การชักนำให้เกิดการกลายในทานตะวันลูกผสม (*Helianthus annuus)* โดยการฉายรังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Induced Mutation on Hybrid Sunflower (*Helianthus annuus*) by Gamma Irradiation through Tissue Culture

ปิยนันท์ พวงจันทร์[1] บุบผา คงสมัย[1,2] และสนธิชัย จันทร์เปรม[1,2]

Piyanan Phuangjan,[1] Buppa Kongsamai[1,2] and Sontichai Chanprame[1,2]

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณรังสีแกมมาที่เหมาะสมสำหรับก่อกลายพันธุ์ทานตะวัน และศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นหลังจากการฉายรังสีร่วมกับวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยตรวจสอบด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี ทำการทดลองโดยใช้ทานตะวันลูกผสมชั่วที่ 1 พันธุ์โอเปรา โดยชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก (multiple shoot) ด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ BA และ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ ก่อนนำไปฉายรังสีแกมมาในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า อาหารสูตรที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยอดทานตะวันพันธุ์โอเปราคือสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มจำนวนยอดได้เฉลี่ย 6.67 ยอด นำยอดเหล่านี้ไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันปริมาณรังสี 0, 1, 2, 3 และ 4 Krad และได้ทดลองฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันให้กับเมล็ดที่ปริมาณรังสี 0, 12, 13 และ 14 Krad แล้วนำเมล็ดมาเพาะในสภาพปลอดเชื้อในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าเมล็ดทานตะวันพันธุ์โอเปราที่ได้รับปริมาณรังสี 13 Krad มีการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ส่วนปริมาณรังสีที่ทำให้ยอดทานตะวันตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผ่านการฉายรังสีมาแล้ว 60 วันคือ 2.69 Krad ผลการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ พบเพียง 5 คู่ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยคู่ไพรเมอร์ *Eco*RI (ACC) และ *Mse*I (CAT) โดยให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลีมอร์ฟิซึมสูงที่สุด 14.92%

คำสำคัญ : การฉายรังสีแกมมา, เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, AFLP, ทานตะวัน

Abstract

The objectives of this research were to determine the suitable doses of gamma rays for induced mutation in F_1 hybrid sunflower 'Opera' and to study the genetic variation occurred after irradiation of the cultured tissue using AFLP technique. Multiple shoots induction of 'Opera' (F_1) hybrid was done in

[1] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Department of Agronomy, Faculty of Agriculture Kamphaengsaen, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom 73140

[2] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140 /ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพ
Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom, 73140/AG-BIO/PERDO-CHE

MS medium supplemented with various concentrations of BA or TDZ. It was found that the suitable medium for multiple shoots induction was MS plus 1 mg/l BA. The medium produced the average of 6.67 shoots. These shoots were subjected to acute irradiation at the doses of 0, 1, 2, 3 and 4 Krad. Seeds of this cultivar were also irradiated at 0, 12, 13 and 14 Krad prior to invitro germination in MS medium. The results showed that $LD_{50(60\ ds)}$of Opera seed was 13 Krad while $LD_{50(60\ ds)}$ of cultured shoot was 2.69 Krad. Genetic variation study using AFLP technique revealed that 5 out of 10 primer pairs gave polymorphic bands of DNA. The *Eco*RI (ACC) and *Mse*I (CAT) yielded the highest percentage of polymorphism of 14.92%

