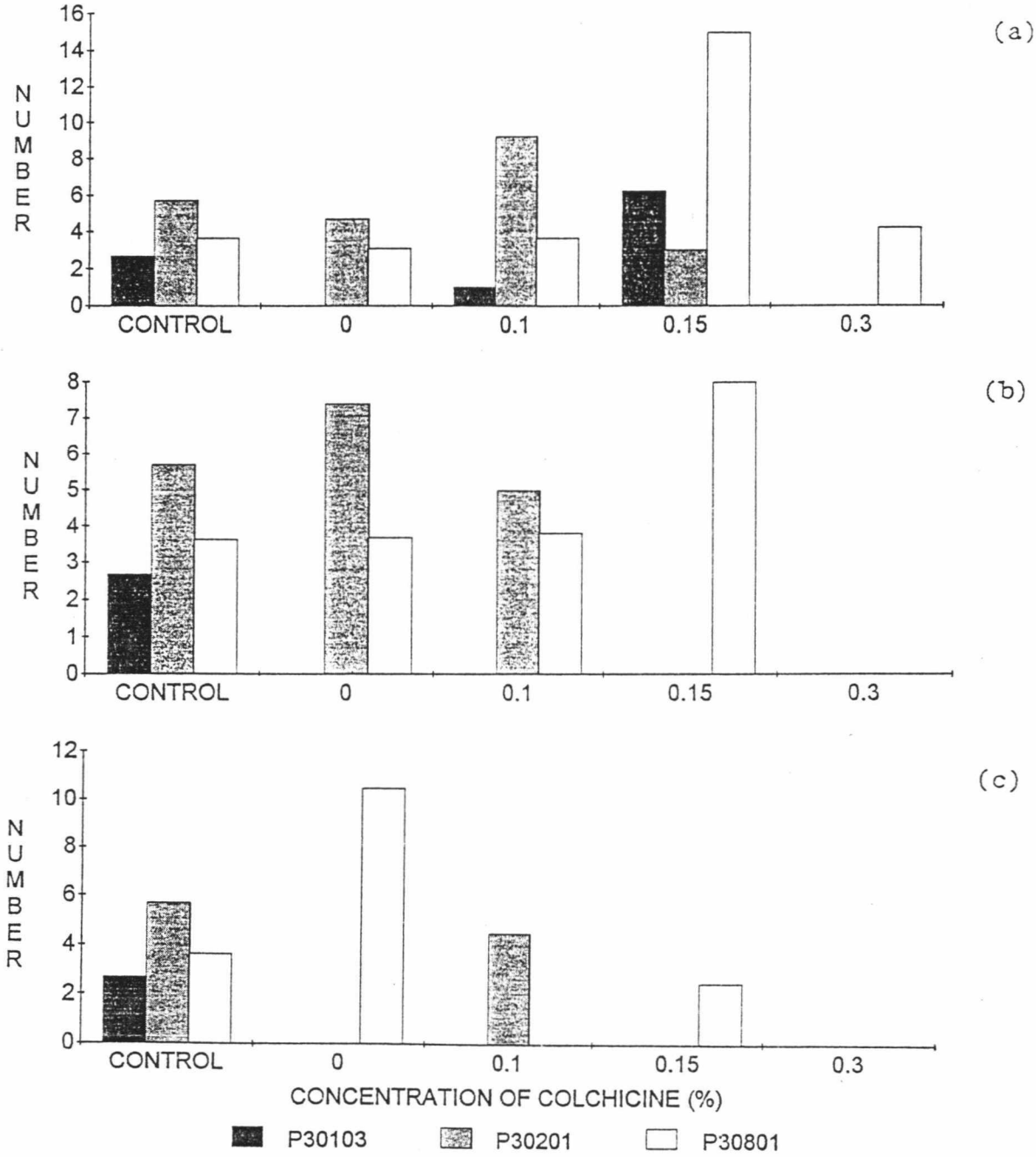
การแตกหน่อของ protocorm-like structure ลดลงเมื่อได้รับการฉายรังสีแกมมา 1 กิโลแรด และ protocorm-like structure ตายหมด เมื่อฉายรังสีที่ปริมาณ 3 5 7 และ 9 กิโลแรด (รูปที่ 15 และ 16) ทั้งนี้เนื่องจากรังสีแกมมาที่มีผลต่อเซลล์พืชมากกว่าสารละลายโคลชิชิน ซึ่งอาจเนื่องมาจากการทำลายโครโมโซมโดยตรง ในขณะที่สารละลายโคลชิชินมีผลต่อ การแบ่งเซลล์ ทำให้ความสามารถในการแบ่งเซลล์ลดลงและตายในที่สุด



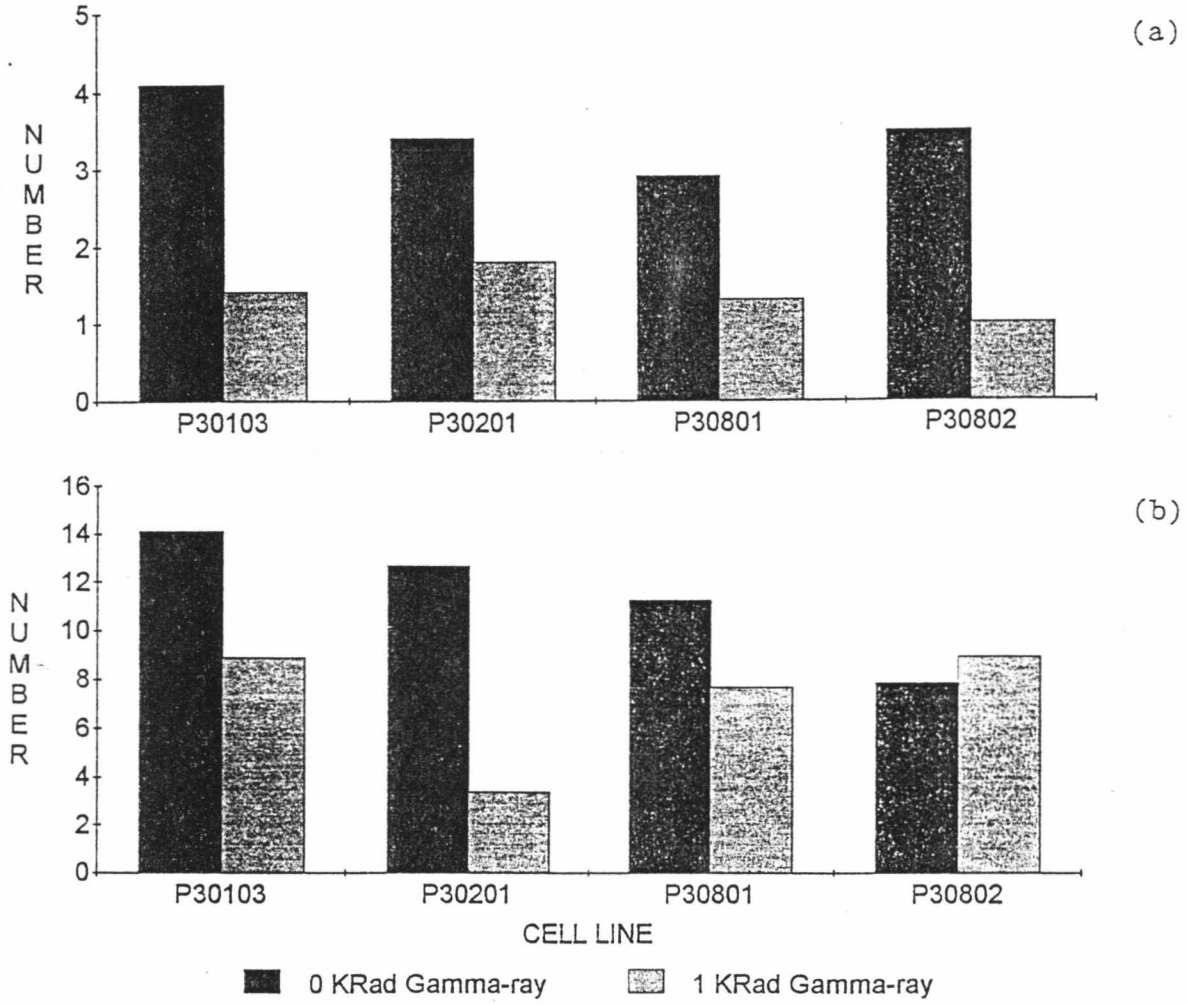
รูปที่ 12 การแตกหน่อของ protocorm-like structure (จำนวน protocorm-like structure เฉลี่ยต่อสายพันธุ์) ของรุ่น M1 สายพันธุ์ P30103 P30201 และ P30801 หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน 0 0.1 0.15 และ 0.3 เปอร์เซนต์ นาน (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมง แล้ว เป็นเวลา 4 สัปดาห์



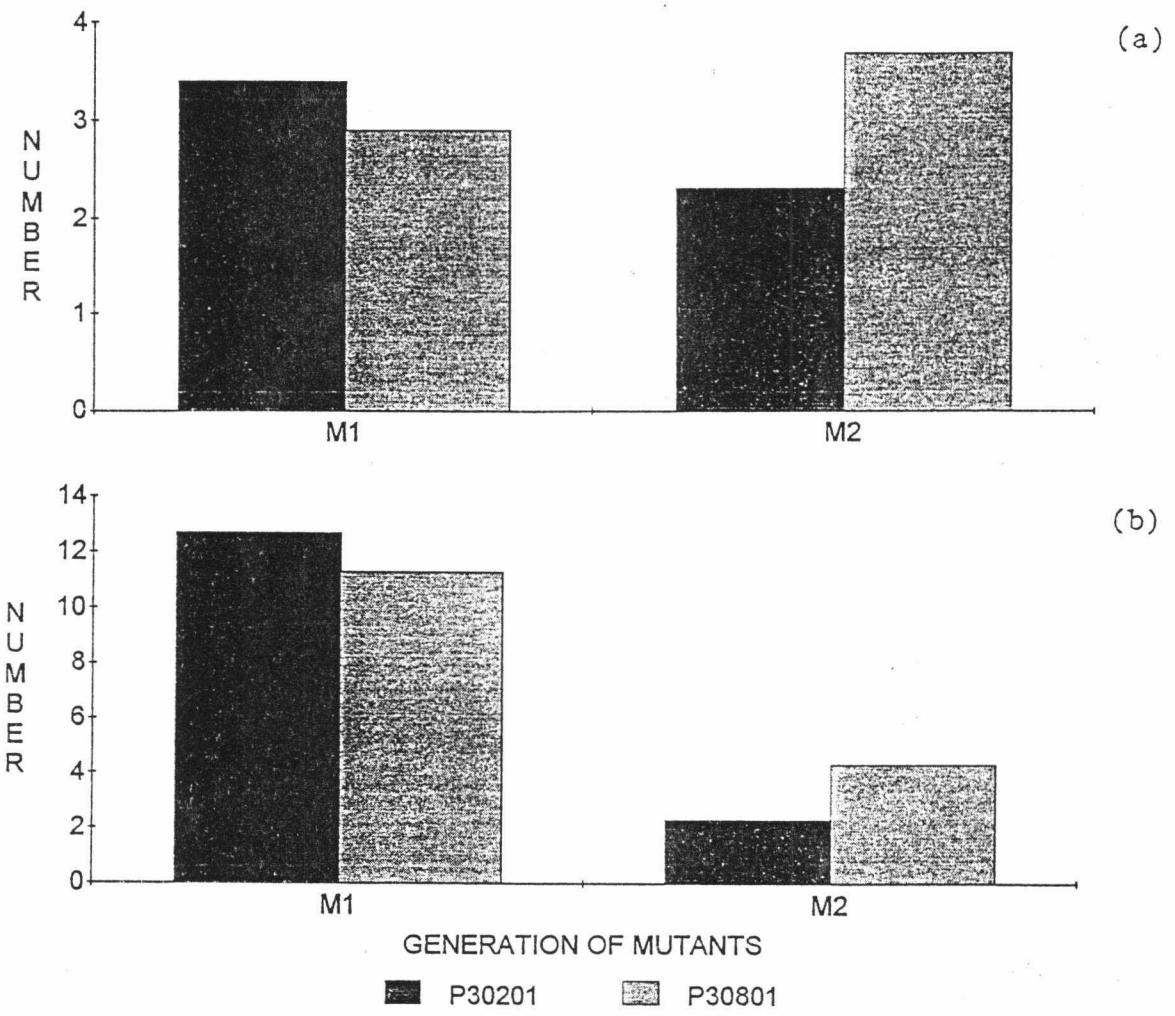
รูปที่ 13 การแตกหน่อของ protocorm-like structure (จำนวน protocorm-like structure เฉลี่ยต่อสายพันธุ์) ของรุ่น M0 สายพันธุ์ P30103 P30201 และ P30801 หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน 0 0.1 0.15 และ 0.3 เปอร์เซนต์ นาน (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมง แล้ว เป็นเวลา 8 สัปดาห์



