การปรับปรุงพันธุ์หญ้าไนล์ (*Acroceras macrum*) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีแกมมา

IMPROVEMENT OF NILEGRASS (*Acroceras macrum*) BY TISSUE CULTURE AND GAMMA IRRADIATION

ศรัณย์ สุขวัฒน์

SARUN SUKHAWAT

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL-2009-SC-M-020-084

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การปรับปรุงพันธุ์หญ้าไนล์ (*Acroceras macrum*) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีแกมมา

IMPROVEMENT OF NILEGRASS (*Acroceras macrum*) BY TISSUE CULTURE AND GAMMA IRRADIATION

ศรัณย์ สุขวัฒน์

SARUN SUKHAWAT

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 105303
วัน,เดือน,ปี 18 พ.ย. 2552

.b.....
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL-2009-SC-M-020-034

IMPROVEMENT OF NILEGRASS (*Acroceras macrum*) BY TISSUE CULTURE AND GAMMA IRRADIATION

SARUN SUKHAWAT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2009

KMITL-2009-SC-M-020-034

COPYRIGHT 2009

OFFICE OF ACADEMIC ADMINISTRATION

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การปรับปรุงพันธุ์หญ้าไนล์ (*Acroceras macrum*) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีแกมมา

Improvement of Nilegrass (*Acroceras macrum*) by Tissue Culture and Gamma Irradiation

นักศึกษา นายศรัณย์ สุขวัฒน์

รหัสประจำตัว 49068304

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.พนา	โลหะทรัพย์ทวี	
ผศ.ดร.อนุรักษ์	โพธิ์เอี่ยม	
ผศ.ดร.สุพัตรา	โพธิ์เอี่ยม	
ศ.ประดิษฐ์	พงศ์ทองคำ	

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 14 พฤษภาคม 2552 เวลา 13.30 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1 ห้อง 424

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่ 25 **เดือน** พฤษภาคม **พ.ศ.** 2552

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การปรับปรุงพันธุ์หญ้าไนล์ (*Acroceras macrum*) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีแกมมา
นักศึกษา	นายศรัณย์ สุขวัฒน์
รหัสนักศึกษา	49068304
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2552
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหญ้าไนล์โดยใช้ชิ้นส่วนข้อ และยอดอ่อน พบว่าอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลฟา-คีโตกลูตาริก 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสมากที่สุดเท่ากับ 45 และ 13.75 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อนำเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสมาชักนำให้พัฒนาเป็นต้นพบว่า เอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนข้อ และส่วนยอดอ่อน เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากส่วนข้อพบว่า อาหารสูตร LS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด 5.4 ยอดต่อข้อ ส่วนการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยโดยนำเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนข้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลฟา-คีโตกลูตาริก 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์มีการเจริญสูงสุดที่ 15-18 วัน และสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดีที่สุด 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยนำเซลล์แขวนลอยไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณ 0-100 เกรย์ พบว่าปริมาณรังสีที่ทำให้เซลล์แขวนลอยมีเปอร์เซ็นต์การตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) มีค่าเท่ากับ 78.04 เกรย์ จากนั้นย้ายต้นที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่รอดชีวิตออกปลูกเพื่อศึกษาเป็นเวลา 45 วัน พบว่าความสูงของต้น และความยาวเฉลี่ยของใบของหญ้าไนล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น จากนั้นนำเทคนิคอาร์เอพีดีมาใช้ในการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างต้นควบคุมกับต้นที่กลายพันธุ์ จากการทดลองพบว่า สามารถนำเทคนิคอาร์เอพีดีมาตรวจสอบการกลายพันธุ์ของหญ้าไนล์ได้

Thesis Title	Improvement of Nilegrass (*Acroceras macrum*) by Tissue Culture and Gamma Irradiation
Student	Mr. Sarun Sukhawat
Student ID	49068304
Degree	Master of Science
Program	Biotechnology
Year	2009
Thesis Advisor	Assist. Prof. Dr. Anurug Poeaim

ABSTRACT

A study on tissue culture of Nilegrass (*Acroceras macrun)*. Node tissue and young shoot were used as explants. The results showed that, the highest Embryogenic callus initiation was LS medium containing 1 mg/l 2,4-D, 0.1 mg/l BA, 100 mg/l α-ketoglutaric, 4 mg/l thiamine HCl. The percentage of embryogenic callus induction were 45% and 13.75%, respectively. While the development of plantlet were best on LS medium containing 5 mg/l BA. The highest regeneration percentages obtained from the node tissue and young shoot were 100%. The suitable medium for multiple shoot formation from node culture was LS medium containing 5 mg/l BA gave the highest average shoot number of 5.4 shoots per node. The embryogenic calli derived from tissue node were selected and transferred to liquid LS medium containing 1 mg/l 2,4-D, 0.1 mg/l BA, 100 mg/l α-ketoglutaric, 4 mg/l thiamine HCl. As studied cell suspension growth rate, we found that the maximum growth rate is after 15-18 days of culture. When take embryogenic cell suspension plated on regeneration medium, It was found that BA 5 mg/l provided the highest percentage of regeneration which is 90%. The four week old cell suspension-derived callus were irradiated with gamma ray at the doses of 0-100 Gy. The results showed that, the dose rate of 78.04 Gy gave 50 % survival rate of irradiated callus (LD_{50}). 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. RAPD analysis was used to determine such polymorphism within and among different control plant and mutation plant. These results suggest that RAPD markers are useful in detecting mutation of Nilegrass.

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ที่กรุณาให้โอกาส ความรู้ คำแนะนำที่ดี ตลอดจนสนับสนุนในด้านต่างๆ ทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จไปได้ด้วยดี รวมถึงการตรวจและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์บัณฑิตประจำ และ ศาสตราจารย์ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบัน ที่กรุณาสละเวลาในการตรวจสอบความถูกต้อง พร้อมทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องและมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่านที่ถ่ายทอดความรู้ให้แก่ข้าพเจ้าขณะที่ได้ศึกษาในสถาบันแห่งนี้

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชอาหารสัตว์ จังหวัด ชัยนาท ซึ่งให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างหญ้าที่นำมาใช้ในการทดลอง รวมถึงคุณ จันทกานต์ อรณนันท์ ที่ได้ให้คำแนะนำต่างๆ อันเป็นประโยชน์แก่การทำวิทยานิพนธ์นี้ และขอขอบคุณศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ทุกคนที่กรุณาให้บริการด้วยดีเสมอมา และขอบคุณกองทุนโครงการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2550-2552 ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ พี่ๆ น้องๆ และเพื่อนๆในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ ชาญศักดิ์ คุณแม่ สุกัญญา และครอบครัว สุขวัฒน์ ทุกคนที่ได้สนับสนุน ช่วยเหลือ ให้ความรัก ความเข้าใจ และเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะยังประโยชน์แก่ท่านที่ทำการศึกษาค้นคว้า ข้าพเจ้าขอมอบความดีนั้นให้แก่ คุณพ่อ คุณแม่ ครู อาจารย์ ที่กรุณาประสิทธิประสาทวิชาให้แก่ข้าพเจ้า ในส่วนข้อบกพร่องที่อาจเกิดขึ้นนั้นข้าพเจ้าขอน้อมรับไว้แต่เพียงผู้เดียว

นายศรัณย์ สุขวัฒน์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญรูป.....VIII

สารบัญตาราง.....X

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2

บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.....3

2.1 หญ้าไนล์ (*Acroceras macrum*).....3

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และทางเกษตร.....3

2.1.1.1 ลำต้น.....3

2.1.1.2 ใบ.....3

2.1.1.3 ช่อดอก.....3

2.1.2 การขยายพันธุ์.....5

2.1.3 ลักษณะการใช้งาน.....5

2.1.4 องค์ประกอบผลผลิตและคุณค่าทางอาหารสัตว์.....5

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....5

2.2.1 การเพาะเลี้ยงแคลลัส.....6

2.2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย.....7

2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์หญ้า.....7

2.4 การกลายพันธุ์.....9

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4.1 การกลายพันธุ์ของยีน....10
2.4.2 การกลายพันธุ์ของโครโมโซม....10
2.4.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืช....11
2.4.3.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ....12
2.4.3.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี....13
2.4.3.2.1 ผลของเซลล์พืชเมื่อได้รับรังสี....13
2.4.3.2.2 ผลที่เกิดขึ้นกับเซลล์ภายหลังการได้รับรังสี....14
2.4.3.2.3 วิธีการฉายรังสี....15
2.4.3.2.4 การหาปริมาณรังสีที่เหมาะสม....15
2.5 การปรับปรุงพันธุ์พืชวงศ์หญ้าโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์....15
2.6 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี....17

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง....19
3.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง....19
3.2 เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมี....19
3.2.1 เครื่องมืออุปกรณ์....19
3.2.2 สารเคมี....20
3.3 วิธีการทดลอง....21
3.3.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนข้อให้พัฒนาเป็นยอดจำนวนมาก....21
3.3.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนข้อ และยอดอ่อนให้พัฒนาเป็นแคลลัส....21
3.3.2.1 ส่วนข้อ....21
3.3.2.2 ส่วนยอดอ่อน....22
3.3.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนข้อและ ยอดอ่อนให้พัฒนาเป็นต้นใหม่....22

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.4 การศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์.....23

3.3.4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย.....23

3.3.4.2 การศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอย.....24

3.3.5 การศึกษาผลของพีอีจีต่อการพัฒนาของเซลล์แขวนลอย.....24

3.3.6 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการพัฒนาของเซลล์แขวนลอย.....25

3.3.7 การศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของหญ้าไนล์ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอย ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ เมื่อปลูกในสภาพธรรมชาติ (M_1V_3)...25

3.3.8 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี.....26

บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....28

4.1 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนข้อให้พัฒนาเป็นยอดจำนวนมาก..28

4.2 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนข้อ และยอดอ่อนให้พัฒนาเป็นแคลลัส.....30

4.2.1 ส่วนข้อ.....30

4.2.2 ส่วนยอดอ่อน.....31

4.3 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนข้อ และ ยอดอ่อนให้พัฒนาเป็นต้นใหม่.....34

4.4 ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์.....37

4.4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย.....37

4.4.2 ผลการศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอย.....38

4.5 ผลการศึกษาผลของพีอีจีต่อการพัฒนาของเซลล์แขวนลอย.....40

4.6 ผลการศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการพัฒนาของเซลล์แขวนลอย 43

4.7 ผลการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของหญ้าไนล์ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอย ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ เมื่อปลูกในสภาพธรรมชาติ (M_1V_3).....46

4.8 ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี.....51

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ.....59

บรรณานุกรม.....61

ภาคผนวก ก.....68

ภาคผนวก ข.....69

ภาคผนวก ค.....71

ประวัติผู้เขียน.....75

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 แสดงลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของหญ้าไนล์....4

4.1 แสดงการพัฒนาเป็นยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์....29

4.2 แสดงลักษณะการพัฒนาเป็นยอดจำนวนมากจากส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์....30

4.3 แสดงลักษณะการพัฒนาเป็นแคลลัสจากส่วนข้อ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์....33

4.4 แสดงลักษณะของยอดอ่อน และการพัฒนาเป็นแคลลัสของยอดอ่อนหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์....33

4.5 แสดงการพัฒนาของเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสเป็นต้นใหม่....35

4.6 แสดงลักษณะเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์....37

4.7 กราฟแสดงระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์ โดยวิธีการหาน้ำหนักสด.... 38

4.8 กราฟแสดงระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์ โดยวิธีการหาน้ำหนักแห้ง...38

4.9 แสดงการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์....39

4.10 แสดงการพัฒนาของเซลล์แขวนลอยหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติมพีอีจีความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์....42

4.11 แสดงผลของพีอีจีต่อการพัฒนาเป็นต้นของเซลล์แขวนลอย....42

4.12 แสดงผลของพีอีจี ต่ออัตราการอยู่รอด และค่า LD_{50} ของเซลล์แขวนลอย หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติมพีอีจี ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 20 สัปดาห์....43

4.13 แสดงผลของรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ ต่ออัตราการอยู่รอด และค่า LD_{50} ของเซลล์แขวนลอยหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS เป็นเวลา 20 สัปดาห์....44

4.14 แสดงการพัฒนาของเซลล์แขวนลอยที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ....45

4.15 แสดงการวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหญ้าไนล์ (M_1V_3)....49

4.16 แสดงตัวอย่างของหญ้าไนล์ (M_1V_3) ที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นควบคุม....50

4.17 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-01....51

4.18 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-02....52

4.19 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-03....52

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.20 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-04.....53
4.21 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-06.....53
4.22 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-08.....54
4.23 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-09.....54
4.24 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ OPA-10.....55

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 แสดงชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี....27

4.1 ผลของ BA ต่อการเกิดยอดจำนวนมากจากส่วนข้อ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์....29

4.2 การเกิดแคลลัสและเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อ หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์....32

4.3 การเกิดแคลลัสและเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงส่วนยอดอ่อน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์....32

4.4 ผลของ BA ต่อการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนข้อ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์....36

4.5 ผลของ BA ต่อการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากยอดอ่อน หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์....36

4.6 ผลของ BA ต่อการพัฒนาเป็นต้นของเซลล์แขวนลอย หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์....40

4.7 ผลของพีอีจี ต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด และการพัฒนาเป็นต้นของเซลล์แขวนลอย หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม พีอีจีความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 20 สัปดาห์....41

4.8 ผลของรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดและการพัฒนาเป็นต้นของเซลล์แขวนลอย หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 20 สัปดาห์....45

4.9 ผลของรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ ต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหญ้าไนล์ (M_1V_3) ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสี หลังการย้ายปลูก 45 วัน....47

4.10 ค่าเฉลี่ยความสูง ขนาดของใบ และขนาดของลำต้นของหญ้าไนล์ (M_1V_3) ที่คัดเลือกมาจำนวน 9 โคลน ที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นควบคุม หลังการย้ายปลูก 45 วัน....48

4.11 แสดงการจำแนกลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างโดยไพร์เมอร์จำนวน 8 ชนิด....56

4.12 แสดงจำนวนไพร์เมอร์ที่สามารถจำแนกความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างต้นควบคุมกับต้นตัวอย่าง....58

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

1. การวิเคราะห์ผลของ BA ต่อการเกิดยอดจำนวนมากจากส่วนข้อของหญ้าไนล์หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์....71
2. การวิเคราะห์ผลการเกิดแคลลัสและเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อ หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์....71
3. การวิเคราะห์ผลการเกิดแคลลัสและเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงส่วนยอดอ่อนหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์....72
4. การวิเคราะห์ผลของ BA ต่อการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนยอดอ่อนเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์....72
5. การวิเคราะห์ผลของ BA ต่อการพัฒนาเป็นต้นของเซลล์แขวนลอยหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์....72
6. การวิเคราะห์ผลของพีอีจี ต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด และการพัฒนาเป็นต้นของเซลล์แขวนลอยหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม พีอีจีความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 20 สัปดาห์....73
7. ผลของรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด และการพัฒนาเป็นต้นของเซลล์แขวนลอย หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 20 สัปดาห์....73
8. ผลของรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ ต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหญ้าไนล์ (M_1V_3) ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสี หลังการย้ายปลูก 45 วัน....74
9. ค่าเฉลี่ยความสูง ขนาดของใบ และขนาดของลำต้นของหญ้าไนล์ (M_1V_3) ที่คัดเลือกมาจำนวน 9 โคลน ที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นควบคุม หลังการย้ายปลูก 45 วัน....74

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

อุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้องในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งโคเนื้อและโคนมนั้นได้มีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้น แต่ปัญหาสำคัญที่ทำให้ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควรเนื่องจากพืชที่ใช้เป็นอาหารสัตว์นั้นมีไม่เพียงพอกับความต้องการของสัตว์ที่เพิ่มมากขึ้น ประเทศไทยมีพื้นที่ที่เกษตรกรปลูกหญ้าและพืชอาหารสัตว์ 1.87 ล้านไร่ มีพื้นที่ทุ่งหญ้าสาธารณะ 3.15 ล้านไร่ (กรมปศุสัตว์, 2549) คิดเป็นผลผลิตพืชอาหารสัตว์ประมาณ 50 ล้านตันต่อปี แต่เมื่อพิจารณาความต้องการอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องได้แก่ โคเนื้อ โคนม กระบือ แพะ และแกะ ประเทศไทยมีสัตว์เคี้ยวเอื้องจำนวน 11.4 ล้านตัว (กรมปศุสัตว์, 2550) จะต้องการใช้เสบียงอาหารสัตว์ประมาณ 150 ล้านตันต่อปี เกษตรกรจึงต้องใช้อาหารข้นมาเสริมเพิ่มขึ้น ทำให้ต้นทุนค่าอาหารสัตว์สูงขึ้น ดังนั้นการปลูกพืชอาหารสัตว์พันธุ์ดีมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการเลี้ยงสัตว์ ปัจจุบันกองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ ได้ดำเนินงานโครงการพัฒนาอาชีพการผลิตพืชอาหารสัตว์เพื่อจำหน่าย ซึ่งจะทำให้ได้อาหารสัตว์คุณภาพดีสำหรับใช้เลี้ยงสัตว์เพิ่มมากขึ้น ช่วยลดต้นทุนค่าอาหารข้นได้ทางหนึ่ง อีกทั้งยังส่งเสริมการพัฒนาพืชอาหารสัตว์ให้เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ และเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ที่สำคัญของโลก ดังนั้นจึงควรมีการปรับปรุงพันธุ์พืชอาหารสัตว์เพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีคุณภาพที่ดี

หญ้าไนล์ (*Acroceras macrum*) เป็นหญ้าอาหารสัตว์ที่มีการนำเข้ามาจากประเทศไต้หวัน มีถิ่นกำเนิดอยู่ที่แอฟริกาใต้ มีคุณค่าทางโภชนะ และความน่ากินสูง (Wilson และ Hacker, 1987) และมีการศึกษาพบว่าหญ้าไนล์มีการย่อยที่ง่ายกว่าและมีคุณภาพที่สูงกว่าหญ้าแพงโกลา (*Digitaria eriantha*) ที่ปลูกในสภาพเดียวกันและมีแนวโน้มที่จะปลูกหญ้าไนล์แทนหญ้าแพงโกลาในอนาคตอันใกล้นี้ (Jeng-Bin และคณะ, 2004) ในปัจจุบันเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีบทบาทอย่างมากต่อการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยอาจใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี หรือสารเคมี ซึ่งการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมาเป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในพืช เนื่องจากรังสีแกมมามีคุณสมบัติเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า มีอำนาจทะลุทะลวงสูง วิธีการฉายรังสีไม่ยุ่งยาก ไม่มีรังสีตกค้างอยู่ในพืช (สิรนุช, 2536) มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์หญ้าอาหารสัตว์โดยการฉายรังสีแกมมา เช่น หญ้ารูซี่ (ดิริฎา, 2545) หญ้ากินนีสีม่วง (สุมล, 2546) หญ้าเนเปียร์แคระ (จันทกานต์, 2540) หญ้าแพงโกลา (ตีรณา, 2551) และหญ้ากรีนแพนิค (Shivashilanker และคณะ, 1988) ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการปรับปรุงพันธุ์หญ้าไนล์ในประเทศไทยมาก่อน ทำให้ข้อมูลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ยังมีค่อนข้างน้อย และหญ้าไนล์ยังเป็นพืชผสมข้ามเนื่องจาก มีเกสรตัวผู้หรือเกสรตัวเมียเป็นหมันทำให้ผสมตัวเองไม่ได้ (self-sterility) จึง

ยากต่อการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการผสมพันธุ์แบบดั้งเดิม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้รังสีแกมมาเพื่อชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) เพื่อคัดเลือกหญ้าไนล์สายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะที่ดีกว่าสายพันธุ์เดิม เช่น มีขนาดลำต้นเล็กลง เพื่อให้ง่ายต่อการทำเป็นหญ้าแห้ง รวมทั้งตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD : Random Amplified Polymorphism DNA) ซึ่งสามารถนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้ปลูกหญ้า และอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้องในอนาคตต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนข้อให้เกิดยอดจำนวนมาก

1.2.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนข้อ และยอดอ่อนของหญ้าไนล์ ให้เกิดแคลลัส และชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นใหม่

1.2.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์ และการพัฒนาเป็นต้นใหม่

1.2.4 ศึกษาหาปริมาณรังสีแกมมาที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าไนล์ เพื่อหาปริมาณรังสีที่ทำให้เซลล์แขวนลอยมีอัตราการอยู่รอด 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50})

1.2.5 ศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของหญ้าไนล์ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆเมื่อปลูกในสภาพธรรมชาติ

1.2.6 ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ได้หญ้าอาหารสัตว์สายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะที่ต้องการเช่น มีขนาดลำต้นเล็กลง เพื่อให้ง่ายต่อการทำเป็นหญ้าแห้ง และถ่ายทอดให้ถึงมือเกษตรกรที่ทำการเพาะปลูกหญ้าอาหารสัตว์ และเกษตรกรที่เลี้ยงสัตว์ต่อไป

1.3.2 มีฐานข้อมูลทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการฉายรังสีแกมมา เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์หญ้าไนล์ต่อไป

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 หญ้าไนล์ (*Acroceras macrum*)

หญ้าไนล์ มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Acroceras macrum* เป็นพืชในวงศ์หญ้า Gramineae (Poaceae) สกุล (Genus) *Acroceras* โดยมีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกาใน แองโกลา คองโก และในแถบแอฟริกาใต้ ที่บริเวณ แทนซาเนีย อูกานดา แซมเบีย ปลูกมากในแถบหุบเขาตามรุ่มแม่น้ำ และตามทุ่งหญ้าที่ชื้นแฉะ

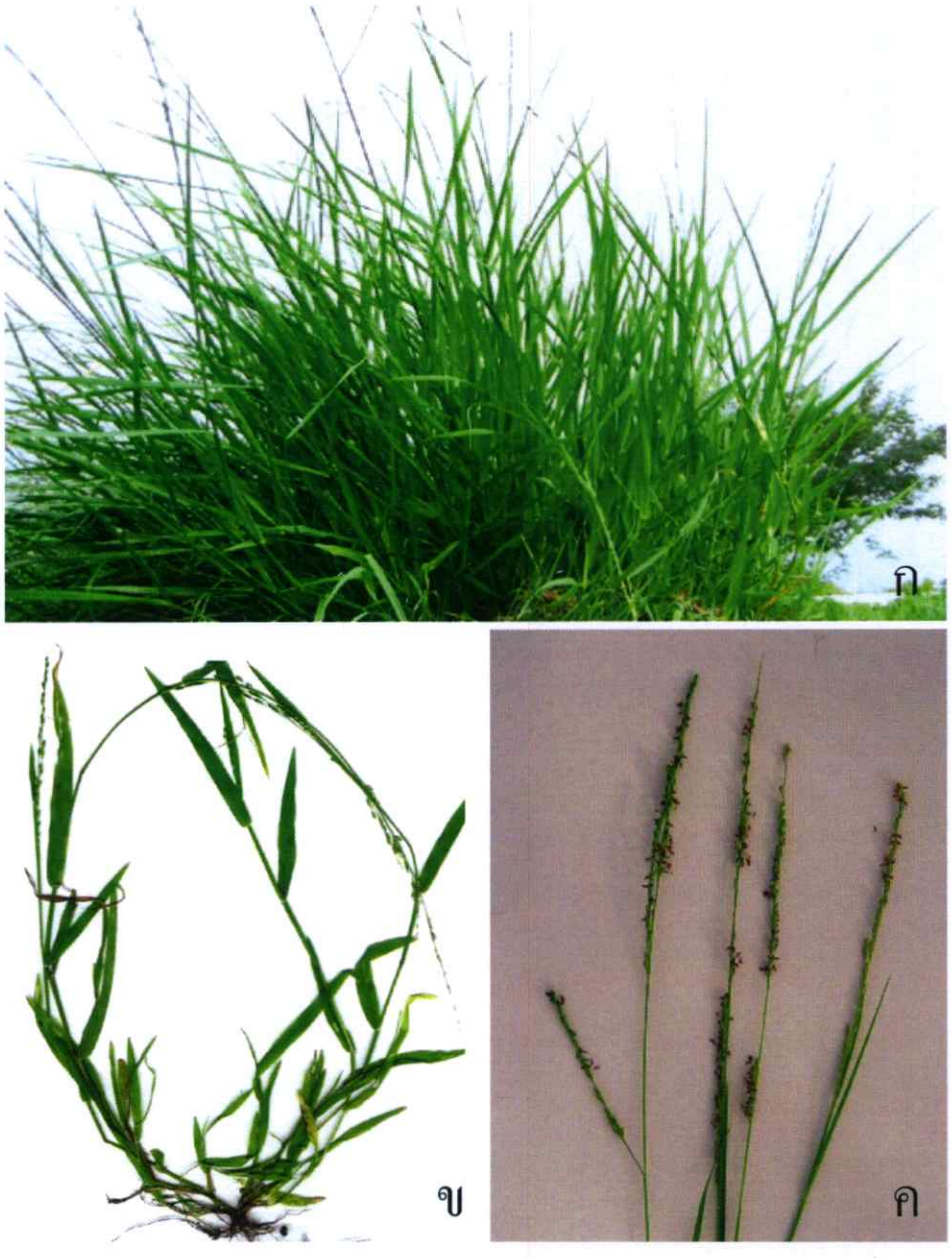
2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และทางการเกษตร