คำนำ

ทานตะวันเป็นพืชน้ำมันที่สำคัญทางเศรษฐกิจรองจากถั่วเหลือง และปาล์มน้ำมัน ทานตะวันทนแล้งได้ค่อนข้างดีเมื่อเปรียบเทียบกับพืชไร่ชนิดอื่นเช่น ข้าวโพด ถั่วเหลือง และถั่วเขียว เมล็ดทานตะวันมีคุณค่าทางโภชนาการสูง กากที่ได้หลังจากสกัดน้ำมันแล้วมีโปรตีน 40 - 50 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันทานตะวันมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวประมาณ 88 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าน้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันปาล์ม และมีสาร antioxidant ทำให้กันหืนได้ดี สามารถเก็บไว้ได้นานกว่าน้ำมันพืชชนิดอื่น เนื่องจากน้ำมันทานตะวันมีคุณค่าสูง จึงเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศทั้งเพื่อการบริโภคและใช้ในอุตสาหกรรม เช่น น้ำมันชักเงา น้ำมันหล่อลื่น สีทาบ้าน ส่วนลำต้นทานตะวันสามารถนำไปทำกระดาษคุณภาพดี ในปีเพาะปลูก 2551/2552 ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกทานตะวันทั้งประเทศรวมประมาณ 300,000 ไร่ (ศรีสุดา, ม.ป.ป.) และมีแนวโน้มขยายพื้นที่ปลูกมากขึ้น

อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ทานตะวันที่ปลูกในประเทศไทยยังไม่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีนัก ผลผลิตไม่เทียบเท่ากับเมล็ดพันธุ์ลูกผสม และเมล็ดพันธุ์ลูกผสมที่ดีต้องนำเข้าจากต่างประเทศมีราคาแพง ทำให้ปัจจุบันได้มีการพัฒนาพันธุ์ผสมเปิดเพื่อให้เกษตรกรเก็บไว้ทำพันธุ์ สามารถช่วยลดการนำเข้าเมล็ดพันธุ์จากต่างประเทศปีละ 60-100 ล้านบาท (สิทธา, 2550) ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาแนวทางสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้กับทานตะวันโดยการหาปริมาณรังสีที่ฉายรังสีแบบเฉียบพลันให้กับเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงและเมล็ดของทานตะวัน และเพื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้น สำหรับใช้เป็นวิธีการเสริมเพื่อการคัดเลือก และปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันโดยเฉพาะในกรณีที่ความแปรปรวนทางพันธุกรรมน้อย

อุปกรณ์และวิธีการ

การเพิ่มจำนวนทานตะวันโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำเมล็ดทานตะวันลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) พันธุ์โอเปรา บริษัท Syngenta มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดด้วยสารละลาย Haiter® 20 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Tween 20 1-2 หยด เขย่านาน 20 นาที และ 10 นาที ตามลำดับ จากนั้นล้างด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำเมล็ดมาเพาะบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่มีค่า pH 5.7 เพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส สภาพแสง 30 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 14 -21 วัน เมื่อทานตะวันงอกจนเกิดใบจริง 2-3 คู่ใบ ตัดยอดขนาดประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร นำไปเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร

ควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิดได้แก่ BA ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพเช่นเดิม

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยฉายรังสีแบบเฉียบพลัน

นำเมล็ดทานตะวันพันธุ์โอเปรามาฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน ในปริมาณต่าง ๆ คือ 0, 12, 13 และ 14 Krad และ ส่วนยอดทานตะวันที่ได้จากการเพาะเมล็ดให้งอกในสภาพปลอดเชื้ออายุประมาณ 2 สัปดาห์ตัดส่วนยอดความยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำไปฉายรังสีที่ปริมาณ 1, 2, 3 และ 4 Krad จากนั้นนำเมล็ดและยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 1 เดือน วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) สิ่งทดลองละ 10 ซ้ำ เมล็ดฉายรังสีซ้ำละ 8 เมล็ด ยอดฉายรังสีซ้ำละ 2 ยอด บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอก จำนวนยอด อัตราการรอดชีวิต

