การชักนำความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้กับว่านชักมดลูก โดยวิธีเพิ่มชุดโครโมโซมและก่อกลายพันธุ์

Induction of Genetic Variation in *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. by Chromosome Doubling and Mutagenesis

จุรีภรณ์ ศรีใหม่[1,2] เสริมศิริ จันทร์เปรม[1,2,3] และ สนธิชัย จันทร์เปรม[1,2,4*]

Abstract

Induction of genetic variation in *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. was carried out by acute irradiation and colchicine treatment. *C. xanthorrhiza* Roxb. was cultured *in vitro* on solid MS medium supplemented with 5 mg/l BA. The cultures were subjected to acute irradiated with gamma rays(1351.19 rad/min) 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 or 8 krad. It was found that $LD_{50(60)}$ was 5.13 krad. The irradiated plants were then transferred to pots. From 3 krad irradiation, the color of leaf sheath of 2 plants turned from green to red color. The culture were also treated with 0 0.1 or 0.2 % colchicine for 24 or 48 hr. It was found that the average number of stomata per unit area were 8.56, 7.00, 6.56, 6.56 and 6.56 for 0, 0.1 or 0.2 % colchicine for 24 hr and 0.1 or 0.2 % colchicine for 48 hr, respectively. The stomatal size of colchicine treated plants was also larger than the normal plant. Then, when to make nuclear content by flow cytometry technique it was found diploid and mixoploid plant.

To determine genetic variation induced by irradiation and colchicine treatment, AFLP technique with 10 primer pairs was applied. The total of 122 DNA bands were applified. The most polymorphic of 29 DNA bands were received from 2 krad-plant. The least polymorphic of 12 DNA bands were received from 6 krad-plant. Whereas the plants treated with colchicine showed no polymorphism. It is indicated that colchicine treatment can induce genetic variation in *C. xanthorrhiza.* Whereas colchicines treatment could not create nucleotide substitution.

Keywords : gamma irradiation, colchicine, polymorphic, flow cytometer

---

[1]ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom, 73140

[2]ศูนย์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

Center for Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

[3]ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Sean, Kasetsart University Kamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

[4]ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Sean, Kasetsart University Kamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

รับเรื่อง : กุมภาพันธ์ 2554

Corresponding author : agrstc@ku.ac.th

บทคัดย่อ

ว่านชักมดลูกได้ถูกนำมาชักนำให้เกิดการความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยการฉายรังสีและการใช้สารโคลชิซิน โดยนำต้นว่านชักมดลูกที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสี 0 1 2 3 4 5 6 7 หรือ 8 กิโลแรด (1,351 แรดต่อนาที) พบว่าปริมาณรังสี 5.13 กิโลแรด ทำให้ต้นว่านชักมดลูกตาย 50% หลังได้รับการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน 60 วัน เมื่อนำต้นว่านชักมดลูกออกปลูกในกระถางพบว่า กาบใบของต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับรังสี 3 krad เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีแดงจำนวน 2 ต้น ส่วนต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0, 0.1% หรือ 0.2% นาน 24 ชั่วโมง หรือ 48 ชั่วโมง มีจำนวนปากใบเฉลี่ยเท่ากับ 8.56, 7.00, 6.56, 6.56 หรือ 6.56 ต่อหน่วยพื้นที่ตามลำดับ และต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับโคลชิซินยังมีขนาดของปากใบใหญ่ขึ้น เมื่อนำต้นว่านชักมดลูกเหล่านี้ไปตรวจปริมาณดีเอ็นเอ (พิโคกรัม) โดยเครื่อง flow cytometer พบว่า มีทั้งต้นที่เป็นดิพพลอยด์ และต้นที่เป็น mixoploid คือต้นที่เป็นทั้งดิพพลอยด์และเตตราพลอยด์ในต้นเดียวกัน

การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับการฉายรังสีด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 คู่ไพรเมอร์พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนทั้งหมด 122 แถบ ซึ่งต้นที่ได้รับรังสี 2 กิโลแรด ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลีมอร์ฟิซึมมากที่สุด คือ 29 แถบ ส่วนต้นที่ได้รับ 6 กิโลแรด ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลีมอร์ฟิซึมน้อยที่สุด คือ 12 แถบ ส่วนต้นที่ได้รับสารโคลชิซินไม่พบแถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลีมอร์ฟิซึม แสดงว่าต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น ส่วนต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับสารโคลชิซินไม่ทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม

คำนำ

ว่านชักมดลูก (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีสรรพคุณทางยา ทำให้ประจำเดือนมาปกติ ขับประจำเดือนในกรณีที่ประจำเดือนมาไม่ปกติ แก้ปวดมดลูก แก้ไส้เลื่อน ขับเลือด ขับลม ขับน้ำคาวปลา แก้โรคลม กระบังลมเคลื่อน รักษาอาการอาหารไม่ย่อย (Chaipromwongsa, 2544) ว่านชักมดลูกมีสารสำคัญหลายกลุ่ม เช่น สารในกลุ่ม curcuminoids, diarylheptanoids, sesquiterpenes เป็นต้น โดยมีฤทธิ์ทางเภสัช คือ ต้านการอักเสบ ต้านเชื้อแบคทีเรีย แก้ไข้ ต้านอนุมูลอิสระ (Subhadhirasakul and Wattanapiromsakul, 2546)

ว่านชักมดลูกเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาและเป็นวัตถุดิบที่สำคัญส่วนหนึ่ง ในการผลิตยาทางการแพทย์แผนไทย และนิยมใช้อยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย การปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มคุณภาพและปริมาณสารที่มีฤทธิ์ทางยาให้มากขึ้นจึงเป็นสิ่งจำเป็นแต่ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของว่านชักมดลูกมีน้อย เนื่องจากมีการขยายพันธุ์ด้วยหัวใต้ดิน ดังนั้นการใช้วิธีก่อกลายพันธุ์และการเพิ่มชุดโครโมโซม จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่มีโอกาสประสบความสำเร็จ ดังเช่นการก่อกลายพันธุ์ในแก้วมังกร โดยใช้รังสีแกมมาทำให้ปริมาณ แคโรทีนอยด์ วิตามินซี และ ฟีนอลทั้งหมด เพิ่มมากขึ้น (Kerdchoechuen *et al*., 2550) และในฟ้าทะลายโจร พบว่าเมื่อแช่ส่วนยอดของฟ้าทะลายโจรในสารโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.2% เป็นเวลา 16 ชั่วโมงทำให้ปริมาณสาร andrographolide ในใบและลำต้นเพิ่มขึ้น (Rojanasiriwongse, 2543)

การทดลองนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม โดยใช้สารโคลชิซินและการก่อกลายพันธุ์โดยใช้รังสีในว่านชักมดลูก ที่มีต่อความแปรปรวนทางพันธุกรรม เพื่อใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ว่านชักมดลูก โดยเฉพาะการเพิ่มปริมาณสารสำคัญต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเพิ่มจำนวนว่านชักมดลูกในสภาพปลอดเชื้อ

ตัดแยกว่านชักมดลูกในสภาพปลอดเชื้อเป็นเหง้าเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS โดยใช้วิตามินของอาหารสูตร B5 ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเป็น 5.6-5.8 เพาะเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 1 เดือน

การฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันให้กับว่านชักมดลูกในสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นว่านชักมดลูกที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน ที่ปริมาณรังสี 0 1 2 3 4 5 6 7 หรือ 8 krad (1,351.19 แรดต่อนาที) แล้วจึงย้ายลงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS โดยใช้วิตามินของอาหารสูตร B5 ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จนครบ 6 สัปดาห์ จากนั้นตัดแยกแต่ละหน่อลงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อให้หน่อเจริญเติบโตเพิ่มขนาดขึ้น เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 1 เดือน บันทึกอัตราการรอดชีวิตเพื่อหาค่า LD_{50} การเจริญเติบโตและลักษณะผิดปกติต่าง ๆ