สามารถเจริญงอกงามดีในที่ชุ่มชื้น ดินที่น้ำซึมผ่านได้ดี เจริญในภูมิประเทศที่ชุ่มชื้นมีฝนประมาณ 625-1,500 มิลลิเมตร แต่ก็สามารถเจริญได้ในเขตฝนตกน้อยที่มีระบบชลประทาน ทนต่อน้ำท่วม แต่ไม่ทนต่อความแห้งแล้ง (Rhind และ Goodenough, 1979)

2.1.1.1 ลำต้น ลำต้นตั้งตรง หรือทอดเลื้อยขนานไปกับผิวดิน สูงเป็นปล้อง แตกชูก้านตรง มีจำนวนก้านพอประมาณ ก้านสูงราว 30-70 เซนติเมตร แต่มักสูงไม่เกิน 1 เมตร ในบางครั้งจะแตกออกรากขนานกับพื้น เจริญงอกงามเป็นพุ่ม มีรากเป็นรากฝอย มีไหล (stolons) เป็นปล้องเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5-4 มิลลิเมตร (ภาพที่ 2.1 ก)

2.1.1.2 ใบ ใบสีเขียวสด เป็นแบบรูปใบหอกแคบ (linear-lanceolate) หรือเป็นแบบรูปไข่แกมใบหอก (ovate-lanceolate) ยาว 8-20 เซนติเมตร กว้าง 5-12 มิลลิเมตร โคนใบบานเป็นรูปหัวใจ (cordate) ปลายใบแหลม ใบเรียบ หรือมีขนละเอียด ลิ้นใบ (ligule) มีขนเล็กน้อย ขอบใบจากโคนใบถึงกลางใบมีรอยหยักแบบขนครุย (ciliate) (ภาพที่ 2.1 ข)

2.1.1.3 ช่อดอก ช่อดอกออกที่ปลายยอดแบบแยกแขนง (panicle) ยาวประมาณ 15- 25 เซนติเมตร มี 2-5 ช่อดอกย่อย (spikelike) กลุ่มดอกย่อย (spikelets) มีสีเขียวอ่อน มีลักษณะปลายแหลม (acuminate) หรือปลายมน (obtuse) ยาวประมาณ 4-5 มิลลิเมตร ไม่มีหาง (awnless) ประกอบด้วย 2 กลุ่มดอกย่อย (florets) ด้านล่างเป็นเพศผู้ ด้านบนเป็นเพศรวม เกสรเพศเมีย (pistil) มีสีม่วง (Oliveira และคณะ, 1973) (ภาพที่ 2.1 ค)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของหญ้าไนล์

ก. ลักษณะต้นของหญ้าไนล์

ข. ลักษณะใบและลำต้นของหญ้าไนล์

ค. ลักษณะช่อดอกของหญ้าไนล์

ที่มา : http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Acroceras_macrum.htm

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/b/be/Ehrharta_erecta.jpg

2.1.2 การขยายพันธุ์

ผลิตดอกในวงจรแสงที่ยาว ในราวเดือนกรกฎาคมทางซีกโลกใต้ มักจะให้เมล็ดได้น้อย ทางเลือกที่เหมาะในการขยายพันธุ์คือ การใช้เหง้า หรืออาจจะใช้วิธีตัดส่วนไหล (stolon) ออกเป็นท่อนๆแล้ว หว่านลงบนพื้นที่ดินเพาะปลูกและไถกลบ แต่วิธีนี้ไม่ประสบผลสำเร็จมากเท่ากับการขยายพันธุ์จากเหง้า ส่วนการผลิตเมล็ดนั้นทำได้ยาก เนื่องจากการเป็นหมันด้วยตัวเอง (self-sterile) แม้นด้วยระบบนิเวศที่เหมาะสมในแปลงเพาะปลูกก็ยังให้เมล็ดในปริมาณน้อย โดยมีสถิติสูงสุดได้ประมาณ 34 กิโลกรัมต่อเฮกแตร์

2.1.3 ลักษณะการใช้งาน

เพาะปลูกเป็นทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ เพื่อการปศุสัตว์ สามารถปล่อยให้สัตว์แทะเล็ม ทนทานต่อการถูกแทะเล็ม แต่ไม่ทนต่อการถูกเหยียบย่ำมากนัก หรือนำมาใช้เป็นหญ้าแห้ง

2.1.4 องค์ประกอบผลผลิต และคุณค่าทางอาหารสัตว์

มีความชื้นสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการตัด 4 สัปดาห์ มีระดับของโปรตีนหยาบอยู่ระหว่าง 9-17 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับ อายุ และ สภาพการเจริญเติบโต ระดับของแคลเซียม อยู่ระหว่าง 0.2-0.6 เปอร์เซ็นต์ และระดับของโปรตีน อยู่ระหว่าง 0.1-0.9 เปอร์เซ็นต์ (Gibbs และคณะ, 1990 ; Rhind และ Goodenough, 1979)

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือ การนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เช่นอวัยวะ เนื้อเยื่อเซลล์มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วยวิตามิน แร่ธาตุ น้ำตาล สารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และมีการควบคุมสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น อุณหภูมิ แสง ความชื้น ชิ้นส่วนเหล่านี้มีการเจริญเติบโต และมีการพัฒนาได้หลายรูปแบบ เช่นสามารถพัฒนาเป็นแคลลัส (callus formation) แล้วพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ (embryogenesis) หรือชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงพัฒนาเป็นอวัยวะ (organogenesis) จากนั้นจึงพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ (อรดี, 2539)

เซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะต่างๆของพืช ที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นได้ผ่านกระบวนการเปลี่ยนสภาพเป็นโครงสร้างที่สมบูรณ์และทำหน้าที่เฉพาะอย่างตามที่กำหนดมาแล้ว การจะชักนำชิ้นส่วนเหล่านี้ให้มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานและมีพัฒนาการจนเกิดเป็นพืชต้นใหม่ได้จะต้องผ่านขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงสภาพเพื่อเปลี่ยนสภาพของเซลล์ 2 ขั้นตอน คือ

1. Dedifferentiation เพื่อเปลี่ยนสถานะของเซลล์ เนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆให้มาอยู่ในสภาพที่เป็นเซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนสภาพ แต่มีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนโดยการแบ่งเซลล์แบบ proliferative division ที่อาจอยู่ในรูปของกลุ่มเซลล์หรือแคลลัส หรืออยู่ในรูปเซลล์เดี่ยวหรือเซลล์แขวนลอย ซึ่งจะเป็นเซลล์ที่ยังไม่ถูกกำหนดให้มีการเปลี่ยนสภาพ (undetermined cell)

2. Redifferentiation เพื่อเปลี่ยนสถานะของกลุ่มเซลล์หรือแคลลัสให้กลับมีการกำหนดการเปลี่ยนแปลงสภาพ (determined cell) เพื่อพร้อมเข้าสู่กระบวนการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่

2.2.1 การเพาะเลี้ยงแคลลัส

การเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์ที่อยู่รวมกันและยังไม่มีการพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆ ประกอบด้วยเซลล์พาเรงไคมา มีขนาดไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีแวคิวโอล จำนวนมาก ส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุอาจมีสีเขียวของคลอโรฟิลล์ มีสีเหลืองของแคโรทีนอยด์และฟลาโวนอยด์ หรือมีสีม่วงจากแอนโทไซยานิน ปริมาณและชนิดของรงควัตถุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหาร และปัจจัยสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง เช่น แสง ลักษณะของแคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันหนาแน่น (compact callus) สีเหลืองอ่อนหรือขาวจะพัฒนาเป็นคัพภะแบบเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสต่อไป ส่วนแคลลัสที่เกาะกันอย่างหลวมๆเรียกว่า friable callus หรือนอน-เอ็มบริโอจีนิคแคลลัส (รังสฤษฎ์, 2540 ; Vasil, 1987) การชักนำแคลลัส ในระยะแรกจะมีการกระตุ้นกิจกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสโดยสภาพทางสรีรวิทยาของเซลล์พืชและสภาพการเพาะเลี้ยงจะมีผลต่อการแบ่งเซลล์ดังกล่าว จากนั้นเซลล์ที่แบ่งแบบไมโทซิสจะเปลี่ยนกลับไปเป็นเนื้อเยื่อเจริญ และมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์พืชเกิดขึ้นต่อไป (Dodds และ Roberts, 1995) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงมี 2 แบบ คือ

1. Embryogenesis เป็นกระบวนการที่เซลล์ร่างกายเปลี่ยนรูปไปเป็นโครงสร้างที่มีส่วนยอดและราก (bipolar structure) ซึ่งมีการเจริญเติบโตระยะต่างๆเหมือนเอ็มบริโอ (embryo) ที่เกิดจากการรวมตัวของเซลล์สืบพันธุ์ เรียกว่า โซมาติก เอ็มบริโอ เป็นโครงสร้างที่มีทั้งส่วนของ shoot primodia และ root primodia ที่เจริญมาจากจุดกำเนิดเดียวกัน โดย เอ็มบริออยด์ (embryoid) จะเกิดได้ 2 ลักษณะ คือ

1.1 Direct embryogenesis เกิดเอ็มบริออยด์โดยตรงจากเซลล์หรือกลุ่มเซลล์โดยไม่ผ่านการเกิดแคลลัสมาก่อน

1.2 Indirect embryogenesis เกิดเอ็มบริออยด์จากแคลลัสโดยชักนำส่วนที่ใช้เพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นแคลลัสที่พร้อมจะเจริญเป็นเอ็มบริออยด์เรียกว่า เอ็มบริโอจีนิคแคลลัส

2. Organogenesis เป็นกระบวนการเกิดอวัยวะจากกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะเหมือนเซลล์แคมเบียม คือ เซลล์ที่มีขนาดเล็กมีแวคิวโอลน้อย ไซโตพลาสซึมเข้มข้น มีเม็ดแป้งขนาดใหญ่ มีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วเรียกว่า เมอริสเต็มมอยด์ (meristemoid) จากจุดกำเนิดนี้จะมีการเจริญเป็นอวัยวะเพียงชนิดเดียวคือ ยอด หรือ ราก เรียก monopolar structure เกิดขึ้น 2 ลักษณะ

2.1 Direct organogenesis อวัยวะเกิดโดยตรงจากเซลล์เนื้อเยื่อหรือ ตา ยอด ตาข้างที่นำมาเพาะเลี้ยงโดยไม่เกิดจากแคลลัสมาก่อน

2.2 Indirect organogenesis อวัยวะเกิดจากแคลลัสบนชิ้นเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง (สุมล, 2546)

2.2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

หมายถึงการนำเซลล์เดี่ยว ๆ (single cell) หรือ กลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก (aggregate cells) มาเลี้ยงในอาหารเหลว เนื้อเยื่อที่เหมาะที่สุดที่จะใช้คือ แคลลัส ซึ่งง่ายต่อการแยกหรือกระจายเซลล์ออกจากกัน การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย มักนิยมเลี้ยงโดยการนำเอาแคลลัสที่เกาะตัวกันหลวม ๆ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว บนเครื่องเขย่า เมื่อเลี้ยงได้ประมาณ 2 - 3 สัปดาห์ ก็จะได้เซลล์แขวนลอย ซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์เดี่ยวที่เรียกว่า (free single cell) และเซลล์ที่เกาะกันเป็นกลุ่มที่เรียกว่า (Agregat cell) การรักษาหรือขยายปริมาณเซลล์แขวนลอย ไปเรื่อย ๆ ทำได้โดยการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 - 3 สัปดาห์ ขึ้นอยู่กับปริมาณของเซลล์และชนิดของพืชที่เพาะเลี้ยง (รังสฤษฎ์, 2541) การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ คือ

2.2.2.1 Lag phase ระยะนี้เซลล์แขวนลอยจะมีการปรับสภาพให้เข้ากับอาหารใหม่ ระยะนี้จะใช้เวลานานขึ้นถ้าปริมาณเซลล์เริ่มต้นมีน้อย โดยทั่วไปควรใช้เซลล์เริ่มต้นประมาณ 9,000-15,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2.2.2.2 Log phase ระยะนี้เซลล์แขวนลอยมีอัตราการเจริญเติบโตสูง ปริมาณเซลล์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เหมาะสำหรับนำไปใช้ในกิจกรรมต่างๆ เช่นเปลี่ยนอาหาร นำไปแยกโปรโทพลาสต์ นำไปชักนำให้พัฒนาเป็นต้น

2.2.2.3 Stationary phase ระยะนี้เซลล์จะมีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับอัตราการตาย ถ้ามีการย้ายเซลล์แขวนลอยลงอาหารใหม่ในระยะนี้เซลล์จะอยู่ในระยะ lag phase นาน

2.2.2.4 Death phase ระยะนี้เซลล์แขวนลอยจะมีอัตราการตายมากกว่าอัตราการเจริญเติบโต โดยทั่วไปจะไม่เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยจนกระทั่งมาถึงระยะนี้ เนื่องจากจะทำให้อัตราการรอดชีวิตต่ำ ทำให้การพัฒนาเป็นต้นต่ำไปด้วย (อนุรักษ์, 2550)

2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์หญ้า

ปัจจุบันเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีบทบาทอย่างมากต่อการปรับปรุงพันธุ์พืช ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์หญ้า สามารถที่จะชักนำให้เกิดแคลลัสและชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้โดยใช้ส่วนต่างๆ เช่น เมล็ด ข้อ และ ช่อดอกอ่อน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง หรือ เพาะเลี้ยงแบบเซลล์แขวนลอย (cell suspension) หรือ การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก ในอาหารสูตรต่างๆ เช่น MS (Murashige และ Skoog, 1962) หรือ LS (Linsmaier และ Skoog, 1965)

Ashok และคณะ (2000) ทำการเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนของหญ้าเบอร์มิวดาพันธุ์ลูกผสม "Tifgreen" (*Cynodon dactylon x C. transvaalensis*) และ "Savannah" (*C. dactylon*) บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1-3 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่ได้ไม่มีลักษณะเป็นเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส เซลล์

เกาะกันหลวมๆ พบว่าเมื่อเติม BA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้มีรูปร่างเป็นกลุ่มก้อน เซลล์เกาะกันแน่น ซึ่งเป็นลักษณะของเอ็มบริโอจีนิกแคลลัส ซึ่งเกิดขึ้นประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ สามารถตรวจสอบได้โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และสามารถชักนำให้พัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ บนอาหารที่ประกอบด้วย BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยหญ้าทั้งสองมีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นเท่ากับ 79.5 และ 83.3 ตามลำดับ และสามารถชักนำให้เกิดรากได้โดยย้ายมาเลี้ยงบนอาหารครึ่ง MS และ การทดลองของ Poeaim และคณะ (2004) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเมล็ดของหญ้า *Zoysia sp* บนอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลฟา-คีโตกลูตาริก 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 3 เปอร์เซ็นต์ และเจลไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดคอมแพคแคลลัสได้หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 35 วัน และสามารถชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นได้บนอาหารสูตร LS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 3 เปอร์เซ็นต์ และ เจลไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ต่อมา Poeaim และคณะ (2005) ศึกษาการเพาะเลี้ยงปลายยอดของหญ้า *Zoysia minima* และ *Z. japonica.* var. Miyako และ Himeno บนอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลฟา-คีโตกลูตาริก 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 3 เปอร์เซ็นต์ และเจลไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 3 เปอร์เซ็นต์ และเจลไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และการทดลองของ Dhandapani และคณะ (2008) ศึกษาการเพาะเลี้ยงส่วนข้อของหญ้า *Z. matrella* L. Merr. cv. Konhee พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอบไซซิก ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด และเกิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอบไซซิก 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถชักนำเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และการทดลองของ Li และคณะ (2009) สามารถชักนำเมล็ดของหญ้า Indiangrass (*Sorghastrum nutans* L. Nash) ให้พัฒนาเป็นเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสได้ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสเท่ากับ 54.5 เปอร์เซ็นต์ และการทดลองของ กมลพรรณ และคณะ (2535) รายงานว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากส่วนข้อของหญ้าแฝกหอม (*Ventiveria zizaniodes* Wash.) โดยสามารถพัฒนาเป็นยอดได้ 10 ยอดต่อข้อ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 10 ไมโครโมลต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และ ดิริฎา (2545) ทดลองชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของหญ้ารูซี่ บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 6 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุด 3.19 ยอดต่อเมล็ด ต่อมา วิภาสิริ (2546) ทำการทดลองชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของ

หญ้าซิกแนลนอน พบว่าอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากคือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA 6 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการเกิดยอดหลายยอดเฉลี่ย 71.37 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนยอดเฉลี่ยต่อเมล็ด 3.82 ยอด และ ตีรณา (2551) รายงานว่าสามารถชักนำส่วนข้อของหญ้าแพงโกล่า (*Digitaria eriantha*) ให้เกิดยอดจำนวนมากได้ โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อข้อสูงสุด คือ 13.05 ยอด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 8 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถชักนำยอดให้เกิดรากได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม ถ่าน 1 กรัมต่อลิตร

ส่วนการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยนั้นมีรายงานดังนี้ Ousama และคณะ (1990) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยโดยทำการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจาก mature caryopes ของหญ้า perennial ryegrass โดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ครึ่ง MS ที่เติม 2,4-D 6 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซส 3 กรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และสามารถชักนำให้พัฒนาเป็นต้นใหม่ได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ครึ่ง MS ที่เติม 0.5 fluridone มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และการทดลองของ Poeaim และคณะ (1995) ศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N6 ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวิธีหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง พบว่าระยะ log phase อยู่ที่ช่วงเวลา 6-16 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์แขวนลอยเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเหมาะสำหรับนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงเป็นต้นใหม่ และการแยกโพรโทพลาสต์ ต่อมา Patnaik และคณะ (1997) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยโดยนำแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนข้อของหญ้า Palmarosa (*Cymbopogon martinii*) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D 13.6 ไมโครโมล และ ไคเนทิน 1.15 ไมโครโมล ไมโอ-อินโนซิทอล 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์จะเจริญได้ดีในช่วง 12-15 วันของการเพาะเลี้ยง และสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้เมื่อย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร สูตร MS ที่เติม BA 6.7 ไมโครโมล และไคเนทิน 1.15 ไมโครโมล ต่อมา Dutta และ Conger (1999) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยและการชักนำให้พัฒนาเป็นต้นใหม่ของหญ้า Switchgrass (*Panicum virgatum*) โดยนำเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนช่อดอกอ่อน มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D 9 ไมโคลโมล BA 4.4 ไมโคลโมล และมอลโตส 30 กรัมต่อลิตร และสามารถนำเซลล์แขวนลอยอายุ 4 สัปดาห์ชักนำให้พัฒนาเป็นต้นใหม่ได้

2.4 การกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ คือ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมของเซลล์ การกลายพันธุ์อาจเกี่ยวข้องกับการสูญหายไปบางส่วนของยีน หรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในยีน เรียกว่า การกลายพันธุ์ของยีน (gene mutation) หรือพอยต์มิวเตชัน (point mutation) ส่วนการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้อง

กับการแลกเปลี่ยนส่วนของโครโมโซม การสูญหายไปหรือเพิ่มเข้ามาของส่วนของโครโมโซมที่ครอบคลุมมากกว่าหนึ่งยีน เรียกว่าการกลายพันธุ์ของโครโมโซม (chromosome mutation) (วิสุทธิ์, 2536)

2.4.1. การกลายพันธุ์ของยีน (gene mutation)

การเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวข้องกับลำดับของนิวคลีโอไทด์เพียงไม่กี่โมเลกุล เช่นการเพิ่มหรือขาดหายไปของเบสหรือการแทนที่เบสชนิดหนึ่งด้วยเบสอีกชนิดหนึ่ง หรือทำให้ลำดับของเบสบนดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป แบ่งตามการกลายของยีนได้ 2 ชนิด คือ

2.4.1.1 การกลายแบบเฟรมชิพต์ (frameshift mutation)

เกิดจากการเพิ่มหรือการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ ทำให้ลำดับเบสบน mRNA เกิดการเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้ลำดับอะมิโนบนสายโพลีเปปไทด์เปลี่ยนแปลงไป ทำให้โปรตีนที่สร้างจากยีนนั้นไม่สามารถทำงานได้เหมือนเดิม หรือทำได้แต่ไม่มีประสิทธิภาพ หรือทำงานไม่ได้เลย

2.4.1.2 การกลายแบบเบสซับสติติวชั่น (base substitution)

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการแทนที่คู่เบส เกิดได้ 2 ลักษณะ คือ

2.4.1.2.1 ทรานซิชั่น (transition)

การแทนที่เบสชนิดหนึ่งด้วยเบสอีกชนิดหนึ่งในกลุ่มเดียวกัน เช่น เบสกลุ่มพิวรีน (purine) มี 2 ชนิด คือ อะดินีน (adenine, A) และ กัวนีน (guanine, G) ดังนั้นเบสอะดินีน จะเข้าแทนที่เบสกัวนีน หรือกลับกัน และในกลุ่มของเบสไพริมิดีน (pyrimidine) มี 2 ชนิด คือ ไซโตซีน (cytosine, C) และไทมีน (thymine, T) ก็จะแทนที่ซึ่งกันและกันได้

2.4.1.2.2 ทรานเวอร์ชัน (transversion)

การแทนที่เบสกลุ่มพิวรีน ด้วยเบสกลุ่มไพริมิดีน หรือ แทนที่เบสกลุ่มไพริมิดีน ด้วยเบสกลุ่มพิวรีน คือ เป็นการแทนที่เบสต่างกลุ่ม

2.4.2 การกลายพันธุ์ของโครโมโซม (chromosome mutation)

การเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวข้องกับยีนหลายยีน เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง หรือจำนวนโครโมโซม แบ่งการกลายของโครโมโซมเป็น 2 ชนิดคือ

2.4.2.1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม

ลักษณะที่เปลี่ยนแปลงเกิดจากการแตกหักของโครโมโซม แล้วมีการเชื่อมต่อกันโดยอาจจะมีชิ้นส่วนขาดหาย (deletion) การขาดหายไปนั้นทำให้ยีนจำนวนหนึ่งหายไปด้วย หรือมีการเชื่อมอย่างผิดปกติ เช่น มีชิ้นส่วนโครโมโซมเพิ่มขึ้นมา (duplication) การเชื่อมแบบกลับทิศทาง (inversion) หรือการเชื่อมสลับคู่ระหว่างโครโมโซมต่างคู่กัน (translocation) จะมีผลทำให้สิ่งมีชีวิตเกิดการเปลี่ยนแปลงไปได้โดยจะมีผลมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับชนิดของยีนและจำนวนยีนที่เกี่ยวข้อง

2.4.2.2 การเปลี่ยนแปลงจำนวนของโครโมโซม

การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

2.4.2.2.1 แอนิวพลอยด์ (aneuploid) เป็นการเพิ่มขึ้นมาหรือหลุดหายไปของโครโมโซมทั้งอัน เป็นจำนวนหนึ่งหรือมากกว่า 1 โครโมโซมขึ้นไป เช่นสิ่งมีชีวิตที่เป็นดิพลอยด์ ก็จะมีจำนวนโครโมโซมเปลี่ยนเป็น 2n + 1, 2n + 2, 2n -1 เป็นต้น การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมแบบนี้ อาจเกิดได้เองตามธรรมชาติหรือเกิดจากการเหนี่ยวนำ ซึ่งจะมีประโยชน์ในด้านการศึกษาทางเซลล์พันธุศาสตร์ แต่ยังไม่มีความสำคัญในด้านการปรับปรุงพันธุ์โดยการกลายพันธุ์

2.4.2.2.2 ยูพลอยด์ (euploid) เป็นการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของโครโมโซมเป็นชุด พืชที่มีเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ประกอบไปด้วยจีโนมครบชุดอย่างน้อย 1 ชุด เรียกว่าพืช โมโนพลอยด์ (monoploid) รวมถึงพืชที่มีจีโนมเพิ่มเป็นผลคูณของชุดจีโนม คือ ดิพลอยด์ (diploid) ทริพลอยด์ (triploid) หรือเรียกรวมๆว่า พอลีพลอยด์ (polyploid) (อรุณี, 2541)

การกลายพันธุ์แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) ซึ่งเป็นผลมาจากรังสี สารเคมี อุณหภูมิ ที่มีอยู่ในธรรมชาติ กระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ และการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำ (induced mutation) เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดจากมนุษย์ใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ (mutagen) (ประดิษฐ์, 2546)

2.4.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืช

การปรับปรุงพันธุ์เพื่อสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ ที่มีลักษณะที่ต้องการนั้นทำได้หลายวิธี วิธีการหนึ่งที่ทำให้ได้พืชสายพันธุ์ใหม่อย่างรวดเร็วกว่าวิธีดั้งเดิม และยังสามารถถ่ายทอดลักษณะที่ต้องการไปยังรุ่นลูกชั่วต่อๆไปได้ นั้นคือ การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induce mutation) พันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำให้เกิดในพืชสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ 2 แนวทาง คือ

1. การใช้ประโยชน์โดยตรง คือการนำมาขยายพันธุ์ ส่งเสริมได้ทันที เหมาะสมกับพืชที่มีการปรับปรุงพันธุ์ยังไม่ได้ระดับสูงสุด สามารถเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมได้ง่ายทำให้ได้ จีโนไทป์ใหม่ๆ ออกมาและนำไปใช้เป็นพันธุ์ใหม่ได้โดยตรง ระยะเวลาในการได้พันธุ์ใหม่จึงค่อนข้างสั้น