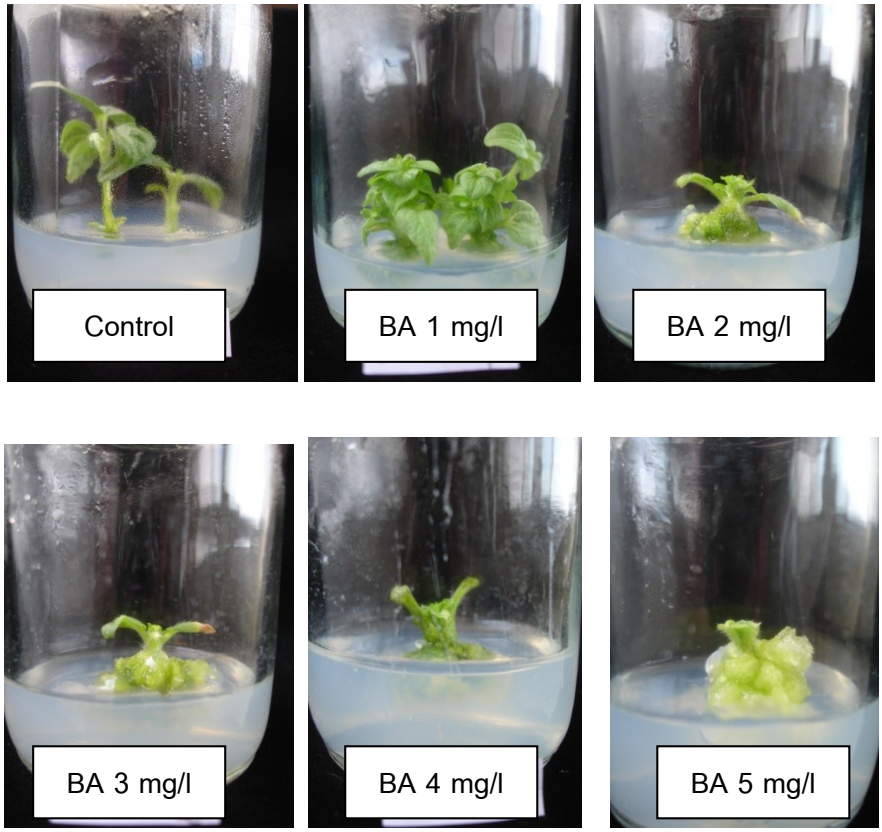
การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของทานตะวันที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันโดยวิธีเอเอฟแอลพี

ใช้ตัวอย่างใบทานตะวันที่ได้จากต้นที่งอกจากเมล็ด และใบจากส่วนของยอดที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน โดยสุ่มมาทั้งหมด 42 ต้นได้แก่ จากเมล็ดฉายรังสีที่ปริมาณ 12, 13, 14 Krad อย่างละ 10 ต้น ส่วนยอดที่ผ่านการฉายรังสี 1 Krad อย่างละ 10 ต้น และ control 2 ต้น สกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB (Aldrich and Cullis, 1993) วิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิคเอเอฟเอลพี (AFLP) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 คู่ คือ E-ACC/M-CAT, E-ACC/M-CAC, E-ACC/M-CTG, E-ACC/M-CTA,E-AAC/M-CAT, E-AAC/M-CTG, E-CGT/M-ATT, E-CAG/M-ATT, E-CAG/M-ACT, E-CAG/M-AGC (E หมายถึง *Eco*RI, M หมายถึง *Mse*I) และแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ polyacrylamide gel electrophoresis และย้อมเจลด้วยวิธี silver staining

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเพิ่มจำนวนทานตะวันโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การทดลองเพิ่มจำนวนโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า ยอดทานตะวันพันธุ์โอเปราที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ pH 5.7 มีเพียงอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่านั้นที่สามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ มีค่าเฉลี่ยจำนวนยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อเริ่มต้น 6.67 ยอด ส่วนสูตรอาหารที่มีความเข้มข้น BA ที่มากกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดจะตายและเกิดเป็นแคลลัสเกิดขึ้น (ภาพที่ 1) สำหรับอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเพียงสูตรที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และที่ไม่เติม TDZ เท่านั้นที่มีชีวิตรอดแต่ก็ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยอดได้



ภาพที่ 1 การตอบสนองของยอดทานตะวันพันธุ์โอเปราเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 0,1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 30 วัน