การเพิ่มชุดโครโมโซมโดยใช้โคลชิซิน

ตัดต้นว่านชักมดลูกออกเป็นต้นเดี่ยว ๆ ในสภาพปลอดเชื้อ ความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร แช่ในสารละลายโคลชิซินที่กรองเชื้อแล้วบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที เมื่อครบเวลาแล้วล้างท่อนพันธุ์ด้วยน้ำสะอาดที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเพิ่มจำนวน นาน 6 สัปดาห์ แล้วย้ายลงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรอีก 6 สัปดาห์ ก่อนย้ายปลูกลงกระถาง วางแผนการทดลองแบบ 3x2 Factorials in CRD มี 20 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 3 ระดับ คือ 0 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาในการแช่สาร 2 ระดับ คือ 24 และ 48 ชั่วโมง บันทึกอัตราการรอดชีวิต จำนวนยอด ความสูง อัตราการรอดชีวิตหลังย้ายปลูก จำนวนปากใบและปริมาณดีเอ็นเอ

การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม

สกัดดีเอ็นเอจากใบว่านชักมดลูกที่ได้รับการฉายรังสีและสารโคลชิซิน โดยวิธี CTAB (Aldrich and Cullis, 1993) วิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 คู่ คือ E-CGT/M-CTG, E-CTG/M-CAG, E-TAC/M-TAC, E-TCG/M-TGA, E-TAC/M-TGA, E-GCA/M-GTA, E-GCA/M-GTC, E-GCA/M-GTC, E-GCC/M-GTA, E-GTC/M-GCC (E หมายถึง *Eco*RI, M หมายถึง *Mse*I) และแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ polyacrylamide gel electrophoresis ใน 4.5% polyacrylamide gel และย้อมเจลด้วยวิธี silver staining

ผลและวิจารณ์

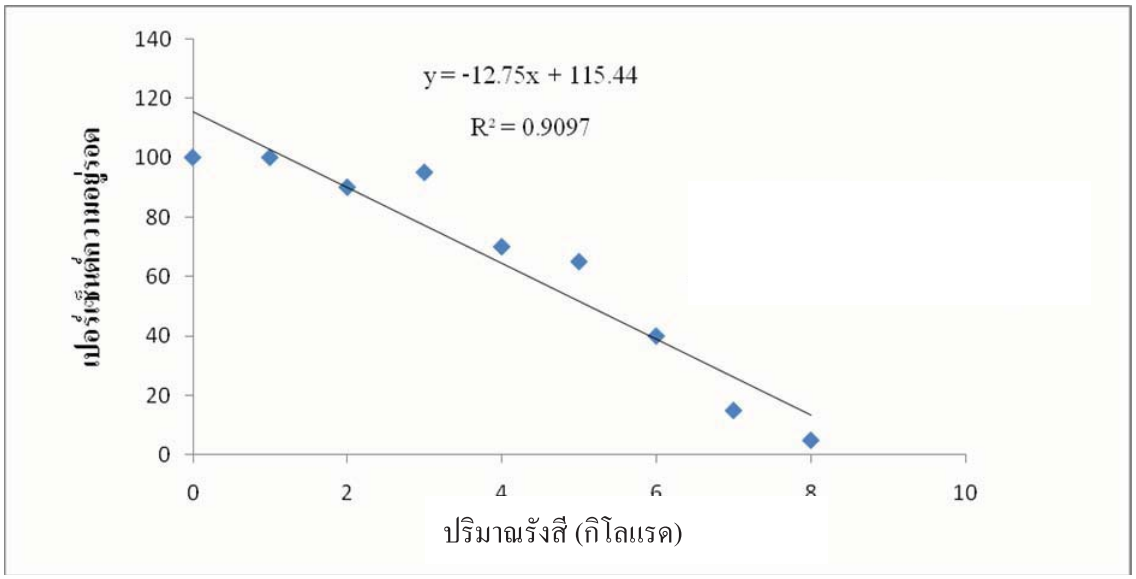
ผลของปริมาณรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน

หลังจากนำต้นว่านชักมดลูกมาฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน ในปริมาณต่าง ๆ คือ 0 1 2 3 4 5 6 7 หรือ 8 กิโลแรด และนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตรเพิ่มจำนวน พบว่า เมื่อปริมาณรังสีมากกว่า 1 กิโลแรด ทำให้ต้นว่านชักมดลูกจำนวนหนึ่งตายและเมื่อปริมาณรังสีมากกว่า 5 กิโลแรด ทำให้ต้นว่านชักมดลูกตายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณรังสีที่ 8 กิโลแรด ทำให้ต้นว่านชักมดลูกตายมากที่สุด (ตารางที่ 1)

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอด มาสร้างสมการถดถอยสามารถ ทำนายค่า $LD_{50(60)}$ ได้คือ 5.13 กิโลแรด (ภาพที่ 1) เมื่อต้นว่านชักมดลูกได้รับรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสี 0 1 2 3 4 5 6 7 หรือ 8 กิโลแรด แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า เมื่อต้นว่านชักมดลูกได้รับรังสีในปริมาณที่เพิ่มขึ้น ความสูง จำนวนใบ จำนวนหน่อ จำนวนรากและความยาวรากได้ลดลง ส่วนต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับรังสีปริมาณ 8 กิโลแรด แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ต้นว่านชักมดลูกจะตายในที่สุด

ตารางที่ 1 จำนวนต้นว่านชักมดลูกที่รอดชีวิตเมื่อได้รับรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 60 วัน หลังจากฉายรังสี

ปริมาณรังสี (กิโลแรด)	จำนวนต้นที่ใช้ในการทดลอง	จำนวนต้นที่รอดชีวิตทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอด
0	20	20	100
1	20	20	100
2	20	18	90
3	20	19	95
4	20	14	70
5	20	13	65
6	20	8	40
7	20	3	15
8	20	1	5



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรังสี (กิโลแรด) กับเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของต้นว่านชักมดลูกที่ ระยะเวลา 60 วัน หลังได้รับการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน

เมื่อย้ายต้นว่านชักมดลูกลงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับรังสี 0-4 กิโลแรด ยังคงมีการแตกหน่ออยู่ โดยมีหน่อใหม่ 1-2 หน่อต่อต้น ส่วนที่ได้รับรังสี 5-7 กิโลแรด นั้นบางต้นไม่มีการแตกหน่อใหม่เลย และมีใบน้อยกว่าปกติ เมื่อนำต้นว่านชักมดลูกออกปลูกในกระถาง พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นว่านชักมดลูกจะมีคล้ายคลึงกัน แต่ในต้นว่าน

ชักมดลูกบางต้นที่ได้รับรังสี 3 กิโลแรด สีของลำต้นเทียมเหนือดินเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีแดง เช่นเดียวกับกล็อกซิเนียที่ได้รับรังสีแกมมา 60 เกรย์ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงสีของลำต้นเป็นสีแดง (Kaensaksiri and Kosakul, 2549)

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้โคลชิซิน

เมื่อให้โคลชิซินแก่ว่านชักมดลูก ที่ความเข้มข้น 0.1 หรือ 0.2% นาน 24 หรือ 48 ชั่วโมง แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ต้นว่านชักมดลูกทั้งที่ไม่ได้รับและได้รับโคลชิซินมีการเจริญเติบโตได้ตามปกติ มีการแตกหน่อใหม่ 3-4 หน่อต่อต้น ความสูงเฉลี่ย 5-7 เซนติเมตร และต้นว่านชักมดลูกมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อย้ายต้นว่านชักมดลูกลงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ต้นว่านชักมดลูกยังคงมีการแตกหน่อโดยมีหน่อใหม่ 1-2 หน่อต่อต้น

