

ผลของการฉายรังสีแกมมาที่มีต่อพริก (*Capsicum* spp.)



มลธิดา ธิศาเวช

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพืชสวน

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2563

ผลของการฉายรังสีแกมมาที่มีต่อพริก (*Capsicum* spp.)



มลธิดา ธิศาเวช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพืชสวน

สำนักบริหารและพัฒนาระบบราชการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

ผลของการฉายรังสีแกมมาที่มีต่อพริก (*Capsicum* spp.)

มลธิดา ธิศาเวช

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพืชสวน

พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรพินธุ์ สฤษดีน้ำ)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร.ประนอม ยิ่งคำมัน)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร.สุรีย์พร สราภิรมย์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรนุช เจริญกิจ)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)

รองอธิการบดี ปฏิบัติการแทน

อธิการบดี มหาวิทยาลัยแม่โจ้

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ชื่อเรื่อง	ผลของการฉายรังสีแกมมาที่มีต่อพริก (<i>Capsicum</i> spp.)
ชื่อผู้เขียน	นางสาวมลธิดา ธิศาเวช
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรพินธุ์ สฤษดิ์น้ำ

บทคัดย่อ

พริก (*Capsicum* spp.) เป็นพืชผักเศรษฐกิจที่มีความสำคัญและนิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย การชักนำให้เกิดการกลายด้วยรังสีจึงเป็นเครื่องมือหนึ่งที่ใช้ในการพัฒนาพืชโดยการสร้างลักษณะใหม่ที่เป็นพันธุ์ที่ต้องการในตลาด งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการฉายรังสีแกมมาที่มีผลต่อการงอกของเมล็ด การรอดชีวิต ลักษณะสัณฐานวิทยา และความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล ผลการทดลองพบว่า การฉายรังสีแกมมาปริมาณ 0, 150, 300, 450 และ 600 เกรย์ ระยะเวลาในการงอกของเมล็ดที่ไม่ฉายรังสีแกมมาเริ่มงอกเร็วกว่าเมล็ดที่ฉายรังสีแกมมาเฉลี่ยที่ 5.67 วัน ส่วนเมล็ดที่ฉายรังสีแกมมาปริมาณ 150 - 600 เกรย์ ระยะเวลาเริ่มงอกอยู่ในช่วง 8.33 - 11.67 วันหลังการเพาะเมล็ด เมื่อตรวจสอบการงอกที่ 2 สัปดาห์ และ 3 สัปดาห์ หลังการเพาะเมล็ด การงอกของเมล็ดลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งเทียบกับเมล็ดที่ไม่ฉายรังสีแกมมา เมล็ดที่ฉายรังสี ปริมาณ 150, 300, 450 และ 600 เกรย์ มีการงอกอยู่ระหว่าง 55.13-57.69, 71.15-76.92, 55.77- 87.17 และ 73.08-75.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในสัปดาห์ที่ 8 หลังการเพาะเมล็ด พริกที่ได้รับรังสีแกมมา มีการรอดชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับชุดควบคุม โดยพริกที่ไม่ฉายรังสีแกมมา มีการรอดชีวิตของต้นกล้า 100 เปอร์เซ็นต์ และการฉายรังสีแกมมากับเมล็ดพบต้นรอดชีวิตเฉพาะปริมาณ 150 เกรย์ และ 300 เกรย์ จำนวน 18 ต้น (11.53 เปอร์เซ็นต์) และจำนวน 2 ต้น (1.28 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ส่วนรังสีแกมมาปริมาณ 450 เกรย์ และ 600 เกรย์ ต้นพริกไม่มีการรอดชีวิต และ ค่า LD₅₀ ในงานทดลองนี้ คือ 105 เกรย์ การเจริญเติบโตของพริกที่ 120 วันหลังการย้ายปลูก พบว่า ต้นพริกทั้ง 20 ต้น มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันทั้งความสูงของต้น เส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่ม เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น ความกว้างใบ ความยาวใบ จำนวนใบต่อต้น จำนวนดอกต่อต้น จำนวนผลต่อต้น น้ำหนักผลผลิตต่อต้น ตลอดจนลักษณะคุณภาพ ได้แก่ น้ำหนักสดต่อผล ความกว้างผล ความยาวผล สีผล และจำนวนเมล็ด และทำการคัดเลือกพริกจำนวน 6 ต้น จากพริกที่ฉายรังสีแกมมา 150 เกรย์ จำนวน 4 ต้น คือ G150/6, G150/8, G150/11 และ G150/13 และที่ฉายรังสีแกมมา 300 เกรย์ จำนวน 2 ต้น คือ G300/1 และ G300/2 จากนั้นปลูกทดสอบการแสดงออกด้านฟีโนไทป์ของประชากรรุ่น M₁ เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ฉายรังสีแกมมา