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการฉายรังสีแบบเฉียบพลัน

การฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันให้กับเมล็ด และส่วนยอดแล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS พบว่า เมล็ดทานตะวันที่ได้รับปริมาณรังสี 13 Krad มีการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ในเวลา 60 วัน (ตารางที่ 1) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ โกศล (2533) ที่ฉายรังสีแกมมาให้กับเมล็ดทานตะวันพันธุ์ลูกผสมพันธุ์แปซิฟิก 33 พบว่าปริมาณรังสีที่ 14.44 Krad มีผลทำให้ทานตะวันพันธุ์แปซิฟิก 33 ตายไป 50 เปอร์เซ็นต์ และสอดคล้องกับงานวิจัยของศิริรัตน์ (2546) ที่พบว่า ปริมาณรังสีที่เพิ่มมากขึ้นทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดทานตะวันลดลง ส่วนปริมาณรังสีที่ทำให้ยอดทานตะวันพันธุ์โอเปรามีการตาย 50 เปอร์เซ็นต์คือ 2.69 Krad เมื่อผ่านการฉายรังสีมาแล้ว 60 วัน(ตารางที่ 2 และ ภาพที่ 2) เมื่อนำยอดทานตะวันที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันมาชักนำให้เกิดรากในอาหารสูตร ½ MS ที่ปราศจากฮอร์โมน พบว่าทานตะวันพันธุ์โอเปร่าที่ฉายรังสีแกมมา 1 Krad เกิดราก และสามารถนำออกปลูกได้ในสภาพธรรมชาติ ลักษณะต้นมีความสูงประมาณ 15-20 เซนติเมตร ลำต้นเล็ก ดอกเล็ก ติดเมล็ดเพียง 8-10 เมล็ด แต่ที่ปริมาณรังสีตั้งแต่ 2 Krad ยอดที่ได้ไม่ออกรากและตายในเวลาประมาณ 90 วัน ผลการทดลองนี้สอดคล้องใกล้เคียงกับงานวัยของ ชุตินทร (2532) ที่ทดลองฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันกับเบญจมาศ พบว่าปริมาณรังสีที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์คือ 1 Krad และปริมาณรังสีที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตลดลง ปริมาณรังสีตั้งแต่ 4 krad ขึ้นไปทำให้การเจริญเติบโตของเบญจมาศหยุดชะงักและตายไปในที่สุด

ตารางที่ 1 ผลของปริมาณรังสีที่มีต่อการงอกของเมล็ดทานตะวันพันธุ์โอเปราหลังจากการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสีต่างๆ (เปอร์เซ็นต์การงอก)

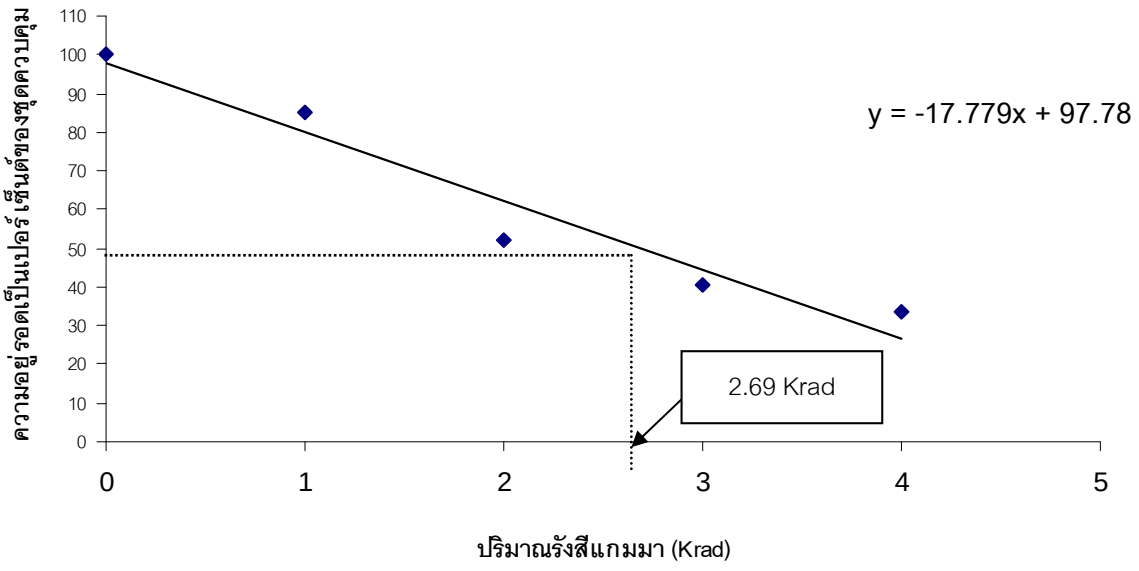
ปริมาณรังสี	ฉายรังสีครั้งที่ 1			ฉายรังสีครั้งที่ 2			ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
0 Krad	76.25	73.75	70	72.5	73.75	75	73.54a
12 Krad	38.75	63.75	53.75	61.25	61.25	85	60.63b
13 Krad	35	38.75	48.75	51.25	62.5	63.75	50c
14 Krad	28.5	30	42.5	41.25	63.75	65	45.17d

