การปรับปรุงพันธุ์โดยชักนำการกลายพันธุ์ในเบญจมาศโดยใช้รังสีแกมมา และการตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยวิธีเอเอฟแอลพี

Gamma Ray Induced Mutation in Chrysanthemum and Detection of DNA polymorphism by AFLP

พันทิพา ลิ้มสงวน[1] สนธิชัย จันทร์เปรม[1,2] อิทธิฤทธิ์ อึ้งวิเชียร[3] ปัทมา ศรีน้ำเงิน[4] และ เสริมศิริ จันทร์เปรม[1,5,*]

Pantipa Limsanguan[1], Sontichai Chanprame[1,2], Ittirit Ungvichian[3], Pattama Srinamnguen[4] and Sermsiri Chanprame[1,5,*]

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

[2] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[3] สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย คลองหลวง ปทุมธานี 12120

[4] คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี จันทบุรี 22170

[5] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสนนครปฐม 73140

[1] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University and Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG–BIO/PERDO–CHE), Bangkok 10900, Thailand

[2] Department of Agronomy , Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[3] Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand

[4] Faculty of Science and Arts, Burapha University, Chanthaburi Campus, Chanthaburi 22170, Thailand

[5] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University,Nakhon Pathom 73140, Thailand

รับเรื่อง: พฤศจิกายน 2559 Received: November 2016

รับตีพิมพ์: สิงหาคม 2560 Accepted: August 2017

* Corresponding author: agrsrc@ku.ac.th

ABSTRACT: The *in vitro* node explants of available commercial bicolor spray chrysanthemum cut flower cultivar (unknown cultivar's name) were acute irradiated with 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 Gy gamma ray. The irradiated nodes were then cultured on solid MS medium.The higher dose of gamma irradiation, the lower survival percentage obtained. The survival percentage of 5 and 10 Gy irradiated nodes were 100% while the lowest survival percentage of 3.3% obtained from 30 Gy. Therefore, the LD_{50} at 30 days after irradiation was 26 Gy. After transplanting in the grower farm, the normal growth and normal plant characters of all plantlets were observed. Change in flower color was observed in the dosages of 15, 20 and 25 Gy. The polymorphism also observed from AFLP using 10 primer pairs and as the irradiation dosage increased, the higher polymorphic bands observed. The dendrogram of the polymorphism revealed the separation of chrysanthemum between normal flowers and those color mutants.

Keywords: Chrysanthemum, mutation, gamma ray, AFLP

Agricultural Sci. J. (2017) Vol. 48(3): 334–345 ว. วิทย. กษ. (2560) 48(3): 334–345

บทคัดย่อ

จากการนำข้อในสภาพปลอดเชื้อของเบญจมาศพันธุ์การค้าชนิดตัดดอก ช่อแบบ spray ดอกแบบ 2 สี (จากตลาดค้าไม้ตัดดอก ไม่ทราบชื่อพันธุ์แน่ชัด) ไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสี 0, 5, 10, 15 20, 25 และ 30 เกรย์ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อให้ยอดพัฒนาบนอาหารสูตร MS พบว่า การฉายรังสีที่ปริมาณรังสีสูงขึ้นมีผลทำให้เบญจมาศตายมากขึ้น โดยเบญจมาศที่ฉายรังสี 5 และ 10 เกรย์ มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ปริมาณรังสี 30 เกรย์ มีอัตราการรอดชีวิต 3.3 เปอร์เซ็นต์ และพบว่ามีค่า LD_{50} ประมาณ 26 เกรย์ เมื่อนำต้นเบญจมาศที่รอดชีวิตออกปลูกในแปลงปลูกของเกษตรกร พบว่าต้นที่รอดชีวิตทุกต้นมีการเจริญเติบโตเป็นปกติและสามารถออกดอกได้ และพบว่าต้นเบญจมาศที่ได้รับรังสีปริมาณ 15, 20 และ 25 เกรย์ บางต้นมีการการกลายของสีดอก และเมื่อตรวจสอบต้นกลายด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 คู่ พบแถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลีมอร์ฟิซึมโดยมีแนวโน้มว่าเมื่อปริมาณรังสีสูงขึ้นมีผลให้เกิดโพลีมอร์ฟิซึมเพิ่มสูงขึ้นด้วยและจากการวิเคราะห์เดนโดแกรมพบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างเบญจมาศที่กลายพันธุ์และเบญจมาศที่ไม่กลายได้