รูปที่ 14 การแตกหน่อของ protocorm-like structure (จำนวน protocorm-like structure เฉลี่ยต่อสายพันธุ์) ของรุ่น M1 สายพันธุ์ P30103 P30201 และ P30801 หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน 0 0.1 0.15 และ 0.3 เปอร์เซนต์ นาน (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมง แล้ว เป็นเวลา 8 สัปดาห์



รูปที่ 15 การแตกหน่อของ protocorm-like structure (จำนวน protocorm-like structure เฉลี่ยต่อสายพันธุ์) ของรุ่น M0 สายพันธุ์ P30103 P30201 P30801 และ P30802 หลังจากได้รับการฉายรังสีแกมมา ปริมาณ 1 กิโลแรด แล้ว เป็นเวลา (a)4 และ (b)8 สัปดาห์



รูปที่ 16 การแตกหน่อของ protocorm-like structure (จำนวน protocorm-like structure เฉลี่ยต่อสายพันธุ์) ของรุ่น M0 และ M1 สายพันธุ์ P30201 และ P30801 หลังจากได้รับการฉายรังสีแกมมา ปริมาณ 1 กิโลแรด แล้วเป็นเวลา (a)4 และ (b) 8 สัปดาห์

2.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

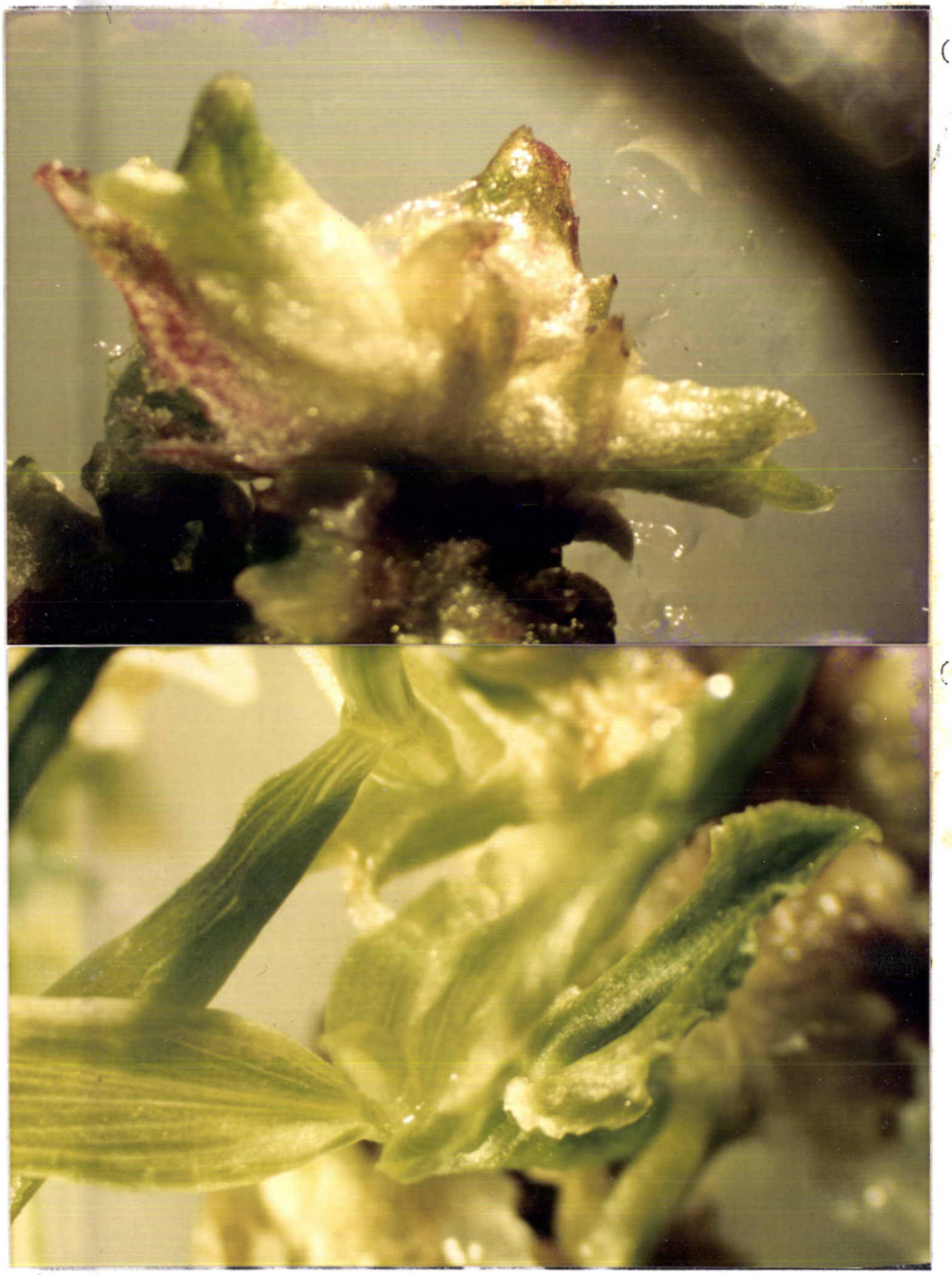
2.3.1 ลักษณะของใบ

ลักษณะของ protocorm-like structure ที่เปลี่ยนแปลงได้เอง เมื่อไม่ได้รับสารละลายโคลชิชินหรือการฉายรังสีแกมมาที่พบได้แก่ การมีกาบใบสีแดงหรือ มีใบด่าง ซึ่งพบน้อยมาก (รูปที่ 17a และ 18a ตามลำดับ) แต่ลักษณะกาบใบสีแดงพบมากเมื่อ protocorm-like structure ได้รับสารละลายโคลชิชิน 0.1 0.15 หรือ 0.3 เปอร์เซนต์

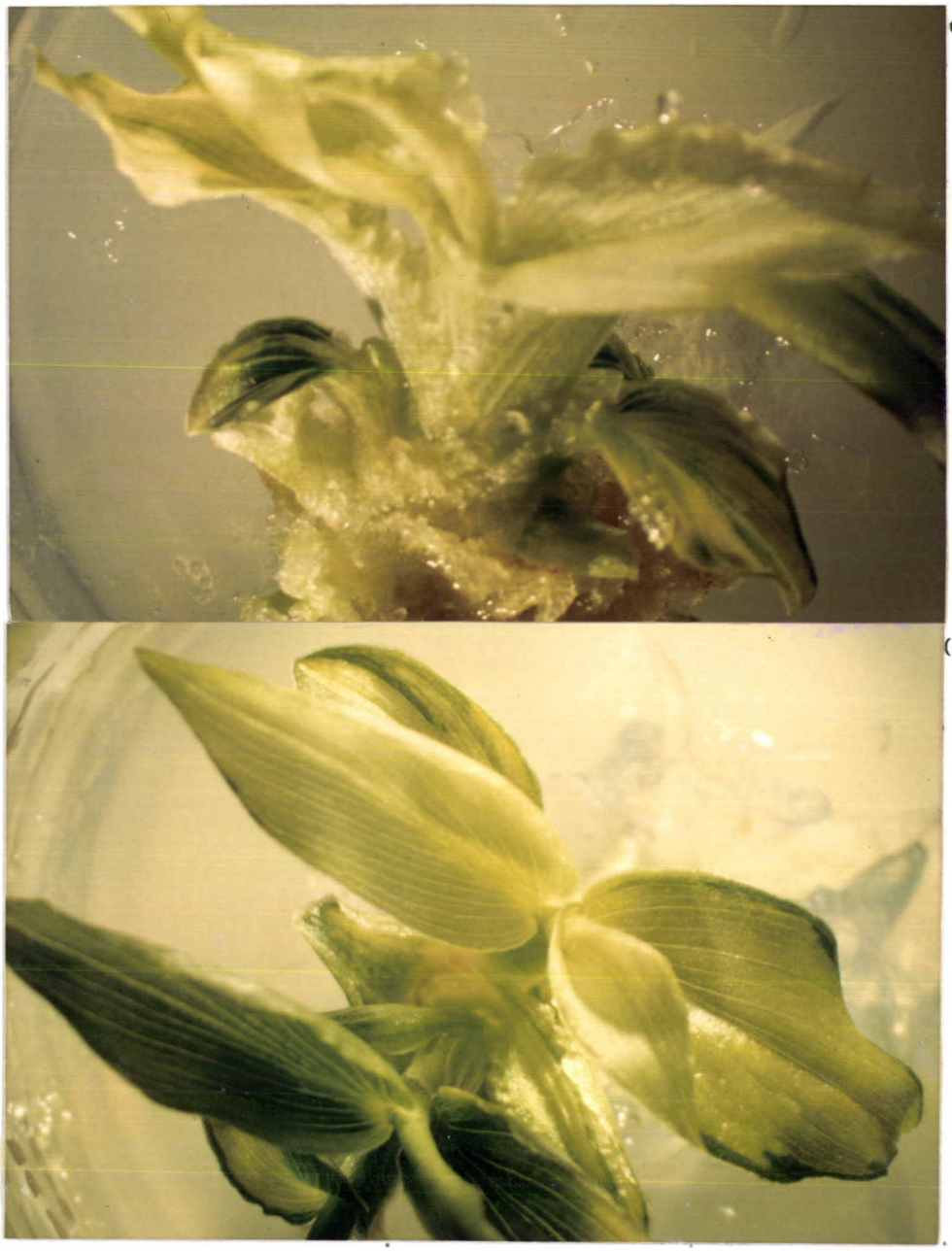
ลักษณะใบหยัก (รูปที่ 17b) การมีใบสีเหลืองขอบใบสีเขียว หรือใบมีเส้นไม่ชัดเจน (รูปที่ 18b) พบใน protocorm-like structure ที่ได้รับสารละลายโคลชิชิน 0.15 เปอร์เซนต์ นาน 4 ชั่วโมง และลักษณะใบหยักแสดงออกใน protocorm-like structure ที่ได้รับการฉายรังสีแกมมา 1 กิโลแรด อีกด้วย ลักษณะที่ผิดปกติพบมากในต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิชิน เมื่อเปรียบเทียบกับการได้รับรังสีแกมมา ทั้งนี้เพราะความเข้มข้นของสารละลายโคลชิชินมีผลต่อการทำลายโครโมโซมน้อยกว่ารังสีแกมมา ทำให้ต้นซึ่งมีการกลายพันธุ์ สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้มากกว่า และทำให้ได้ลักษณะที่เปลี่ยนไปมากมาย ซึ่งสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้