(ชุดควบคุม) สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ จำนวนต้นที่มีค่าพีโนไทป์มากกว่าชุดควบคุม และจำนวนต้นที่มีค่าพีโนไทป์น้อยกว่าชุดควบคุม และจากการทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD จำนวน 3 ไพรเมอร์ พบว่า มี 3 ไพรเมอร์ (OPA-12, OPJ-01 และ OPAB-20) แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ จึงนำไปทดสอบกับประชากรรุ่น M_0 และประชากรรุ่น M_1 พบว่า ประชากรรุ่น M_0 จำนวน 20 ต้น ไพรเมอร์ OPA-12 แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกับชุดควบคุมที่ดีเอ็นเอขนาด 2,000 bp จำนวน 13 ต้น (65 เปอร์เซ็นต์) ไพรเมอร์ OPJ-01 แสดงที่ขนาด 1,600 bp จำนวน 11 ต้น (55 เปอร์เซ็นต์) และไพรเมอร์ OPAB-20 แสดงที่ขนาด 1,400 bp จำนวน 3 ต้น (15 เปอร์เซ็นต์) เมื่อทำการทดสอบกับประชากรรุ่น M_1 ของสายต้นที่ได้คัดเลือกไว้ทั้งหมด 91 ต้น พบว่า ไพรเมอร์ OPA-12 แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างขนาด 2,000 bp ไพรเมอร์ OPJ-01 แสดงที่ขนาด 1,600 bp และไพรเมอร์ OPAB-20 แสดงที่ขนาด 1,400 bp และ 900 bp จากนั้นเปรียบเทียบความสัมพันธ์กับการแสดงออกด้านพีโนไทป์และจีโนไทป์ของประชากรรุ่น M_1 นี้ พบว่า ไพรเมอร์ RAPD ทั้ง 3 ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบ สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้ แต่ยังไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะพีโนไทป์และจีโนไทป์ของพริกที่เกิดขึ้นได้

คำสำคัญ : พริก, รังสีแกมมา, การรอดชีวิต, ลักษณะสัณฐานวิทยา, เทคนิคทางชีวโมเลกุล

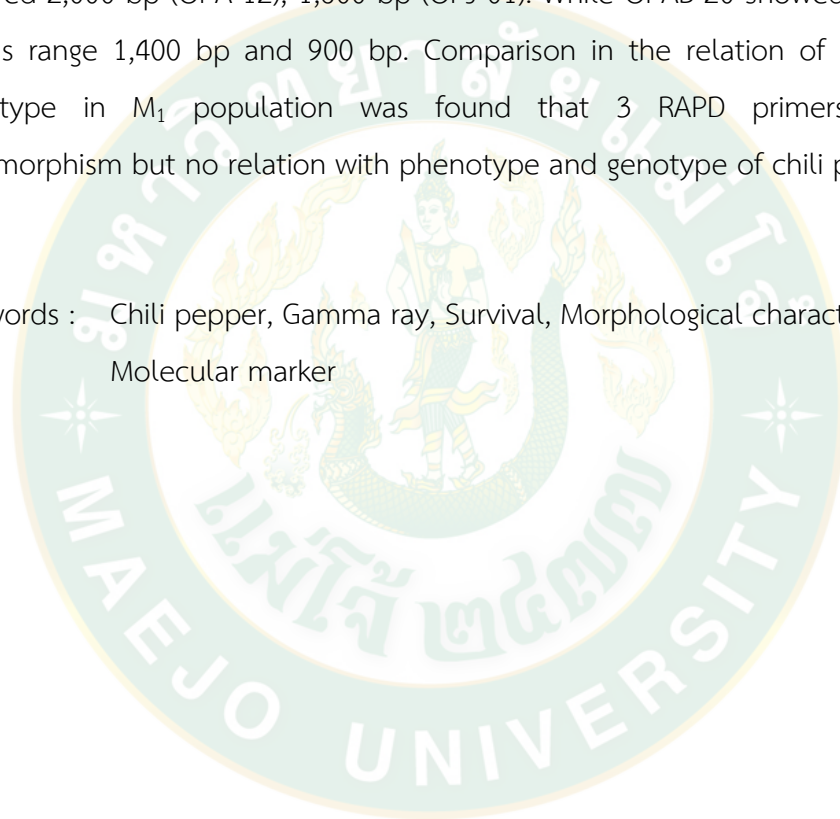
Title	EFFECT OF GAMMA IRRADIATION ON CHILI PEPPER (<i>Capsicum</i> spp.)
Author	Miss Monthida Thisawech
Degree	Master of Science in Horticulture
Advisory Committee Chairperson	Assistant Professor Dr. Orapin Saritnum