คำสำคัญ: เบญจมาศ, การกลายพันธุ์, รังสีแกมมา, เอเอฟแอลพี

บทนำ

เบญจมาศ เป็นไม้ดอกในวงศ์ Compositae ที่ได้รับความนิยมแพร่หลายทั่วโลกมีปริมาณการผลิตและมูลค่าการจำหน่ายสูงมาก โดยเฉพาะประเทศเนเธอร์แลนด์ซึ่งเป็นทั้งผู้ผลิตและผู้ส่งออกรายใหญ่ของโลก สำหรับประเทศไทยมีสภาพภูมิอากาศที่สามารถปลูกเบญจมาศได้ดี โดยเฉพาะในเขตภูเขาสูงทางภาคเหนือ และมีแหล่งผลิตที่สามารถปลูกเบญจมาศพันธุ์ทนร้อนคือบริเวณ อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา ทั้งนี้การปลูกเบญจมาศให้ได้ผลดีจำเป็นต้องมีพันธุ์ที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่นั้น ๆ โดยเฉพาะพันธุ์ทนร้อน นอกจากนี้ผู้บริโภคไม้ดอกไม้ประดับนั้นมักมีความนิยมและความต้องการลักษณะที่แปลกใหม่อยู่ตลอดเวลา ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์เบญจมาศจึงจำเป็นที่จะต้องทำอย่างต่อเนื่อง ซึ่งนอกจากจะปรับปรุงพันธุ์ให้ตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคแล้ว ยังต้องมีการปรับปรุงพันธุ์เพื่อตอบสนองต่อสภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยเช่นกัน

อย่างไรก็ตาม เบญจมาศเป็นพืชที่มีความสามารถในการติดเมล็ดต่ำการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีผสมเกสรจึงประสบความสำเร็จน้อยมากและอาจใช้เวลานาน ดังนั้นจึงมีการนำเทคนิคการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เบญจมาศกันมาก โดยเทคนิคการก่อกลายพันธุ์ที่มีการนำมาใช้กันมากได้แก่ การใช้รังสีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยมีรายงานความสำเร็จหลายรายงาน ซึ่งอาจใช้วิธีการฉายรังสีกับท่อนพันธุ์ หรือฉายรังสีให้กับแคลลัส และนำไปชักนำให้เกิดต้นใหม่ (Mandal *et al*., 2000; Jain, 2005; Lee *et al*., 2008) ซึ่งมีรายงานว่าสามารถเพิ่มโอกาสของการกลายพันธุ์ให้มากขึ้น (Lamseejan *et al*., 2000) รังสีที่นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชคือรังสีแกมมา ซึ่งเป็นรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความถี่สูง ไม่มีมวล ไม่มีประจุ มีอำนาจในการทะลุทะลวงผ่านวัตถุได้สูง จัดอยู่ในกลุ่มของรังสีก่อไอออน (ionizing radiation) ที่สามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาในเซลล์และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้ รังสีแกมมามีกำเนิดมาจากการสลายตัวของนิวไคลด์กัมมันตรังสี แหล่งรังสีแกมมาที่นิยมใช้คือ โคบอลต์–60 และซีเซียม–137 (Kikuchi *et al*., 1995) ในเบญจมาศนั้นมีรายงานการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น (Lamseejan *et al*., 2000) นำเบญจมาศชนิด spay type มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกลีบดอกมาฉายรังสีแกมมา

ที่ปริมาณรังสี 10–110 เกรย์ แล้วตัดแบ่งเพิ่มปริมาณจากรุ่น M_1V_1 ถึง M_1V_4 พบว่า มีค่า LD_{50} ที่ 14 เกรย์ และมีเพียงยอดที่ไม่ได้รับรังสี และที่ได้รับรังสี 10 เกรย์ เท่านั้นที่สามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ ซึ่งพบว่าลักษณะสีดอกของเบญจมาศมีความผันแปรไปจากสีเดิม Nagatomi *et al*. (2003) นำกลีบและตาของเบญจมาศพันธุ์ Taihei มาฉายรังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้พันธุ์กลาย 4 พันธุ์ ซึ่งทุกพันธุ์มีการเจริญเติบโตคล้ายกับพันธุ์ Taihei ซึ่งเหมาะสำหรับผลิตเป็นไม้ตัดดอก

Misra *et al*. (2003) นำกลีบดอกของเบญจมาศพันธุ์ Latima มาชักนำให้เกิดแคลลัส แล้วนำแคลลัสไปฉายรังสีแกมมา 0.5–1.0 เกรย์ แล้วชักนำให้เกิดต้น เมื่อนำต้นไปปลูกในแปลงพบต้นกลายพันธุ์ 2 ต้น ซึ่งมีดอกเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง โดยต้นหนึ่งมีกลีบดอกเหมือนต้นเดิม ส่วนอีกต้นหนึ่งกลีบดอกเปลี่ยนเป็นมีลักษณะเป็นหลอด และ Thangmanee (2012) นำแคลลัสของเบญจมาศมาฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสี 0–30 เกรย์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสและการเกิดยอดลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น โดยมีค่า LD_{50} ที่ปริมาณรังสี 26 เกรย์ และแคลลัสที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงสุดคือที่ผ่านการฉายรังสี 5 เกรย์

การศึกษาการกลายพันธุ์ในระดับโครโมโซมและดีเอ็นเอนั้น ทำได้โดยอาศัยหลักการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมหรือ genetic marker เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทั้งลักษณะทางปริมาณและคุณภาพช่วยให้สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างและภายในประชากรหรือระหว่างสมาชิกภายในประชากรได้การตรวจสอบการกลายด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) นี้ แม้ว่าจะมีข้อดีคือ มีความคงตัวสูง ไม่ผันแปรตามสภาพแวดล้อมและสภาพทางสรีระ แต่มีข้อเสียคือวิธีการการตรวจสอบยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นในการตรวจสอบการกลายนั้นจึงมักตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นอันดับแรกแล้วจึงใช้การตรวจสอบการกลายด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ขึ้นหรือแก้ปัญหาในกรณีที่ไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวได้ ในงานวิจัยนี้จึงได้ตรวจสอบการกลายในระดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP เฉพาะในต้นที่พบการกลายทางสัณฐานแล้วเท่านั้น

เทคนิคเอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism; AFLP) เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการของการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะโดยการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) ซึ่งพัฒนาขึ้นโดย Vos *et al.* (1995) โดยเครื่องหมายเอเอฟแอลพีสามารถบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่เป็นชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กันในพืชหลายชนิดและยังสามารถจำแนกลักษณะที่เกิดจากการกลายพันธุ์ได้ Liscum and Briggs (1995)

งานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาพันธุ์เบญจมาศเพื่อใช้เป็นพันธุ์สำหรับการปลูกในพื้นที่อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมาในเบญจมาศ แล้วศึกษาและคัดเลือกพันธุ์กลายที่เหมาะสมกับพื้นการผลิตที่ดังกล่าว รวมทั้งศึกษาการกลายในระดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการฉายรังสีแกมมา

การทดลองนี้ศึกษาในเบญจมาศพันธุ์การค้าชนิดช่อแบบ spray ดอกแบบ 2 สี (bicolor) ที่มีกลีบดอกสีเหลืองโคนกลีบสีแดงเข้ม ซึ่งไม่ทราบชื่อพันธุ์แน่ชัดแต่ลักษณะโดยรวมคล้ายพันธุ์ Raisa ของเนเธอร์แลนด์ (Figure 2) โดยนำส่วนตาข้างของช่อดอกมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารแข็งสูตร MS และเพิ่มปริมาณต้นให้เพียงพอสำหรับใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่

เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ ผงวุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร ปรับค่า pH ที่ 5.7 เพาะเลี้ยงในสภาพแสง 50 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนอาหารทุกเดือน จากนั้นตัดส่วนข้อไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน ด้วยเครื่องฉายรังสีรุ่น Mark I ของศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ใช้ปริมาณรังสี 6 ระดับคือ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 เกรย์ ปริมาณรังสีละ 30 ข้อ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ฉายรังสี แล้วนำข้อที่ผ่านการฉายรังสีมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดยอดจากนั้นตัดยอดที่ได้นำไปชักนำให้ออกรากบนอาหารสูตรเดิมเป็นเวลา 1 เดือน

นำต้นที่มีรากสมบูรณ์ออกปลูกในสภาพธรรมชาติ โดยชำในพีทมอสในกระบะเพาะชำเป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นตัดยอดจากแต่ละต้นให้มีขนาดความยาวเท่า ๆ กัน ประมาณ 2 นิ้ว นำลงปักชำในกระบะอีกครั้งเพื่อให้ได้ต้นที่มีขนาดสม่ำเสมอ ใช้เวลา 1 เดือน จึงนำออกปลูกในแปลงเกษตรกรผู้ปลูกเบญจมาศ ตำบลไทยสามัคคี อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา โดยเกษตรกรเป็นผู้ดูแลแปลงปลูกเช่นเดียวกับวิธีการดูแลเบญจมาศที่ปลูกเป็นการค้า

2. การศึกษาการกลายทางสัณฐานของเบญจมาศที่ผ่านการฉายรังสี

บันทึกอัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนที่นำไปฉายรังสี เมื่ออายุ 4 สัปดาห์ ในสภาพเพาะเลี้ยงและคำนวณค่า LD_{50} รวมทั้งตรวจสอบลักษณะการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ในสภาพเพาะเลี้ยงจากนั้นศึกษาลักษณะการกลายทางสัณฐานเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการฉายรังสี ในต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติเมื่อออกดอกชุดแรก

3. การตรวจสอบการกลายระดับ DNA โดยวิธี AFLP

ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค AFLP นี้ตรวจสอบในต้นที่เกิดการกลายทั้งหมด 8 ต้น โดยคัดเลือกมาตรวจสอบเฉพาะต้นที่แสดงการกลายเหมือนกันทั้งต้น และต้นที่ผ่านการฉายรังสีปริมาณต่าง ๆ แต่ไม่พบการกลายอีกจำนวน 7 ต้น และเปรียบเทียบกับต้นปกติที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีจำนวน 1 ต้น ทำโดยการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบเบญจมาศโดยวิธี CTAB ตามวิธีการของ Doyle and Doyle (1990) จากนั้นนำจีโนมิกดีเอ็นเอความเข้มข้น 500 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการตรวจสอบการกลายโดยวิธี AFLP ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Laksana (2008) ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Mse*I จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อกับ adapter ที่มีลำดับเบส ดังนี้

*Eco*RI adapter: 5´–CTCGTAGACTGCGTACC–3´/ 3´–CATCTGACGCATGGTTAA–5´
*Mse*I adapter: 5´–GACGATGAGTCCTGAG–3´/ 3´–TACTCAGGACTCAT–5´