2. การใช้ประโยชน์ทางอ้อม พันธุ์กลายที่มีลักษณะที่น่าสนใจ แต่ยังไม่ดีพอที่จะนำมาขยายพันธุ์โดยตรง เนื่องจากยังมีลักษณะอื่นๆ ที่ไม่ต้องการอยู่ด้วย โดยถ่ายทอดลักษณะที่ต้องการเข้าไปยังพืชที่ต้องการปรับปรุง

การกลายพันธุ์ที่เกิดโดยไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด เรียกว่าการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติซึ่งมีอัตราการเกิดที่ต่ำ วิธีการต่างๆ ที่นำมาชักนำให้เกิดอัตราการกลายพันธุ์มากขึ้น เช่น

1. การชักนำให้กลายพันธุ์โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2. การชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยรังสี

3. การชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี (สิรนุช, 2540)

2.4.3.1 การชักนำให้กลายพันธุ์โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยชักนำให้เกิดแคลลัสหรือเลี้ยงในสภาพที่เป็นเซลล์แขวนลอย เมื่อกลุ่มเซลล์มีการพัฒนาไปเป็นต้นพืช พบว่า พืชที่เกิดขึ้นใหม่มีลักษณะแตกต่างกันออกไป ซึ่งไม่ปรากฏในพันธุ์เดิม บางลักษณะสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ แสดงว่าได้เกิดการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมขึ้น ลักษณะความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เรียกว่า โซมาโคลนอลแวริเอชัน (somaclonal variation) สามารถคัดเลือกลักษณะที่ดีไปใช้ในการสร้างพันธุ์ใหม่ได้ การเกิดแปรผันทางพันธุกรรรมในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง มีการเกิดได้มากน้อยขึ้นอยู่กับวิธีการเพาะเลี้ยง และระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง การเพาะเลี้ยงโดยผ่านแคลลัสหรือผ่านสภาพที่เป็นเซลล์แขวนลอย ทำให้ต้นพืชที่เกิดมามีการแปรผันทางพันธุกรรมสูง ยิ่งเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงระยะที่เป็นต้นพืชใช้เวลานาน ยิ่งมีโอกาสทำให้เกิดการแปรผันทางพันธุกรรมสูงขึ้น การแปรผันที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงมีแหล่งที่มา 3 แหล่งคือ

1. การแปรผันทางพันธุกรรมเกิดอยู่แล้วในเนื้อเยื่อที่ใช้เพาะเลี้ยง
2. การแปรผันทางพันธุกรรม เกิดจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง มีคุณสมบัติเป็นสิ่งก่อกลายพันธุ์
3. การแปรผันเกิดจากการตอบสนองของจีโนมพืชต่อความเครียด (stress) ต่างๆ ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดในสภาพของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (อรุณี, 2550)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาพที่เป็นเซลล์แขวนลอย หรือสภาพที่เป็นแคลลัส เซลล์ทุกเซลล์มีโอกาสเกิดเป็นต้นใหม่ได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็น โททิโพเทนต์ (totipotent) หากนำเซลล์เหล่านี้มาเลี้ยงในอาหารที่ใส่สารที่ช่วยในการคัดเลือก (selective agent) เพื่อให้ได้ลักษณะที่เฉพาะเจาะจง สารดังกล่าวอาจเป็นทอกซิน (toxin) สารป้องกันกำจัดวัชพืช กรด หรือเกลือเพื่อคัดเลือกพืชที่สามารถทนเค็ม หรือสารพวกออสโมติคัม (osmoticum) บางชนิด เช่น โพลีเอทธีลีน ไกลคอล (polythylene glycol) หรือพีอีจี (PEG) น้ำตาลแมนนิทอล (mannitol) และ ซอลบิทอล (sorbitol) เป็นต้น โดยสารเหล่านี้จะทำหน้าที่ลดแรงดันออสโมซิส (osmotic potential) ของสารละลายที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ ทำให้เซลล์อยู่ในสภาพที่ขาดน้ำ เพื่อคัดเลือกพืชที่ทนแล้ง เซลล์ที่รอดชีวิตคือเซลล์ที่มีการเกิดความแปรผันทางพันธุกรรม ทำการชักนำเซลล์เหล่านี้ให้พัฒนาเป็นต้น แล้วนำพืชที่คัดเลือกได้ออกปลูกทดสอบในเรือนปลูกพืชทดลอง (green house) เพื่อคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ หากลักษณะความทนทานต่อสารที่ช่วยในการคัดเลือกยังคงอยู่ ก็จะได้พืชพันธุ์ใหม่ที่เป็นประโยชน์ออกมา เช่น พืชทนเค็ม ทนแล้ง ทนต่อโรค ทนต่อสารกำจัดวัชพืช โอกาสของการได้ลักษณะที่พึงประสงค์มีมากขึ้น เนื่องจากเกี่ยวข้องกับเซลล์เป็นล้านๆเซลล์ และการใช้สารที่ช่วยคัดเลือก ที่จำเพาะเจาะจงทำให้การคัดเลือกลักษณะต่างๆได้ตามประสงค์มากขึ้น (สิรนุช, 2540) เช่นการทดลองของ Lu และคณะ (2006) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยและการเกิดโซมาโคลนอล

แวริเอชันของหญ้าเบอร์มิวดา (*C. transvaalensis* x *C.dactylon*) โดยนำเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนข้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ใช้ ธาตุอาหารหลักของอาหารสูตร N6 และธาตุอาหารรองของสูตร B5 ที่เติม dicamba 6.6 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเสท 0.5 กรัมต่อลิตร กลูตามีน 0.5 กรัมต่อลิตร โพรลีน 0.5 กรัมต่อลิตร อินโนซิทอล 0.1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และชักนำเซลล์แขวนลอยให้พัฒนาเป็นต้นได้ โดยสามารถตรวจพบการเกิดโซมาโคลนอลแวริเอชัน หลังจากนำมาคัดเลือกต้นที่สามารถทนต่อสภาวะแล้ง โดยพบว่ามี 7 โคลน ที่สามารถทนต่อสภาวะแล้งได้มากกว่าต้นควบคุม

2.4.3.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี

การกลายพันธุ์ในธรรมชาติมีอัตราการเกิดที่ต่ำ ในขณะที่การใช้สารเคมีหรือรังสีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์สามารถเกิดได้ในอัตราที่สูงกว่า การชักนำเพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์ ที่นิยมทำกันคือการชักนำด้วย รังสี

รังสี (radiation) หมายถึง พลังงานที่ออกมาในรูปของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (eletromagetic wave) หรือโพตอน (photon) หรือออกมาในรูปของอนุภาคที่มีขนาดเล็ก (particulate wave) ซึ่งสามารถแบ่งรังสีตามพลังงานที่มีอยู่ในตัวมันเองได้เป็น 2 พวก คือ รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (non-ionizing radiation) และ รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation)

รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (non-ionizing radiation) คือรังสีที่มีพลังงานต่ำ เมื่อผ่านเข้าไปในตัวกลางใดๆ จะไม่สามารถทำให้ตัวกลางนั้นแตกตัวเป็นไอออน (ionization) เนื่องจากมีพลังงานไม่เพียงพอที่จะผลักอิเล็กครอนให้หลุดออกจากอะตอมได้ เช่น รังสี UV (ultraviolet light) แสงสว่าง อินฟาเรด รังสีเรเซอร์ และไมโครเวฟ เป็นต้น

รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) คือรังสีที่มีพลังงานสูงพอที่จะทำให้เกิด คู่ไอออนในตัวกลางที่รังสีผ่านไป โดยทำให้อะตอมหรือโมเลกุล (กลุ่มของอะตอม) เกิดการสูญเสียอิเล็กตรอน หรือได้อิเล็กตรอนเพิ่มขึ้นมา หากเกิดการสูญเสียอิเล็กตรอน ก็จะกลายเป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่มีประจุบวก และหากได้อิเล็กตรอนเพิ่มขึ้นมา ก็จะมีประจุลบ จึงเรียกอะตอมหรือโมเลกุลที่มีประจุบวกหรือลบดังกล่าวว่า ไอออน ได้แก่ รังสี แอลฟา รังสีบีตา รังสีแกมมา รังสีเอกซ์ และอนุภาคนิวตรอน เป็นต้น

รังสีแกมมาเป็นรังสีที่ได้รับความนิยม เพื่อใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชมากกว่ารังสีเอกซ์ เนื่องจากมีวิธีการฉายที่ไม่ยุ่งยาก ไม่มีรังสีตกค้างอยู่ในพืชซึ่งจะไม่เป็นอันตรายแก่ผู้ที่นำพืชไปปลูก

2.4.3.2.1 ผลของเซลล์พืชเมื่อได้รับรังสี

เมื่อเซลล์พืชได้รับรังสี หรืออนุภาคนิวตรอน รังสีหรืออนุภาคจะถ่ายพลังงานให้กับโมเลกุลต่างๆของเซลล์ ในกระบวนการถ่ายทอดพลังงาน ทำให้โมเลกุลที่ได้รับพลังงานแตกตัวเป็นไอออน (iron) และฟรีเรดิคอล (free radical) ต่างๆจะมีการจัดเรียงตัวของ

โมเลกุลใหม่ มีการทำปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างกัน เกิดเป็นโมเลกุลที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างไปจากเดิม (สิรนุช, 2540) รังสีทำให้อะตอมต่างๆภายในเซลล์เกิดการแตกตัวเป็นไอออน โดยเฉพาะการเกิด chemical radicals ที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาและก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีขึ้นภายในเซลล์ ทำให้อาจทำให้เกิดความเสียหายต่อการทำหน้าที่ต่างๆของเซลล์ เซลล์พืชที่ได้รับความเสียหายจากรังสีและเกิดการเปลี่ยนแปลงของข้อมูลทางพันธุกรรมได้คือ เซลล์เนื้อเยื่อเจริญ (meristematic cells) ที่อยู่ที่ส่วนต่างๆของพืช มีความสามารถในการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้ ซึ่งภายในเซลล์จะมีชีวโมเลกุลที่สำคัญคือ ดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic ; DNA) โดยผลของรังสีจะทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไปดังนี้

1. เกิดการสลายตัวของพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ที่เชื่อมระหว่างคู่เบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ

2. เกิดการตัดขาดระหว่างพันธะที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลฟอสเฟต ที่ทำหน้าที่เป็น backbone ของดีเอ็นเอ (phosphate diester bond) ทำให้เกิด single strand break และ double strand break

3. เกิดการแตกหักที่พันธะโควาเลนท์ (covalent bond) อื่นๆของดีเอ็นเอ

4. เกิด cross linkage ระหว่างสายและภายในสายของดีเอ็นเอ

5. เกิด dimer ระหว่าง pyrimidine base ภายในสายของดีเอ็นเอสายใดสายหนึ่ง เช่น เกิด TT หรือ CC เป็นต้น

6. เกิด DNA – protein crosslink เป็นการเชื่อมต่อระหว่างเบสและกรดอะมิโนด้วย sulfide linkage (SH) (สิรนุช, 2541)

2.4.3.2.2 ผลที่เกิดขึ้นกับเซลล์ภายหลังการได้รับรังสี

ความผิดปกติต่างๆที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ภายหลังการได้รับรังสี จะส่งผลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของเซลล์ เช่น อาจมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ต่างๆ กระบวนการเมทาโบลิซึม กระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งจะส่งผลต่อการแบ่งเซลล์ การเปลี่ยนแปลงจะเกิดมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับ ปริมาณรังสีที่ได้รับ ชนิดของเซลล์เป็นต้น โดยการแบ่งเซลล์นั้น อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลต่อเซลล์ได้ดังนี้

1. เซลล์ตายทันทีในขณะได้รับรังสี

2. เซลล์ที่ได้รับรังสีอาจมีการแบ่งเซลล์ได้ระยะหนึ่ง หรือไม่มีการแบ่งเซลล์เลยแต่มีชีวิตอยู่ได้ระยะหนึ่ง หลังได้รับรังสีแล้วจึงตาย

3. เซลล์มีชีวิตอยู่ต่อไปได้ แต่ไม่มีการแบ่งเซลล์ได้อีก

4. เซลล์มีชีวิตอยู่และสามารถแบ่งเซลล์ต่อไปได้ แต่การแบ่งเซลล์ในระยะแรกๆหลังได้รับรังสีแล้ว จะช้าลงบ้าง (อรุณี, 2541)

2.4.3.2.3 วิธีการฉายรังสี

การจะฉายรังสีแบบใดขึ้นอยู่กับวัตถุ ตัวอย่างพืช และความพร้อมของอุปกรณ์การฉายรังสี การฉายรังสีกับตัวอย่างพืชทำได้ 2 วิธีคือ

1. การฉายรังสีแบบเฉียบพลัน (Acute irradiation) คือ การให้รังสีโดยใช้อัตรารังสีและปริมาณรังสีสูงๆ และสิ้นสุดการฉายในระยะเวลาสั้นๆ

2. การฉายรังสีแบบเรื้อรัง (Chronic irradiation) คือ การให้รังสีโดยใช้อัตรารังสีและปริมาณรังสีต่ำๆ แต่ใช้เวลาในการฉายรังสีเป็นระยะเวลานานๆ เช่น เป็นสัปดาห์ หรือเป็นเดือน

2.4.3.2.4 การหาปริมาณรังสีที่เหมาะสม

เนื่องจากพืชต่างชนิดกัน จะมีความไวต่อรังสีที่แตกต่างกัน ดังนั้นในการจะใช้รังสีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชชนิดใดชนิดหนึ่ง จะต้องทราบปริมาณรังสีที่เหมาะสมที่จะใช้กับพืชชนิดนั้นๆเสียก่อน ปริมาณรังสีที่เหมาะสมอาจทำการศึกษาจากรายงานผลงานวิจัย หรือที่แนะนำโดยทบวงการพลังงานปรามาณูระหว่างประเทศ (IAEA, 1977) หรือนักวิจัยเองสามารถทำการทดลองเบื้องต้น เพื่อหาปริมาณรังสีที่เหมาะสมได้ เช่นทำการหาค่า LD_{50} (50% Lethal Dose) คือค่าที่ทำให้พืชมีอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ หรือ ค่า GR50 (50% growth reduction) คือค่าที่ทำให้อัตราการเจริญลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (อรุณี, 2530)

2.5 การปรับปรุงพันธุ์พืชวงศ์หญ้าโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการฉายรังสีนั้นสามารถกระทำได้กับพืชก่อนนำมาเพาะเลี้ยง เช่นการฉายรังสีกับ เมล็ด หรือท่อนพันธุ์แล้วค่อยนำมาเพาะเลี้ยง หรือ การฉายรังสีกับเซลล์แคลลัส หรือในสภาพที่เป็นเซลล์แขวนลอย แล้วนำมาชักนำให้พัฒนาเป็นต้น การใช้วิธี ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการฉายรังสีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยผ่านแคลลัส หรือเซลล์เซลล์แขวนลอยนี้ เป็นการปรับปรุงพันธุ์พืชที่มีประสิทธิภาพกว่าการใช้ส่วนของเมล็ด หรือ ท่อนพันธุ์ ซึ่งเป็นการปรับปรุงพันธุ์โดยการกลายพันธุ์แบบเก่า (classical mutation) (Micke และคณะ, 1990) เนื่องจากมีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูง และเพิ่มโอกาสการเกิดการกลายพันธุ์ทั้งต้น (non-chimaerism) (Jain และคณะ, 1998)

Shivashilanker และคณะ (1988) นำเมล็ดของหญ้ากรีนแพนิค (*P. maximum* var. trichoglume) มาฉายรังสีแกมมาที่ระดับต่างๆ คือ 40 50 และ 60 กิโลแรด พบว่าหญ้ากรีนแพนิคเกิดการกลายพันธุ์ในลักษณะต่างๆ เช่น ไม่มีการออกดอก เพิ่มผลผลิตน้ำหนักสดได้โดยตรง อีกทั้งยังมีจำนวนกอและมีน้ำหนักต่อกอเพิ่มขึ้น การกลายพันธุ์นี้ยังมีผลมากต่อน้ำหนักในใบมากกว่าลำต้น การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนะการของใบ พบว่าพืชที่ไม่มีดอกนี้มีโปรตีน 6.04 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าชนิดที่ออกดอกถึง 100 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณแคลเซียม 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็น 2 เท่าของพืชที่ไม่กลายพันธุ์และมีความชื้น 11.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าพืชที่ไม่กลายพันธุ์ ขณะที่ปริมาณเส้นใยลดลง

2 เปอร์เซ็นต์ และรายงานของ Chen และคณะ (1997) ได้ทำการปรับปรุงพันธุ์หญ้าแพงโกลาพันธุ์ A254 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่เป็นหมันแต่อ่อนแอต่อโรค 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 เคซีนไฮโดรไลเซท 0.5 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 13 เดือน จากนั้นจึงชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยนำเซลล์แขวนลอยไปเลี้ยงในสารละลาย EMS เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วชักนำให้พัฒนาเป็นต้นใหม่ จากการทดลองพบว่า สามารถคัดเลือกต้นที่มีลักษณะใหม่ได้รวม 10 ต้น (TC1-TC10) จากจำนวนทั้งหมด 202 ต้น โดยมีลักษณะต่างๆ เช่น TC2, TC4 และ TC8 มีลำต้นตรง ใบมีลักษณะบางและมีไหลเล็กน้อย TC7 และ TC9 มีลักษณะลำต้นเลื้อยมากกว่า A254 เป็นต้น และรายงานของ Lu และคณะ (2009) ทำการปรับปรุงพันธุ์หญ้าเบอร์มิวดา (*C. dactylon*) โดยการฉายรังสีแกมมาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อให้ได้ต้นที่มีลักษณะเตี้ยแคระโดยนำส่วนไหล จำนวน 3000 ท่อน มาฉายรังสีแกมมาที่ระดับ 700-1000 เกรย์ หลังจากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในโรงเรือนเพื่อคัดเลือกต้นที่มีลักษณะเตี้ยแคระออกมาได้ 3 โคลน โดยมีลักษณะใบสั้น ระยะห่างระหว่างปล้องสั้น และเมื่อนำมาทดสอบภายใต้สภาวะแล้ง พบว่าโคลนที่กลายพันธุ์นี้จะมีค่า relative water content ที่สูงกว่า และมีค่า ion leakage ที่ต่ำกว่าต้นควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสี ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นต้นที่สามารถทนต่อสภาวะแล้งได้ และรายงานของจันทกานต์ (2544) ศึกษาผลของรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ ต่อแคลลัส ที่พัฒนาจากม้วนใบอ่อนของหญ้าเนเปียร์แคระ (*Pennisetum purpureum*) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองพบว่า แคลลัสมีค่า LD_{50} เท่ากับ 1.6 กิโลแรด และเมื่อนำแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีมาชักนำให้พัฒนาเป็นต้นบนอาหารสูตร MS ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ระดับต่างๆ คือ 0-2 เปอร์เซ็นต์แต่ละสูตรประกอบด้วย BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัม ต่อลิตร น้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ต้นที่ได้จากอาหารที่ไม่เติมเกลือ และเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าและเจริญเติบโตดีกว่าต้นที่ได้จากอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ต่อมา วิภาสิริ (2546) ศึกษาผลของรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ ต่อการพัฒนาของยอดจำนวนมากของหญ้าซิกแนลนอนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 6 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากฉายรังสีแล้วนำมาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์พบว่าอัตราการรอดชีวิตจะลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น โดยมีค่า LD_{50} ที่ 43.47 เกรย์ และเมื่อนำต้นที่รอดชีวิตไปปลูกทดสอบในสภาพธรรมชาติพบว่า จะมีจำนวนต้นต่อกอไม่แตกต่างกัน แต่มีจำนวนใบต่อต้นต่อกอ ความสูงของต้น ความกว้างและความยาวของใบแตกต่างกัน และรายงานของ ตีรณา (2551) ศึกษาผลของรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ ต่อการพัฒนาของยอดจำนวนมากของหญ้าแพงโกล่า หลังจากฉายรังสีแล้วนำมาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอัตราการรอดชีวิตจะลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น โดยมีค่า LD_{50} ที่ 80.9 เกรย์ และเมื่อนำ

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ต้นที่รอดชีวิตไปปลูกทดสอบในสภาพธรรมชาติเป็นระยะเวลา 45 วัน ทำการคัดเลือกโคลนที่มีลักษณะที่แตกต่างจากต้นควบคุมที่ไม่ได้รับรังสีเช่น ขนาดของใบ ขนาดของลำต้น และความสูงของต้น การแตกกอ จากการทดลองพบว่าสามารถคัดเลือกโคลนที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นควบคุมได้ 19 โคลน เช่นมีลักษณะเตี้ยแตกกอมาก หรือมีขนาดใบหรือลำต้นเล็กลง

2.6 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

การกลายพันธุ์เป็นกระบวนการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ดังเห็นได้จากการที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ (หรือเบส) บางช่วงของดีเอ็นเอจีโนม หรือจีโนมิคดีเอ็นเอ (genomic DNA) มีความแปรผัน (variation) อาจเป็นได้ทั้งในส่วนที่เป็นยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีน ส่วนที่เป็นยีนคือส่วนของดีเอ็นเอที่กำหนดสร้างโปรตีนซึ่งจะมีผลต่อลักษณะฟีโนไทป์ (phenotype) โดยอาจแสดงลักษณะที่แตกต่างออกมาที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า หรือในส่วนที่ไม่ใช่ยีน คือส่วนของดีเอ็นเอที่ไม่กำหนดสร้างโปรตีน ซึ่งจะไม่ปรากฏความแตกต่างทางฟีโนไทป์ของสิ่งมีชีวิตทั้งๆ ที่มีความแปรผันในระดับดีเอ็นเอ ดังนั้นการตรวจความแปรผันได้นั้นต้องตรวจสอบถึงในระดับโมเลกุล (อมรา, 2540) ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้วิธีเครื่องหมายโมเลกุลนั้นแบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ Hybridization-based marker เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุล ซึ่งพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการของลำดับเบสดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการจะตรวจสอบ โดยเทคนิคที่นำมาใช้คือ อาร์เอฟแอลพี (Restriction Fragment Length Polymorphism : RFLP) เป็นต้น ส่วน PCR-based marker เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลที่พัฒนาขึ้น โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณหรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองดีเอ็นเอ หรือ เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR) ตัวอย่างได้แก่ เทคนิค อาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA : RAPD) หรือเทคนิคเอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism : AFLP) (William และคณะ, 1990)

เทคนิคอาร์เอพีดี พัฒนามาจากการทำพีซีอาร์ เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบด้วยไพรเมอร์ขนาดสั้นๆ เพียงไพร์เมอร์เดียว มีขนาดประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ แทนการใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ทราบลำดับเบส การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนั้นทำในสภาวะ low stringency คือ annealing ที่อุณหภูมิ 37-45 องศาเซลเซียส ทำให้สามารถจับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ที่ตำแหน่งของทั้งสองสายดีเอ็นเอ (Welsh และ McClelland, 1990) โดยจะเกาะกับดีเอ็นเอในตำแหน่งที่เป็นเบสคู่สมตลอดจีโนมแบบสุ่ม ไพรเมอร์ที่เกาะในทิศทางตรงข้าม และมีระยะห่างที่เหมาะสม จะทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบได้ หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มแล้ว สามารถแยกขนาดดีเอ็นเอที่ได้ด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส และตรวจสอบดูแถบดีเอ็นเอที่ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ภายใต้แสงอัตราไวโอเลต อาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการจัดและจำแนกสายพันธุ์ในเบื้องต้น ทั้งนี้เนื่องจากเทคนิคอาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่ง่าย มีความสะดวก

105303

และรวดเร็วในการปฏิบัติงานและการตรวจสอบผล และยังไม่จำเป็นต้องทราบลำดับดีเอ็นเอก่อนการทำอาร์เอพีดีอีกด้วย (Grattapaglia และ Sederoff, 1994 ; สุรินทร์, 2545) มีรายงานวิจัยที่ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีมาตรวจสอบการกลายพันธุ์ของพืชที่เกิดจากการชักนำด้วยรังสีหรือความแปรผันทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดังนี้

Akashi (1998) ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของ หญ้าอะตราตรัมที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอย โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้ไพร์เมอร์จำนวน 10 ชนิด (OPA01-10) พบว่าจะแสดงแถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 59 แถบ โดยมีไพร์เมอร์ 1 ชนิด (OPA-06) ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างจากต้นควบคุม และการทดลองของ Sultana และคณะ (2005) ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของข้าว Indica basmati viz. B-370 B-2000 และ Super basmati จำนวน 50 โคลน ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้ไพร์เมอร์ 8 ชนิด จากการทดลองพบว่ามีไพร์เมอร์ 4 ชนิดคือ S-13 S-19 R-17 และ OPX-11 ที่แสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างโคลนที่กลายพันธุ์และต้นควบคุม และ สรายุทธ์ (2551) ศึกษาการกลายพันธุ์ของหญ้ากินนีสีม่วง โดยนำเมล็ดมาฉายรังสีแกมมาที่ 400 เกรย์ พบว่าสามารถคัดเลือกต้นที่มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงของ ขนาดลำต้น จำนวนหน่อต่อต้น และวิเคราะห์ค่าทางโภชนะ เช่น ค่าโปรตีนหยาบ (CP: crud protein), ADF (acid detergent fiber), NDF (neutral detergent fiber), DMD (dry matter digestibillity) และผลผลิตน้ำหนักแห้ง ซึ่งพบว่า 2 โคลนที่เหมาะสมในการผลิตหญ้าแห้ง เนื่องจากมีลำต้นขนาดเล็ก แตกกอดี มีคุณค่าทางโภชนะสูง เมื่อคัดเลือกโคลนที่มีลักษณะเปลี่ยนแปลง จำนวน 5 โคลน มาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี เปรียบเทียบกับโคลนที่ไม่ได้ฉายรังสี โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 34 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ 4 ชนิด ได้แก่ OPB2 OPB12 OPF1 และ OPF5 ที่แสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างโคลนที่กลายพันธุ์และต้นควบคุม