2.3.2 ผลของสารละลายโคลชิชินต่อความสูงของต้น

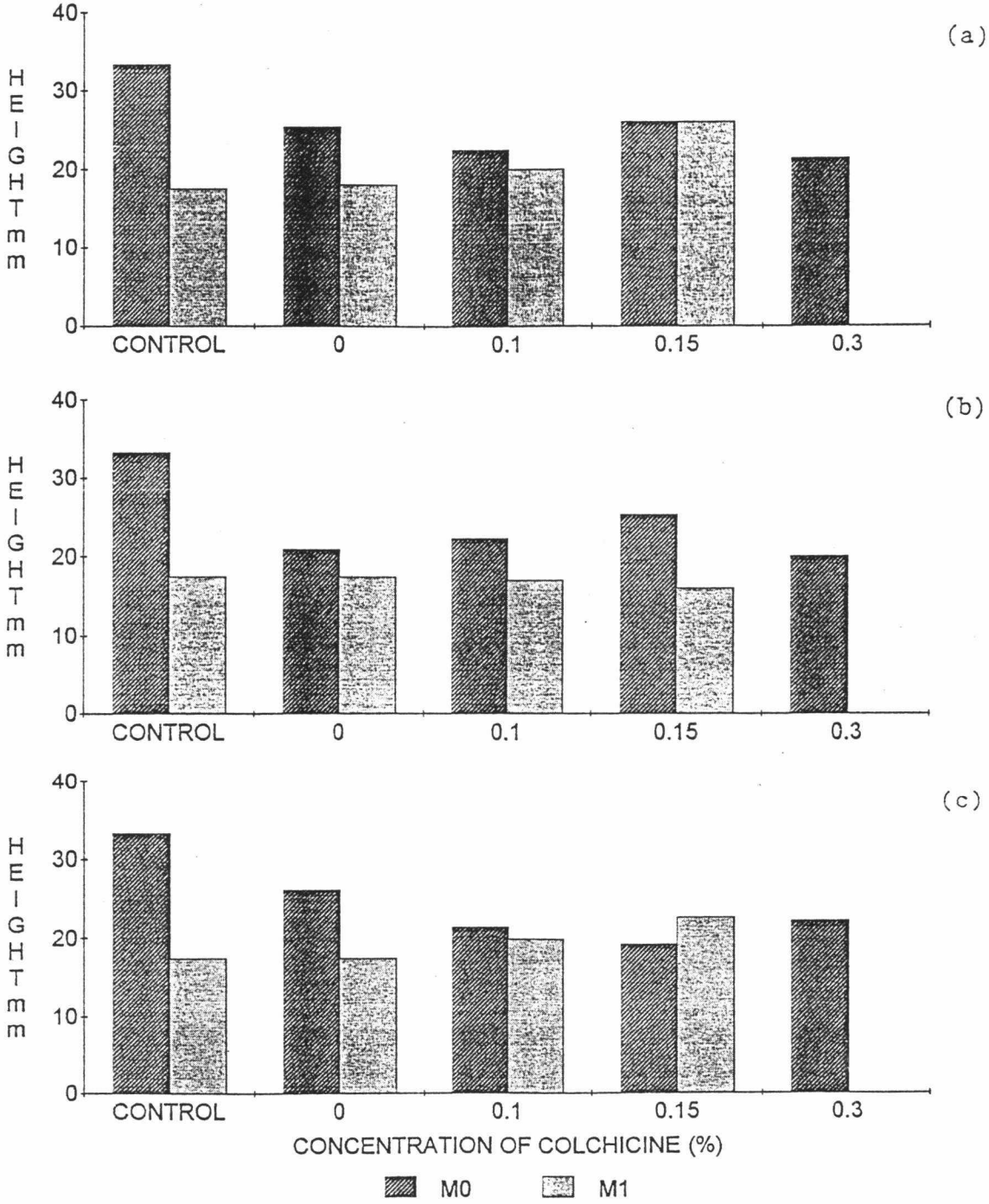
protocorm-like structure ที่ได้รับสารละลายโคลชิชิน 0.1 0.15 และ 0.3 เปอร์เซนต์ เจริญให้ต้นที่เตี้ยกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิชินและ protocorm-like structure ที่แช่ในน้ำเป็นเวลา 2 4 และ 6 ชั่วโมง ให้ต้นซึ่งเตี้ยกว่า protocorm-like structure ที่ไม่ได้แช่น้ำ (control) ทั้งในรุ่น M0 และ M1 (รูปที่ 19) ยกเว้น M1 ซึ่งเจริญมาจาก M0 ที่ได้รับสารละลายโคลชิชิน 0.15 เปอร์เซนต์ นาน 2 และ 6 ชั่วโมง ซึ่งมีความสูงมากกว่า control และต้นที่แช่ในน้ำ



รูปที่ 17 ลักษณะของใบที่ผิดปกติ (a) กาบใบสีแดง (25.5X)
(b) ขอบใบหยัก (26X)



รูปที่ 18 ลักษณะของใบที่ผิดปกติ (a) ใบด่าง (16X)
(b) ใบสีเหลืองมีขอบใบเขียวและใบมีเส้นใบชัดเจน (15.5X)



รูปที่ 19 ความสูงเฉลี่ยของต้นไพล (มิลลิเมตร) ในรุ่น M0 และ M1 หลังจากได้รับสารละลายโคลชิชิน 0 0.1 0.15 0.3 เปอร์เซนต์ นาน (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมง แล้ว 8 สัปดาห์

2.3.3 ผลของสารละลายโคลชิชินต่อความยาวใบรวม

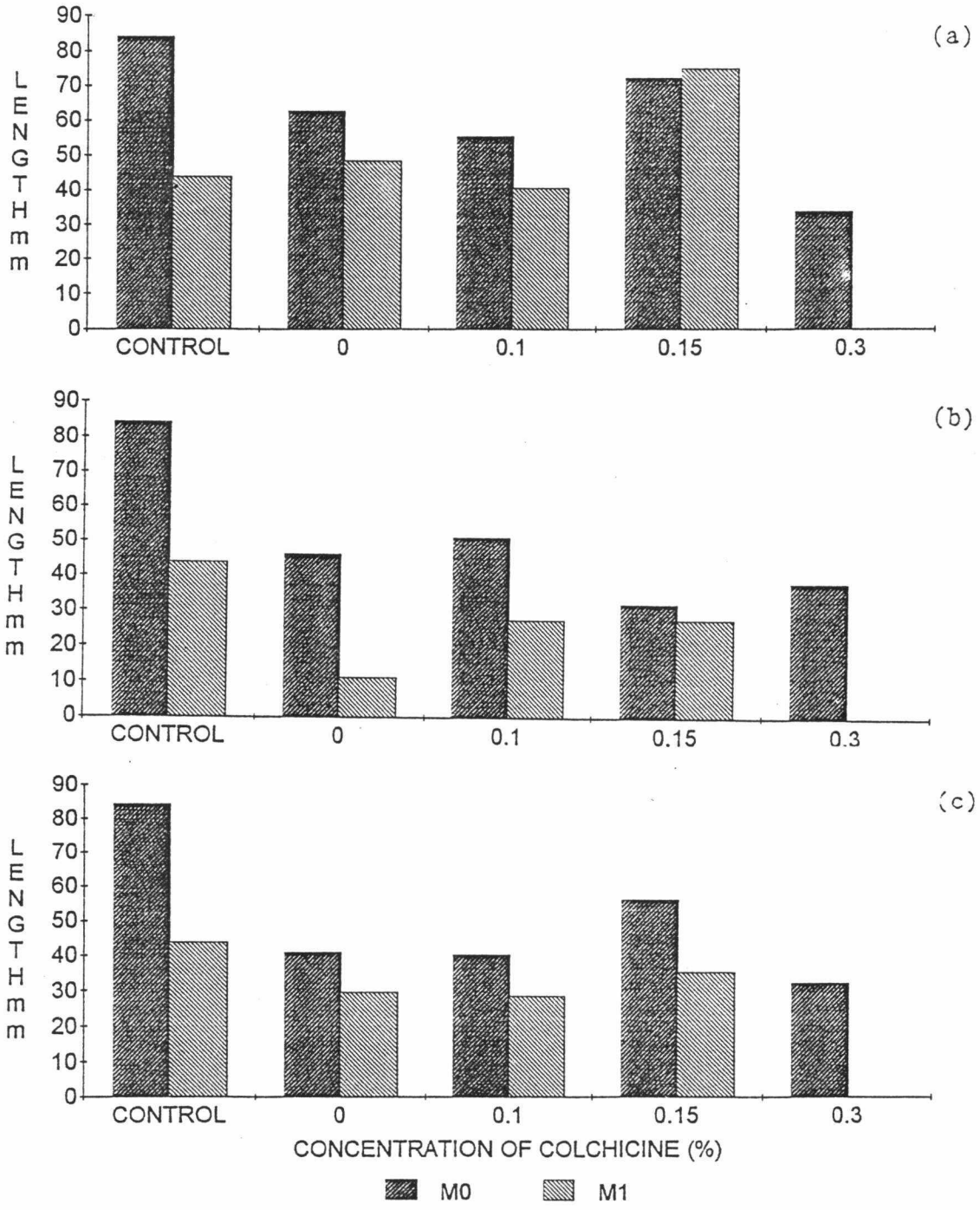
ความยาวใบรวมของต้นที่เจริญจาก protocorm-like structure ที่ได้รับสารละลายโคลชิชิน 0 0.1 0.15 และ 0.3 เปอร์เซนต์ ลดลงเมื่อเทียบกับความยาวใบรวมของต้นที่เจริญจาก protocorm-like structure ที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิชิน (control) ตามลำดับ (รูปที่ 20) แต่มีจำนวนใบมากกว่าและใบกว้างกว่า นอกจากนี้ เมื่อนำ protocorm-like structure ซึ่งแตกออกจากรุ่น M0ไปเลี้ยงต่อ ต้นที่ได้ (M1) มีความยาวใบรวมเฉลี่ยน้อยกว่าความยาวใบรวมเฉลี่ยของ M0 จึงพบต้นที่มีลักษณะอ้วนป้อมดังเช่นการทดลองในชิง (ปิยะดา,2531) ยกเว้นในรุ่น M1 ที่เจริญจาก M0 ซึ่งได้รับสารละลายโคลชิชิน 0.15 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.3.4 ผลของรังสีแกมมาต่อความยาวใบรวมและความสูง