ขั้นตอนต่อมาคือการทำ preselective amplification (PCR I) ซึ่งใช้ annealing temperature 56 องศาเซลเซียส โดยมีลำดับเบสของไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 ตัวที่ปลาย 3’ ของไพรเมอร์ ดังนี้

*Eco*RI primer +1 (E–A) 5’–GACTGCGTACCAATTCA–3’
*Mse*I primer +1 (M–A) 5’–GATGAGTCCTGAGTAAA–3’

สำหรับขั้นตอน selective amplification ใช้ผลผลิตที่ได้จาก PCR I มาเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณโดยในขั้นตอนนี้เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นคู่สมกับส่วนของ adapter และบริเวณจดจำของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 ตัวที่ปลายด้าน 3’ (primer+3) รวมทั้งหมดมี 10 คู่ไพรเมอร์ดังนี้

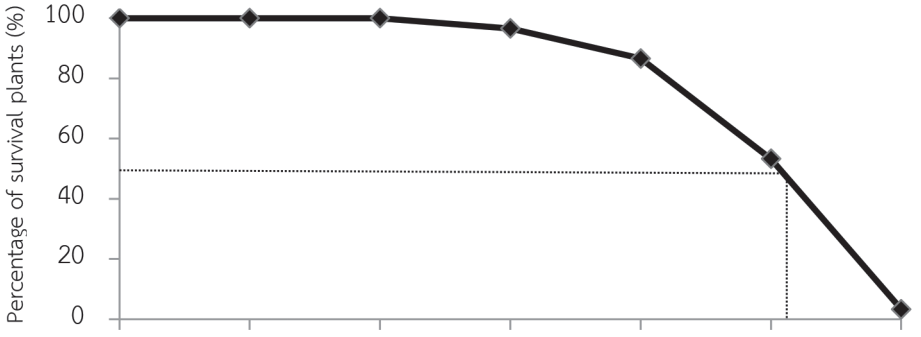
คู่ Primers	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
EcoRI	E–AAC	E–AAC	E–ACC	E–ACC	E–GCC	E–GCA	E–AAC	E–ACC	E–GCA	E–ACC
MseI	M–AGG	M–GTA	M–GTA	M–ACA	M–GTA	M–GTA	M–TAC	M–TAC	M–TAC	M–GTC

การทำ PCR ในขั้นตอนนี้ใช้โปรแกรม touch–down PCR โดยลดอุณหภูมิในขั้น annealing ที่เริ่มต้นที่ 65 องศาเซลเซียส ลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียส จำนวน 13 รอบ แล้วนำผลผลิตของปฏิกิริยา selective amplification ไปแยกขนาดดีเอ็นเอโดยการทำอิเล็คโทรโฟรีซิสบน denaturing polyacrylamide gel โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 80 โวลต์เป็นเวลา 120 นาที ย้อมเจลด้วยวิธี silver staining โดยนำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่มาแช่สารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 10% โดยวางบนเครื่องเขย่า 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที แล้วนำมาย้อมด้วยสารละลาย silver nitrate บนเครื่องเขย่า 30 นาที นำแผ่นกระจกล้างด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็วแล้วนำมาทำให้ปรากฏแถบดีเอ็นเอโดยการเขย่าในสารละลาย developer เมื่อแถบดีเอ็นเอปรากฏชัดเจนแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดอะซิติก 10% ล้างกระจกเจลครั้งสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น 2 นาที แล้วจึงนำกระจกไปผึ่งให้แห้งแล้วนำแถบดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม NTSYS

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลของรังสีต่อการรอดชีวิตของข้อเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อ

เมื่อตัดส่วนข้อของเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน โดยใช้ปริมาณรังสี 5–30 เกรย์ แล้วนำข้อที่ผ่านการฉายรังสีมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับข้อที่ไม่ได้ฉายรังสี พบว่า เมื่อฉายรังสีที่ปริมาณรังสีสูงขึ้นมีผลทำให้เบญจมาศตายมากขึ้น เบญจมาศที่ไม่ได้ฉายรังสีและที่ฉายรังสีปริมาณ 5 และ 10 เกรย์ มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเบญจมาศที่ฉายรังสีปริมาณ 15, 20 และ 25 เกรย์ มีอัตราการรอดชีวิต 96.6, 86.6 และ 53.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่ปริมาณรังสี 30 เกรย์ มีอัตราการรอดชีวิตของยอดเบญจมาศต่ำที่สุด 3.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถลากเส้นตัดกราฟหาค่า LD_{50} ได้ประมาณ 26 เกรย์ (Figure 1)



Gamma ray dose (Gy)	0	5	10	15	20	25	30
No. of survival plantlets	30	30	30	29	26	16	1
Survival plantlets (%)	100	100	100	96.6	86.6	53.3	3.3

Figure 1 The survival of *in vitro* chrysanthemum nodes and LD_{50} after irradiation with gamma ray and cultured on solid MS medium for 30 days