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง

หญ้าไนล์ (*Acroceras macrum*) ได้รับจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพืช อาหารสัตว์ จังหวัด ชัยนาท

3.2 เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 เครื่องมืออุปกรณ์

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

3.2.1.2 เครื่องชั่งแบบละเอียด (blance)

3.2.1.3 เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH meter)

3.2.1.4 เตาอบไมโครเวฟ (microwave)

3.2.1.5 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave)

3.2.1.6 ตู้อบความร้อนแห้ง (hot air oven)

3.2.1.7 ตู้ปลอดเชื้อ (larminar air flow)

3.2.1.8 ตู้เย็น 4 และ -20 องศาเซลเซียส (refrigerator)

3.2.1.9 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

3.2.1.10 เครื่องเขย่า (sheaker)

3.2.1.11 เครื่องปั๊มสูญญากาศ (vaccum suction)

3.2.1.12 กระดาษกรอง (filter papers)

3.2.1.13 โถดูดความชื้น (desicator)

3.2.1.14.บีกเกอร์ (beaker)

3.2.1.15 กระบอกตวง (graduated cylinder)

3.2.1.16.แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)

3.2.1.17.กรวยกรอง (glass funnel)

3.2.1.18.หลอดหยด (dropper)

3.2.1.19 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture flask)

3.2.1.20 ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)

3.2.1.21 จานเพาะเชื้อ (plate)

3.2.1.22 ปากคีป (forcept)

3.2.1.23 มีดผ่าตัด (blades)

3.2.1.24 โกร่งบดยา (mortar and pestle)

3.2.1.25 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol lamp)

3.2.1.26 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

3.2.1.27 กล้องสเตอริโอ (stereo microscope)

3.2.1.28 กล้องถ่ายรูปดิจิตอล (digital camera)

3.2.1.29 เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis)

3.2.2.30 เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV transiluminator)

3.2.1.31 เครื่องมือวัดหาค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

3.2.1.32 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycle)

3.2.1.33 เครื่องเขย่าผสมสารละลาย (vortex mixer)

3.2.1.34 หลอดทดลอง (microcentrifuge tube) ขนาด 0.2 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร

3.2.1.35 ชุดไมโครปิเปตต์ (micropipette set)

3.2.2 สารเคมี

3.2.2.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร LS (ภาคผนวก ก)

3.2.2.2 สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ เช่น คลอร็อกซ์ และ สารเปียกใบ (tween-20)

3.2.2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เช่น 2.4-D และ BA เป็นต้น

3.2.2.4 แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์

3.2.2.5 ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit (*Qiagen)*

3.2.2.6 ชุดเอนไซม์ *Tag* DNA polymerase

3.2.2.7 สารละลาย Mix dNTPs

3.2.2.8 สารละลาย 1X TBE Buffer, 10X TBE Buffer

3.2.2.9 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (marker) ขนาด 100 คู่เบส

3.2.2.10 สีย้อม (loading dye)

3.2.2.11 เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide)

3.2.2.12 อะกาโรสเจล (agarose gel)

3.2.2.13 ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)

3.2.2.14 สารละลาย EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetate)

3.2.2.15 น้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionize water)

3.2.2.16 ไพรเมอร์จำนวน 10 ชนิด ชุด OPA01-10 ของ Operon Technologies

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนข้อให้พัฒนาเป็นยอดจำนวนมาก

คัดเลือกและตัดชิ้นส่วนข้อของหญ้าไนล์มาล้างด้วยน้ำสะอาด นำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารเปียกใบจำนวน 1-2 หยด เขย่านาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที นำชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว วางลงบนทิชชูปลอดเชื้อ ตัดปลายทั้งสองข้างของชิ้นเนื้อเยื่อออก ให้เหลือขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS (Linsmaier Skoog, 1965) ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร อาหารทุกสูตรปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 5 ชิ้น เมื่อเวลาผ่านไป 6 สัปดาห์ ทำการบันทึกจำนวนและความยาวของยอดและรากที่เกิดขึ้นต่อข้อ

3.3.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนข้อ และยอดอ่อนให้พัฒนาเป็นแคลลัส

3.3.2.1 ส่วนข้อ

นำส่วนข้อที่ทำการฟอกฆ่าเชื้อตามการทดลองที่ 3.3.1. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยในแต่ละสูตรประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลฟา-คีโตกลูตาริก ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 4 ซ้ำๆ ละ 20 ชิ้น เมื่อระยะเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ ทำการบันทึกจำนวนและลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นแล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์จากสูตรดังนี้

$$\%\ \text{การเกิดแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนข้อที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนข้อเริ่มต้น}} \times 100$$

$$\%\ \text{การเกิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนข้อที่เกิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนข้อเริ่มต้น}} \times 100$$

3.3.2.2 ส่วนยอดอ่อน

นำส่วนข้อที่ทำการฟอกฆ่าเชื้อตามการทดลองที่ 3.3.1. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก จากนั้นนำส่วนยอดอ่อนที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ มาตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยในแต่ละสูตรประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลฟา-คีโตกลูตาริก ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะมืด ควบคุมอุณหภูมิที่ 25-28 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 4 ซ้ำๆ ละ 20 ชิ้น เมื่อเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ บันทึกจำนวนและลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นแล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์จากสูตรดังนี้และ

$$\%\ \text{การเกิดแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนยอดอ่อนที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนยอดอ่อนเริ่มต้น}} \times 100$$

$$\%\ \text{การเกิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนยอดอ่อนที่เกิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนยอดอ่อนเริ่มต้น}} \times 100$$

3.3.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนข้อ และยอดอ่อนให้พัฒนาเป็นต้นใหม่

คัดเลือกเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อ และยอดอ่อน บนอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ได้จากการทดลองที่ 3.3.2.1 และ 3.3.2.2 อายุ 8 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 20 ชิ้น เมื่อเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ บันทึกจำนวนแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นต้น แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ จากสูตรดังนี้

$$\%\ \text{การพัฒนาเป็นต้นใหม่} = \frac{\text{จำนวนแคลลัสที่พัฒนาเป็นต้นใหม่}}{\text{จำนวนแคลลัสเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยง}} \times 100$$

3.3.4 การศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์

3.3.4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

นำเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนข้อของหญ้าไนล์ที่เพาะเลี้ยงอยู่บนอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 8 สัปดาห์ 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 ทำการแยกเซลล์โดยใช้ช้อนโลหะกดบี้ให้เซลล์กระจายตัวออกจากกัน เซลล์จะหลุดออกเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของหญ้าในแต่ระยะเวลาคือ 0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 และ 30 วัน ตามลำดับ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ในแต่ละช่วงระยะเวลา เมื่อเพาะเลี้ยงถึงระยะเวลาตามกำหนด ทำการกรองเซลล์แขวนลอย เพื่อหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง

3.3.4.1.1 หาน้ำหนักกระดาษกรองขนาด 90 มิลลิเมตร ให้คงที่ โดยนำกระดาษกรองมาใส่ในจานแก้ว แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 108 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ บันทึกน้ำหนักของกระดาษกรอง (A)

3.3.4.1.2 นำแผ่นกระดาษกรองวางลงบนกรวยกรอง (bucher funnel) แล้วนำไปต่อกับ ขวดรูปชมพู่เพื่อที่จะทำการกรองในระบบสุญญากาศด้วยปั๊มสุญญากาศ

3.3.4.1.3 เทน้ำกลั่นผ่านกระดาษกรอง ทำการกรองในระบบสุญญากาศรอจนกระทั่งน้ำไม่หยดแล้ว นำกระดาษกรองที่เปียกไปชั่งน้ำหนัก บันทึกน้ำหนัก (B)

3.3.4.1.4 เปลี่ยนกระดาษแผ่นใหม่ แล้วจึงทำการกรองเซลล์แขวนลอยด้วยระบบสุญญากาศ ล้างเซลล์ที่อาจติดค้างอยู่ภายในขวดรูปชมพู่ด้วยน้ำกลั่น ชั่งน้ำหนักเซลล์และกระดาษกรอง บันทึกน้ำหนัก (C)

3.3.4.1.5 นำกระดาษที่มีเซลล์อยู่ไปอบที่อุณหภูมิ 108 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์

3.3.4.1.6 นำกระดาษกรองที่มีเซลล์ที่อบแห้งแล้ว ไปชั่งหาน้ำหนักแห้งโดยเครื่องชั่งที่มีทศนิยม 4 ตำแหน่ง บันทึกผลน้ำหนัก (D)

3.3.4.1.7 นำค่าเฉลี่ยของทั้ง 2 ขวดที่ได้มาเขียนกราฟ และหาสมการความสัมพันธ์ของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งกับระยะเวลา

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

ค่าน้ำหนักแห้ง (dry weight) = (D)-(A)

3.3.4.2 การศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอย

นำเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนข้อของหญ้าไนล์ ที่อายุ 8 สัปดาห์ ย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 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 ทำการแยกเซลล์โดยใช้ช้อนโลหะกดบี้ให้เซลล์กระจายตัวออกจากกัน เซลล์จะหลุดออกเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ ทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 2 สัปดาห์ นำเซลล์แขวนลอยที่มีอายุ 4 สัปดาห์มาวางบนกระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อซับน้ำให้แห้ง จากนั้นย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 30 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 20 ชิ้น เมื่อเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ บันทึกจำนวนเซลล์แขวนลอยที่สามารถพัฒนาเป็นต้นแล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ตามสูตรดังนี้

$$\%\ \text{การพัฒนาเป็นต้นของเซลล์แขวนลอย} = \frac{\text{จำนวนเซลล์แขวนลอยที่พัฒนาเป็นต้นใหม่}}{\text{จำนวนเซลล์แขวนลอยเริ่มต้น}} \times 100$$

3.3.5 การศึกษาผลของพีอีจีต่อการพัฒนาของเซลล์แขวนลอย

นำเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนข้อของหญ้าไนล์ ที่อายุ 8 สัปดาห์ ย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 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 ทำการแยกเซลล์โดยใช้ช้อนโลหะกดบี้ให้เซลล์กระจายตัวออกจากกัน เซลล์จะหลุดออกเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ ทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 2 สัปดาห์ นำเซลล์แขวนลอยที่มีอายุ 4 สัปดาห์มาวางบนกระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อซับน้ำให้แห้ง จากนั้นย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร และพีอีจี (MW 8000) ที่ความเข้มข้น 0 2 4 6 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 30 ชิ้น เมื่อเวลาผ่านไป 20 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้น และเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์แขวนลอย ดังนี้

$$\%\ \text{การอยู่รอดของเซลล์แขวนลอย} = \frac{\text{จำนวนเซลล์แขวนลอยที่รอดชีวิต}}{\text{จำนวนเซลล์แขวนลอยเริ่มต้น}} \times 100$$

3.3.6 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการพัฒนาของเซลล์แขวนลอย

นำเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 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 อายุ 4 สัปดาห์ ที่ผ่านการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์ ย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนนำไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณต่างๆ คือ 0 20 40 60 80 และ 100 เกรย์ โดยใช้เครื่องฉายรังสีแกมมา (รุ่น Mark I มีซีเซียม 137 เป็นต้นกำเนิดรังสี ของศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ ฯ) จากนั้นนำไปชักนำให้พัฒนาเป็นต้น โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD กำหนดให้ปริมาณรังสีเป็นทรีทเมนต์ แต่ละทรีทเมนต์ มี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 30 ชิ้น หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนเซลล์แขวนลอยที่อยู่รอดที่ปริมาณรังสีแต่ละอัตรา เพื่อหาปริมาณรังสีที่ทำให้เซลล์แขวนลอยมีอัตราการอยู่รอด 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50})

3.3.7 ศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของหญ้าไนล์ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆเมื่อปลูกในสภาพธรรมชาติ (M_1V_3)

นำต้นอ่อนของหญ้าไนล์ (M_1V_1) ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ คือ 0 20 40 60 80 และ 100 เกรย์ ย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 6 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดยอดและรากที่สมบูรณ์ ทำการคัดเลือกต้นที่มีลักษณะที่แตกต่างไปจากต้นควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสี โดยคัดเลือกมาปริมาณรังสีละ 15 โคลน (M_1V_2) ออกปลูกในสภาพธรรมชาติ 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 นำหญ้าไนล์ไปวางเพาะเลี้ยงในสภาพธรรมชาติ เมื่ออายุได้ 4 สัปดาห์ ทำการตัดหญ้า หลังจากนั้น 45 วัน ทำการบันทึกผลลักษณะต่างๆ ของหญ้าไนล์ (M_1V_3) คือ ความสูงของต้น โดยวัดจากโคนต้นถึงปลายใบสุด ความกว้างของใบ วัดจากกาบใบของใบที่ 3 นับจากยอด ความยาวของใบ วัดจากกาบใบถึงปลายใบของใบที่ 3 นับ

จากยอด และขนาดของลำต้น วัดจากปล้องที่ 3 ของลำต้นนับจากโคน โดยการวัดทั้งหมดจะทำการสุ่มวัด 10 ต้น จากแต่ละโคลนของแต่ละปริมาณรังสีแล้วหาค่าเฉลี่ย

3.3.8 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

คัดเลือกโคลนที่มีลักษณะแตกต่างไปจากต้นควบคุมที่แยกได้จากการทดลองที่ 3.3.7 และต้นควบคุมมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit (*Qiagen*) (ภาคผนวก ข) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพร์เมอร์ชุด OPA ของ Operon Technologies จำนวน 10 ชนิด คือ OPA01-10 โดยมีการเรียงลำดับเบสแบบสุ่ม ดังตารางที่ 3.1 ทำการเตรียมสารละลายที่เป็นส่วนประกอบในเทคนิคพีซีอาร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร สารละลายจีโนมิคดีเอ็นเอความเข้มข้น 200 นาโนกรัม สารละลาย dNTPs ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ พีซีอาร์บัฟเฟอร์ (PCR buffer) ความเข้มข้น 1 เท่า น้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized H_2O) และเอนไซม์ *Tag* DNA polymerase ความเข้มข้น 1 ยูนิต นำสารละลายดังกล่าวผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 15 ไมโครลิตร แล้วนำเข้าเครื่อง DNA thermal cycle เพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) โดยปฏิกิริยาที่ใช้มีสภาวะ ดังนี้ ขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 45 รอบ ตามด้วยขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

ตารางที่ 3.1 แสดงชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

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

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนข้อให้พัฒนาเป็นยอดจำนวนมาก

จากการนำส่วนข้อของหญ้าไนล์ที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าส่วนข้อของหญ้าไนล์สามารถพัฒนาเกิดเป็นยอดจำนวนมากได้ แสดงให้เห็นว่า BA มีผลในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก เนื่องจาก BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน มีผลโดยตรงในการชักนำเนื้อเยื่อให้เกิดยอด โดยจะไปกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์และเกิดตายอด (Krishnamoorthy, 1981) โดยที่ระดับความเข้มข้นของ BA มากขึ้น จำนวนยอดต่อข้อก็จะเพิ่มสูงขึ้น จากการทดลองพบว่าจำนวนยอดต่อข้อที่พัฒนาบนอาหารสูตรต่างๆ จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.1) (ภาพที่ 4.1) โดยอาหารสูตรที่สามารถชักนำส่วนข้อให้เกิดยอดได้มากที่สุดคือ อาหารสูตร LS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 5.40 ยอดต่อข้อ (ภาพที่ 4.2) สอดคล้องกับการทดลองของ กมลพรรณ และคณะ (2535) รายงานว่า BA มีผลให้แฝกหอมแตกยอดเพิ่มขึ้น โดย BA 10 ไมโครโมลต่อลิตร จะชักนำให้สร้างยอดใหม่จำนวนมากที่สุดคือ 10 ยอดต่อต้น

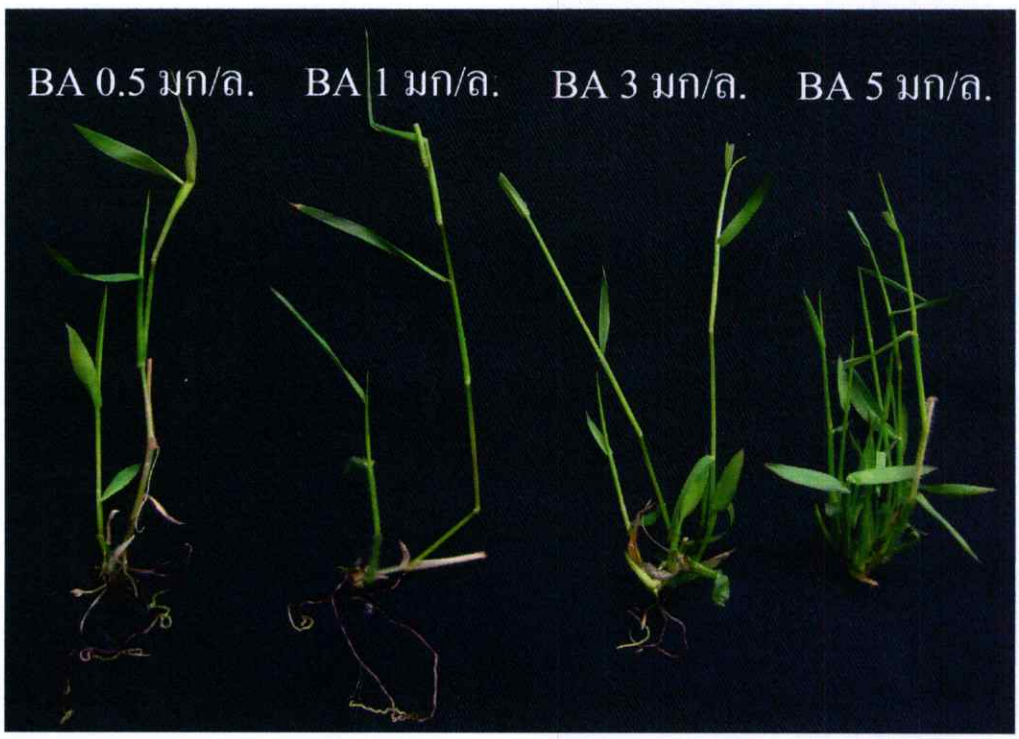
ส่วนการเจริญเติบโตของยอดและรากของหญ้าไนล์ พบว่าในกลุ่มที่มีจำนวนของยอดมาก ความยาวของยอดจะลดลง ส่วนในกลุ่มที่มีจำนวนของยอดน้อยความยาวของยอดจะมากขึ้น จึงทำให้ยอดที่เลี้ยงในอาหารที่มี BA ความเข้มข้นที่ต่ำ จะมีความยาวของยอดมากกว่าที่เลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้นที่สูงกว่า จากการทดลองพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าไนล์บนอาหารสูตร LS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีการเจริญเติบโตของยอดดีที่สุด โดยมีความยาวของยอดเฉลี่ยเท่ากับ 9.41 เซนติเมตร รองมาคืออาหารสูตรที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีความยาวยอดเฉลี่ยเท่ากับ 9.32 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.1) เนื่องจาก BA จะมีผลไปลดอิทธิพลของออกซินที่สร้างที่ปลายยอด ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการยืดยาวของเซลล์ ความยาวของยอดจึงลดลงเมื่อได้รับ ความเข้มข้นของ BA ที่สูงขึ้น (Vieitze และคณะ,1983 ; Taiz และ Zeiger, 1991)

สำหรับการเกิดราก พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าไนล์บนอาหารที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้นสูง จะทำให้การเกิดรากนั้นลดลง โดยอาหารสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีการพัฒนาของรากมากที่สุดโดยจะเกิดรากได้ 3.66 รากต่อตาข้าง และมีความยาวของรากเฉลี่ยมากที่สุดคือ 4.60 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ผลของ BA ต่อการเกิดยอดจำนวนมากจากส่วนข้อของหญ้าไนล์หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

BA (มก/ล.)	จำนวนข้อที่เพาะเลี้ยง	จำนวนยอดทั้งหมด	จำนวนยอดต่อข้อ	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม.)	จำนวนรากทั้งหมด	จำนวนรากต่อข้อ	ความยาวรากเฉลี่ย (ซม.)
0.5	15	26	1.73[d]	9.41[ab]	52	3.66[a]	4.60[a]
1	15	42	2.80[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	5.40[a]	5.50[d]	25	1.66[dc]	0.78[d]

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



ภาพที่ 4.1 แสดงการพัฒนาเป็นยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อบนอาหารสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

ภาพที่ 4.2 แสดงการพัฒนาเป็นยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อบนอาหารสูตร LS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์

4.2 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนข้อ และยอดอ่อนให้พัฒนาเป็นแคลลัส

4.2.1 ส่วนข้อ

จากการนำส่วนข้อของหญ้าไนล์มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ อาหารทุกสูตรสามารถชักนำส่วนข้อให้พัฒนาเป็นแคลลัสได้โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 41.25-61.25 เปอร์เซ็นต์ โดยอาหารสูตรที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้พัฒนาเป็นแคลลัสได้มากที่สุดเท่ากับ 61.25 เปอร์เซ็นต์ รองมาคืออาหารสูตรที่เติม 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นแคลลัสเท่ากับ 53.75 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2) ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นมีสองลักษณะคือ ลักษณะเป็นปุ่ม สีขาวขุ่นอมเหลือง เซลล์เกาะกันค่อนข้างแน่น มีเนื้อแข็ง ซึ่งเป็นลักษณะของเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส (ภาพที่ 4.3 ก) ซึ่งมีความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดี (Vasil, 1983) และลักษณะที่เป็น นอน-เอ็มบริโอจีนิคแคลลัส คือมีสีขาวใส ฉ่ำน้ำ เซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆ (ภาพที่ 4.3 ข) มีความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นได้ต่ำ หรือไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้เลย (Redway และ Vasil, 1990) (Ketchum และคณะ, 1987) หรือเป็นลักษณะผสมคือมีทั้งเอ็มบริโอจีนิค และนอน-เอ็มบริโอจีนิค อยู่ในแคลลัสเดียวกัน (ภาพที่ 4.3 ค) จากการทดลองพบว่าอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้พัฒนาเป็นเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสได้มากที่สุดเท่ากับ 45 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2) สอดคล้องกับการทดลอง ของ Patnaik และคณะ (1997) ที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนข้อของหญ้า Palmarosa (*C. martinii*) โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นเอ็มบริโอจีนิค และนอน-เอ็มบริโอจีนิค ส่วนการทดลองของ Li และคณะ (2009) รายงานว่าสามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสจากเมล็ดของหญ้า Indiangrass

(*S. nutans* L. Nash) ได้ดีที่สุดเท่ากับ 54.5 เปอร์เซ็นต์เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.2.2 ส่วนยอดอ่อน

จากการนำส่วนข้อของหญ้าไนล์ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก เนื่องจากการทดลองที่ 4.1 พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ นำยอดอ่อนที่ได้มาตัดเป็นชิ้นๆ ขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.4 ก-ข) แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส จากการทดลองพบว่ายอดอ่อนสามารถพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสได้โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 8.75-27.50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.3) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตรที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดเท่ากับ 27.50 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นมีสองลักษณะคือ เอ็มบริโอจีนิคแคลลัส (ภาพที่ 4.4 ค) และลักษณะเป็น นอน-เอ็มบริโอจีนิคแคลลัส (ภาพที่ 4.4 ง) จากการทดลองพบว่า อาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้พัฒนาเป็นเอ็มบริโอจีนิคได้มากที่สุดเท่ากับ 13.75 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.3) Spangenberg และคณะ (1998) รายงานว่าชนิดของเนื้อเยื่อตัวอย่างที่นำมาเพาะเลี้ยงมีผลต่อการพัฒนาเป็นแคลลัสของหญ้าอาหารสัตว์หลายชนิด สอดคล้องกับการทดลองของ Zhang และคณะ (2007) รายงานว่าส่วนช่อดอกอ่อนของหญ้าเบอร์มิวดาพันธุ์ลูกผสม "TifSport" สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีกว่าส่วนข้อ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ถึง 100 เปอร์เซ็นต์เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อมา Dhandapani และคณะ (2008) รายงานว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนช่อดอกอ่อนและส่วนข้อของหญ้า zoysia (*Z. matrella L. Merr.*) โดยชิ้นส่วนทั้งสองมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสไม่แตกต่างกัน แต่ส่วนช่อดอกอ่อนสามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสได้ดีกว่าส่วนข้อ และเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนช่อดอกอ่อนสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ดีกว่าเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนข้อ Evan และคณะ (1981) รายงานว่า 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์หญ้าเพื่อใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยจะกระตุ้นกระบวนการแบ่งเซลล์ทำให้เซลล์ขยายขนาดจนเกิดเป็นก้อนแคลลัส (Feung, 1974) และ เป็นสารที่จำเป็นต่อกระบวนการเอ็มบริโอจีนีซิสในพืช (Venkatachalum และ jayabalan, 1999) Redway และ Vasil (1990) รายงานว่าการใช้ BA ความเข้มข้นต่ำๆ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน สามารถช่วยในการชักนำให้เกิดแคลลัสในพืชวงศ์หญ้าได้ดีขึ้น Behrend และ Mateles (1976) รายงานว่า แอลฟา-คีโตกลูตาเรท มีส่วนเกี่ยวข้องในขบวนการ ammonia assimilation เป็นกระบวนการที่แอมโมเนียถูกเปลี่ยนไปเป็นโปรตีนหรือสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนอื่นๆ (organic nitrogen compounds) สามารถกระตุ้นการเกิดและการเจริญเติบโต