ABSTRACT

Chili pepper (*Capsicum* spp.) is an important commercial crop and widely consumed. Induced mutagenesis is a great potential tool for plant improvement through creating new characters among the existing commercial variation. This study was aimed to determine the effect of gamma irradiation on seed germination, survival, morphological characteristic and genetic variation using molecular technique. The result showed in effect of the dosage of gamma irradiation at 0, 150, 300, 450 and 600 Gy on seed germination time that non-irradiation was 5.67 days after sowing faster than irradiated seed (8.33-11.67 days after sowing). At 2 weeks and 3 weeks after sowing, the seed germination percentage decreased significantly comparing with control. The average of seed germination in the gamma treatment at 150, 300, 450 and 600 Gy were 55.13-57.69%, 71.15-76.92%, 55.77-87.17%, and 73.08-75.64%, respectively. Survival percentage in gamma irradiation at 8 weeks after sowing was decreased significantly comparing with control (100%). Gamma dose 150 Gy and 300 Gy had 18 plants (11.53%) and 2 plants (1.28%), respectively. While the gamma ray in 450 Gy and 600 Gy could not survival. Lethal dose 50% of population (LD_{50}) was 105 Gy. Morphological characteristics of chili pepper plants at mature stage (120 days after transplanting) were different in height, diameter of canopy, diameter of stem, leaf width, leaf length, number of leaves per plant, number of flowers per plant, number of fruits per plant, yield as well as fruit quality in fresh weigh per fruit, fruit width, fruit length, fruit color and number of seed. Six chili pepper plants including with 4 plants in 150 Gy (G150/6, G150/8, G150/11 and G150/13) and 2 plants in 300 Gy (G300/1 and

G300/2) were selected. The phenotype of M_1 population were divided into 2 groups; the number of plants that had phenotype higher than the control and those that had phenotype lower than the control. The genetic variation with 30 RAPD primers to test in M_0 and M_1 population was found that 3 primers showed polymorphic band (OPA-12, OPJ-01 and OPAB-20). M_0 plants showed DNA fragment was 2,000 bp (13 plants, 65%) with OPA-12, 1,600 bp in OPJ-01 (11 plants, 55%) and 1,400 bp in OPAB-20 (3 plants, 15%). The polymorphic band in M_1 selected line, 91 plants showed 2,000 bp (OPA-12), 1,600 bp (OPJ-01). While OPAB-20 showed 2 polymorphic bands range 1,400 bp and 900 bp. Comparison in the relation of phenotype and genotype in M_1 population was found that 3 RAPD primers showed the polymorphism but no relation with phenotype and genotype of chili pepper.