การที่ข้อเบญจมาศตายมากขึ้นเมื่อได้รับปริมาณรังสีเพิ่มขึ้นนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lamseejan *et al*. (2000) ที่พบว่าเบญจมาศชนิด spray type มีค่า LD_{50} ที่ 14 เกรย์ โดยยอดที่ได้รับรังสี 50 เกรย์ตายภายใน 25–30 วัน และมีเพียงยอดที่ไม่ได้รับรังสี และที่ได้รับรังสี 10 เกรย์ เท่านั้นที่สามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ และงานวิจัยของ Thangmanee (2012) ที่พบว่ารังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่สูงขึ้นมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสเบญจมาศลดลง โดยมีค่า LD_{50} ที่ปริมาณรังสี 26 เกรย์ และแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสี 5 เกรย์ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงสุด นอกจากนี้การตายของข้อเบญจมาศที่มากขึ้นเมื่อได้รับปริมาณรังสีเพิ่มขึ้นนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยเบญจมาศพันธุ์อื่นอีก เช่น งานวิจัยของ Yamaguchi *et al*. (2008) ซึ่งทดลองในเบญจมาศพันธุ์ Taihei พบว่าแคลลัสที่ได้รับรังสีแกมมาที่ปริมาณ 15–60 เกรย์ มีการเกิดยอดลดลงเมื่อได้รับปริมาณรังสีสูงขึ้น

การที่ปริมาณรังสีสูงขึ้นส่งผลกระทบต่อพืชมากขึ้นนี้ Kikuchi *et al*. (1995) อธิบายว่ารังสีทำให้อะตอมต่าง ๆ ภายในเซลล์เกิดแตกตัวเป็นไอออนและเกิด chemical radicals ที่ไวต่อการทำปฏิกิริยา ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีขึ้นภายในเซลล์ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าว อาจทำให้เกิดความเสียหายต่อการทำหน้าที่ต่าง ๆ ของเซลล์ อาจทำให้เซลล์ถูกทำลายหรือเกิดการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติหากเกิดขึ้นมากหรือรุนแรงก็จะทำให้พืชตายได้ และ Shikazono *et al*. (2003) อธิบายว่า นอกจากการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอแล้ว รังสียังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนหรือโครงสร้างของโครโมโซมได้เช่นกัน การที่โครโมโซมแตกหักเนื่องจากรังสีและมีการเชื่อมต่อกันในภายหลังอาจทำให้ชิ้นส่วนขาดหายไปบางส่วนมีผลทำให้ยีนจำนวนหนึ่งหายไปด้วย หรืออาจมีชิ้นส่วนโครโมโซมเพิ่มขึ้นมา หรือเกิดการเชื่อมแบบกลับทิศหรือสลับคู่ระหว่างโครโมโซมต่างคู่กัน (translocation) ก็จะทำให้สิ่งมีชีวิตนั้นๆ เกิดการกลายพันธุ์ได้ การเปลี่ยนแปลงนี้จะมีผลมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับชนิดของยีนและจำนวนยีนที่เกี่ยวข้อง ถ้าเกิดความผิดปกติขึ้นมากก็อาจไม่รอดชีวิตได้ แต่ถ้าการเชื่อมต่อกันนั้นต่อกันเหมือนเดิมก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น

2. ผลของรังสีต่อการกลายของเบญจมาศในแปลงปลูก

เมื่อนำต้นเบญจมาศที่รอดชีวิตออกปลูกในสภาพธรรมชาติในแปลงปลูกของเกษตรกร พบว่าต้นที่รอดชีวิตทุกต้นมีการเจริญเติบโตเป็นปกติ มีความสูงต้น ลักษณะทรงต้น ขนาดต้น รูปร่างและขนาดใบ รวมทั้งสีใบ ไม่ต่างจากต้นที่ไม่ผ่านการฉายรังสี นอกจากนี้ทุกต้นสามารถออกดอกได้ สำหรับการกลายของดอกนั้น จากการตรวจสอบในดอกที่บานชุดแรก พบว่า ต้นเบญจมาศที่ได้รับรังสีปริมาณ 15, 20 และ 25 เกรย์ บางต้นมีการกลายของสีดอกเกิดขึ้นแต่ลักษณะทรงดอกยังคงปกติ ซึ่งพบการกลายทั้งที่เป็นกลายทั้งต้นและกลายเพียงบางส่วนของต้นโดยในบางต้นดอกแต่ละดอกมีการกลายที่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงลักษณะที่เป็น chimera อย่างชัดเจนทั้งนี้สีดอกที่กลายจากสีเดิมคือที่มีลักษณะเป็น bicolor มีกลีบดอกสีเหลืองโคนกลีบสีแดงนั้น สามารถจัดกลุ่มการกลายออกเป็น 4 กลุ่มสี (Figure 2) คือ 1) กลีบดอกเป็นสีแดงขลิบเหลือง จำนวน 1 ต้น จากรังสี 15 เกรย์ 2) กลีบดอกเป็นสีเหลืองมีขีดสีแดงตรงโคนกลีบ จำนวน 3 ต้น จากรังสี 20 และ 25 เกรย์ 3) กลีบดอกเป็นสีขาวโคนกลีบสีม่วง จำนวน 3 ต้น จากรังสี 15 และ 20 เกรย์ และกลุ่มที่ 4) กลีบดอกเป็นสีขาวล้วน จำนวน 1 ต้น จากรังสี 20 เกรย์ โดยมีสรุปจำนวนต้นแยกตามลักษณะการกลายและปริมาณรังสีใน Table 1 ซึ่งช่วงปริมาณรังสีที่พบการกลายมากคือ 15 และ 20 เกรย์ ส่วนปริมาณรังสีที่ 30 เกรย์ นั้น มีต้นรอดชีวิตเพียง 1 ต้น เท่านั้นและเมื่อนำออกปลูกไม่พบการกลาย