CV (%) = 25.08

ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาที่ระดับต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ตารางที่ 2 ผลการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสีต่างๆ ที่มีต่อความอยู่รอดของยอดทานตะวันพันธุ์โอเปราบันทึกผลการในสภาพเพาะเลี้ยงภายหลังการฉายรังสี 60 วัน

ปริมาณรังสี (Krad)	จำนวนยอดที่ใช้ในการทดลอง	จำนวนยอดที่รอดชีวิตทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอด	ความอยู่รอดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับชุดควบคุม
0	30	27	90	100
1	30	23	76.67	85.19
2	30	14	46.67	51.85
3	30	11	36.67	40.74
4	30	9	30	33.33



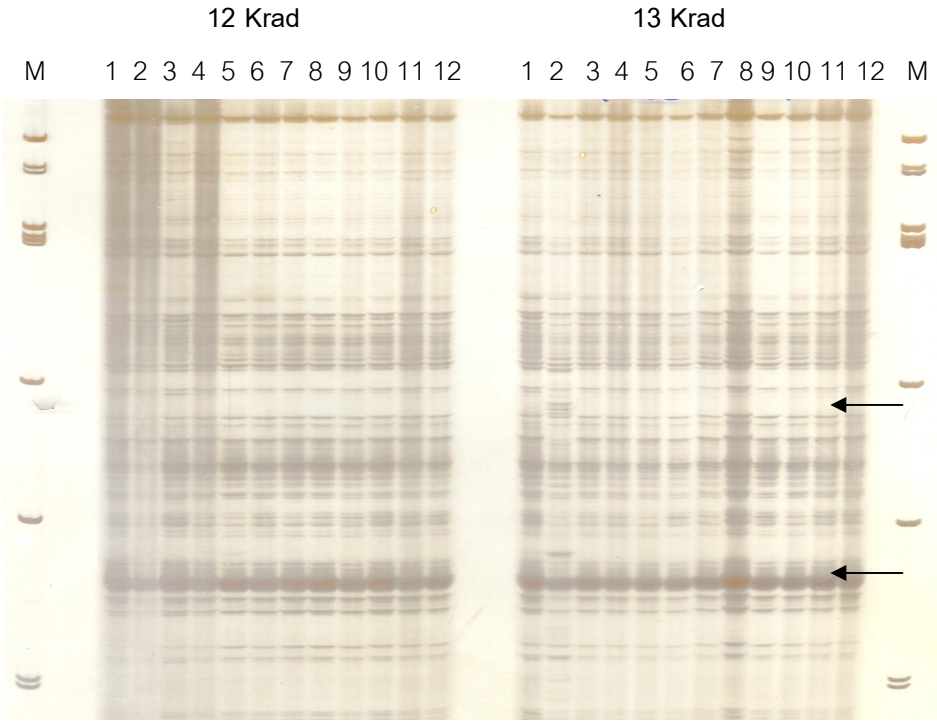
ภาพที่ 2 เปอร์เซ็นต์การรอดตายเมื่อเทียบกับชุดคบคุมของยอดทานตะวันพันธุ์โอเปราเมื่ออายุ 60 วันหลังจากที่ได้รับรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณต่างๆ