ในช่วงแรกของโซมาติกเอ็มบริโอ สอดคล้องกับการทดลองของ Asano และคณะ(1996) ที่รายงานว่า แอลฟา-คีโตกลูตาเรท สามารถช่วยให้เกิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสได้มากขึ้นในหญ้า Japanese lawn grass (*Z. japonica*) โดยจะไปกระตุ้น แอลฟา-คีโตแอซิดดีไฮโดรจีเนส คอมเพล็กซ์ ทำให้ผลผลิตของ ATP มากขึ้นโดย วัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle)

ตารางที่ 4.2 การเกิดแคลลัสและเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อ หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

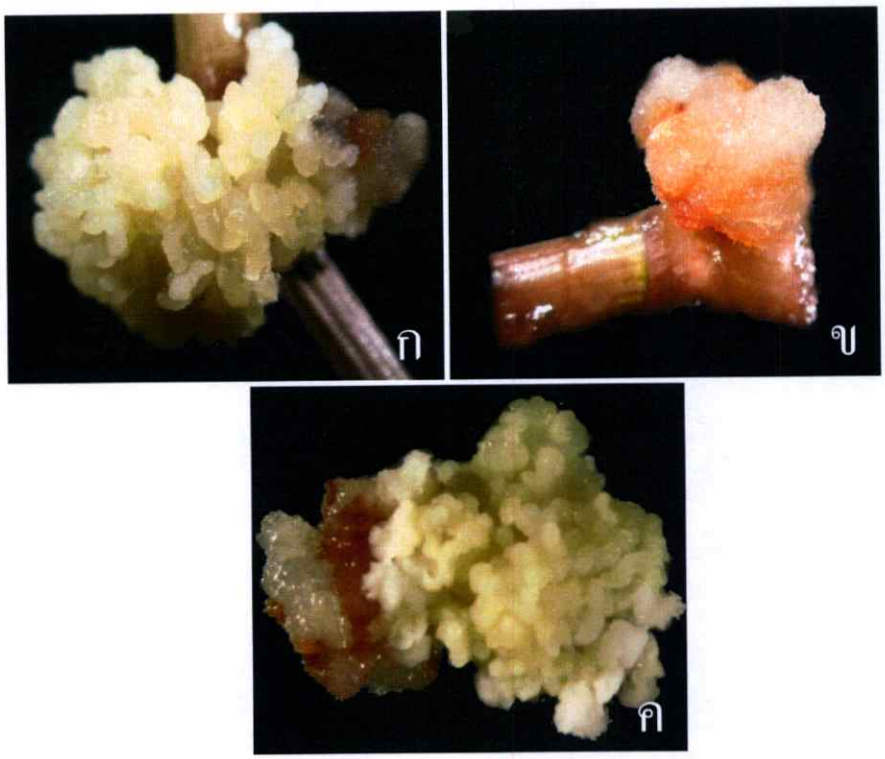
ความเข้มข้น 2,4-D (มก/ล.)	จำนวนข้อที่เพาะเลี้ยง	จำนวนข้อที่พัฒนาเป็นแคลลัส (%)	จำนวนข้อที่เกิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส (%)
0.5	80	33 (41.25)^{c}	15 (18.75)^{c}
1	80	49 (61.25)^{a}	36 (45)^{a}
3	80	43 (53.75) ^{ab}	26 (32.5)^{b}
5	80	39 (48.75)^{bc}	17 (21.25)^{c}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ 4.3 การเกิดแคลลัสและเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงส่วนยอดอ่อน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้น 2,4-D (มก/ล.)	จำนวนยอดอ่อนที่เพาะเลี้ยง	จำนวนยอดอ่อนที่พัฒนาเป็นแคลลัส (%)	จำนวนยอดอ่อนที่เกิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส (%)
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}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

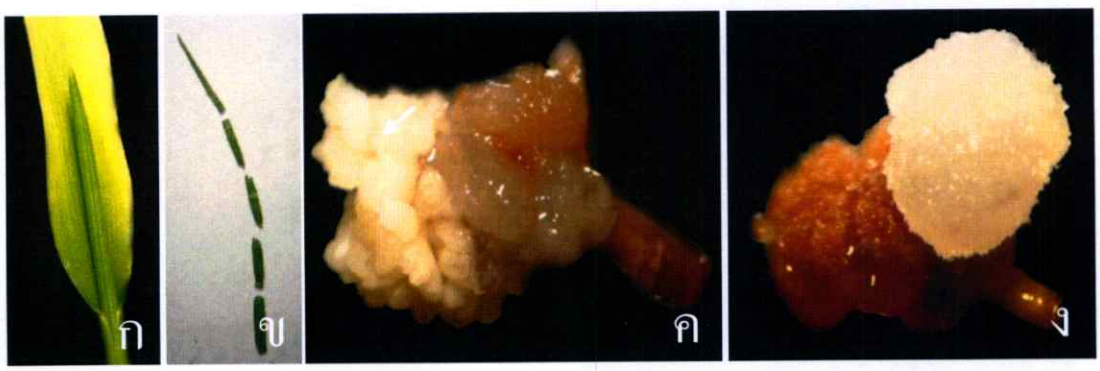


ภาพที่ 4.3 แสดงลักษณะการเกิดแคลลัสจากส่วนข้อหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

ก. เอ็มบริโอจีนิคแคลลัส

ข. นอน-เอ็มบริโอจีนิคแคลลัส

ค. แคลลัสแบบผสม



ภาพที่ 4.4 แสดงลักษณะของยอดอ่อน และการพัฒนาเป็นแคลลัสของยอดอ่อนหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

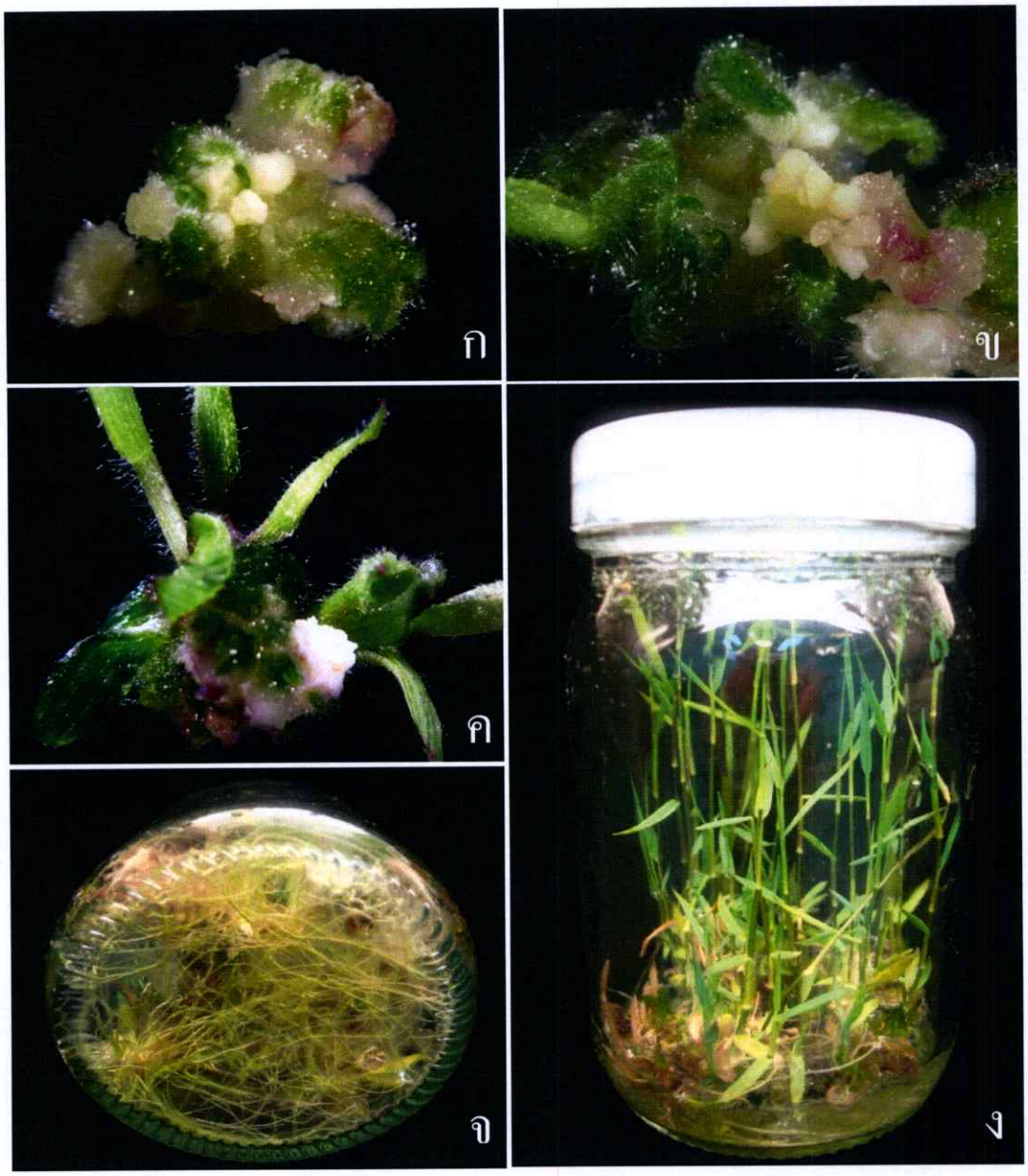
ก-ข. ลักษณะของยอดอ่อนในสภาพปลอดเชื้อที่นำมาใช้ในการทดลอง

ค. เอ็มบริโอจีนิคแคลลัส

ง. นอน-เอ็มบริโอจีนิคแคลลัส

4.3 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนข้อ และยอดอ่อนให้พัฒนาเป็นต้นใหม่

จากการคัดเลือกเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส อายุ 8 สัปดาห์ ที่พัฒนาจากส่วนข้อ และส่วนยอดอ่อนของหญ้าไนล์มาชักนำให้พัฒนาเป็นต้นบนอาหารสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 4 สัปดาห์ พบว่า เอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนข้อและส่วนยอดอ่อนสามารถพัฒนาเกิดเป็นกลุ่มเซลล์สีเขียว (green sport) (ภาพที่ 4.5 ก) โดยจะมีการพัฒนาเป็นโครงสร้างคล้ายใบ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาประมาณ 6 สัปดาห์ (ภาพที่ 4.5 ข-ค) และจะพัฒนาเป็นใบจริงและเปลี่ยนแปลงเป็นยอดอ่อนในที่สุด โดยเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ซึ่งพวกพืชในตระกูลหญ้า สามารถที่จะชักนำให้เกิดต้นได้โดยการเกิดเป็นโครงสร้างคล้ายใบมีสีเขียว ที่บริเวณผิวของแคลลัส เกิดจากส่วนของใบเลี้ยง (scutellum) ขยายขนาดใหญ่ขึ้น และพัฒนากลายเป็นยอดอ่อนในที่สุด (Vasil, 1987) และจากการทดลองพบว่าเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนข้อสามารถพัฒนาเป็นต้นได้บนอาหารทุกสูตรเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4) ส่วนเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนยอดอ่อน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นอยู่ในช่วง 68.33-100 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตรพัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ รองมาคืออาหารสูตรที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้เท่ากับ 98.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.5) โดยต้นใหม่ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถพัฒนาเป็นต้นที่มีระบบรากที่สมบูรณ์ได้ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ (ภาพที่ 4.5 ง-จ) สอดคล้องกับการทดลองของ Lu และคณะ(2006) รายงานว่าสามารถชักนำเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสของหญ้าเบอร์มิวดาให้พัฒนาเป็นต้นได้ 97 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA 4.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนงานวิจัยของ Dhandapani และคณะ (2008) รายงานว่าเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสของหญ้า zoysia (*Z. matrella* L. Merr.) ที่พัฒนาจากส่วนช่อดอกอ่อนสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ดีกว่าเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนามาจากส่วนข้อ โดยมีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นเท่ากับ 82 และ 67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.5 แสดงการพัฒนาของเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสเป็นต้นใหม่

ก. เอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นจุดเขียว หลังเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์

ข-ค. เอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นยอด หลังเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์

ง. เอ็มบริโอจีนิคแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ หลังเพาะเลี้ยง 12 สัปดาห์

จ. ระบบรากที่เกิดขึ้นของต้นที่พัฒนาจากเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส

ตารางที่ 4.4 ผลของ BA ต่อการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนข้อหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้น BA (มก/ล.)	จำนวนเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยง (ชิ้น)	จำนวนเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาเป็นต้น (%)
0.5	60	60 (100)[a]
1	60	60 (100)[a]
3	60	60 (100)[a]
5	60	60 (100)[a]

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ 4.5 ผลของ BA ต่อการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนยอดอ่อน หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

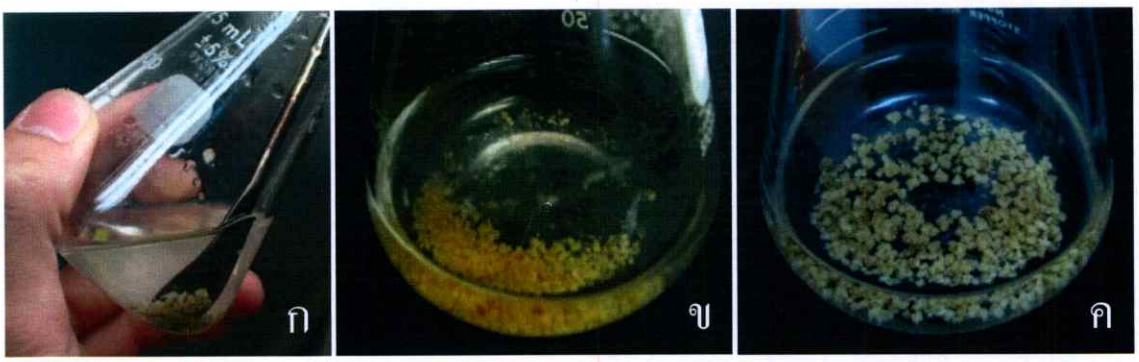
ความเข้มข้น BA (มก/ล.)	จำนวนเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยง (ชิ้น)	จำนวนเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาเป็นต้น (%)
0.5	60	41 (68.33)[b]
1	60	48 (80)[ab]
3	60	59 (98.33)[a]
5	60	60 (100)[a]

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

4.4 ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์

4.4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์ ในอาหารเหลว LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์ ในระยะเวลาต่างๆ จากการทดลองพบว่า เมื่อทำการบดย่อยเซลล์ให้มีขนาดเล็กลงด้วยช้อนโลหะที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ภาพที่ 4.6 ก) เซลล์จะเกาะกันเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก (ภาพที่ 4.6 ข) และเพาะเลี้ยงต่อไปลักษณะของเซลล์แขวนลอยจะเกาะกันเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ขึ้น มีเนื้อแข็ง แยกออกจากกันได้ง่าย (ภาพที่ 4.6 ค) และจากการหาค่าน้ำหนักสด (ภาพที่ 4.7) และค่าน้ำหนักแห้ง (ภาพที่ 4.8) ของเซลล์จากการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่าเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 6-18 วัน โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มมากขึ้น 8-9 เท่า ซึ่งในระยะนี้เป็นช่วง Log phase เซลล์มีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว เหมาะสำหรับนำไปใช้ในกิจกรรมต่างๆ เช่น เปลี่ยนอาหารใหม่ หรือ นำไปชักนำให้พัฒนาเป็นต้นใหม่ (อนุรักษ์, 2550) สอดคล้องกับการทดลองของ Lu และคณะ (2006) ที่สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยจากเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสของหญ้าเบอร์มิวดา (*C. transvaalensis x C. dactylon*) โดยเซลล์แขวนลอยสามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วโดยมีลักษณะเกาะกันเป็นกลุ่มมีเนื้อแข็ง และรายงานของ Terakawa และคณะ (1992) สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยจากเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสของหญ้า creeping bentgrass *(Agrostis palustris* Huds.)โดยเซลล์จะมีการเจริญอย่างรวดเร็วโดยจะมีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้น 5 เท่า หลังจากเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์

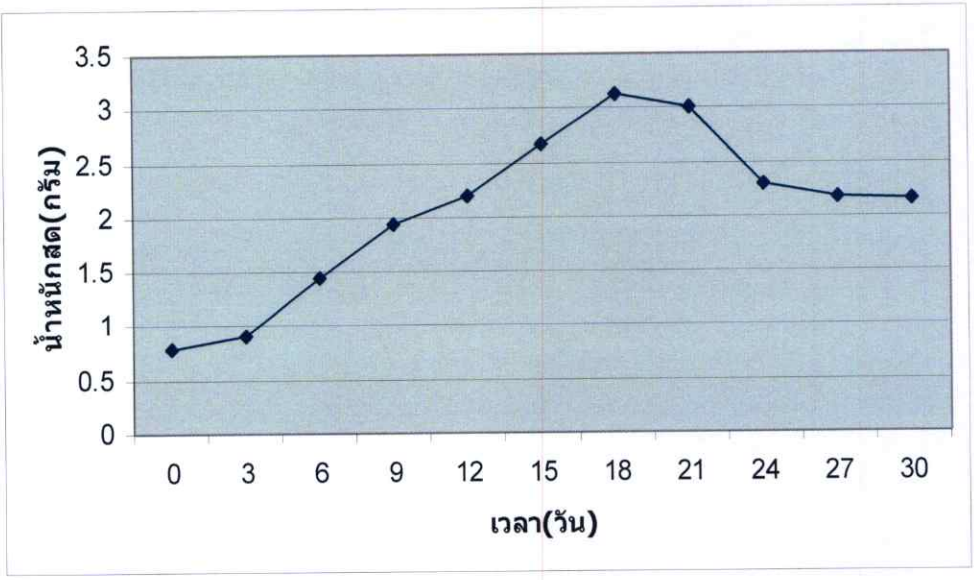


ภาพที่ 4.6 แสดงลักษณะเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์

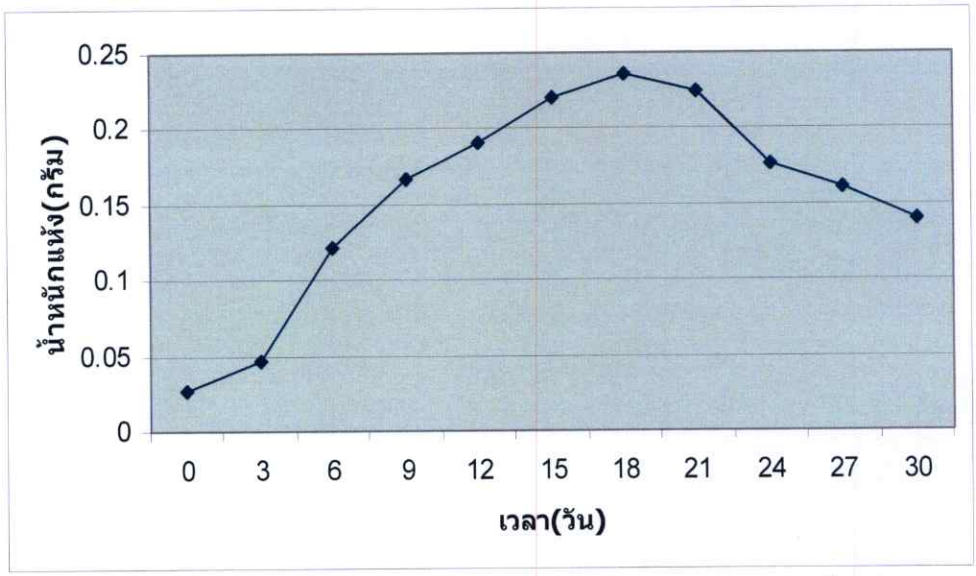
ก. การบดย่อยเซลล์ให้มีขนาดเล็กลงด้วยช้อนโลหะที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

ข. เซลล์แขวนลอยเมื่อเริ่มทำการเพาะเลี้ยง

ค. เซลล์แขวนลอยหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์



ภาพที่ 4.7 กราฟแสดงระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย โดยวิธีการหาน้ำหนักสด

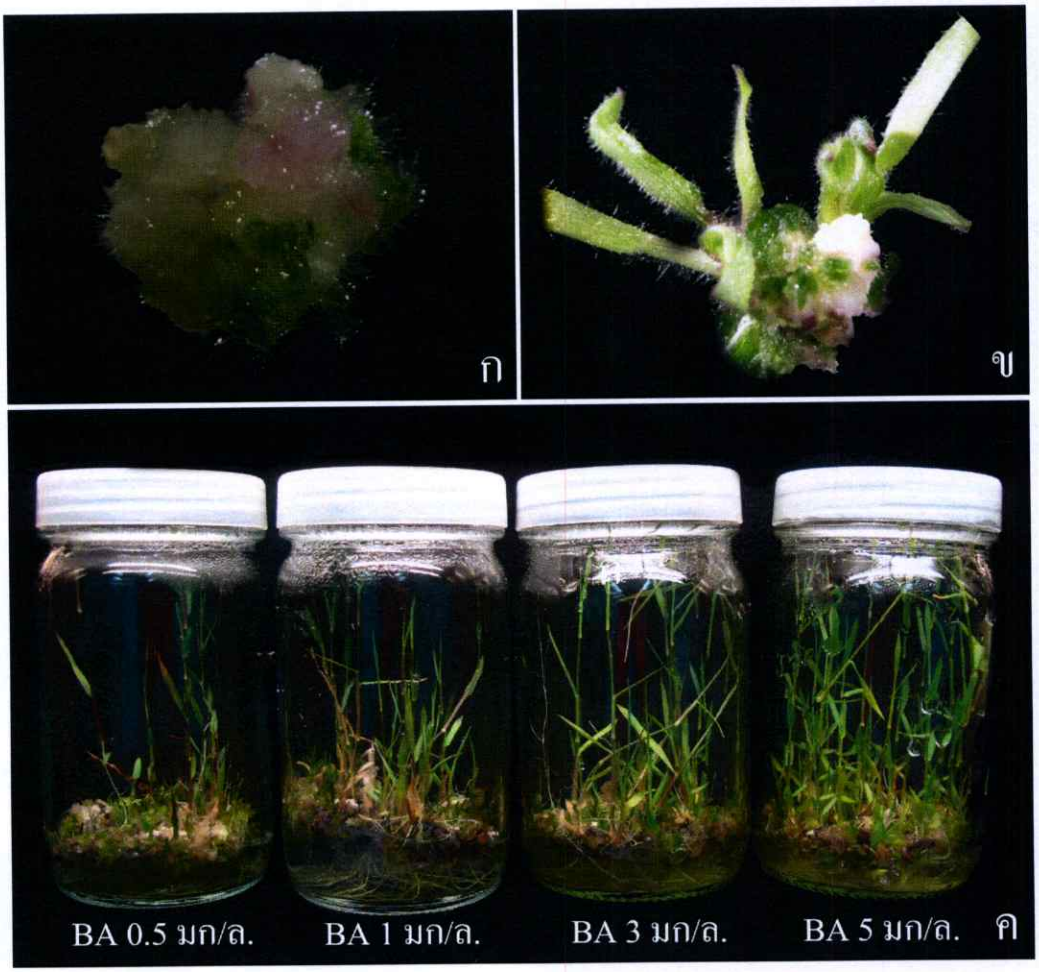


ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย โดยวิธีการหาน้ำหนักแห้ง

4.2.2 ผลการศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอย

จากการนำเซลล์แขวนลอย อายุ 4 สัปดาห์ ที่ผ่านการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงจะมีขนาดใหญ่ขึ้น และสามารถพัฒนาเกิดเป็นจุดเขียวได้บนอาหารทุกสูตร (ภาพที่ 4.9 ก) และสามารถพัฒนาเป็นยอดได้ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4-6 สัปดาห์ (ภาพที่ 4.9 ข) โดยที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเซลล์แขวนลอย

สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ 63.33-90 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.9 ค) (ตารางที่ 4.6) โดยอาหารสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้สูงสุดถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของแคลลัสที่นำมาเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยนั้นมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยและการพัฒนาเป็นต้นใหม่ โดยเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงจากเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสจะสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้สูง (Potrykus, 1991; Spangenberg และคณะ 1998) สอดคล้องกับการทดลองของ Lu และคณะ (2006) สามารถชักนำเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสของหญ้าเบอร์มิวดาให้พัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดีที่สุดบนอาหารแข็งที่เติม BA 4.8 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยมีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นเท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.9 แสดงการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์

ก. เซลล์แขวนลอยที่พัฒนาเป็นจุดเขียวเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ข. เซลล์แขวนลอยที่พัฒนาเป็นยอดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ค. เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ตารางที่ 4.6 ผลของ BA ต่อการพัฒนาเป็นต้นของเซลล์แขวนลอยหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้น BA (มก/ล.)	จำนวนเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยง	จำนวนเซลล์แขวนลอยที่พัฒนาเป็นต้น (%)
0.5	60	38 (63.33)[d]
1	60	44 (73.33)[c]
3	60	49 (81.63)[b]
5	60	54 (90)[a]