การกลายของสีดอกที่เป็นผลมาจากรังสีดังกล่าวนี้ พบว่าในงานวิจัยของ Lamseejan *et al*. (2000) มีรายงานว่าเบญจมาศพันธุ์การค้าดอกสีม่วงที่ผ่านการ

ฉายรังสีแกมมามีลักษณะสีดอกผันแปรมากและได้ดอกสีใหม่คือสีเหลืองอ่อน และงานวิจัยของ Nagatomi *et al*. (2003) ที่ทดลองฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรังกับเบญจมาศพันธุ์ Taihei ได้พันธุ์กลาย 4 พันธุ์ ซึ่งพันธุ์กลายที่ได้ทุกพันธุ์มีการเจริญเติบโตคล้ายกับพันธุ์ Taihei แต่มีสีดอกเปลี่ยนแปลงไป ส่วนงานวิจัยของ Misra *et al*. (2003) ที่ฉายรังสีแกมมากับเบญจมาศพันธุ์ Latima และได้ต้นกลายพันธุ์ 2 ต้น ซึ่งมีสีดอกเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลืองทั้งคู่ แต่ต้นหนึ่งกลีบดอกมีลักษณะกลายจากแบบปกติเป็นแบบหลอด ซึ่ง Schum and Preil (1998) ได้รายงานว่าที่ผ่านมามีรายงานต่าง ๆ ที่มีการรวบรวมข้อมูลไว้ระบุว่าในไม้ดอกไม้ประดับนั้นการกลายของสีดอกนั้นเกิดขึ้นมากถึง 55% ในขณะที่การกลายของลักษณะดอกมีรายงานเพียง 15% และ Lee *et al*. (2008) รายงานเพิ่มเติมว่าสีดอกที่พบว่ามีการกลายได้ง่ายคือสีชมพูหรือแดง การกลายของสีดอกนี้คาดว่าอาจเกิดจากการที่รังสีส่งผลให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสบนดีเอ็นเอที่ส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงลำดับของกรดอมิโนและการผันแปรของสีดอก Shikazono *et al*. (2003)

Table 1 Number of flower color mutants resulted from gamma irradiation at 0–30 Gy

Dose of Gamma ray (Gy)	No. of plant	No. of normal plant	No. of flower color mutants				
			Red-yellow	Yellow-red streak	White-purple	White	% of mutants
0	30	30	0	0	0	0	0
5	30	30	0	0	0	0	0
10	30	30	0	0	0	0	0
15	29	26	1	0	2	0	10.3
20	26	22	0	2	1	1	15.4
25	16	15	0	1	0	0	6.3
30	1	1	0	0	0	0	0

Figure 2 Control (non–irradiated plant) and mutants of chrysanthemum flower color after irradiated with gamma ray

3. การตรวจสอบการกลายในระดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP

ในงานวิจัยนี้ ได้ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของต้นเบญจมาศที่ได้รับการฉายรังสีและเกิดการกลาย โดยคัดเลือกมาตรวจสอบเฉพาะต้นที่แสดงการกลายเหมือนกันทั้งต้น นำมาตรวจสอบการกลายระดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 คู่ โดยพบว่าทั้ง 10 คู่ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลีมอร์ฟิซึม จำนวนทั้งหมด 102 แถบ (Table 2) และพบแนวโน้มว่าเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้นมีผลให้เกิดโพลีมอร์ฟิซึมเพิ่มสูงขึ้นด้วย โดยปริมาณรังสี 25 เกรย์ พบแถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลีมอร์ฟิซึมมากที่สุด จำนวน 25 แถบ ส่วนที่ต้นที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลีมอร์ฟิซึมน้อยที่สุดจำนวน 4 แถบ การตรวจพบโพลีมอร์ฟิซึมนั้นแสดงว่าต้นเบญจมาศที่ได้รับการฉายรังสีมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้นในตำแหน่งที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ ทำให้สามารถหรือไม่สามารถตัดและเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ ซึ่งมีผลทำให้ขนาดและจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้เปลี่ยนแปลงไป (Vos *et al*., 1995; Lee *et al*., 2002)