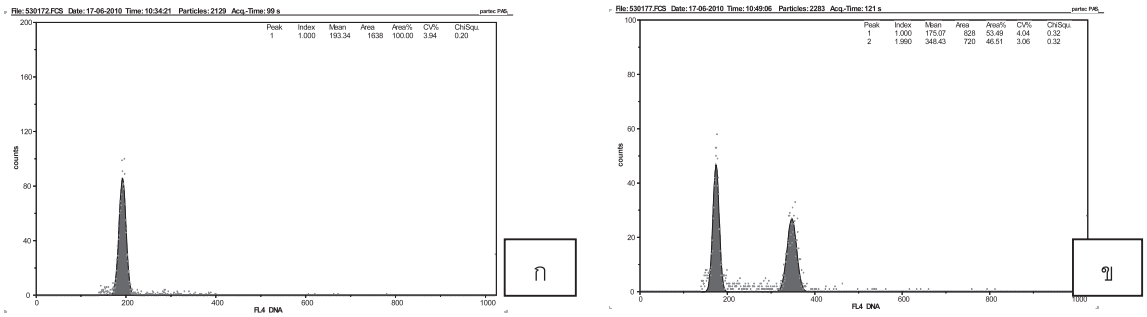
จากนั้น จึงย้ายต้นว่านชักมดลูกออกปลูกในกระถาง ดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นว่านชักมดลูก เลือกต้นที่มีลักษณะของใบที่หนา มีสีเข้มจากต้นปกติ จากนั้นนำไปนับจำนวนปากใบ บริเวณกลางใบของแต่ละต้น พบว่า ต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับโคลชิซินทั้งสองความเข้มข้นและสองระยะเวลามีจำนวนปากใบเฉลี่ยลดน้อยลง และจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ ของจำนวนปากใบ พบว่า ความเข้มข้นของโคลชิซินทำให้จำนวนปากใบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนระยะเวลาที่ว่านชักมดลูกได้รับสารโคลชิซิน และปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับระยะเวลาไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 2)

และเมื่อนำต้นว่านชักมดลูกเหล่านี้ ไปตรวจปริมาณดีเอ็นเอโดยเครื่อง flow cytometer พบว่า มีทั้งต้นที่เป็นดิพพลอยด์ และต้นที่เป็น mixoploid คือต้นที่เป็นทั้งดิพพลอยด์และเตตราพลอยด์ในต้นเดียวกัน (ภาพที่ 2) โดยต้นที่ได้รับโคลชิซินความเข้มข้น 0.1% นาน 48 ชั่วโมง จำนวนหนึ่งต้นเกิดเป็น mixoploid การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม จะมีผลสำเร็จต่อเมื่อเซลล์อยู่ในขั้นตอนของการแบ่งเซลล์ ประกอบกับการให้สารเคมีที่เหมาะสม เช่น ชนิดและความเข้มข้นของสาร การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้สารเคมีเป็นวิธีที่สะดวกในการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม และให้ผลสำเร็จสูงเนื่องจากเซลล์มีการแบ่งตัวตลอดเวลา โดยเฉพาะมีการผ่าหรือตัดให้เป็นแผล (Distabanjong *et al*., 2551) ดังนั้นการเกิด mixoploid (2N+4N) ในต้นว่านชักมดลูกอาจเกิดจากการให้โคลชิซินในหน่อของต้นว่านชักมดลูกซึ่งประกอบด้วยเซลล์เป็นจำนวนมาก ซึ่งแต่ละเซลล์อยู่ในระยะการแบ่งเซลล์ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 2 จำนวนปากใบเฉลี่ยของต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับโคลชิซิน 2 ระดับความเข้มข้น และ 2 ระยะเวลา

ความเข้มข้น (%)	เวลา (ชั่วโมง)		ค่าเฉลี่ย (ความเข้มข้น)
	24	48	
0	8.6	9.1	8.8 a [1/]
0.1	7	6.6	6.8 b
0.2	6.6	6.9	6.8 b
ค่าเฉลี่ยเวลา	7.4	7.5	
CV (%)	20.9		

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD



ภาพที่ 2 ปริมาณดีเอ็นเอของว่านชักมดลูกที่ตรวจสอบโดยใช้เครื่อง Flow cytometer ของต้นปกติ (ภาพ ก) และต้นที่ได้รับสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.1% นาน 48 ชั่วโมง (ภาพ ข)