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี

ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทานตะวันที่ผ่านการฉายรังสีโดยเทคนิคเอเอฟแอลพีโดยนำคู่ไพรเมอร์มาเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในขั้น selective amplification และแยกขนาดด้วยวิธีการอิเล็กโทรโฟรีซีสในตัวกลาง denature polyacrylamide gel และคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอได้ 10 คู่ไพรเมอร์ มีเพียง 5 คู่ไพรเมอร์ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) ของทานตะวันพันธุ์โอเปราที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันตรวสอบตัวอย่างใบจากเมล็ดฉายรังสีที่ปริมาณ 12, 13, 14 Krad ส่วนยอดที่ผ่านการฉายรังสี 1 Krad อย่างละ 10 ต้น และ control 2 ต้น โดยคู่ไพรเมอร์ *Eco*R I (ACC) และ *Mse* I (CAT) แสดงร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลีมอร์ฟิซึม (percentage of polymorphism) สูงที่สุด 14.92% (ตารางที่ 3) แสดงว่า การฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันให้กับยอดทานตะวัน และเมล็ดทานตะวัน มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอขึ้น เช่นเดียวกับการทดลอง Oliveira *et al.* (2004) ซึ่งศึกษาผลของการฉายรังสีแกมมาให้เมล็ดทานตะวันพันธุ์ HA BR 104 เพื่อให้ต้านทานโรคใบจุด (*Alternaria* leaf spot) โดยนำเมล็ดฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 150 และ 165 เกรย์ พบว่า ทานตะวันพันธุ์ HA BR 104 ที่ผ่านการฉายรังสีสามารถต้านทานโรคใบจุดในระดับที่ไม่เกิดโรค หรือ ในระดับที่เกิดโรคน้อยกว่า 5% และจากการทดลองของ Dong *et al.* (2007) ศึกษาความหลากหลายของทานตะวันบริโภคเมล็ด 70 สายพันธุ์ด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ 8 คู่ พบว่า คู่ไพรเมอร์ทั้ง 8 คู่แสดงแถบดีเอ็นเอมีสัดส่วนค่าโพลีมอร์ฟิซึมเท่ากับ 78.50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสายพันธุ์ทานตะวันที่แตกต่างกัน และการใช้จำนวนไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน ทำให้ค่าโพลีมอร์ฟิซึมแตกต่างกัน และการทดลองของ Rashid *et al.* (2009) ศึกษาผลของรังสีแกมมาให้กับเมล็ดข้าวพันธุ์ Basmati-370 และพันธุ์ Basmati-Pak โดยนำเมล็ดไปฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 150, 200, 250 และ 300 เกรย์ แล้วตรวจสอบการกลายด้วยเครื่องหมายเอแอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ P*st* I ร่วมกับ *Mse* I จำนวน 16 คู่ พบว่า คู่ไพรเมอร์ทั้ง 16 คู่แสดงแถบดีเอ็นเอมีสัดส่วนค่าโพลีมอร์ฟิซึมเท่ากับ 37.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสิ่งบ่งชี้ว่าอาจเกิดการกลายพันธุ์ขึ้นในข้าวภายหลังการฉายรังสีในปริมาณต่างๆ

ตารางที่ 3 คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (polymorphism) ในทานตะวันพันธุ์โอเปราที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันเมื่อตรวสอบด้วยเทคนิค AFLP

ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			% Polymorphism
	ที่แตกต่าง	ที่เหมือนกัน	ทั้งหมด	
ACC-CAT	10	57	67	14.92
ACC-CTA	7	75	82	8.54
CAG-ACT	2	83	85	2.35
CAG-AGC	2	61	61	3.28
CGT-ATT	1	46	47	2.13
ผลรวม	22	322	342	31.22
ค่าเฉลี่ย	4.4	64.4	68.4	6.24