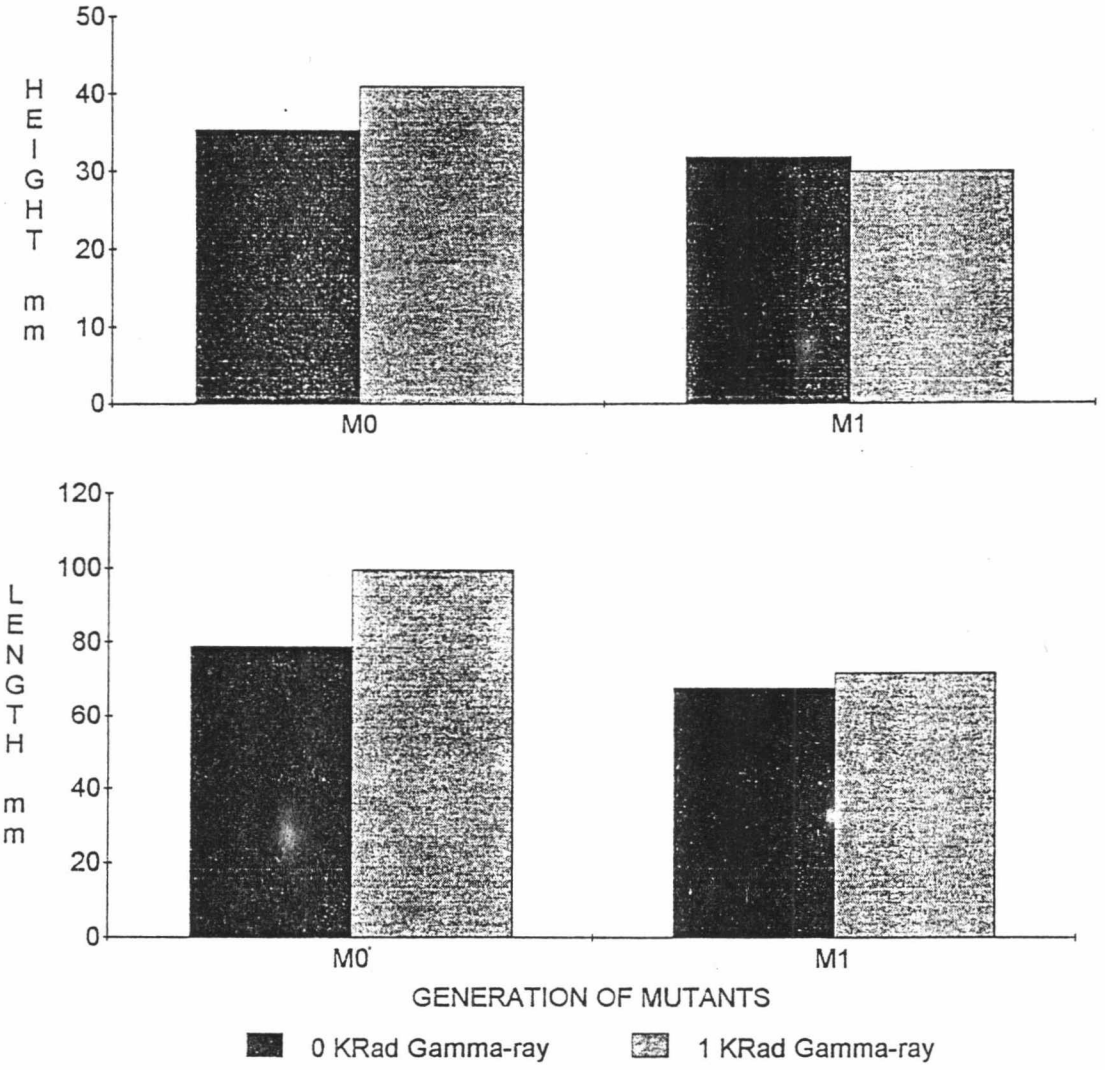
ความยาวใบรวมและความสูงของต้นที่เจริญจาก M0 และ M1 มีแนวโน้มมากขึ้นเมื่อ protocorm-like structure ได้รับการฉายรังสีแกมมา 1 กิโลแรด แสดงว่ารังสีแกมมามีผลทำให้ต้นมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าต้นปกติ แต่ M1 จะเตี้ยกว่าและมีความยาวใบรวมน้อยกว่า M0 (รูปที่ 21) การใช้รังสีแกมมาและสารละลายโคลชิชินทำให้ได้ต้นที่เตี้ยลงในรุ่นลูก (M1) ซึ่งอาจเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่ถาวร ไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงที่ยืนถ่ายทอดไปยังรุ่นลูก

2.3.5 ผลของสารละลายโคลชิชินต่อปากใบ

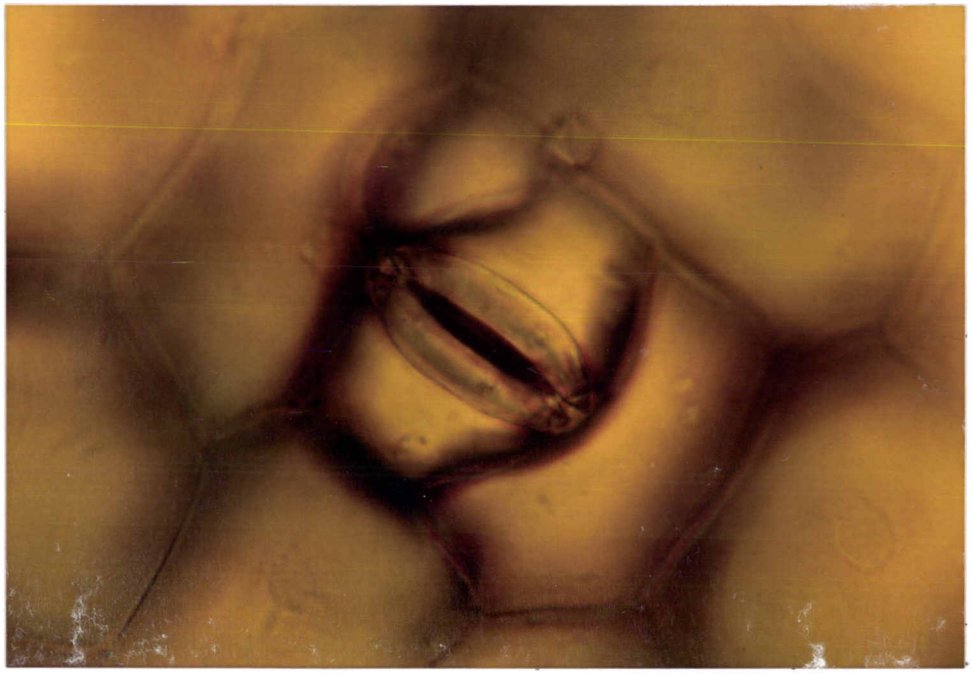
ความยาวเฉลี่ยและความกว้างเฉลี่ยของปากใบ (รูปที่ 22) มีแนวโน้มยาวและกว้างขึ้นใน protocorm-like structure ที่ได้รับสารละลายโคลชิชิน 0.1 0.15 และ 0.3 เปอร์เซนต์ (รูปที่ 23 และ 24 ตามลำดับ) โดยมีความยาวเฉลี่ยและความกว้างเฉลี่ยของปากใบ มากกว่า controlเมื่อ protocorm-like structure ได้รับสารละลายโคลชิชินเข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์ นาน 2 และ 4 ชั่วโมง และที่ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซนต์ นาน 4 ชั่วโมง ส่วนจำนวนปากใบต่อพื้นที่ใน 1 ตารางเซนติเมตร ไม่สม่ำเสมอ ทั้งใน protocorm-like structure ที่ได้รับ



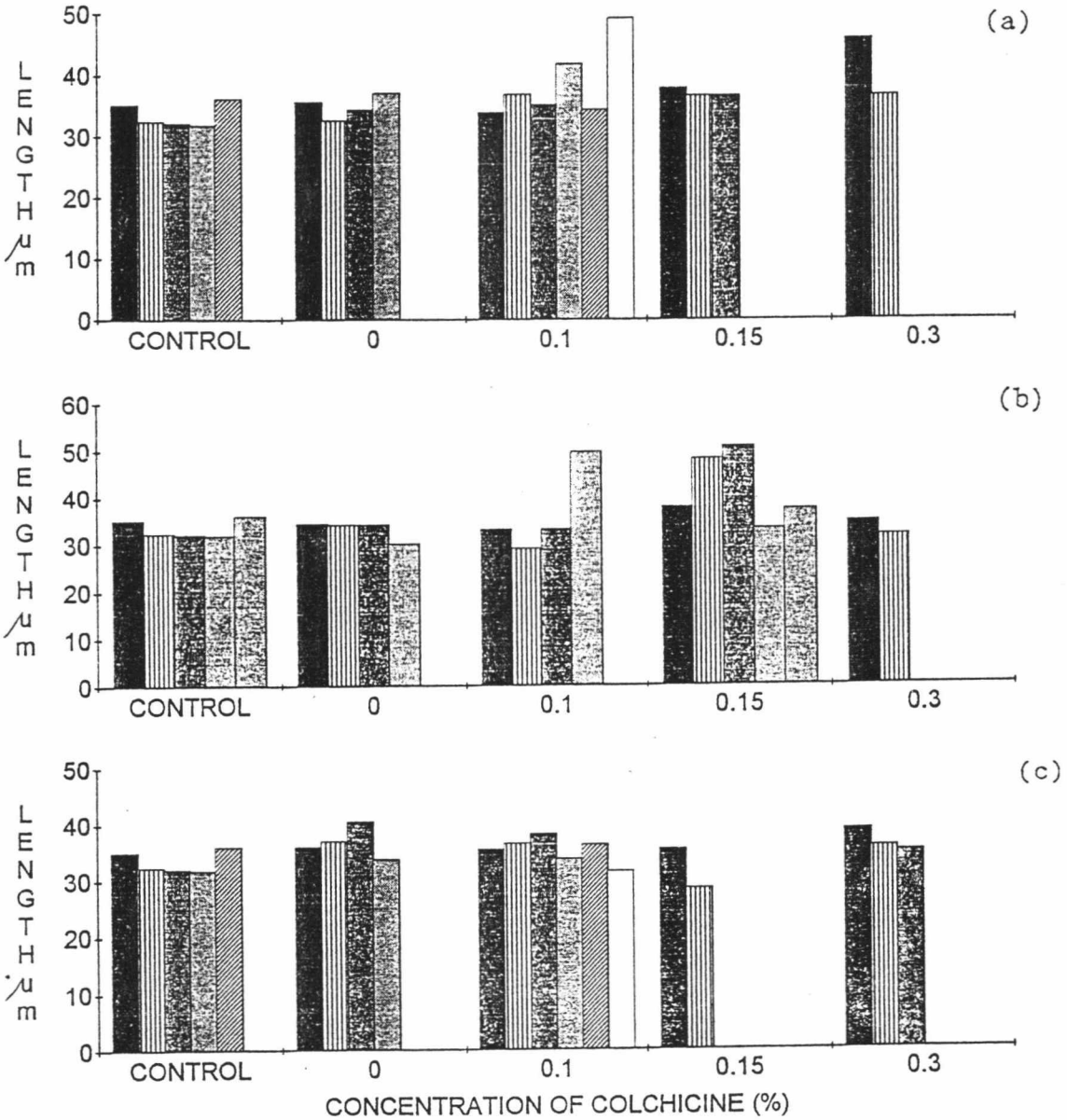
รูปที่ 20 ความยาวใบรวมเฉลี่ยของต้นไพล (มิลลิเมตร) ในรุ่น M0 และ M1 หลังจากได้รับสารละลายโคลชิชิน 0 0.1 0.15 0.3 เปอร์เซนต์ นาน (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมง แล้ว 8 สัปดาห์