เมื่อนำผลของการเกิดโพลีมอร์ฟิซึมมาสร้างเป็นเดนโดแกรมโดยวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS (Figure 3) โดยเมื่อพิจารณาที่ค่า similarity coefficience 0.95 พบแนวโน้มว่าสามารถแบ่งกลุ่มต้นที่ศึกษาออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีการกลายของสีดอก และกลุ่มที่ไม่มีการกลายซึ่งรวมทั้งต้นที่ผ่านการฉายรังสีและต้นที่ไม่ได้ฉายรังสี และสำหรับในกลุ่มที่มีการกลายนั้นสามารถวิเคราะห์ความเชื่อมโยงของการเกิดโพลีมอร์ฟิซึมที่คล้ายคลึงกันในกลุ่มที่มีการกลายในรูปแบบใกล้เคียงกันแม้ว่าจะมีที่มาจากปริมาณรังสีที่ต่างกันก็ตาม แต่เมื่อพิจารณาที่ค่า similarity coefficience 0.99 พบว่าในกลุ่มของต้นที่มีการกลายของสีดอกไปในแนวทางเดียวกันนั้น อาจมีกำเนิดของการกลายมาจากจุดกำเนิดที่ต่างกันเนื่องจากมีแถบดีเอ็นเอบางส่วนที่แสดงความแตกต่างกัน

อย่างไรก็ตาม การทดลองในครั้งนี้ ยังเป็นการศึกษาในต้นที่นำออกปลูกชั่วรุ่นแรก การจะนำพันธุ์กลายมาใช้ประโยชน์ในการพัฒนาเป็นพันธุ์ใหม่สำหรับปลูกเป็นการค้านั้น ยังจำเป็นที่จะต้องมีการปลูกทดสอบ และ คัดเลือกสายต้นที่มีความคงตัวสูงและมีลักษณะเป็นที่ต้องการของตลาดและของเกษตรกรผู้ผลิตด้วย ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปที่จะต้องศึกษาคือประเด็นความคงตัวของสายพันธุ์กลายในชั่วรุ่นต่าง ๆ ซึ่งจะได้ดำเนินการวิจัยในโอกาสต่อไป

Table 2 Number of polymorphism of genomic DNA from certain chrysanthemum irradiated with gamma ray at different doses was characterized using AFLP markers

Primers	Total of polymorphism	No. of polymorphism at different doses					
		0 Gy	5 Gy	10 Gy	15 Gy	20 Gy	25Gy
E–AAC/M–AGG	9	0	1	1	3	2	2
E–AAC/M–GTA	12	1	2	1	2	3	3
E–ACC/M–GTA	8	0	1	2	1	2	2
E–ACC/M–ACA	11	0	1	2	2	3	3
E–GCC/M–GTA	10	1	2	1	2	2	2
E–GCA/M–GTA	13	1	2	1	3	2	4
E–AAC/M–TAC	15	1	2	2	3	4	3
E–ACC/M–TAC	12	0	2	2	2	3	3
E–GCA/M–TAC	5	0	0	1	2	1	1
E–ACC/M–GTC	7	0	1	1	2	1	2
Total	102	4	14	14	22	23	25

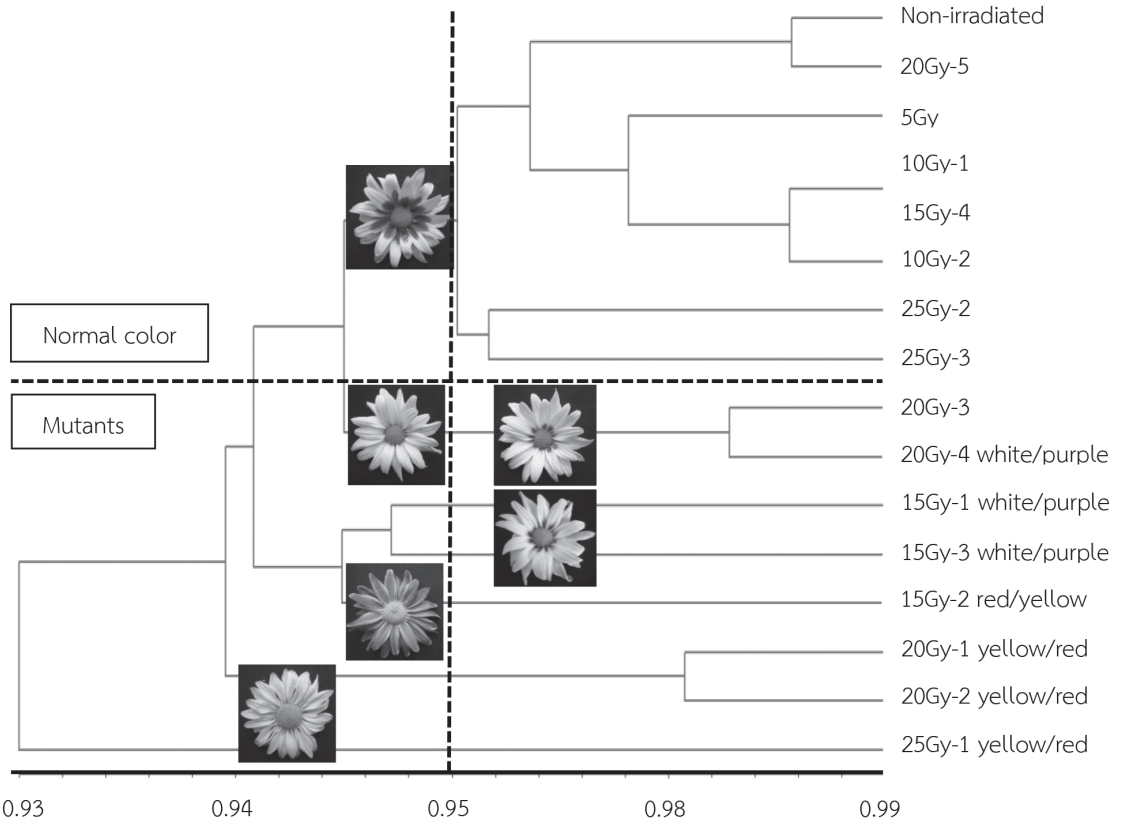


Figure 3 Dendrogram of the mutant plantlets produced from AFLP technique using 10 primer pairs and analyzed by NTSYS program