ภาพที่ 3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอทานตะวันพันธุ์โอเปราที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ E-ACC/M-CTA แสดงตำแหน่งแถบดีเอ็นเอที่บอกความแตกต่าง (ลูกศรชี้) แถว M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (ØX174 DNA/*Hin*fI) 1-10 คือจำนวนต้นทานตะวันผ่านการฉายรังสีแกมมาที่สุ่มมาตรวจสอบ,11-12 คือ ต้นควบคุม (Control)

สรุปและเสนอแนะ

สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มยอดทานตะวันคือสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณรังสีที่ทำให้ยอดทานตะวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาย 50% (LD_{50}) คือ 2.69 Krad แต่เมื่อนำยอดที่ผ่านการฉายรังสีแกมมามาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารชักนำรากพบเพียงยอดที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ 1 Krad ที่ออกรากและนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้เท่านั้น ส่วนยอดที่ผ่านการฉายรังสีที่ระดับสูงกว่า 1 Krad ตายทั้งหมดเมื่อในเวลา 90 วัน ส่วนเมล็ดที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ 13 Krad พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การงอกเหลือ 50 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลด้วยเทคนิคเอแอฟแอลพีโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ พบเพียง 5 คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยคู่ไพรเมอร์ *Eco*RI (ACC) และ *Mse*I (CAT) แสดงค่าร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลีมอร์ฟิซึมสูงที่สุด 14.92%

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ศูนย์ความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สกอ. ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์การทดลอง

เอกสารอ้างอิง

โกศล พวงจิตร. 2533. **ผลของรังสีแกมมาที่มีผลต่อทานตะวัน**. วิทยานิพนธ์ ภาควิชาพืชไร่นา. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

ชุตินทร บูรณะกนิษฐ. 2532. **การชักนำให้เบญจมาศกลายพันธุ์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสี**. วิทยานิพนธ์ ภาควิชาพืชสวน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

ศรีสุดา เตชะสาน. ม.ป.ป. **การปลูกทานตะวัน**. แหล่งที่มา: www.eto.ku.ac.th/neweto/e-book/plant/flower/sunflower.pdf, 20 กันยายน 2552.

ศิริรัตน์ วชิรจิรากร. 2546. **ผลของรังสีแกมมาที่มีผลต่อเมล็ดทานตะวัน**. ปัญหาพิเศษ ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

สิทธา วรินดา. 2550. การพัฒนาพันธุ์ทานตะวัน. น. 261-264. *ใน* **การประชุมวิชาการ งา ทานตะวัน ละหุ่ง และคำฝอยแห่งชาติ ครั้งที่ 5**. 23-25 พฤษภาคม 2550. ณ โรงแรมเทวราช, จ.น่าน.

Aldrich, K.J. and C.A. Cullis. 1993. RAPD analysis in flax: optimization of yield and reproducibility using Klen *Taq* 1 DNA polymerase, chelex 100 and gel purification of genomic DNA. **Plant Mol. Biol. Rep.** 11: 128-141.

Dong, G.J., G.S. Liu and K. F. Li. 2007. Studying genetic diversity in the core germplasm of confectionary sunflower (*Helianthus annuus* L.) in China based on AFLP and morphological analysis. **Russian J. Genet.** 43: 627-635.

Murashigie, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. **Physiol. Plant.** 15: 473.

Oliveira, M.F.de., A.T. Neto, R.M.V.B.C. Leite, V.B.R. Castiglioni and C.A.A. Arias. 2004. Mutation breeding in sunflower for resistance to Alternaria leaf spot. **Helia.** 27(41): 41-50.

Rashid, M., L. Ren-hu, J. Wei, X. Yong-han, W. Fu-Lin, T. Yue-zhi, W. Jun-mei, A. A. Cheema, C. Jing-qing and G. He. 2009. Genomic diversity among Basmati rice (*Oryza sativa* L.) mutants obtained 60 Co gamma radiations using AFLP markers. **African J. Biot.** 8(24): 6777-6783.