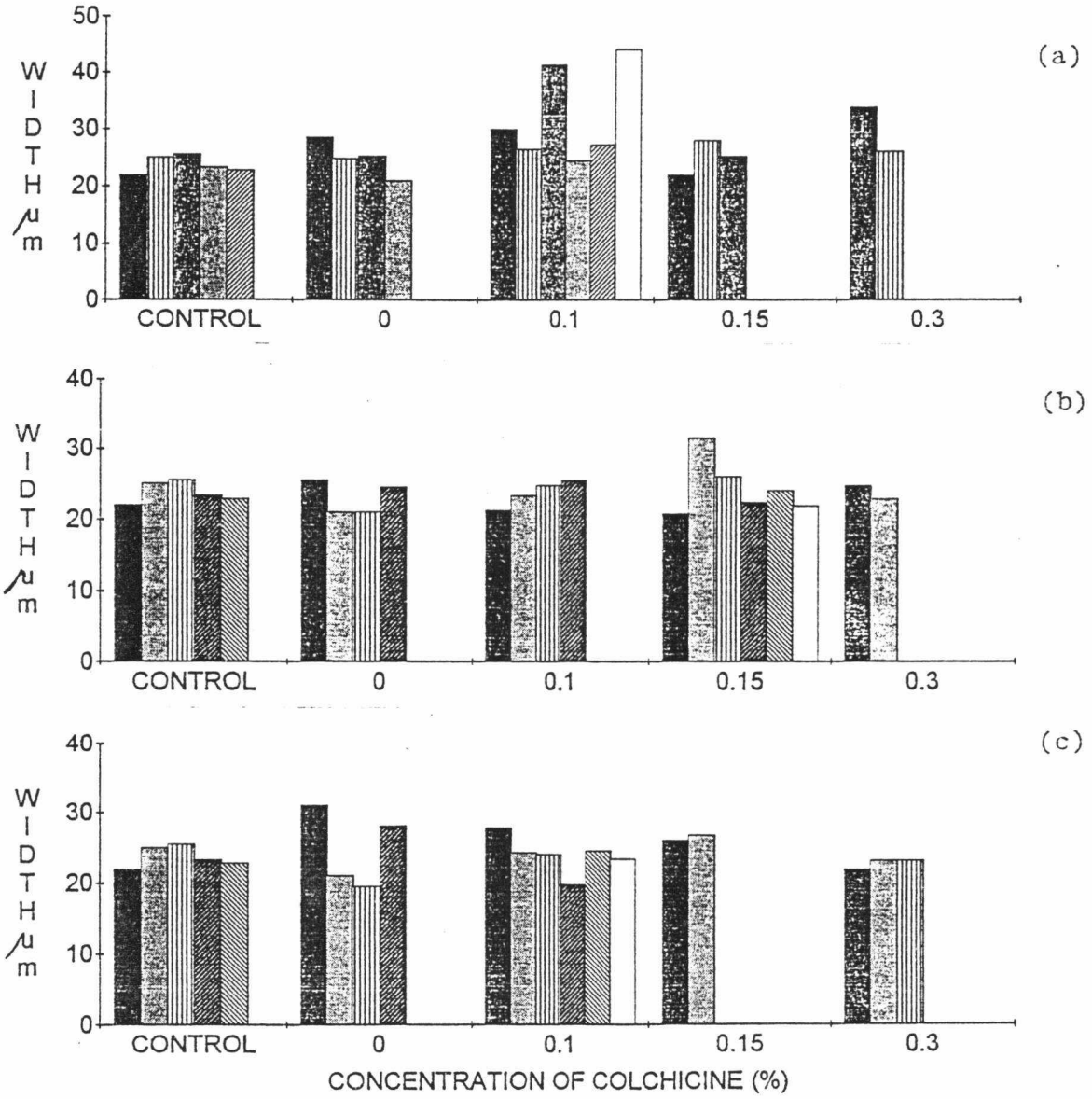
รูปที่ 21 ความสูงเฉลี่ยและความยาวใบรวมเฉลี่ยของต้นไพล (มิลลิเมตร) ในรุ่น M0 และ M1 หลังจากได้รับการฉายรังสีแกมมา 0 และ 1 กิโลแรด แล้ว 8 สัปดาห์



รูปที่ 22 ลักษณะปากใบที่พบในต้นไพล (1700X)



รูปที่ 23 ความยาวเฉลี่ยปากใบของไพล (ไมโครเมตร) รุ่น M0 หลังจากได้รับสารละลายโคลชิชิน 0 0.1 0.15 0.3 เปอร์เซนต์ นาน (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมง แล้ว 8 สัปดาห์



รูปที่ 24 ความกว้างเฉลี่ยปากใบของไพล (ไมโครเมตร) รุ่น M0 หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซิน 0 0.1 0.15 0.3 เปอร์เซนต์ นาน (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมง แล้ว 8 สัปดาห์

และไม่ได้รับ สารละลายโคลชิชิน (รูปที่ 25) ต้นที่มีขนาดปากใบใหญ่ มีแนวโน้มที่จะมีจำนวนปากใบน้อย (รูปที่ 23,24 และ 25) ต้นที่มีใบสีเหลือง มีแนวโน้มที่มีจำนวนปากใบมากขึ้น (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) อาจเนื่องมาจากความต้องการออกซิเจนมากขึ้นเพราะเซลล์สังเคราะห์แสงได้น้อยลง

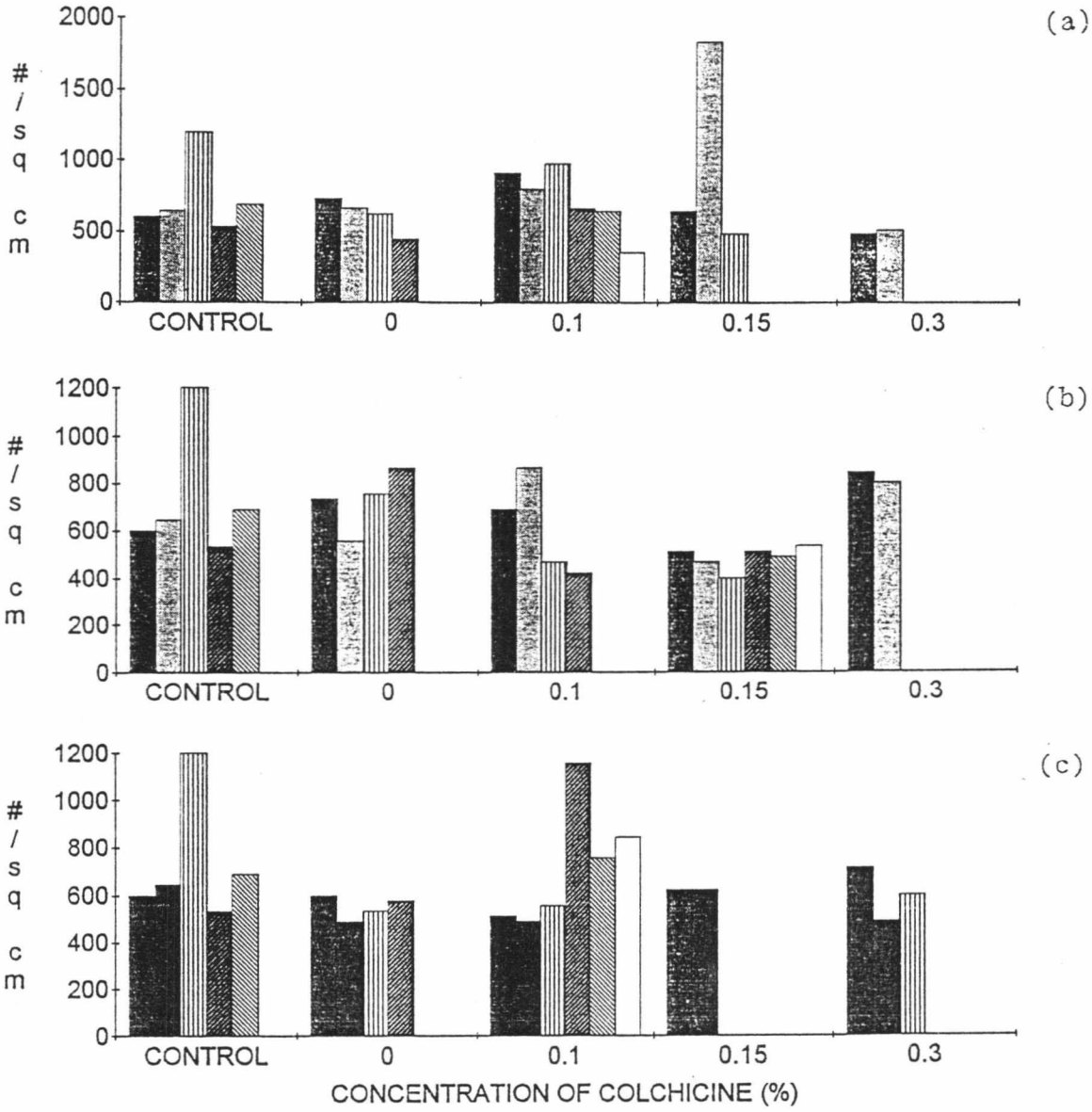
ความยาวเฉลี่ย ความกว้างเฉลี่ยและจำนวนปากใบเฉลี่ยต่อพื้นที่ใบในต้นรุ่น M1 ไม่มีความสม่ำเสมอในทุกความเข้มข้นของสารละลายโคลชิชิน (รูปที่ 26 27 และ 28) แต่มีแนวโน้มที่จะมีขนาดของปากใบเล็กลง ทั้งความยาวเฉลี่ยและความกว้างเฉลี่ยเมื่อเปรียบเทียบกับ M0 แต่จำนวนปากใบเฉลี่ยต่อพื้นที่ มีแนวโน้มมากขึ้นในรุ่น M1 เมื่อเปรียบเทียบกับ M0 (รูปที่ 28 และ 25 ตามลำดับ) เมื่อ protocorm-like structure ได้รับสารละลายโคลชิชินนาน 4 และ 6 ชั่วโมง