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

4.5 ผลของพีอีจีต่อการพัฒนาของเซลล์แขวนลอย

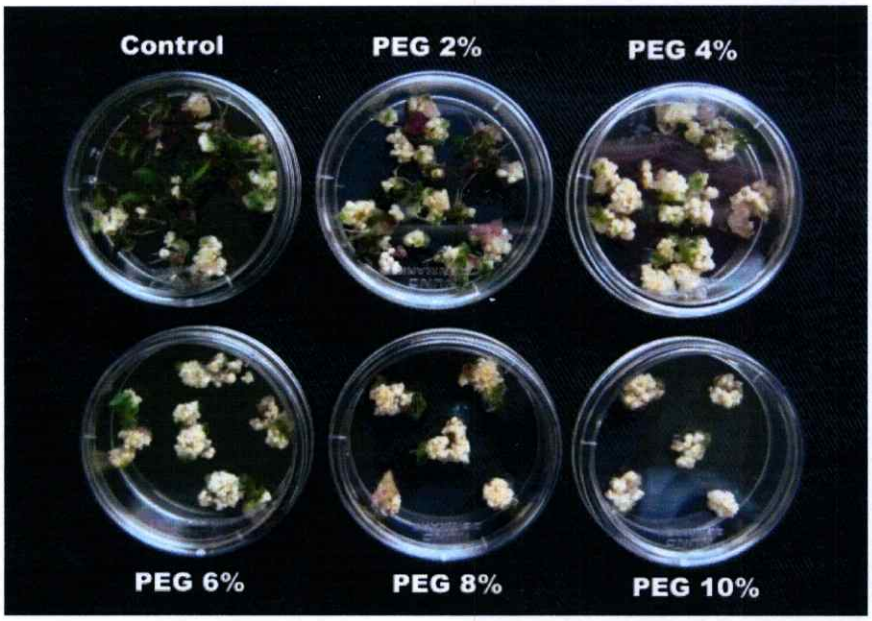
จากการนำเซลล์แขวนลอยอายุ 4 สัปดาห์ ที่ผ่านการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 2 สัปดาห์ นำมาชักนำให้พัฒนาเป็นต้นบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร และพีอีจีที่ความเข้มข้น 0 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นการปรับแรงดันออสโมติกของอาหารให้ลดลง ทำให้เซลล์ที่นำมาคัดเลือกอยู่ในสภาพขาดน้ำจากการทดลองพบว่า เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นของเซลล์แขวนลอยนั้นจะลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นของพีอีจี เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4.10) (ตารางที่ 4.7) ความเข้มข้นสูงสุดที่เซลล์แขวนลอยสามารถพัฒนาเป็นต้นได้คือ พีอีจี 8 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นเท่ากับ 12.21 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.11 ก) โดยที่ความเข้มข้นของ พีอีจี 10 เปอร์เซ็นต์ เซลล์แขวนลอยไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ ส่วนการทดลองของประภา (2538) รายงานว่าแคลลัสของข้าวสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ 1.3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม พีอีจี 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอัตราการรอดชีวิตเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์นั้นก็จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของพีอีจีเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.7) โดยเซลล์แขวนลอยที่ไม่สามารถรอดชีวิตได้จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด จากการทดลองพบว่าเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมพีอีจีความเข้มข้นมากกว่า 6 เปอร์เซ็นต์ อัตราการรอดชีวิตจะลดลงอย่างมาก (ภาพที่ 4.11ข) และจะตายหมดเมื่อความเข้มข้นของพีอีจีเพิ่มเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.11 ค) โดยความเข้มข้นของพีอีจีที่ทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์แขวนลอยลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) มีค่าเท่ากับ 6.13 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.12) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 สัปดาห์ สอดคล้องกับการทดลองของ Galovic และคณะ (2005) รายงานว่า พีอีจีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้แคลลัสของข้าวสาลี สายพันธุ์ NS55/25 และ Pesma มีอัตราการรอดชีวิตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ Bressan และคณะ (1981) กล่าวว่าพีอีจีเป็นสารในกลุ่ม ออสโมติคัม ทำหน้าที่

ลดแรงดันออสโมซิส (osmotic potential) ของสารละลายที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ เซลล์จะดูดซึมน้ำได้น้อยลงทำให้อยู่ในสภาพที่ขาดน้ำ โดยนิยมนำพีอีจีมาใช้ในการจำลองสภาวะแล้งในสภาพหลอดทดลองเพื่อคัดเลือกเซลล์หรือพืชที่ทนต่อสภาวะแล้งได้ เช่นการทดลองของ Wang และคณะ (2003) ทำการคัดเลือกมันเทศทนแล้งโดยนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม พีอีจี ความเข้มข้น 0-35 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามี 3 ต้นที่สามารถทนต่อสภาวะแล้งได้มากกว่าต้นควบคุม หรือการทดลองของ Muhammad และคณะ (2007) ทำการคัดเลือกข้าวทนแล้ง โดยนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมพีอีจีความเข้มข้น 10 และ 18 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองพบว่าแคลลัสที่รอดชีวิตมีปริมาณโพรลีนเพิ่มขึ้น ซึ่งจะทำให้ทนต่อสภาวะแล้งได้มากขึ้น

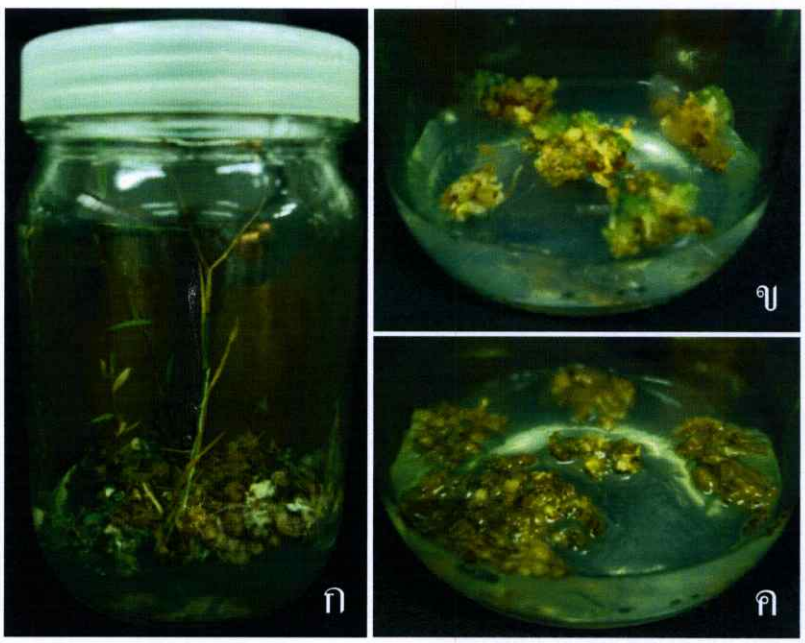
ตารางที่ 4.7 ผลของพีอีจี ต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด และการพัฒนาเป็นต้นของเซลล์แขวนลอยหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม พีอีจีความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 20 สัปดาห์

พีอีจี (%)	จำนวนเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยง	จำนวนเซลล์แขวนลอยที่รอดชีวิต (%)	จำนวนเซลล์แขวนลอยที่พัฒนาเป็นต้น (%)	จำนวนต้นทั้งหมดที่เกิดขึ้น
0	90	90 (100) [a]	67 (74.44) [a]	115
2	90	90 (100) [a]	62 (68.88) [a]	108
4	90	85 (94.44) [a]	55 (61.11) [b]	112
6	90	49 (54.44) [b]	46 (51.11) [c]	33
8	90	23 (25.55) [c]	11 (12.21) [d]	6
10	90	0 [d]	0 [e]	0

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



ภาพที่ 4.10 แสดงการพัฒนาของเซลล์แขวนลอยหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติมพีอีจี ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

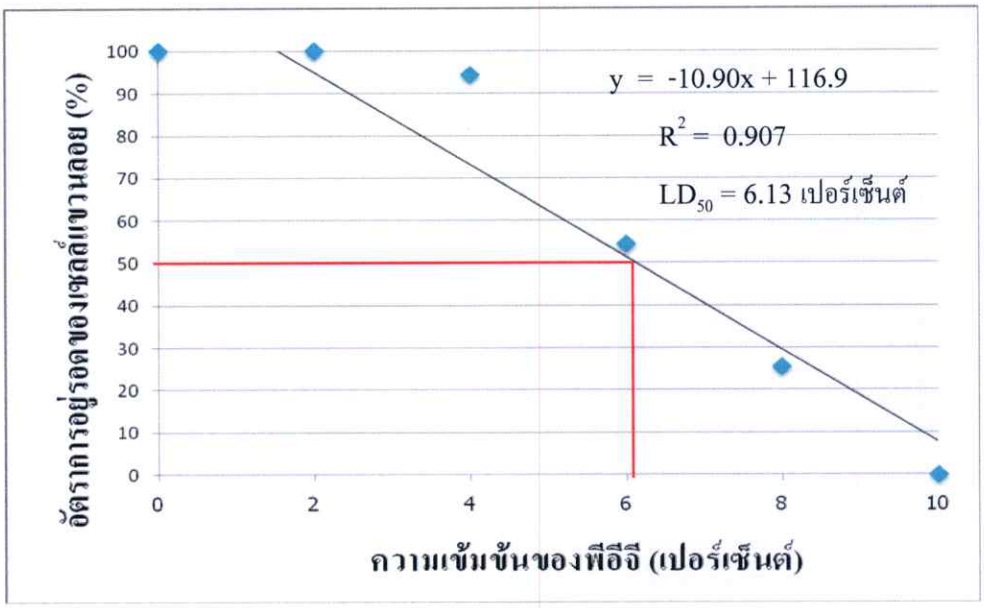


ภาพที่ 4.11 แสดงผลของพีอีจีต่อการพัฒนาเป็นต้นของเซลล์แขวนลอย

ก. การพัฒนาเป็นต้นของเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติมพีอีจี 8 เปอร์เซ็นต์

ข. แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมพีอีจี 6 เปอร์เซ็นต์

ค. แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมพีอีจี 10 เปอร์เซ็นต์

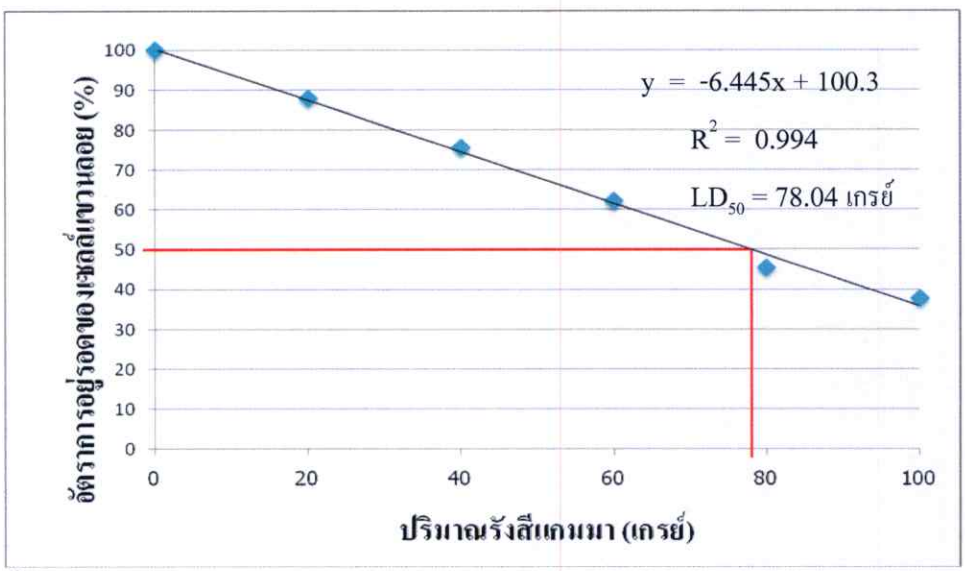


ภาพที่ 4.12 แสดงผลของพีอีจีต่ออัตราการอยู่รอด และค่า LD_{50} ของเซลล์แขวนลอย หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติมพีอีจีความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 20 สัปดาห์

4.6 ผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการพัฒนาของเซลล์แขวนลอย

จากการนำเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์ อายุ 4 สัปดาห์ ที่ผ่านการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 2 สัปดาห์ ไปฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสีต่างๆ แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 สัปดาห์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์แขวนลอยจะลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.8) โดยเซลล์แขวนลอยที่ไม่สามารถอยู่รอดได้ จะเปลี่ยนเป็นสีดำและตายในที่สุด (ภาพที่ 4.14 ก) ผลดังกล่าวนี้อาจเกิดจากที่รังสีได้สร้างความเสียหายให้กับโครโมโซมและองค์ประกอบอื่นๆ ในไซโตพลาสซึม ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ (Gual, 1977) การทดลองนี้พบว่าปริมาณรังสีที่ทำให้เซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์ตายเป็นจำนวน 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) มีค่าเท่ากับ 78.04 เกรย์ (ภาพที่ 4.13) ค่า LD_{50} ที่ได้จากการทดลองนี้มีค่าค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับหญ้าชนิดอื่นเช่น แคลลัสของหญ้าเนเปียร์แคระมีค่า LD_{50} เท่ากับ 10.6 เกรย์ (จันทกานต์, 2544) หรือในแคลลัสของหญ้าอะตราตั้มมีค่า LD_{50} เท่ากับ 22.13 เกรย์ (ธนภักษ์, 2545) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากปริมาณรังสีที่มีผลทำให้พืชมีอัตราการตายเป็นจำนวน 50 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น ขนาดของนิวเคลียส จำนวนและขนาดของโครโมโซม ปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดต่อเซลล์ เป็นต้น (Sparrow และคณะ 1963) นอกจากนี้ยังพบว่าการพัฒนาเป็นต้นของเซลล์แขวนลอยจะลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้นเช่นกัน (ตารางที่ 4.8) (ภาพที่ 4.14 ข) โดยเซลล์แขวนลอยที่ได้รับรังสีปริมาณ 100 เกรย์ จะสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ต่ำที่สุดเท่ากับ 35.55 เปอร์เซ็นต์ ส่วนจำนวนยอดทั้งหมดนั้นจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น โดยเซลล์แขวนลอยที่ได้รับรังสีปริมาณ 80 เกรย์ จะสามารถพัฒนาเกิดยอดได้จำนวนมาก

ที่สุด 2.56 ยอดต่อเซลล์แขวนลอย บางรายงานกล่าวว่ารังสีที่ปริมาณต่ำๆ จะช่วยในการพัฒนาเป็นยอดจากชิ้นส่วนพืชหรือแคลลัสดีขึ้น เช่น การทดลองของ Arabi และคณะ (2005) รายงานว่ารังสีแกมมาที่ปริมาณ 10 เกรย์ สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนีซีส และสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ โดยมีจำนวนต้นทั้งหมดเพิ่มมากขึ้น จากการเพาะเลี้ยงเกสรตัวผู้ของข้าวบาเลย์ แต่การทดลองในหญ้าไนล์นี้ ปริมาณรังสีที่สูงถึง 80 เกรย์ สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเกิดยอดได้จำนวนมากที่สุด อาจมีสาเหตุเนื่องจากรังสีมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างยอดภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อ (Pandey และคณะ 1978) โดยต้นที่พัฒนามาจากเซลล์แขวนลอยที่รอดชีวิตจากการฉายรังสีแกมมานี้ สามารถพบความแปรปรวนในลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ต้นเตี้ยแคระแกร็น (ภาพที่ 4.14 ค) และต้นที่มีใบกว้างกว่าปกติ (ภาพที่ 4.14 ง) ต้นที่ผิดปกติมากเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปจะตายในที่สุด เนื่องจากเซลล์ที่ได้รับรังสีอาจมีการแบ่งเซลล์ สามารถมีชีวิตอยู่ได้ระยะหนึ่งหลังได้รับรังสีแล้วจึงตาย (อรุณี, 2530) และเมื่อย้ายต้นอ่อนที่รอดชีวิต (M_1V_1) ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ปริมาณรังสีแกมมา 0 20 40 60 80 และ 100 เกรย์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถพัฒนาเกิดเป็นต้นที่มีระบบยอดและรากที่สมบูรณ์ได้ (M_1V_2) (ภาพที่ 4.14 จ) โดยมีจำนวนต้นทั้งหมด 106 104 101 95 100 และ 39 ต้น ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8) และทำการคัดเลือกโคลนที่มีลักษณะของ ความสูง ขนาดของใบ หรือขนาดลำต้นที่แตกต่างไปจากต้นควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสี โดยคัดเลือกมาปริมาณรังสีละ 15 โคลน รวมทั้งหมด 75 โคลน (M_1V_2) ออกปลูกในสภาพธรรมชาติต่อไป

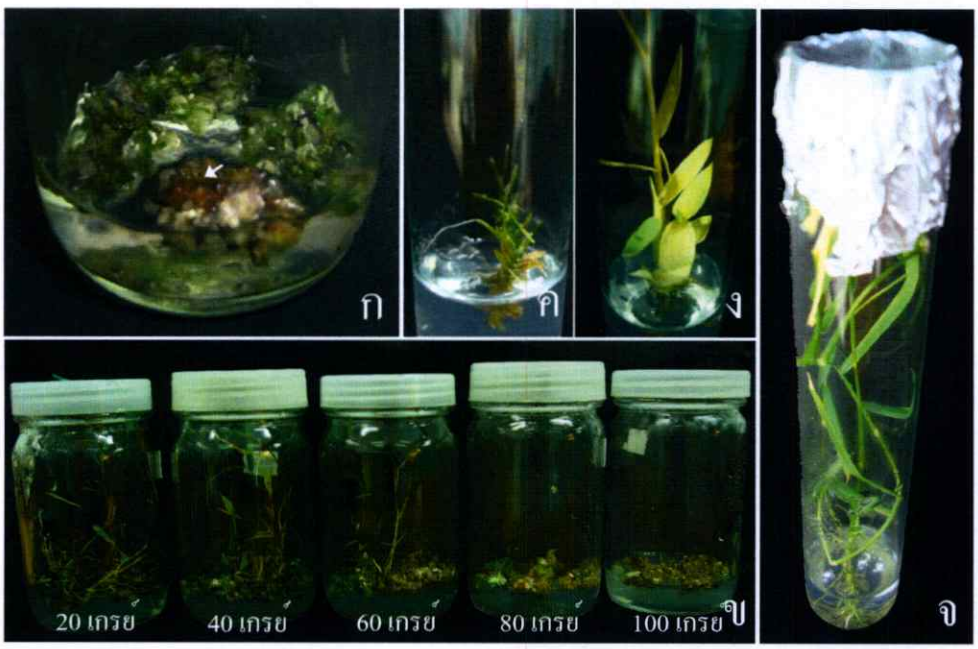


ภาพที่ 4.13 แสดงผลของรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ ต่ออัตราการอยู่รอด และค่า LD_{50} ของเซลล์แขวนลอย หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 20 สัปดาห์

ตารางที่ 4.8 ผลของรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดและการพัฒนาเป็นต้นของเซลล์แขวนลอย หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 20 สัปดาห์

ปริมาณรังสี (เกรย์)	จำนวนเซลล์แขวนลอย (ชิ้น)	จำนวนเซลล์แขวนลอยที่อยู่รอด (%)	จำนวนเซลล์แขวนลอยที่พัฒนาเป็นต้น (%)	จำนวนต้นทั้งหมดที่เกิดขึ้น	จำนวนต้นต่อเซลล์แขวนลอย
0	90	90(100) [a]	68(75.55) [a]	106	1.55 [d]
20	90	79(87.77) [a]	59(65.55) [b]	104	1.75 [c]
40	90	68(75.55) [b]	53(58.88) [bc]	101	1.90 [c]
60	90	56(62.21) [c]	46(51.10) [cd]	95	2.06 [b]
80	90	41(45.55) [d]	39(43.33) [de]	100	2.56 [a]
100	90	34(37.77) [d]	32(35.55) [e]	39	1.21 [e]

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



ภาพที่ 4.14 แสดงการพัฒนาของเซลล์แขวนลอยที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ

ก. เซลล์แขวนลอยที่ไม่สามารถรอดชีวิตจะเปลี่ยนเป็นสีดำและตายในที่สุด

ข. การพัฒนาเป็นต้นของเซลล์แขวนลอยที่ได้รับปริมาณรังสีต่างๆ

ค. ลักษณะต้นเตี้ยแคระแกรนที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ได้รับรังสี 10 เกรย์

ง. ลักษณะต้นที่มีใบกว้างกว่าปกติที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ได้รับรังสี 8 เกรย์

จ. หญ้าไนล์ (M_1V_2) ที่มีระบบยอดและรากที่สมบูรณ์

4.7 ผลการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของหญ้าไนล์ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ เมื่อออกปลูกในสภาพธรรมชาติ (M_1V_3)

จากการนำต้นอ่อนของหญ้าไนล์ (M_1V_1) ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ คือ 0 20 40 60 80 และ 100 เกรย์ ย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 6 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดยอดและรากที่สมบูรณ์ แล้วทำการคัดเลือกต้นที่มีลักษณะของ ความสูง ขนาดของใบ หรือขนาดลำต้นที่แตกต่างไปจากต้นควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสี โดยคัดเลือกมาปริมาณรังสีละ 15 โคลน รวมทั้งหมด 75 โคลน (M_1V_2) ออกปลูกในสภาพธรรมชาติ เป็นเวลา 45 วัน แล้วทำการบันทึกลักษณะต่างๆ ของหญ้าไนล์ (M_1V_3) คือความสูงของต้น ความกว้าง และความยาวของใบ และขนาดของลำต้น (ภาพที่ 4.15 ก-ง) พบว่าการเจริญเติบโตทั้งในด้านความสูง และขนาดของใบของหญ้าไนล์ที่พัฒนามาจากเซลล์แขวนลอยที่ได้รับรังสีปริมาณต่างๆ มีแนวโน้มลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น โดยพบว่าความสูงเฉลี่ย ความกว้าง และความยาวเฉลี่ยของใบของหญ้าไนล์ ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ได้รับการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่าง ๆ คือ 0 20 40 60 80 และ 100 เกรย์ นั้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ขนาดของลำต้นเฉลี่ย จะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยที่ปริมาณรังสีแกมมา 100 เกรย์ นั้น กลุ่มต้นหญ้าจะมีความสูงเฉลี่ยของต้นต่ำที่สุด คือเท่ากับ 37.93 เซนติเมตร ส่วนความยาวของใบนั้นพบว่า ปริมาณรังสีที่ 60 เกรย์ มีความยาวของใบสั้นที่สุด คือเท่ากับ 10.62 เซนติเมตร และความกว้างของใบนั้นพบว่า ปริมาณรังสีที่ 80 เกรย์ ความกว้างของใบจะเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับต้นที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ไม่ได้รับรังสี ผลของรังสีที่มีต่อสัณฐานวิทยา เกิดขึ้นได้กับรูปร่างลักษณะของพืช อาจเกิดขึ้นกับลำต้น ใบ ราก และดอก อาจทำให้ลำต้นแคระแกรน (dwarf) หรือมีใบที่ผิดปรกติ เช่น ใบเล็ก เนื่องจากรังสีไปทำลายออกซินซึ่งเป็นฮอร์โมนที่เร่งการเจริญเติบโต (อรุณี, 2530) หรือรังสีไปมีผลในการยับยั้งขบวนการสร้างจิบเบอเรลลิน (GA biosynthesis) ซึ่งจะมีผลต่อยืดยาวของลำต้น (Ross และคณะ, 1997) สอดคล้องกับการทดลองของ ธนภักษ์ (2545) ที่รายงานว่า หญ้าอะตราตัม ที่ได้รับปริมาณรังสีเพิ่มขึ้นจะทำให้ค่าเฉลี่ยความสูงของต้นลดลง และการกลายพันธุ์ในลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาในขนาดของลำต้นได้มีรายงาน เช่น สรายุทธ์ (2551) สามารถคัดเลือกหญ้ากินนีสีม่วงที่พัฒนาจากเมล็ดที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา ที่มีลำต้นขนาดเล็กลงและแตกกอมากกว่าต้นควบคุม หรือการทดลองของ Lu และคณะ (2009) ได้ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการฉายรังสีแกมมาในหญ้าเบอร์มิวดา เพื่อให้ได้ต้นที่มีลักษณะเตี้ยแคระโดยนำส่วนไหลจำนวน 3000 ท่อน มาฉายรังสีแกมมาที่ระดับ 700-1000 เกรย์ หลังจากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในโรงเรือนพบว่าสามารถคัดเลือกต้นที่มีลักษณะเตี้ยแคระออกมาได้ 3โคลนโดยมีลักษณะใบเล็กระยะห่างระหว่างปล้องสั้น

ตารางที่ 4.9 ผลของรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ ต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหญ้าไนล์ (M_1V_3) ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสี หลังการย้ายปลูก 45 วัน

ปริมาณรังสี (เกรย์)	ความสูงต้น (ซม.)	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	ขนาดลำต้น (ซม.)	จำนวนต้นที่บันทึก
0	43.52 ^{ab}	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