สรุป

เมื่อฉายรังสีที่ปริมาณรังสีสูงขึ้นมีผลทำให้เบญจมาศตายมากขึ้น พบว่ามีค่า LD_{50} ประมาณ 26 เกรย์ โดยเบญจมาศที่ฉายรังสี 5 และ 10 เกรย์ มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ปริมาณรังสี 30 เกรย์ มีอัตราการรอดชีวิต 3.3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำต้นเบญจมาศที่รอดชีวิตออกปลูกในสภาพธรรมชาติพบว่าต้นที่รอดชีวิตทุกต้นมีการเจริญเติบโตและสามารถออกดอกได้และต้นเบญจมาศที่ได้รับรังสีปริมาณ 15–25 เกรย์ บางต้นมีการกลายของสีดอก จำแนกได้เป็น 4 กลุ่มสี และเมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีโดยใช้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 คู่ พบแถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลีมอร์ฟิซึม ซึ่งมีแนวโน้มว่าเมื่อปริมาณรังสีสูงขึ้นมีผลให้เกิดโพลีมอร์ฟิซึมเพิ่มสูงขึ้นและสามารถแยกความแตกต่างระหว่างเบญจมาศที่กลายพันธุ์และเบญจมาศที่ไม่กลายได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์

และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และโครงการการสร้างภาคีในการผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโท-เอกสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12: 13–15.

Jain, S.M. 2005. Mutation-assisted breeding in ornamental plant improvement. Acta Hortic. 714: 85–98.

Kikuchi, O.I., N.L.D. Mastro and F.M. Wiendl. 1995. Preservative solution for gamma irradiated chrysanthemum cut flowers. Radiat. Phys. Chem. 46: 1309–1311.

Laksana, C. 2008. Morphological variation, genetic variation and plumbagin production of *Plumbagoindica*L. regenerated from hairy roots. M.S. Thesis, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. (in Thai).

Lamseejan, S., P. Jompuk, A. Wongpiyasatid, S. Deeseepan and P. Kwanthamachart. 2000. Gamma – rays induced morphological changes in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). Kasetsart J. (Nat. Sci.) 34: 417–422.

Lee, G., S.J. Chung, I.S. Park, J.S. Lee, J.B. Kim, D.S. Kim and S.Y. Kang. 2008. Variation in the phenotypic features and transcripts of color mutants of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) derived from gamma ray mutagenesis. J. Plant Biol. 51: 418–423.

Lee, Y.I., I.S. Lee and Y.P. Lim. 2002. Variations in sweet potato regenerates from gamma ray irradiated embryonic callus. J. Plant Biotech. 4: 163–170.

Liscum, E. and W.R. Briggs. 1995. Mutations in the NPH1 locus of Arabidopsis disrupt the perception of phototropic stimuli. Plant cell.7: 473–485.

Mandal, A.K.A., D. Chakrabarty and S.K. Datta. 2000. *In vitro* isolation of solid novel flower colour mutants from induced chimeric ray florets of chrysanthemum. Euphytica. 114: 9–12.

Misra, P., S.K. Datta and D. Chakrabarty. 2003. Mutation in flower colour and shape of *Chrysanthemum morifolium* induced by gamma–radiation. Biol. Plant. 47: 153–156.

Nagatomi, S., E. Miyahira and K. Degi. 2003. Combined effect of gamma irradiation methods and in vitro explants sources onmutation induction of flower color in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Gamma Field Symp. 35: 51–69.

Schum, A. and W. Preil. 1998. Induced mutations in ornamental plants, p. 333-336 *In* S. Mohan Jain, D.S. Brar and B.S. Ahloowalia. (eds.) Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement, Kluwer Academic Publishers, Berlin, German.

Shikazono, N., Y. Yukihiko, K. Satoshi, S. Chihiro, W. Hiroshi, T. Shigemitsu and T. Atsushi. 2003. Mutation rate and novel *tt* Mutants of *Arabidopsis thaliana* induced by carbon ions. Genetics. 163: 1449–1455.

Thangmanee, C. 2012. Mutation Induction by Gamma Irradiation in Chrysanthemum (*Chrysanthemum x grandifloram* (Ramat.) Kitam). Ph.D. Thesis, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zebeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprintings. Nucleic Acids Res. 23: 4407–4414.

Yamaguchi, H., A. Shimizu, K. Degi and T. Morishita. 2008. Effects of dose and dose rate of gamma ray irradiation on mutation induction and nuclear DNA content in chrysanthemum. Breed. Sci. 58: 331–335.