2.3.6 ผลของรังสีแกมมาต่อปากใบ

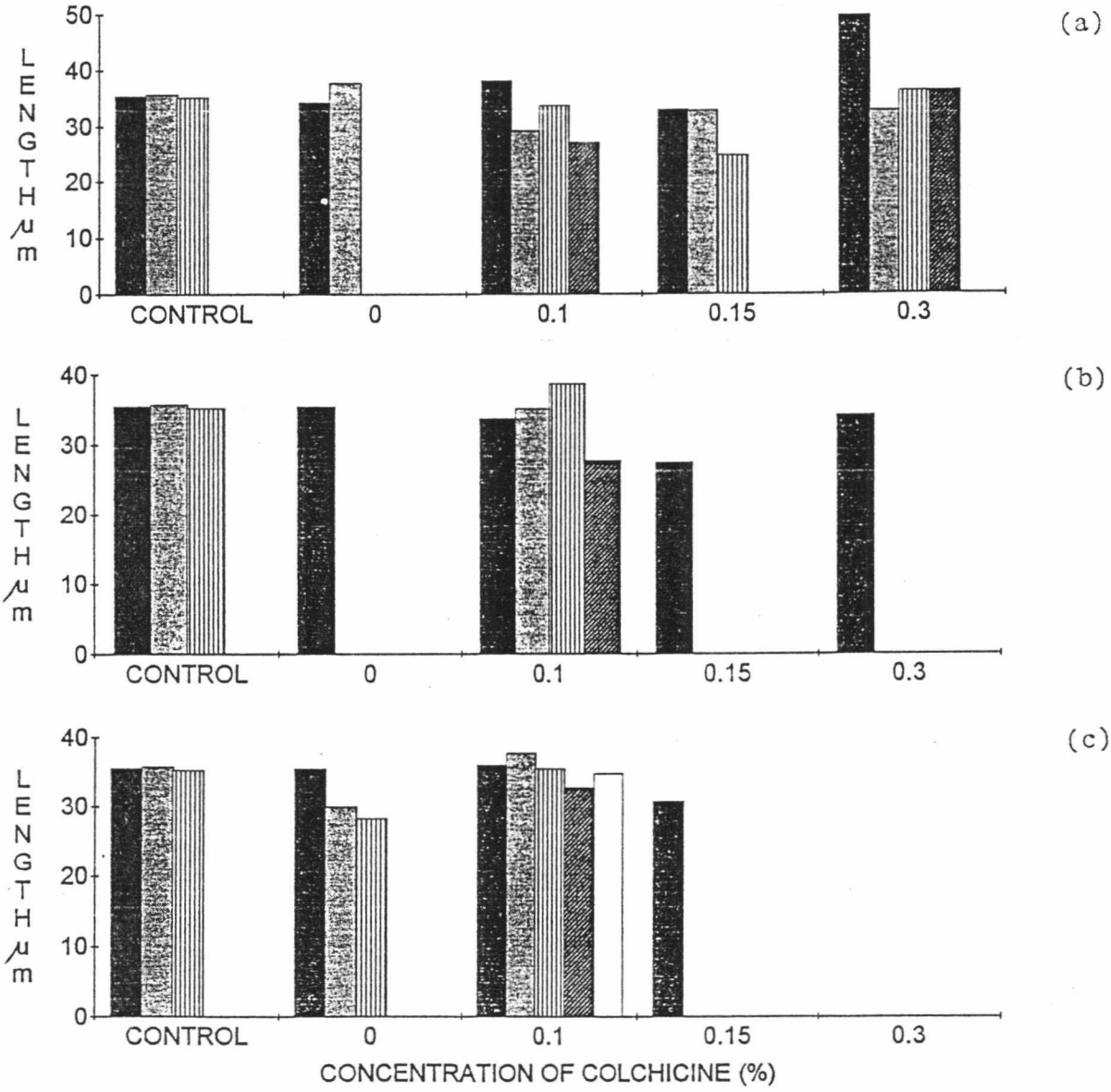
ความยาวเฉลี่ยของปากใบและจำนวนปากใบต่อพื้นที่ใบ มีแนวโน้มน้อยลง เมื่อ protocorm-like structure ได้รับการฉายรังสีแกมมา 1 กิโลแรด ตรงกันข้ามกับความกว้างของปากใบซึ่งมีแนวโน้มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับ control (0 กิโลแรด) (รูปที่ 29) ทำให้มีลักษณะคล้ายวงกลม แต่ความยาวเฉลี่ย ความกว้างเฉลี่ยของปากใบ และจำนวนปากใบต่อพื้นที่มากขึ้นในรุ่น M1 (รูปที่ 30) และปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้นใน M1 ซึ่งเจริญจาก M0 ที่ได้รับรังสีแกมมา (รูปที่ 29 และ 30) ทั้งที่ต้นมีขนาดเตี้ยลงและความยาวใบน้อยลง

2.4 โครโมโซมของไพล

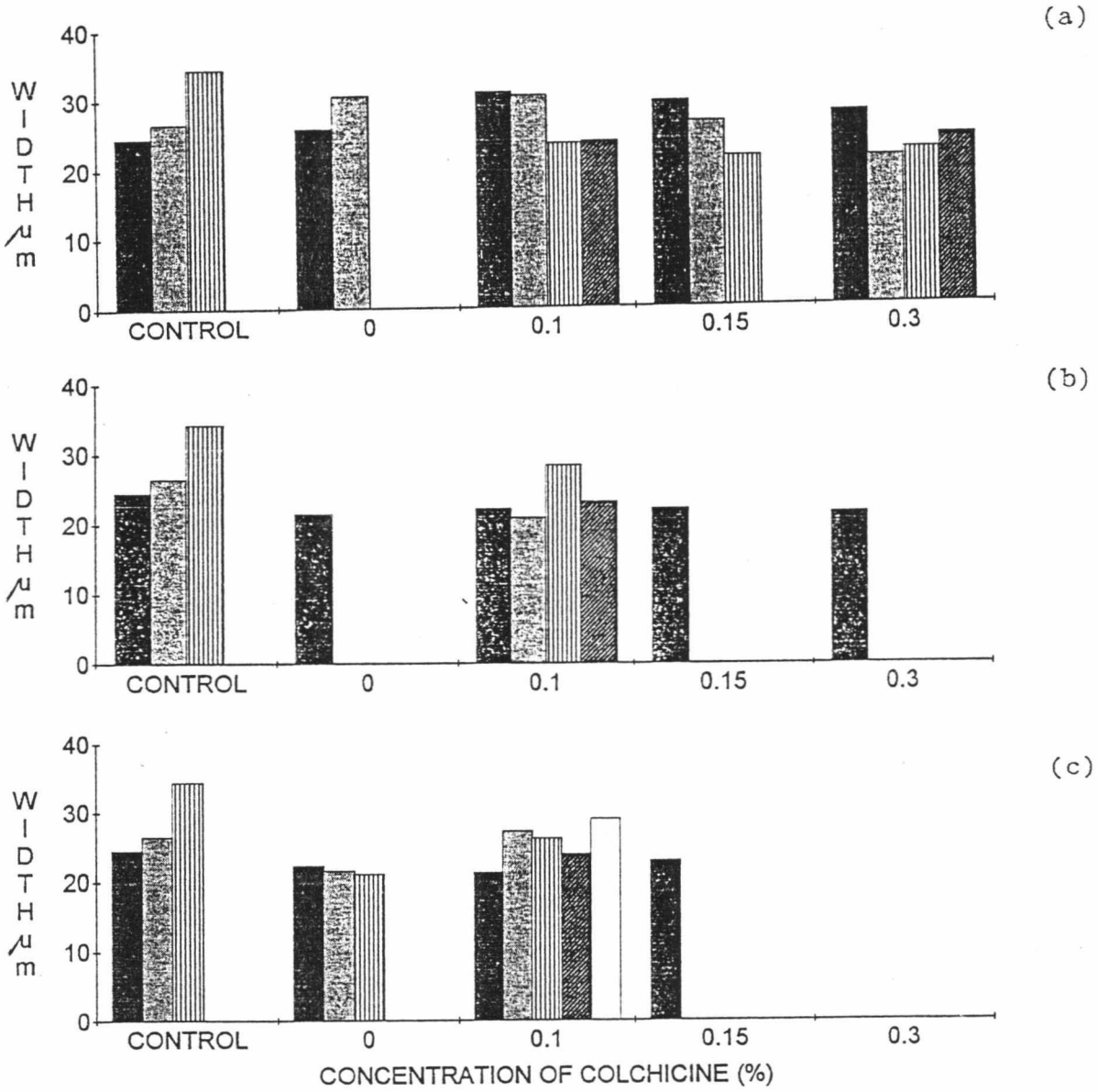
เนื่องจากต้นไพลที่เจริญจาก protocorm-like structure ที่ได้รับสารละลายโคลชิชิน และรังสีแกมมามีการเจริญช้ากว่าต้น control จึงไม่มีรากที่จะนำมาตรวจสอบดูโครโมโซมได้ แต่จากการศึกษาต้นซึ่งเจริญจาก protocorm-like structure ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=22 (รูปที่ 31) ซึ่งเป็นจำนวนปกติที่พบในต้นไพล



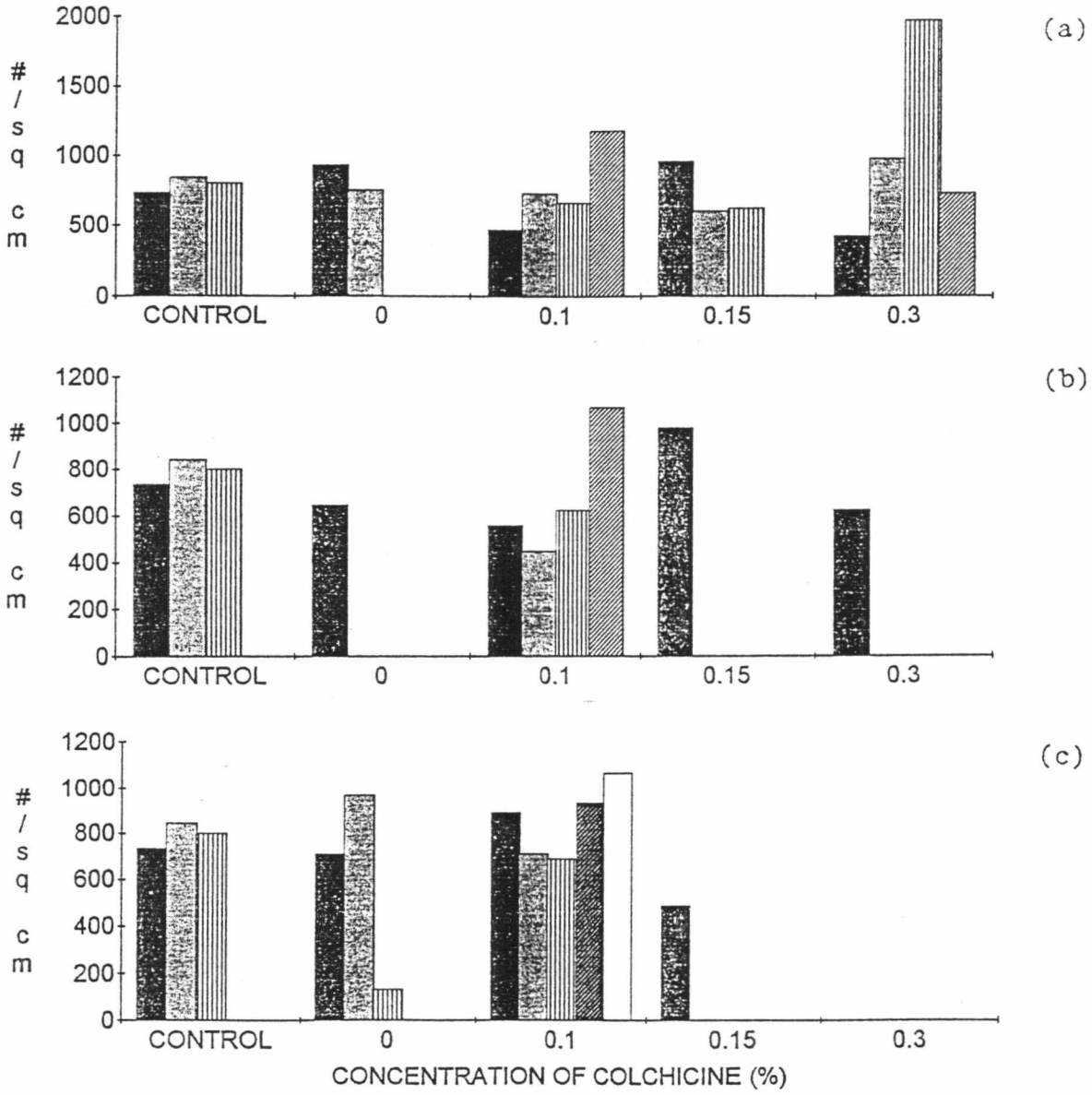
รูปที่ 25 จำนวนปากใบเฉลี่ยต่อตารางเซนติเมตรของใบไพลรุ่น M0 หลังจากได้รับสารละลายโคลชิชิน 0 0.1 0.15 0.3 เปอร์เซนต์ นาน (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมง แล้ว 8 สัปดาห์