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากการคัดเลือกลักษณะความแปรปรวนทางสัณฐานวิทยาของต้นที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์ที่ได้รับรังสีปริมาณต่างๆ (M_1V_3) จากปริมาณรังสีละ 15 โคลน รวมทั้งหมด 75 โคลน สามารถคัดเลือกออกมาได้ 9 โคลน ที่มีลักษณะของ ความสูงของต้น และขนาดของใบ ที่แตกต่างไปจากต้นควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีแกมมา ได้แก่โคลนที่ 0405 0407 0608 0612 0613 0614 0615 0807 และ 1004 (ตัวอย่างที่ 2-10) และต้นควบคุม (control) หรือหญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสี (ตัวอย่างที่ 1) โดยเมื่อนำข้อมูลของลักษณะทางสัณฐานวิทยามาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ตัวอย่างทั้ง 9 โคลน มีความสูงเฉลี่ย ขนาดของใบ และขนาดของลำต้น ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.9) โดยโคลนที่ 0405 0407 0612 0613 0614 และ 0615 จะมีลักษณะความสูงเฉลี่ย ขนาดของใบ และขนาดของลำต้นที่ด้อยกว่าต้นควบคุม ซึ่งโคลนที่ 0613 และ 0614 จะมีความสูง ขนาดลำต้น และขนาดของใบต่ำที่สุด (ภาพที่ 4.16 ก-ค) ซึ่งคาดว่า 2 โคลนนี้น่าจะนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการนำไปทำหญ้าแห้งได้ดี เนื่องจากต้นที่มีขนาดลำต้นเล็กสามารถทำแห้งได้ง่าย ส่วนโคลนที่มีลักษณะที่เด่นกว่าต้นควบคุมได้แก่ โคลนที่ 0807 ซึ่งมีขนาดลำต้นและความกว้างของใบที่ใหญ่กว่าต้นควบคุม (ภาพที่ 4.16 ก-ข)

ตารางที่ 4.10 ค่าเฉลี่ยความสูง ขนาดของใบ และขนาดของลำต้นของหญ้าไนล์ (M_1V_3) ที่คัดเลือกมาจำนวน 9 โคลน ที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นควบคุม หลังการย้ายปลูก 45 วัน

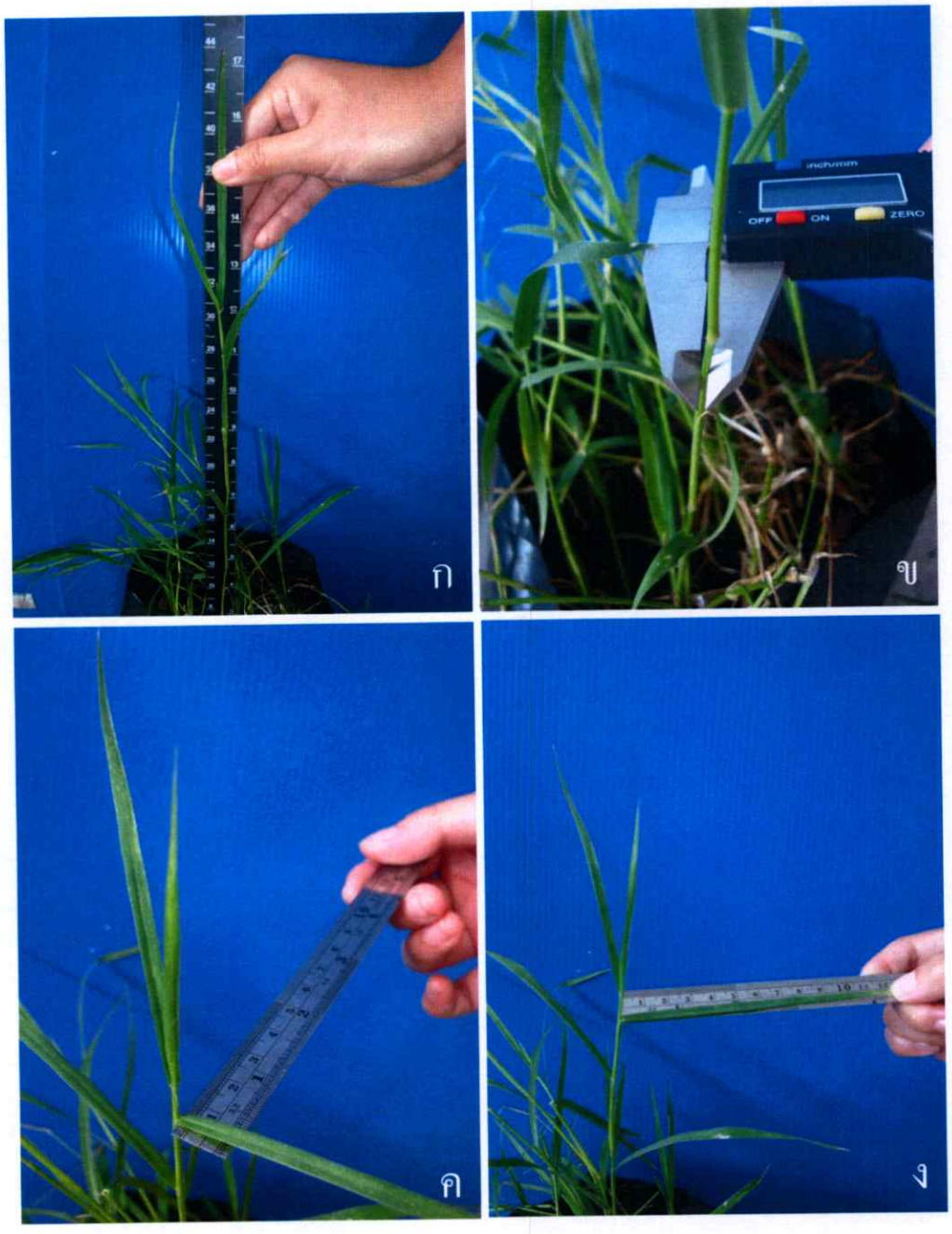
ตัวอย่างที่	โคลน	ความสูงของต้น (ซม.)	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	ขนาดลำต้น (ซม.)
1	Control	45.35^{a}	13.75^{a}	0.426^{cd}	0.119^{ab}
2	0405	34.90^{b}	9.5^{cd}	0.392^{def}	0.907^{b}
3	0407	36.95^{b}	9.15^{d}	0.358^{e}	0.888^{b}
4	0608	35.6^{b}	10.55^{bc}	0.476^{b}	0.106^{bc}
5	0612	38.75^{b}	11^{b}	0.435^{c}	0.105^{c}
6	0613	20.40^{d}	5.35^{f}	0.306^{f}	0.075^{d}
7	0614	28.30^{c}	7.45^{e}	0.378^{ef}	0.075^{d}
8	0615	36.50^{b}	10.30^{bcd}	0.414^{cde}	0.097^{cd}
9	0807	37.45^{b}	11^{b}	0.516^{a}	0.124^{a}
10	1004	29.15^{c}	6.9^{e}	0.381^{ef}	0.092^{cd}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

control หมายถึง หญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสี

xx-- ตัวเลข 2 ตัวแรก คือ 02 04 06 08 และ 10 แทนปริมาณรังสีแกมมา เท่ากับ 20 40 60 80 และ 100 เกรย์ ตามลำดับ

--xx ตัวเลข 2 ตัวหลัง แทนลำดับต้นที่ ของแต่ละปริมาณรังสี



ภาพที่ 4.15 แสดงการวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหญ้าไนล์ (M_1V_3)

ก. การวัดความสูงของต้น

ข. การวัดขนาดของลำต้น

ค. การวัดความกว้างของใบ

ง. การวัดความยาวของใบ

ภาพที่ 4.16 แสดงตัวอย่างของหญ้าไนล์ (M_1V_3) ที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นควบคุม

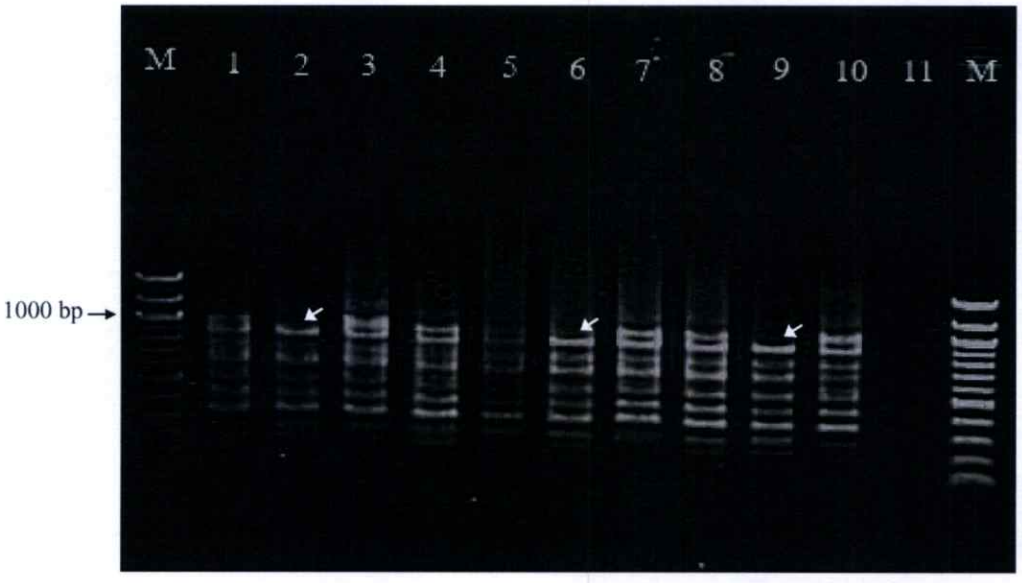
ก. ลักษณะของขนาดลำต้นของหญ้าไนล์ที่แตกต่างไปจากต้นควบคุม

ข. ลักษณะของใบของหญ้าไนล์ที่แตกต่างไปจากต้นควบคุม

ค. ลักษณะของความสูงของหญ้าไนล์ที่แตกต่างไปจากต้นควบคุม

4.8 ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

จากการคัดเลือกโคลนที่มีลักษณะที่แตกต่างไปจากต้นควบคุมที่ได้จากการทดลองที่ 4.7 จำนวน 9 โคลนได้แก่ โคลนที่ 0405 0407 0608 0612 0613 0614 0615 0807 และ 1004 (ตัวอย่างที่ 2-10) และต้นควบคุม (control) หรือหญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสี (ตัวอย่างที่ 1) นำมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่าจากจำนวนไพร์เมอร์ที่ใช้ 10 ชนิด คือ OPA01-10 จะมีไพร์เมอร์จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ OPA-01 OPA-02 OPA-03 OPA-04 OPA-06 OPA-08 OPA-09 และ OPA-10 ที่สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันระหว่างต้นควบคุมและต้นที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสี (ภาพที่ 4.17-4.24)



ภาพที่ 4.17 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีโดยไพร์เมอร์ OPA-01

Lane M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

Lane 1 : ดีเอ็นเอหญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีที่ใช้เป็นต้นควบคุม (control)

Lane 2-10 : ดีเอ็นเอหญ้าไนล์ ตัวอย่างที่ 2 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 ตามลำดับ

Lane 11 : Negative Control

ภาพที่ 4.18 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีโดยไพร์เมอร์ OPA-02

Lane M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

Lane 1 : ดีเอ็นเอหญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีที่ใช้เป็นต้นควบคุม (control)

Lane 2-10 : ดีเอ็นเอหญ้าไนล์ ตัวอย่างที่ 2 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 ตามลำดับ

Lane 11 : Negative Control

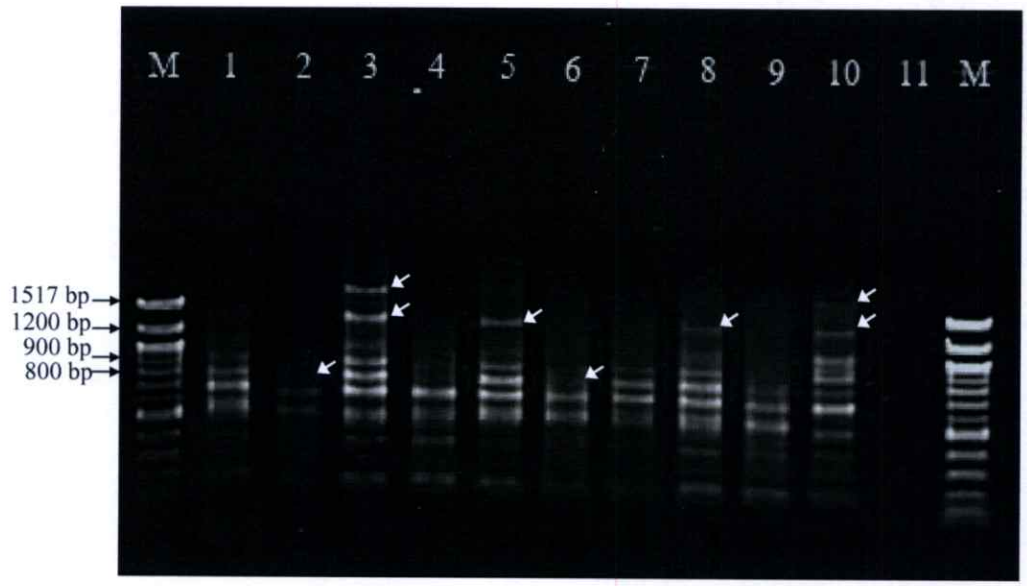
ภาพที่ 4.19 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีโดยไพร์เมอร์ OPA-03

Lane M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

Lane 1 : ดีเอ็นเอหญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีที่ใช้เป็นต้นควบคุม (control)

Lane 2-10 : ดีเอ็นเอหญ้าไนล์ ตัวอย่างที่ 2 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 ตามลำดับ

Lane 11 : Negative Control



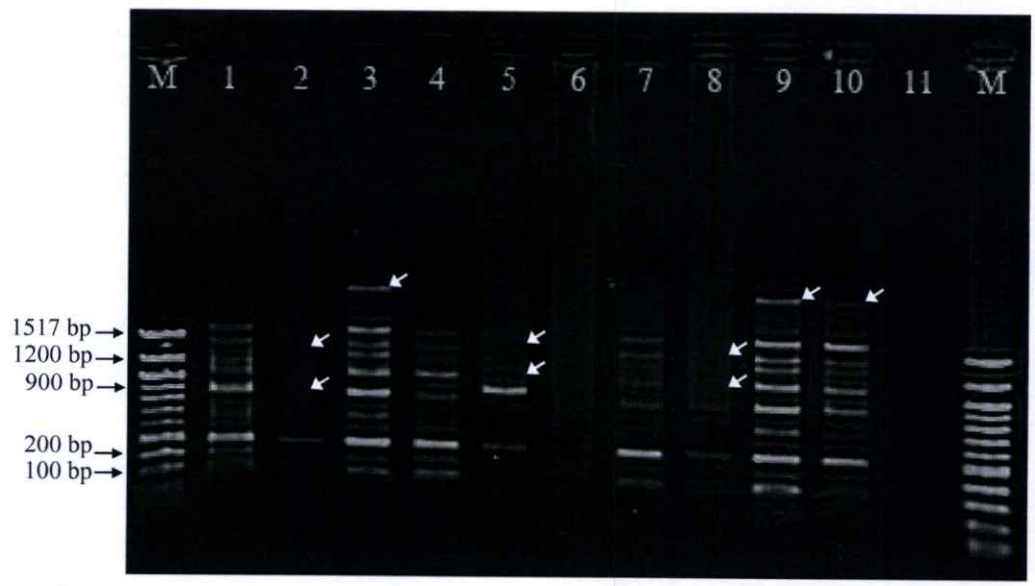
ภาพที่ 4.20 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีโดยไพร์เมอร์ OPA-04

Lane M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

Lane 1 : ดีเอ็นเอหญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีที่ใช้เป็นต้นควบคุม (control)

Lane 2-10 : ดีเอ็นเอหญ้าไนล์ ตัวอย่างที่ 2 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 ตามลำดับ

Lane 11 : Negative Control



ภาพที่ 4.21 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีโดยไพร์เมอร์ OPA-06

Lane M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

Lane 1 : ดีเอ็นเอหญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีที่ใช้เป็นต้นควบคุม (control)

Lane 2-10 : ดีเอ็นเอหญ้าไนล์ ตัวอย่างที่ 2 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 ตามลำดับ

Lane 11 : Negative Control

ภาพที่ 4.22 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีโดยไพร์เมอร์ OPA-08

Lane M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

Lane 1 : ดีเอ็นเอหญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีที่ใช้เป็นต้นควบคุม (control)

Lane 2-10 : ดีเอ็นเอหญ้าไนล์ ตัวอย่างที่ 2 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 ตามลำดับ

Lane 11 : Negative Control

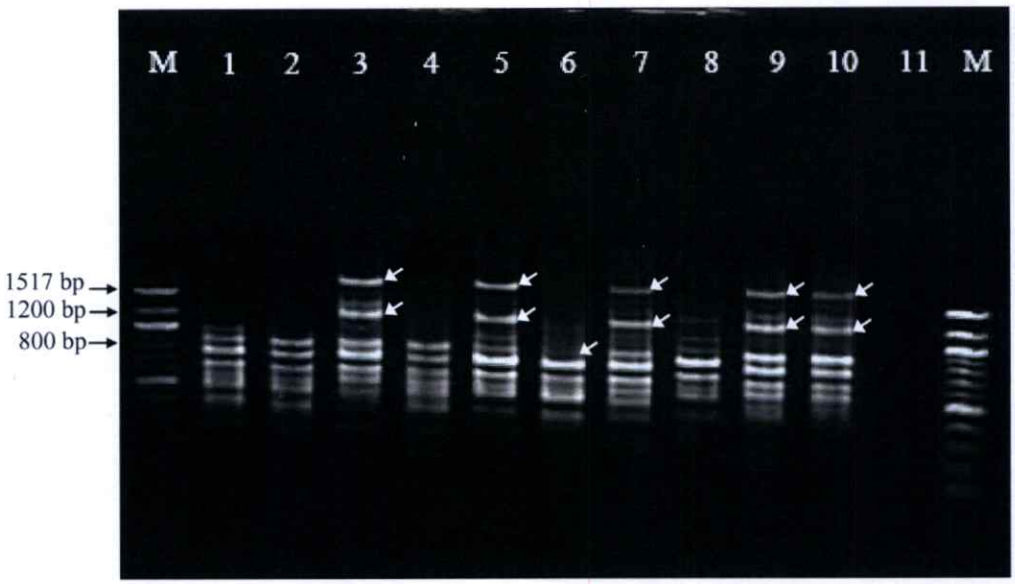
ภาพที่ 4.23 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีโดยไพร์เมอร์ OPA-09

Lane M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

Lane 1 : ดีเอ็นเอหญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีที่ใช้เป็นต้นควบคุม (control)

Lane 2-10 : ดีเอ็นเอหญ้าไนล์ ตัวอย่างที่ 2 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 ตามลำดับ

Lane 11 : Negative Control



ภาพที่ 4.24 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีโดยไพร์เมอร์ OPA-10

Lane M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

Lane 1 : ดีเอ็นเอหญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีที่ใช้เป็นต้นควบคุม (control)

Lane 2-10 : ดีเอ็นเอหญ้าไนล์ ตัวอย่างที่ 2 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 ตามลำดับ

Lane 11 : Negative Control

จากภาพที่ 4.17-4.24 เป็นภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์จำนวน 8 ชนิดที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างหญ้าไนล์ที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีแกมมาที่ใช้เป็นต้นควบคุม (ตัวอย่างที่ 1) และหญ้าไนล์ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ (ตัวอย่างที่ 2-10) โดยแสดงให้เห็นว่า

ไพร์เมอร์ OPA-01 (ภาพที่ 4.17) สามารถแยกความต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ 3 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 2 6 และ 9 โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาด 1000 คู่เบส ขาดหายไป

ไพร์เมอร์ OPA-02 (ภาพที่ 4.18) สามารถแยกความต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ 3 ตัวอย่าง คือตัวอย่างที่ 2 4 และ 6 โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1200 คู่เบส ขาดหายไป

ไพร์เมอร์ OPA-03 (ภาพที่ 4.19) สามารถแยกความต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ 5 ตัวอย่าง คือตัวอย่างที่ 2 และ 4 โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1000 คู่เบส ขาดหายไป และตัวอย่างที่ 8 และ 9 โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 และ 500 คู่เบส ขาดหายไป ส่วนในตัวอย่างที่ 10 จะมีแถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่กว่า 1500 คู่เบสเพิ่มขึ้นมา

ไพร์เมอร์ OPA-04 (ภาพที่ 4.20) สามารถแยกความต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ 6 ตัวอย่าง คือตัวอย่างที่ 2 และ 6 โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาด 800 และ 900 คู่เบส ขาดหายไป ส่วนตัวอย่างที่ 3

และ 10 จะมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1200 และ 1517 คู่เบส เพิ่มขึ้นมา และตัวอย่างที่ 5 และ 8 โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1200 คู่เบส เพิ่มขึ้นมา

ไพร์เมอร์ OPA-06 (ภาพที่ 4.21) สามารถแยกความต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ 6 ตัวอย่าง คือตัวอย่างที่ 2 โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 1000 1200 และ 1517 คู่เบส ขาดหายไป และตัวอย่างที่ 5 และ 8 จะมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1000 1200 และ 1517 ขาดหายไป ส่วนตัวอย่างที่ 3 9 และ10 จะมีแถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่กว่า 1517 คู่เบส เพิ่มขึ้นมา

ไพร์เมอร์ OPA-08 (ภาพที่ 4.22) สามารถแยกความต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ 4 ตัวอย่าง คือตัวอย่างที่ 3 7 9 และ 10 โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาด 1200 คู่เบส เพิ่มขึ้นมา

ไพร์เมอร์ OPA-09 (ภาพที่ 4.23) สามารถแยกความต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ 5 ตัวอย่าง คือตัวอย่างที่ 2 4 6 และ 10 โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1000 คู่เบส ขาดหายไป ส่วนตัวอย่างที่ 9 จะมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1517 คู่เบส เพิ่มขึ้นมา

ไพร์เมอร์ OPA-10 (ภาพที่ 4.24) สามารถแยกความต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ 6 ตัวอย่าง คือตัวอย่างที่ 2 5 7 9 และ 10 โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1200 และ 1517 เพิ่มขึ้นมา ส่วนตัวอย่างที่ 6 จะมีแถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส ขาดหายไป โดยไพร์เมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างได้สามารถสรุปดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 แสดงการจำแนกลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างโดยไพร์เมอร์จำนวน 8 ชนิด

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 1517	
OPA-04	2		800,900
	3	ประมาณ 1200,1517	

ตารางที่ 4.11 (ต่อ)

ไพร์เมอร์	ตัวอย่างที่แยกได้	แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น (bp)	แถบดีเอ็นเอที่หายไป (bp)
	5	ประมาณ 1200	
	6		800,900
	8	ประมาณ 1200	
	10	ประมาณ 1200,1517	
OPA-06	2		ประมาณ 900,1000,1200,1517
	3	ขนาดใหญ่กว่า 1517	
	5		ประมาณ 1000,1200,1517
	8		ประมาณ 1000,1200,1517
	9	ขนาดใหญ่กว่า 1517	
	10	ขนาดใหญ่กว่า 1517	
OPA-08	3	1200	
	7	1200	
	9	1200	
	10	1200	
OPA-09	2		ประมาณ 1000
	4		ประมาณ 1000
	6		ประมาณ 1000
	9	ประมาณ 1517	
	10		ประมาณ 1000
OPA-10	3	ประมาณ 1200,1517	
	5	ประมาณ 1200,1517	
	6		800
	7	ประมาณ 1200,1517	
	9	ประมาณ 1200,1517	
	10	ประมาณ 1200,1517	

จากผลการทดลอง พบว่าไพร์เมอร์ทั้ง 8 ตัวนี้สามารถจำแนกความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าไนล์ได้ทั้ง 9 โคลน โดยไพร์เมอร์ที่สามารถจำแนกความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างต้นควบคุม และ ต้นตัวอย่าง ได้มากที่สุดคือ ไพร์เมอร์ OPA-04 OPA-06 และ OPA-10

สามารถจำแนกได้ถึง 6 โคลน และพบว่าโคลนที่ 0405 0807 และ 1004 มีไพร์เมอร์ ที่สามารถจำแนกความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างต้นควบคุมได้มากที่สุด คือ 6 ไพร์เมอร์ ส่วนโคลนที่ 0614 มีไพร์เมอร์ที่สามารถจำแนกลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้น้อยที่สุดคือ 2 ไพร์เมอร์ (ตารางที่ 4.12) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ สรายุทธ์ (2551) ที่สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ของหญ้ากินนีสีม่วง ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาที่ 400 เกรย์ โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ 34 ไพรเมอร์ พบว่ามี 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPB-02 OPB-12 OPF-01 และ OPF-05 ที่แสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างโคลนที่กลายพันธุ์และต้นควบคุม

ตารางที่ 4.12 แสดงจำนวนไพร์เมอร์ที่สามารถจำแนกความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างต้นควบคุมกับต้นตัวอย่าง

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

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหญ้าไนล์ พบว่าอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลฟา-คีโตกลูตาริก ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำส่วนข้อและส่วนยอดอ่อนให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดเท่ากับ 61.25 และ 27.50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และสามารถชักนำส่วนข้อ และส่วนยอดอ่อนให้เกิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสได้ดีที่สุดเท่ากับ 45 และ 13.75 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ และเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนข้อและส่วนยอดอ่อน สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ และอาหารสูตรที่สามารถชักนำส่วนข้อของหญ้าไนล์ให้เกิดยอดได้มากที่สุด คือ อาหารสูตร LS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 5.4 ยอดต่อข้อ ส่วนการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยนั้นพบว่า เซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเหลวสูตร LS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลฟา-คีโตกลูตาริก ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีการเจริญเติบโตสูงสุดหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15-18 วัน และสามารถชักนำเซลล์แขวนลอยให้พัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์