ตารางที่ 3 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี

คู่ไพรเมอร์	แถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนแถบดีเอ็นเอเป็นโพลีมอร์ฟิซึมที่ปริมาณรังสี (กิโลแรด) ต่างๆ						
		1	2	3	4	5	6	7
CGT/CTG	16	3	1	1	2	4	1	1
CTG/CAG	22	1	4	3	3	1	2	1
TAC/TAC	6	1	5	1	3	2	1	1
TCG/TGA	12	2	3	3	2	1	2	2
TAC/TGA	10	1	4	2	1	1	1	1
GCA/GTA	9	1	2	4	3	0	1	1
GCA/GTC	5	2	2	2	3	2	1	1
GCC/GTA	18	0	3	2	3	0	1	1
GCA/GTC	11	2	2	4	4	4	1	2
GTC/GCC	13	2	3	0	2	5	1	2
รวม	122	15	29	22	26	20	12	13

การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับการฉายรังสีและโคลชิซิน

เพื่อตรวจสอบความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับรังสีและโคลชิซิน จึงตรวจสอบด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 คู่ไพรเมอร์ พบว่า ในต้นที่ได้รับรังสีเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนทั้งหมด 122 แถบ โดยต้นที่ได้รับรังสี 2 กิโลแรด ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลีมอร์ฟิซึมมากที่สุด คือ 29 แถบ ส่วนที่รังสี 6 Krad ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลีมอร์ฟิซึมน้อยที่สุด คือ 12 แถบ (ตารางที่ 3) การเกิดโพลีมอร์ฟิซึมไม่เกิดเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณรังสีสูงขึ้น อาจเนื่องมาจากต้นว่านชักมดลูกที่รอดชีวิตจากการได้รับรังสีมักเป็นต้นที่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมน้อย ส่วนต้นที่มีการเปลี่ยนแปลงไปมาก ๆ มักไม่มีชีวิตรอด ดังนั้นต้นที่รอดจึงเป็นต้นที่ค่อนข้างปกติ จึงเกิดโพลีมอร์ฟิซึมน้อย ประกอบกับจำนวนต้นรอดชีวิตลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณรังสี ส่วนต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับโคลชิซินเมื่อนำมาตรวจสอบโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี พบว่า ไม่เกิดโพลีมอร์ฟิซึม เพราะโคลชิซินมีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้างสายสปินเดิล (spindle fiber) ในระยะที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีส

ทำให้ไม่มีการดึงโครโมโซมให้แยกออกจากกันในระยะเมตาเฟส (metaphase) โครโมโซมจึงไม่เคลื่อนที่เข้าสู่ขั้วเซลล์ ทำให้มีจำนวนเพิ่มขึ้นอีกเท่าตัว (Campiranon, 2536; Lamseejan, 2536) แต่โคลชิซินไม่มีผลในการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส ทำให้เมื่อตรวจสอบความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมจึงไม่เกิดโพลีมอร์ฟิซึม แสดงว่าต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับการฉายรังสี มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม เกิดการเปลี่ยนแปลงเบสอันเนื่องมาจากรังสีแกมมา ในตำแหน่งที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ทำให้สามารถหรือไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ มีผลทำให้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้เปลี่ยนแปลงไป (Peyachokanagul, 2545 ; Kokotovic *et al.,* 1999) เช่นเดียวกับการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในต้นเจตมูลเพลิงแดง ที่เกิดจากแคลลัสและเซลล์แขวนลอยที่ได้รับสาร ethylmethanesulphonate เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 8 คู่ ที่สามารถตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นได้ โดยตรวจสอบการเกิดโพลีมอร์ฟิซึม (Choorattana, 2551)