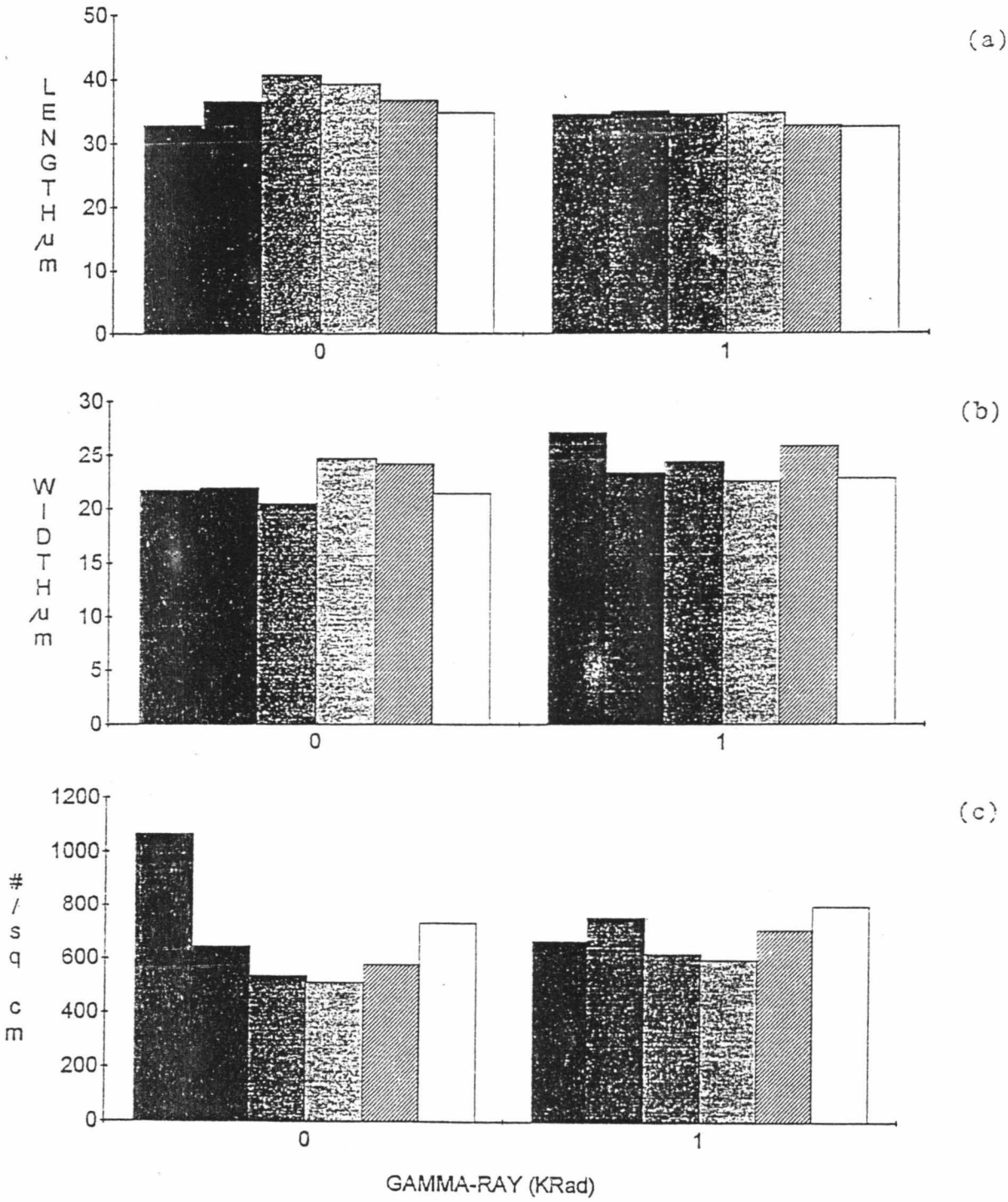
รูปที่ 26 ความยาวเฉลี่ยปากใบ (ไมโครเมตร) ของรุ่น M1 ซึ่งเจริญจากรุ่น M0 หลังจากได้รับสารละลายโคลชิชิน 0 0.1 0.15 0.3 เปอร์เซนต์ นาน (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมง แล้ว 8 สัปดาห์



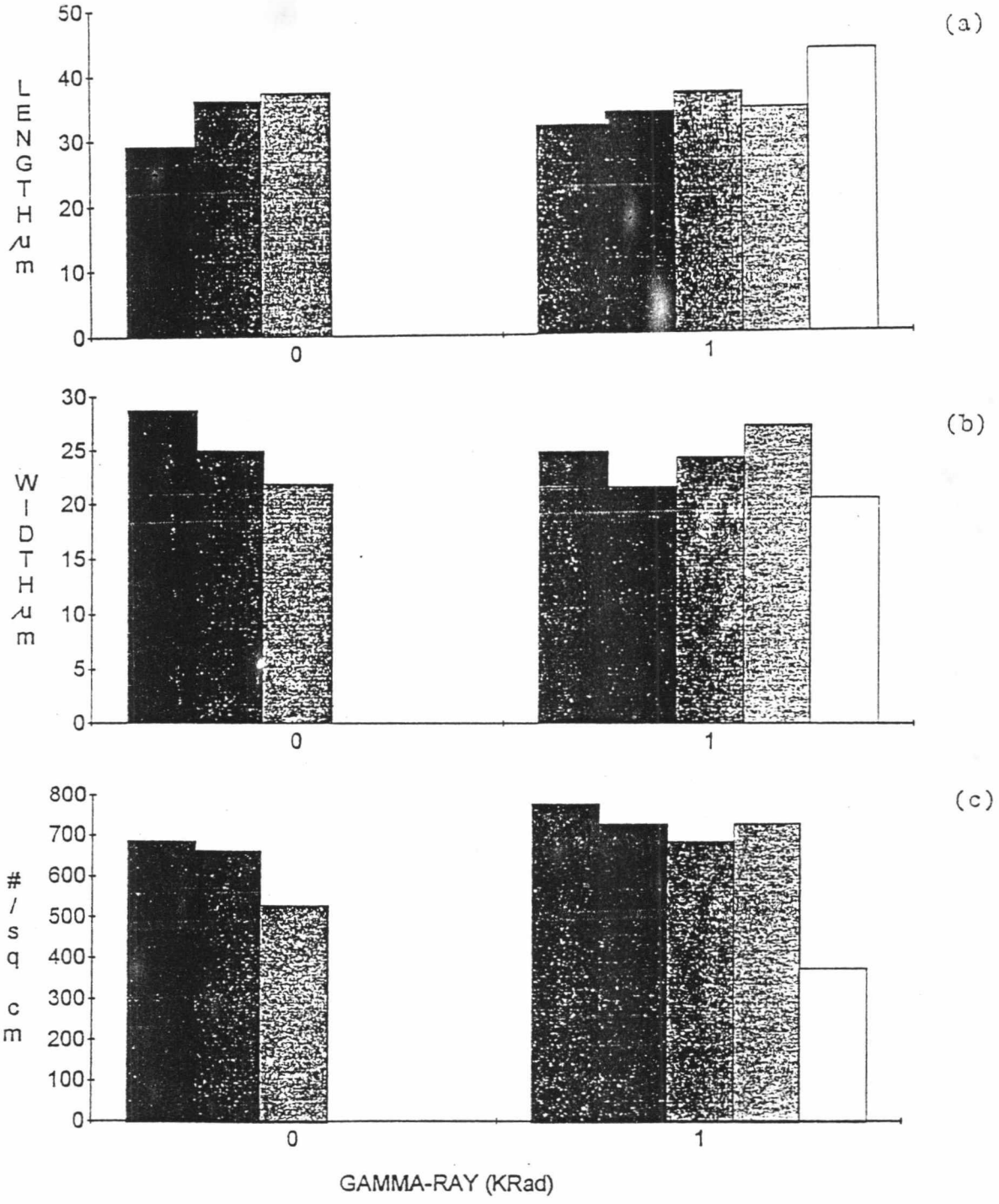
รูปที่ 27 ความกว้างเฉลี่ยปากใบของไพล (ไมโครเมตร) ของรุ่น M1 ซึ่งเจริญจากรุ่น M0 ที่ได้รับสารละลายโคลชิชิน 0 0.1 0.15 0.3 เปอร์เซนต์ นาน (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมง แล้ว 8 สัปดาห์



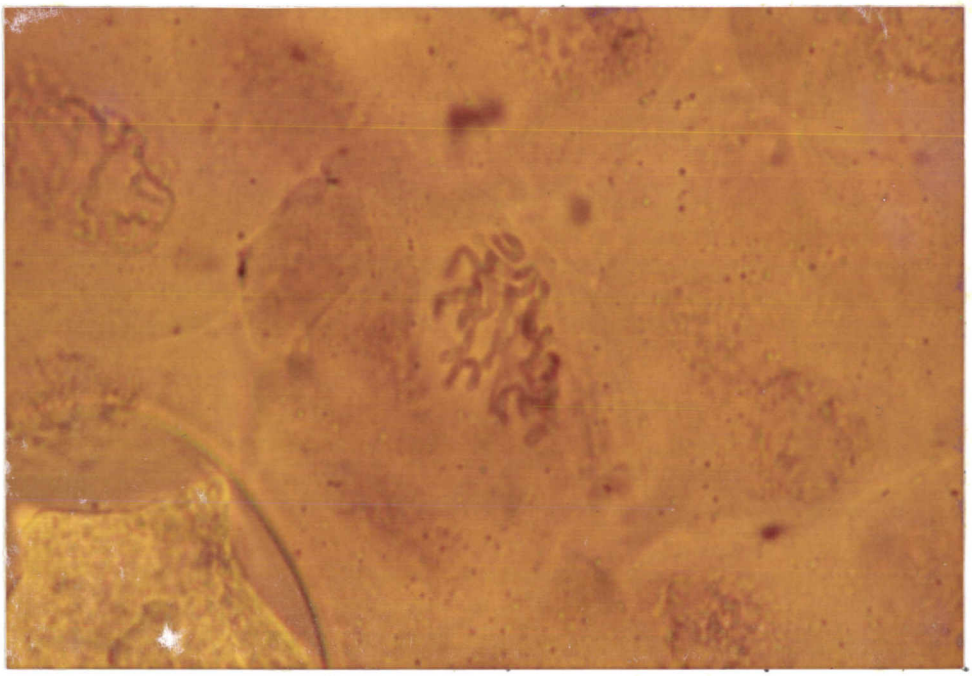
รูปที่ 28 จำนวนปากใบเฉลี่ยต่อตารางเซนติเมตรของใบไพลรุ่น M1 ซึ่งเจริญจากรุ่น M0 หลังจากได้รับสารละลายโคลชิชิน 0 0.1 0.15 0.3 เปอร์เซนต์ นาน (a)2 (b)4 และ (c)6 ชั่วโมง แล้ว 8 สัปดาห์