ส่วนการศึกษาผลของพีอีจี ต่อการพัฒนาของเซลล์แขวนลอยนั้นพบว่าความเข้มข้นของพีอีจีที่ทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์แขวนลอยลดลง 50% (LD_{50}) มีค่าเท่ากับ 6.13 โดยความเข้มข้นสูงสุดที่เซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์สามารถพัฒนาเป็นต้นได้คือพีอีจี 8 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นเท่ากับ 12.21 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองนี้สามารถคัดเลือกเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์ที่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้บนอาหารที่ประกอบด้วยสารในกลุ่มออสโมติก คือ พีอีจี เพื่อชักนำให้เกิดสภาวะแล้ง เซลล์แขวนลอยที่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ คาดว่าน่าจะเป็นต้นที่สามารถทนต่อสภาวะแล้งได้มากกว่าสายพันธุ์เดิม แต่ถ้ามีการศึกษาเพิ่มเติม เช่นการนำต้นที่คัดเลือกได้ มาทดสอบภายใต้สภาวะแล้งเทียบกับต้นควบคุม แล้วทำการวัดค่าต่างๆ เช่น ปริมาณโพรลีน คลอโรฟิลล์ หรือปริมาณน้ำที่สะสมในพืช หรือทำการคัดเลือกในสภาพธรรมชาติต่อไป จะทำให้ช่วยคัดเลือกต้นที่สามารถทนต่อสภาวะแล้งได้

ส่วนการศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการพัฒนาของเซลล์แขวนลอยนั้นพบว่าปริมาณรังสีที่ทำให้เซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์ตายเป็นจำนวน 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) มีค่าเท่ากับ 78.04 เกรย์ โดยที่ความสูงเฉลี่ยของต้น และขนาดของใบของหญ้าไนล์ ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ได้รับการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่าง ๆ (M_1V_3) จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยความสูงของต้นและขนาดของใบ จะมีแนวโน้มลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น และสามารถคัดเลือกโคลนที่คาดว่าน่าจะเกิดการกลายพันธุ์ได้ 9 โคลน ได้แก่โคลนที่ 0405 0407 0608 0612 0613 0614 0615 0807 และ 1004 ซึ่งบางโคลนมีลักษณะที่น่าจะเหมาะสมในการใช้ประโยชน์เป็นอาหารสัตว์ ในด้านการทำหญ้าแห้ง เพราะมีลักษณะขนาดลำต้นเล็กสามารถทำแห้งได้ง่าย แต่ถ้ามีการศึกษาเพิ่มเติมเช่น นำไปทดสอบผลผลิตในแปลงปลูก หรือนำไปตรวจสอบคุณค่าทางโภชนะของอาหารสัตว์ เช่น ค่า CP (crud protein), NDF (neutral detergent fiber), DMD (dry matter digestibility) จะทำให้สามารถคัดเลือกหญ้าอาหารสัตว์ที่มีคุณภาพที่ดีมากขึ้นได้ และจากการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีของหญ้าไนล์ ที่คาดว่าน่าจะเกิดการกลายพันธุ์จำนวน 9 โคลน โดยใช้ไพร์เมอร์จำนวน 10 ชนิด พบว่ามีไพร์เมอร์จำนวน 8 ชนิด ที่สามารถจำแนกความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างต้นตัวอย่างจำนวน 9 โคลน กับต้นที่เป็นต้นควบคุมได้ โดยไพร์เมอร์ที่สามารถจำแนกความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นระหว่างต้นควบคุมกับต้นตัวอย่าง ได้มากที่สุดคือ ไพร์เมอร์ OPA-04 OPA-06 และ OPA-10 สามารถจำแนกได้ถึง 6 ตัวอย่าง โดยพบทั้งแถบดีเอ็นเอที่มีการขาดหายไป หรือเพิ่มขึ้นมา และพบว่าโคลนที่ 0405 0807 และ 1004 มีไพร์เมอร์ที่สามารถจำแนกความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นระหว่างต้นควบคุม ได้มากที่สุดคือ 6 ไพร์เมอร์ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า รังสีแกมมาสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าไนล์ผ่านทางเซลล์แขวนลอยได้ ซึ่งสามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ได้จากลักษณะที่แสดงออกมาทางฟีโนไทป์ และยืนยันกลายพันธุ์ในระดับโมเลกุลได้โดยการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ซึ่งสามารถที่จะนำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการฉายรังสีแกมมานี้มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์หญ้าไนล์ต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

กรมปศุสัตว์, 2550. ข้อมูลสถิติปศุสัตว์ 2550
[Online]. Available: http://www.dld.go.th/ict/yearly/yearly50/stock50.html

กรมปศุสัตว์, 2549. สถิติพื้นที่ปลูกหญ้า / พืชอาหารสัตว์และทุ่งหญ้าสาธารณะ
[Online]. Available: http://www.dld.go.th/nutrition/data_stat/data_stat.html

กมลพรรณ นามวงศ์พรหม มาลี ณ นคร วงจันทร์ วงศ์แก้ว และวีระชัย ณนคร. 2535. "การขยายท่อนพันธุ์แฝกหอมในหลอดทดลอง." น. 725-729. **ในรายงานการประชุมวิชาการครั้งที่ 30.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จันทกานต์ อรณนันท์. 2544. "การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าเนเปียร์แคระโดยรังสีแกมมากับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ." วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดิริฎา มานะวิบูรย์. 2545. "การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้ารูซี่โดยรังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ." วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ตีรณา อุทุมพฤกษ์. 2551. "การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าแพงโกล่าโดยรังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ." วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธนภักษ์ อินยอด. 2545. "การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าอะตราตรัมโดยรังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ." วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2546. **พันธุศาสตร์**. ภาควิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 317 น.

ประภา ศรีพิจิตต์. 2538. "การคัดเลือกพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) ทนทานต่อสภาพแล้งโดยใช้สารเคมี polyethylene glycol." **ว.วิชาการเกษตร** 13(2) : 117-124.

รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ : หลักการและเทคนิค.** ภาควิชาพืชไร่นา, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิภาสิริ ทิวสมบูรณ์. 2546. "การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าซิกแนลนอนโดยรังสีแกมม่าร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ." วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 75 น.

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2536. **พันธุศาสตร์**. เจ้าพระยาระบบการพิมพ์. กรุงเทพฯ. 640 น.

สุมล นิลรัตน์นิศากร. 2546. "ผลของรังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีต่อการเจริญเติบโตของหญ้ากินนีสีม่วง." วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2536. **การกลายพันธุ์ของพืช**. ห้างหุ้นส่วนจำกัดพันนี่พับลิชชิ่ง. 197 น

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2540. **การกลายพันธุ์ของพืช**. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 205 น.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2541. "การกลายพันธุ์และความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับรังสีและสารเคมีก่อกลายพันธุ์." หน้า 73-90. **ใน การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยเทคนิคการกลายพันธุ์**. ศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีและเอเอฟแอลพี.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2550. **เทคโนโลยีชีวภาพของพืช**. วี.เจ.พริ้นติ้ง. กรุงเทพฯ. 159 น.

อมรา คัมภิรานนท์. 2540. **พันธุศาสตร์ของเซลล์**. มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์. กรุงเทพฯ.

อรดี สหวัชรินทร์. 2539. **เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์. 2530. **วิธีปรับปรุงพันธุ์โดยการกลายพันธุ์**. เอกสารคำสอน. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์. 2541. "หลักการและวิธีการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีในพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยรังสีในพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด." น. 97-111. **ใน การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคการกลายพันธุ์**. ศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

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

Akashi, R and K. Osamu. 1998. "Detection of somaclonal variation using RAPD analysis in plants regenerate from suspension culture." **Grassland Science.** 44(3) : 203-207.

Arabi, M.I.E., B. Al-Safadi, M. Jawhar and N. Mir-Ali. 2005. "Enhancement of embryogenesis and plant regeneration from barley anther culture by low doses of gamma irradiation." **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.** 41 : 762-764.

Asano, Y., H. Katsumoto, D. Inokuma, S. Kaneko, Y. Ito and 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.

Ashok, C and Q. Rongda. 2000. "Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf- type bermudagrass: Effect of 6-benzyladenine in callus induction medium." **Plant Cell. Tiss Organ Cult.** 60 : 113-120.

Behrend, J and 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.

Bressan, R., A. Hasegawa and P.M. Handa. 1981. "Resistance of cultured higher plant cells to polyethylene glycol-induced water stress." **Plant Sci. Lett.** 21 : 23-30.

Chen, C.S., S.M. Wang and Y.K. Cheng. 1997. "Morphological and RAPD variations of regenerant derived from cell suspension culture of pangolagrass." p. 15-16. International Grass Congress. Saskachewan, Wininpeg, Manitoba and Saskatoon.

Dhandapani, M., S.B. Hong, C.R. Aswath and D.H. Kim. 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.

Dodds, J.H and L.W. Roberts. 1995. **Experiment in plant Tissue Culture**. Cambridge University Press, Cambridge.

Dutta, G.S and B.V. Conger. 1999. "Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of switchgrass." **Crop Sci.** 39 : 243-247.

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.

Feung, C.S., R.O. Mumma And R.H. Hamilton. 1974. "Metabolism of 2,4-D dichlorophenoxy-acetic acid in several tissue cultures." **Plant Physiol.** 53 : 41.

Galovic, V., Z. Kotaranin and S. Dencic. 2005. "*In vitro* assessment of wheat tolerance to drought." **Gentika.** 37 : 165-171.

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

Gibbs Russell, G.E., L. Watson, M. Koekemoer, L. Smook, N.P. Barker, H.M. Anderson and M.J. Dallwitz. 1990. "Grasses of Southern Africa.' Memoirs of the Botanical Survey of South Africa." **Botanical Research Institute.**

Grattapaglia, D and R. Sederoff. 1994. "Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers." **Genetics.** 137 : 1121-1137.

IAEA. 1997. **Manual on Mutation Breeding**. Technical Reports Series No. 119. Second Edition. IAEA, Vienna. 288 p.

Jain, S.M., D.S. Brar and B.S. Ahloowalia. 1998. **Somaclonal Variation and Induced Mutaions in Crop Improvement**. Kluwer Academic Publishers. London.

Jeng, B.L., L. Mei-Chu, C. Shyh-Rong and F.H.H. Su. 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.

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

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

Lu, S., Z. Wang, X. Peng, Z. Guo, G. Zhang and L. Han. 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.

Lu, S., Z. Wang, Y. Niu, Y. Chen, H. Chen, Z. Fan, J. Lin, K. Yan, Z. Guo and Li, H. 2009. "Gamma-ray radiation induced dwarf mutants of turf-type bermudagrass." **Plant Breeding.** 128 : 205-209.

Micke, A., B. Donani and M. Maluszynski. 1990. Induced mutations for crop improvement. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, International Atomic Energy Agency, Vienna.

Muhammad, S.A., F.J. Ahmad and A. Muhammad. 2007. "Iso-osmotic effect of NaCl and PEG on growth, cations and free proline accumulation in callus tissue of two indica rice (*Oryza sativa* L.) genotypes." **Plant Growth Regul.** 53 : 53-63

Murashige, T and F. Skoog 1962. "A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures." **Physiol. Plant.** 15 : 473-497.

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

Ousama, M., F. Zaghmout and A.T. William. 1990. "Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic suspension culture of perennial ryegrass." **In Vitro Cell. Dev. Biol.** 26 : 491-424.

Pandey, K.N., P.S. Saharwal and T.R. Kemp. 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. Y. Matsuda and T. Murata. 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., Y. Matsuda, T. Inoue, T. Shigeyasu and T. Murata. 2004. "Optimization of callus induction and plant regeneration from seed explants of *Zoysia* sp." **J. Jpn Soc. Turfgrass Sci.** 31 : 3-10.

Poeaim, A., N. Sangduen, S. Pongchareankit, W. Boonmee and W. Kaewbunsong. 1995. "Growth curve of KHAO-DAWK-MALI 105 rice (*Oryza sativa* L.) Suspension Culture." p 204. **International Conference on Biotechnology Research and Application for Sustainable in Development**. Bangkok : Chulabhorn Research Institute, (BRASD)

Potrykus, I. 1991. "Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results." **Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 42 : 205-225.

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.

Rhind, J.M.L.C and D.C.W. Goodenough. 1979. *Acroceras macrum* Stapf (Nile grass): a review. **Proceedings of the Grassland Society of South Africa**. 14 : 27-36.

Ross, J.J., I.C. Murfet and J.B. Reid. 1997 "Gibberellin mutants." **Physiol. Plant.** 100, 550-560.

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.

Shivashilanker, G. D.M. Mahishi and R.S. Kulkarni. 1988. "A non-flowering green panic grass (*Panicum maximum* var. trichoglume) obtained through gamma irradiation." **Mut Bred. News.** 32 : 9-10.

Spangenberg, G., Z.Y. Wang and Potrykus. 1998. **Biotechnology in Forage and Turf Grasses Improvement.** In: Biotechnology in Forage and Turf Grasses Inprovement.Springer-Verlag. Berlin,Heidelberg, New York p.1-5

Sultana, R., F. Tahira, H. Tayyab, B. Khurram and R. Shiekh. 2005. "RAPD Characterization of Somaclonal variation in indica basmati rice." **Pak. J. Bot.** 37(2) : 249-262.

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

Terakawa, T., T. Sato and M. Koike. 1992. "Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic suspension cultures of creeping bentgrass *(Agrostis palustris* Huds.)" **Plant Cell Reports.** 11 : 457-461.

Vasil, I.K. 1983. "Toward the development of a single cell system for grasses." p.131-144. *In* proc. On Cell Tissue Culture Techniques for Cereal Crop. Improvement. Science Press, Beijing, China.

Vasil, I.K. 1987. "Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops." **J. Plant Physiol.** 128 : 193-218.

Venkatachalum, P and N. jayabalan. 1999. "Indirect somatic embryogenesis and plantlet regeneration in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) throught cell culture." **J. Trop. Agr.** 37 : 5-11.

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.

Wang, Y.P., Q.C. Liu, A.X. Li, H. Zhai, S.S. Zhang and B.I. Liu. 2003. "*In vitro* selection of drought-tolerant mutants in sweetpotato." **Agri. Sci. China.** 2 : 1314-1320.

Welsh, J and M. McClelland. 1990. "Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primer." **Nucl. Acids Res.** 18 : 7213-7218.

Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers." **Nucl. Acids Res.** 18 : 6231-6235.

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

Zhang, S., H. Wayne and O.A. Peggy. 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.

[Online]. Available: http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Acroceras_macrum.htm

[Online]. Available: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/b/be/Ehrharta_erecta.jpg

ภาคผนวก ก

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร LS (Linsmaier และ Skoog 1965)

ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มก/ล.)
ammonium nitrate	NH_4NO_3	1,690
potassium nitrate	KNO_3	1,900
calcium chloride	$CaCl_2.2H_2O$	440
magnesium sulfate	$MgSO_4.7H_2O$	370
potassium dihydrogen - phosphate	KH_2PO_4	170
boric acid	H_3BO_3	6.2
manganese sulfate	$MnSO_4.4H_2O$	22.3
zinc sulfate	$ZnSO_4.4H_2O$	8.6
potassium iodide	KI	0.83
sodium molypdate	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
cupper sulfate	$CuSO_4.5H_2O$	0.025
cobalt chloride	$CoCl_2.6H_2O$	0.025
EDTA Disodium Salt	Na_2EDTA	37.3
Iron sulfate	$FeSO_4.7H_2O$	27.8
myo-inositol	$C_6H_{12}O_6$	100
thiamine-HCl (vitamin B_1)	$C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS$	0.4

ภาคผนวก ข

1. การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด DNeasy Plant Mini Kit (*Qiagen*)

1.1 นำตัวอย่างประมาณ 2 กรัม แล้วตัดเป็นชิ้นเล็กๆ บดในไนโตรเจนเหลวให้เป็นผลละเอียด

1.2 นำตัวอย่างที่บดแล้วใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรเติมสารละลายบัฟเฟอร์ AP1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และสารละลาย RNase ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการ vortex จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยทำการกลับหลอดไปมาเบาๆ ทุก 2-3 นาทีเพื่อให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

1.3 เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AP2 ปริมาตร 130 ไมโครลิตร และนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายที่ได้ลงในคอลัมน์สีม่วง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

1.4 ดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรและเติมสารละลายบัฟเฟอร์ AP3/E ปริมาตร 675 ไมโครลิตร ดูดสารละลายที่ผสมแล้วปริมาตร 650 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์สีขาวนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทำซ้ำอีกครั้ง)

1.5 จากนั้นย้ายคอลัมน์สีขาว ใส่ลงในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตรที่มาพร้อมกับชุดสกัดดีเอ็นเอ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AW ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AW ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงไปอีกครั้ง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

1.6 ย้ายคอลัมน์ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำคอลัมน์ที่สวมอยู่กับหลอดทดลองออก ส่วนใสที่อยู่ในหลอดคือสารละลายจีโนมิคดีเอ็นเอ (genomic DNA)

1.7 นำไปตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ และควรเก็บรักษาสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส หรือ –20 องศาเซลเซียส

2. การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

2.1 การวิเคราะห์สารละลายดีเอ็นเอ

การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ spectrophotometer วิธีนี้ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอและวัดปริมาณดีเอ็นเอ โดยนำสารละลายดีเอ็นเอมาทำการ

เจือจาง 100 เท่า (dilution factor เท่ากับ 100) ด้วยการดูดน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 495 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไปผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่นแสง 260 และ 280 นาโนเมตร โดยอัตราส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ถ้าค่า OD260/OD280 อยู่ระหว่าง 1.7-1.8แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นเกลียวคู่บริสุทธิ์แต่ถ้าอัตราส่วนสูงกว่า 1.8 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอเจือปน

นำค่า OD ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร มาใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ จากค่ามาตรฐาน ถ้าวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 1 แสดงว่า มีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสามารถคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอได้จากสูตร

ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (μg/ml) = OD260 x 50 μg/ml x dilution factor

2.2 การแยกขนาดดีเอ็นเอและตรวจสอบดีเอ็นเอ

เตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในสารละลาย 1X TBE buffer วางลงบนเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า เทสารละลาย 1X TBE buffer ให้ท่วมผิวหน้าอะกาโรสเจล แล้วจึงดูดสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อม 1 ไมโครลิตร และน้ำปราศจากไอออน 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงหยอดลงในหลุมอะกาโรสเจล เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ปล่อยกระแสไฟฟ้าจากขั้วลบไปบวก โดยใช้ความต่างศักย์ (voltage) คงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที หรือจนกระทั่งสังเกตเห็นสีย้อมเคลื่อนที่ไปประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของความยาวของเจล นำอะกาโรสเจลไปแช่ในสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นล้างสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ออกโดยการนำอะกาโรสเจลโดยแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 20-30 นาที ตรวจสอบการเรืองแสงของดีเอ็นเอภายใต้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต และบันทึกผลเป็นภาพถ่าย

ภาคผนวก ค

ตารางผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ผลของ BA ต่อการเกิดยอดจำนวนมากจากส่วนข้อของหญ้าไนล์หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ลักษณะที่วิเคราะห์	SV.	SS	DF	MS	F	Sig.
จำนวนยอดต่อข้อ	Between Groups	22.213	3	7.404	24.959*	.000
	Within Groups	2.373	8	.297		
	Total	24.587	11			
ความยาวยอดเฉลี่ย	Between Groups	30.391	3	10.130	55.492*	.000
	Within Groups	1.460	8	.183		
	Total	31.852	11			
จำนวนรากต่อข้อ	Between Groups	6.543	3	2.181	21.108*	.000
	Within Groups	.827	8	.103		
	Total	7.370	11			
ความยาวรากเฉลี่ย	Between Groups	26.993	3	8.998	338.687*	.000
	Within Groups	.213	8	.027		
	Total	27.206	11			

หมายเหตุ * = มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ผลการเกิดแคลลัสและเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อ หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ลักษณะที่วิเคราะห์	SV.	SS	DF	MS	F	Sig.
การเกิดแคลลัส	Between Groups	850.000	3	283.333	5.440*	.014
	Within Groups	625.000	12	52.083		
	Total	1475.000	15			
การเกิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส	Between Groups	1731.250	3	577.083	22.160*	.000
	Within Groups	312.500	12	26.042		
	Total	2043.750	15			

หมายเหตุ * = มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ผลการเกิดแคลลัสและเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงส่วนยอดอ่อน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ลักษณะที่วิเคราะห์	SV.	SS	DF	MS	F	Sig.
การเกิดแคลลัส	Between Groups	767.188	3	255.729	8.049*	.003
	Within Groups	381.250	12	31.771		
	Total	1148.438	15			
การเกิดเอ็มบริโอจีนิคแคลลัส	Between Groups	304.688	3	101.562	3.679*	.044
	Within Groups	331.250	12	27.604		
	Total	635.938	15			

หมายเหตุ * = มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ผลของ BA ต่อการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนยอดอ่อนเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

SV.	SS	DF	MS	F	Sig.
Between Groups	2083.333	3	694.444	4.167*	.047
Within Groups	1333.333	8	166.667		
Total	3416.667	11			

หมายเหตุ * = มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ผลของ BA ต่อการพัฒนาเป็นต้นของเซลล์แขวนลอยหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

SV.	SS	DF	MS	F	Sig.
Between Groups	1171.838	3	390.613	83.193*	.000
Within Groups	37.562	8	4.695		
Total	1209.400	11			

หมายเหตุ * = มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ผลของพีอีจี ต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด และการพัฒนาเป็นต้นของเซลล์แขวนลอยหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม พีอีจีความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 20 สัปดาห์

ลักษณะที่วิเคราะห์	SV.	SS	DF	MS	F	Sig.
อัตราการอยู่รอด	Between Groups	30900.791	5	6180.158	476.687*	.000
	Within Groups	155.578	12	12.965		
	Total	31056.369	17			
การพัฒนาเป็นต้นใหม่	Between Groups	14498.862	5	2899.772	134.291*	.000
	Within Groups	259.119	12	21.593		
	Total	14757.980	17			

หมายเหตุ * = มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางผนวกที่ 7 ผลของรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดและการพัฒนาเป็นต้นของเซลล์แขวนลอย หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 20 สัปดาห์

ลักษณะที่วิเคราะห์	SV.	SS	DF	MS	F	Sig.
อัตราการอยู่รอด	Between Groups	7107.706	5	1421.541	43.447*	.000
	Within Groups	392.630	12	32.719		
	Total	7500.336	17			
การพัฒนาเป็นต้นใหม่	Between Groups	3235.315	5	647.063	19.777*	.000
	Within Groups	392.608	12	32.717		
	Total	3627.922	17			

หมายเหตุ * = มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางผนวกที่ 8 ผลของรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ ต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหญ้าไนล์ (M_1V_3) ที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสี หลังการย้ายปลูก 45 วัน

ลักษณะที่วิเคราะห์	SV.	SS	DF	MS	F	Sig.
ความสูงของต้น	Between Groups	947.674	5	189.535	5.446*	.000
	Within Groups	2923.675	84	34.806		
	Total	3871.349	89			
ความยาวของใบ	Between Groups	80.819	5	16.164	5.137*	.000
	Within Groups	264.331	84	3.147		
	Total	345.151	89			
ความกว้างของใบ	Between Groups	.023	5	.005	2.963*	.016
	Within Groups	.131	84	.002		
	Total	.154	89			
ขนาดของลำต้น	Between Groups	.028	5	.006	.779^{ns}	.567
	Within Groups	.610	84	.007		
	Total	.639	89			

หมายเหตุ * = มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$)

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางผนวกที่ 9 ค่าเฉลี่ยความสูง ขนาดของใบ และขนาดของลำต้นของหญ้าไนล์ (M_1V_3) ที่คัดเลือกมา จำนวน 9 โคลน ที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นควบคุม หลังการย้ายปลูก 45 วัน

ลักษณะที่วิเคราะห์	SV.	SS	DF	MS	F	Sig.
ความสูงของต้น	Between Groups	4214.603	9	468.289	13.273*	.000
	Within Groups	3175.425	90	35.282		
	Total	7390.028	99			
ความยาวของใบ	Between Groups	733.911	17	43.171	17.643*	.000
	Within Groups	396.400	162	2.447		
	Total	1130.311	179			
ความกว้างของใบ	Between Groups	.539	17	.032	19.177*	.000
	Within Groups	.268	162	.002		
	Total	.806	179			
ขนาดของลำต้น	Between Groups	.025	9	.003	12.782*	.000
	Within Groups	.019	90	.000		
	Total	.044	99			

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นายศรัณย์ สุขวัฒน์
วันเดือนปีเกิด	27 ตุลาคม 2526
ที่อยู่	4 หมู่ 1 ต. คลองสวน อ.บางบ่อ จ.สมุทรปราการ 10560
ประวัติการศึกษา	ปี 2548 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปี 2552 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานวิจัยที่ได้รับรางวัล	รางวัลชมเชย ในการเสนอผลงานภาคโปสเตอร์ การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 7 เรื่อง "Plant regeneration from suspension culture of Nilegrass (*Acroceras macrum*)"