Keywords : Chili pepper, Gamma ray, Survival, Morphological characteristic, Molecular marker



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรพินธุ์ สฤกษ์ดีนำ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ ดร.ประพนอม ยงค์คำมัน อาจารย์ ดร.สุรีย์พร สราภิรมย์ และ อาจารย์ ดร.กิตติคุณ พระกระจ่าง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา เสนอแนะ และให้ความช่วยเหลือการเริ่มต้นการวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์นพดล จรัสสัมฤทธิ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สนับสนุน และให้คำปรึกษาตลอดช่วงการศึกษา

ขอขอบคุณ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรมที่สนับสนุนทุนการศึกษาและวิจัย

ขอขอบคุณ ทุนศิษย์ก้านกฐิ และขอขอบคุณ โครงการพัฒนาหน่วยวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาเพื่อการสร้างนวัตกรรมด้านการเกษตรของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้สนับสนุนทุนการศึกษาและวัสดุในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ สาขาวิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร และสาขาฟิสิกส์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์เครื่องมือในการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่น้อง เพื่อนนักศึกษาปริญญาโทสาขาวิชาพืชสวน ที่สนับสนุนและให้กำลังใจเสมอมา สุดท้ายนี้ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดวิชาความรู้ให้คำแนะนำจนสามารถจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จได้

มลธิดา ธิศาเวช

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
สารบัญตารางภาคผนวก.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	2
ขอบเขตการศึกษา.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสาร.....	3
ลักษณะทั่วไป และถิ่นกำเนิดของพริก.....	3
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์.....	5
การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์.....	7
สารก่อกลายพันธุ์ (mutagen หรือ mutagenic agent).....	8
วิธีการเหนี่ยวนำให้พืชมีการเปลี่ยนแปลงด้วยรังสีแกมมา.....	9
การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เมื่อได้รับรังสี.....	9
วิธีการฉายรังสีแกมมากับเมล็ดพืช และการกำหนดปริมาณรังสีที่ใช้.....	11
เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช.....	11

การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ (genomic DNA).....	14
การวัดปริมาณและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ	15
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน.....	18
สถานที่ทำการทดลอง	18
วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี	18
วิธีการทดลอง	19
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล.....	24
การทดลองที่ 1 การศึกษาปริมาณของการฉายรังสีแกมมาสำหรับเมล็ดพริก	24
การทดลองที่ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของพริกที่ถูกชักนำโดยการฉายรังสีแกมมา	27
การทดลองที่ 3 การตรวจสอบรูปแบบทางพันธุกรรมของพริกที่ฉายรังสีแกมมาโดยใช้เทคนิคทาง ชีวโมเลกุล	42
วิจารณ์ผลการทดลอง	55
บทที่ 5 สรุปผล และข้อเสนอแนะ	60
บรรณานุกรม.....	62
ภาคผนวก.....	69
ประวัติผู้วิจัย.....	73

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของสารใน 1 ปฏิกริยา	23
ตารางที่ 2 ปฏิกริยา PCR	23
ตารางที่ 3 ผลของการฉายรังสีแกมมาต่อระยะเวลาในการงอกของเมล็ด การงอกของเมล็ด และ การรอดชีวิตของต้นกล้า	24
ตารางที่ 4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของพริกที่ฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M_0 ระยะเก็บเกี่ยว 120 วันหลังการย้ายปลูก	29
ตารางที่ 5 ลักษณะคุณภาพผลของพริกที่ฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M_0 ที่ระยะเก็บเกี่ยว 120 วันหลังการย้ายปลูก	32
ตารางที่ 6 การแสดงออกด้านฟีโนไทป์ของพริกที่ฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M_1 ต้น G150/6..	36
ตารางที่ 7 การแสดงออกด้านฟีโนไทป์ของพริกที่ฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M_1 ต้น G150/8..	37
ตารางที่ 8 การแสดงออกด้านฟีโนไทป์ของพริกที่ฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M_1 ต้น G150/11	38
ตารางที่ 9 การแสดงออกด้านฟีโนไทป์ของพริกที่ฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M_1 ต้น G150/13	39
ตารางที่ 10 การแสดงออกด้านฟีโนไทป์ของพริกที่ฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M_1 ต้น G300/1	40
ตารางที่ 11 การแสดงออกด้านฟีโนไทป์ของพริกที่ฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M_1 ต้น G300/2	41
ตารางที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบผลของฟีโนไทป์กับจีโนไทป์ของประชากรรุ่น M_1	50