รูปที่ 29 ความยาวเฉลี่ยของปากใบ (ไมโครเมตร) (a) ความกว้างเฉลี่ยของปากใบ (ไมโครเมตร) (b) จำนวนปากใบเฉลี่ยต่อตารางเซนติเมตรของใบ (c) ของรุ่น M0 หลังจากได้รับการฉายรังสีแกมมา 0 และ 1 กิโลแรด แล้ว 8 สัปดาห์



รูปที่ 30 ความยาวเฉลี่ยของปากใบ (ไมโครเมตร) (a) ความกว้างเฉลี่ยของปากใบ (ไมโครเมตร) (b) จำนวนปากใบเฉลี่ยต่อตารางเซนติเมตรของใบ (c) ของรุ่น M1 หลังจากได้รับการฉายรังสีแกมมา 0 และ 1 กิโลแรด แล้ว 8 สัปดาห์



รูปที่ 31 โครโมโซมของไพล (3430X)

ต้นซึ่งมีลักษณะอ้วนป้อมที่พบมีการเจริญเติบโตช้า หากนำรากของต้นซึ่งมีลักษณะนี้และลักษณะผิดปกติอื่นๆ มาดูจำนวนโครโมโซม อาจพบจำนวนชุดของโครโมโซมที่เปลี่ยนแปลงไปได้ ซึ่งโดยปกติแล้วสารโคลชิชินจะมีผลทำลาย spindle fiber ยับยั้งการแบ่งเซลล์ทำให้มีจำนวนโครโมโซมมากขึ้นเท่าตัว (Elliott, 1958) และต้นมีขนาดใหญ่ขึ้น

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สารละลายโคลชิชินและรังสีแกมมา มีผลทำให้การเจริญเติบโตและอัตรารอดชีวิตของไพลลดลง เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้น และระยะเวลาที่ใช้ สามารถชักนำให้เกิดลักษณะที่ผิดปกติขึ้น เช่น ความสูง ความยาวใบรวม ขนาดปากใบ จำนวนปากใบ สีและลักษณะของใบ สารละลายโคลชิชินชักนำให้การเปลี่ยนแปลงได้มากชนิดกว่ารังสีแกมมา เพราะอำนาจในการทำลายของสารละลายโคลชิชินที่ใช้ทดลองนี้น้อยกว่าของรังสีแกมมา และรังสีแกมมา ซึ่งมีผลต่อไพลในระดับโมเลกุล ทำให้การทำงานของเซลล์ผิดปกติและตายได้ในที่สุด หากใช้รังสีแกมมาที่มีปริมาณในช่วงน้อยกว่า 3 กิโลแรด อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของต้นไพลและต้นนั้นมีชีวิตอยู่รอดได้มากขึ้น โอกาสที่พบลักษณะต้นที่เราต้องการก็มีมากขึ้นด้วย และถ้าหากได้ทำการตรวจสอบโครโมโซมรากของต้นที่เจริญจาก protocorm-like structure ที่ได้รับสารละลายโคลชิชิน หรือ รังสีแกมมา ก็อาจจะบอกได้ว่าเป็นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงที่จำนวนโครโมโซมหรือไม่ การเลือกความเข้มข้นของสารละลายโคลชิชิน และรังสีแกมมาที่เหมาะสม อาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ต้นที่มีขนาดใหญ่ขึ้นและสามารถถ่ายทอดได้ไปยังรุ่นลูกหลานได้ ซึ่งลักษณะนี้อาจนำมาสู่การได้เหง้ามีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้ได้ปริมาณน้ำมันไพลต่อต้นสูงขึ้นหรือได้ต้นซึ่งสามารถผลิตน้ำมันไพลได้มากขึ้น และมีคุณภาพดีขึ้นได้

ภาคผนวก

ภาคผนวก

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรของ Linsmaier and Skoog (Linsmaier and Skoog,1965)

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้(มิลลิกรัมต่อลิตร)
Major salt	
NH_4NO_3	1,690
KNO_3	1,900
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
Minor Salt	
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4.4H_2O$	22.3
$ZnSO_4.4H_2O$	8.6
KI	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Na_2EDTA	37.3
$FeSO_4.7H_2O$	27.8
Vitamins	
myo-inositol	100
thiamine-HCl	0.4

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ Linsmaier and Skoog (1965)

1. เตรียม stock

stock 1 NH_4NO_3 เข้มข้น 10 เท่า

stock 2 KNO_3 เข้มข้น 10 เท่า

stock 3 $CaCl_2.2H_2O$ เข้มข้น 10 เท่า

stock 4 $MgSO_4.7H_2O$ เข้มข้น 10 เท่า

stock 5 KH_2PO_4 เข้มข้น 10 เท่า

stock 6 Minor salt ประกอบด้วย H_3BO_3 $MnSO_4.4H_2O$ $ZnSO_4.4H_2O$ KI $Na_2MoO_4.2H_2O$ $CuSO_4.5H_2O$ $CoCl_2.6H_2O$ เข้มข้น 100 เท่า

stock 7 Na_2EDTA และ $FeSO_4.7H_2O$ เข้มข้น 100 เท่า

stock 8 วิตะมิน ประกอบด้วย myo-inositol และ thiamine-HCl เข้มข้น 100 เท่า

stock 9 BAP เข้มข้น 100 เท่า

2. ขั้นตอนการเตรียมอาหาร Linsmaier and Skoog(1965)ที่มีน้ำตาล sucrose 20 กรัมต่อลิตร และ BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.1 ตวง stock 1 stock 2 stock 3 stock 4 และ stock 5 อย่างละ 100 มิลลิลิตร

2.2 ตวง stock 6 stock 7 และ stock 8 อย่างละ 10 มิลลิลิตร

2.3 ปิเปต stock 10 20 มิลลิลิตร

2.4 ชั่งน้ำตาล 20 กรัม

2.5 เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1 ลิตร

2.6 ปรับ pH 5.5 ด้วย 0.1 N HCl และ 0.1 N NaOH

2.7 เติมวุ้น 30 กรัม หลอมให้ละลาย

2.8 เทลงขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพอประมาณ ขวดเล็ก 10 มิลลิลิตร ขวดกลาง 20 มิลลิลิตร ขวดใหญ่ 30 มิลลิลิตร

2.9 ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที

เอกสารอ้างอิง

1. จิตตรีบุล พุ่มศิริ, ฐิติรัตน พรประยุทธ, ธนิต ผิวนิ่ม, วิโรจน์ กนกศิลปธรรม. เอกสารประกอบการอบรมวิชาการทางชีววิทยา. 67-113 มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2530 .
2. บัญญัติ สุขศรีงาม. เครื่องเทศที่ใช้เป็นสมุนไพรเล่ม 1. 65-69 โอเดียนสโตร์, 2536 .
3. ประศาสตร์ เกื้อมณี. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. 18-33 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2524 .
4. ปิยะดา ตันตสวัสดิ์. ผลของโคลชิซนต่อชิงที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2531 .
5. ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. หลักการและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. 73-88 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2524 .
6. มหาวิทยาลัยมหิดล คณะเภสัชศาสตร์. สมุนไพรสิรีรุ่งชาติ. มหาวิทยาลัยมหิดล น. 211, 2535 .
7. รุจินาถ อรรถสิทธิ์."สมุนไพรมหัศจรรย์แห่งธรรมชาติ" สารคดี. ฉบับที่ 91, 2535. 136-156
8. วิสุทธิ์ ใบไม้. พันธุศาสตร์ฉบับปรับปรุงใหม่ (3.พิมพ์ครั้งที่ 3. 141-183. เจ้าพระยาระบบการพิมพ์, 2536 .
9. ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหิดล. ก้าวไปกับสมุนไพร. 130-114 มหาวิทยลัยมหิดล, 2529 .
10. เสงี่ยม พงษ์บุญรอด. ไม้เทศเมืองไทยสรรพคุณของยาเทศและยาไทย. 373-374 โรงพิมพ์ไทยเทอดธรรม, 2508 .
11. สิรนุช ลามศรีจันทร์. การกลายพันธ์ของพืช. 1-114 ห้างหุ้นส่วนจำกัดพับบลิชชิ่ง, 2536 .
12. สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน. สมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐาน. น.109 โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, 2530 .

13. Chandrasekharan,S.N. and S.V. Parthasarathy. Cytogenetics and Plant Breeding. P.Vardachary & Co., Madras.(1948): 340.

14. Elliott ,F.C. Plant Breeding and Cytogenetes.McGraw-Hill Inc., New York. (1958): 395 .

15. Hosoki, T. and Sagawa, Y. Clonal propagation of ginger *Zinger officinale* through tissue culture. HortScience 12(1977):451-452.

16. Ikeda, L.R. and Tanabe, M.J., In Vitro subculture applications for ginger HortScience 24 (1) (1989): 142-143.

17. Linsmaier, E.M., and Skoog, F., Organic Growth Factor requirements of tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 18(1965): 100-127.

18. Poonsapaya, P. and Kraisintu, K. Micropropagation of *Zingiber cassumunar* Roxb. Acta Horticulture. 334 (1993): 594-602.

19. Reghunath, B.P. and Bajaj, Y.P.S. Micropropagation of Cardacmom *(Eleffaria cardomomum* Maton) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.19:High-Tech and Micropropagation .(1992): 175-198.

20. Sakamura, F. and Suqa, T. *Zingiber officinale* Roxcoe (Ginger): In vitro propagation and the Production of Volatile Constituents Biotechnology in Agriculture and Forestry 7(1989):524-538.

21. Sakamura, F., Ogihara, K., Suga, T., Taniquchi, K., and Tanaka.,Volatile constituents of *Zingiber officinale* rhizomes produced by in vitro shoot tip culture. Phytochemistry 25 (1986):1333-1335.

22. Savitsky,H. Polyploid sugar beets. Cytological Study and Methods of Production. Proc. Am. Soc. Sugar Beet technol. 1952 .

23. Wasuwat, S., The pharmacological study on nam man phlai, *Zingiber cassumunar' Roxb.* 10th Cong. of Sci. Techol. of Thailand. (1984): 218