สรุป

การให้รังสีแกมมาแบบเฉียบพลันกับต้นว่านชักมดลูกในสภาพปลอดเชื้อ มีผลทำให้ต้นว่านชักมดลูกตายเมื่อได้รับปริมาณรังสีมากกว่า 1 กิโลแรดขึ้นไป และจากสมการถดถอย สามารถทำนายได้ว่าปริมาณรังสี 5.13 กิโลแรด ทำให้ต้นว่านชักมดลูกตาย 50% หลังได้รับการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน เป็นระยะเวลา 60 วัน และปริมาณรังสี 3 กิโลแรด ทำให้ต้นว่านชักมดลูกบางต้นมีสีของลำต้นเทียมเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีแดง ส่วนการให้โคลชิซินแก่ว่านชักมดลูกที่ระดับความเข้มข้น 0.1 หรือ 0.2% นาน 24 หรือ 48 ชั่วโมง มีผลทำให้ต้นว่านชักมดลูกมีจำนวนปากใบเฉลี่ยลดน้อยลง เมื่อนำต้นว่านชักมดลูกเหล่านี้ไปตรวจปริมาณดีเอ็นเอโดยเครื่อง flow cytometer พบว่า มีทั้งต้นที่เป็นดิพพลอยด์ และต้นที่เป็น mixoploid คือต้นที่เป็นทั้งดิพพลอยด์และเตตราพลอยด์ในต้นเดียวกัน และเมื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นว่านชักมดลูก ที่ได้รับรังสีที่ปริมาณต่าง ๆ ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีโดยใช้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 คู่ไพรเมอร์ พบว่าทุกคู่ไพรเมอร์ทำให้เกิดโพลีมอร์ฟิซึมได้ในขณะที่ต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับโคลชิซินทั้ง 2 ความเข้มข้นและ 2 ระยะเวลาไม่เกิดโพลีมอร์ฟิซึม แสดงว่าต้นว่านชักมดลูกที่ได้รับการฉายรังสีมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

Aldrich, K.J. and C.A. Cullis. 1993. RAPD analysis in flax : optimization of yield and reproducibility using KlenTaq1 DNA polymerasy. Chelex 100 and gel purification of genomic DNA. **Plant Mol. Biol. Rep.** 11 : 128-141.

Campiranon, A. 2536. **Cytogenetics.** Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok. 322 p. (in Thai)

Chaipromwongsa, B. 2544. **Handbook of Curcuma**. Angtanationgnan phas publishing. Bangkok. 34 p. (in Thai)

Choorattana, S. 2551. **Mutation Induction of *Plumbago indica* L. and *P. zeylanica* L. by Tissue Culture and Mutagen**. M.S. Thesis, Kasetsart University. (in Thai)

Distabanjong, C., K. Distabanjong, B. Kaewrat and S. Supakasorn. 2551. Chromosome doubling in Torch Ginger, *Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith *via* tissue culture, pp. 154-190. *In* **Annual Report 2549-50**. Biotechnology Research and Development office, Department of Agriculture. (in Thai)

Kaensaksiri, T. and T. Kosakul. 2549. Effects of gamma radiation on gloxinia *Sinningia speciosa*. **Scientific Research J.** 5(1):13-23. (in Thai)

Kerdchoechuen, O., S. Photchanachai, N. Laohakunjit, A. Uthairatanakij, P. Jitareerat, V. Limophasmanee, S. Segsarnviriya, P. Pransopon and T. Kongratarporn. 2550. Effect of gamma radiation on carotenoids, vitamin C and total phenol in Dragon fruit. **Agr. Sci. J.** (38)(suppl.): 247-250. (in Thai)

Kokotovic, B., N.F. Friis, J.S. Jensen and P. Ahrens. 1999. Amplified frangment length polymorphism fingerprint of Mycoplasma species**. J. Clin. Microbiol.** 37 : 3300-3307.

Lamseejan, S. 2536. **Plant Mutation**. Department of Applied Radiation and Isotopes, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok. 197 p. (in Thai)

Peyachokanagul, S. 2545. **Genome and DNA Marker: A Laboratory in RAPD and AFLP.** Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok. 116p.(in Thai)

Rojanasiriwongse, W. 2543. To Increase Andrographolide by using Chemicals and *In Vitro* Culture of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall.ex Nees. *In* **Annual Report 2543**. Faculty of Engineering, Rangsit University. (in Thai)

Subhadhirasakul, S. and C. Wattanapiromsakul. 2546. ***Curcuma xanthorrhiza***. Available Source: http://pcog.pharmacy.psu.ac.th/thi/Article/Article2546.asp, 3 0ctober 2010. (in Thai)