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของ <i>Capsicum</i> spp.....	6
ภาพที่ 2 ผลกระทบทางตรงและทางอ้อมของรังสีกับนิวคลีโอไทด์	10
ภาพที่ 3 หลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR.....	13
ภาพที่ 4 ปริมาณรังสีแกมมาที่ทำให้ถึงความตาย 50% (LD ₅₀)	26
ภาพที่ 5 ลักษณะต้นกล้าพริกที่ฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ ที่ 8 สัปดาห์หลังการเพาะเมล็ด.....	26
ภาพที่ 6 ลักษณะต้นกล้าพริกที่มีการงอกผิดปกติหลังได้รับการฉายรังสีแกมมา	27
ภาพที่ 7 ตัวอย่างต้นพริกในประชากรรุ่น M ₀ ที่ระยะการเก็บเกี่ยว 120 วันหลังการย้ายปลูก	28
ภาพที่ 8 ตัวอย่างผลพริกในประชากรรุ่น M ₀ ที่ระยะเก็บเกี่ยว 120 วันหลังการย้ายปลูก	31
ภาพที่ 9 ผลการคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD กับไพรเมอร์ OPA-12	42
ภาพที่ 10 ผลการคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD กับไพรเมอร์ OPJ-01.....	43
ภาพที่ 11 ผลการคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD กับไพรเมอร์ OPAB-20.....	43
ภาพที่ 12 ผลการทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD ในพริกประชากรรุ่น M ₀ กับ ไพรเมอร์ OPA-12	44
ภาพที่ 13 ผลการทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD ในพริกประชากรรุ่น M ₀ กับ ไพรเมอร์ OPJ-01	45
ภาพที่ 14 ผลการทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD ในพริกประชากรรุ่น M ₀ กับ ไพรเมอร์ OPAB-20	45
ภาพที่ 15 รูปแบบการแสดงออกทางพันธุกรรมของพริกประชากรรุ่น M ₁ กับไพรเมอร์ OPA-12	47
ภาพที่ 16 รูปแบบการแสดงออกทางพันธุกรรมของพริกประชากรรุ่น M ₁ กับไพรเมอร์ OPJ-01	48
ภาพที่ 17 รูปแบบการแสดงออกทางพันธุกรรมของพริกประชากรรุ่น M ₁ กับไพรเมอร์ OPAB-20..	49

สารบัญตารางภาคผนวก

หน้า

ตารางภาคผนวกที่ 1 การเตรียมสารละลาย 2X CTAB buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร	70
ตารางภาคผนวกที่ 2 การเตรียมสารละลาย 1X TE buffer pH 8.0 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร	70
ตารางภาคผนวกที่ 3 การเตรียมสารละลาย 5M NaCl ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร	70
ตารางภาคผนวกที่ 4 การเตรียมสารละลาย 0.5M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร	70
ตารางภาคผนวกที่ 5 การเตรียมสารละลาย 1M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร	71
ตารางภาคผนวกที่ 6 การเตรียมสารละลาย 50X TAE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร	71
ตารางภาคผนวกที่ 7 การเตรียมสารละลาย 1X TAE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร.....	71
ตารางภาคผนวกที่ 8 การเตรียมสารละลาย 1% Agarose gel ปริมาตร 100 มิลลิลิตร	71
ตารางภาคผนวกที่ 9 การเตรียมสารละลาย Master mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา	71
ตารางภาคผนวกที่ 10 RAPD primers ที่ใช้ในการทดลองจำนวน 30 ไพรเมอร์.....	72

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญของปัญหา

พริก (*Capsicum spp.*) อยู่ในวงศ์ Solanaceae เป็นพืชผักที่สำคัญทางเศรษฐกิจพืชหนึ่งในประเทศไทยนิยมปลูกกันอย่างแพร่หลาย สามารถสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรอย่างมาก โดยประเทศไทยมีศักยภาพในการผลิตพริก เนื่องจากมีพื้นที่เหมาะสมสามารถปลูกพริกได้ตลอดทั้งปี เป็นที่ต้องการทั้งตลาดภายในและต่างประเทศ มีการส่งออกเมล็ดพันธุ์ไปยังต่างประเทศในปี 2562 มูลค่ากว่า 782 ล้านบาท (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2562) โดยมีการนำพริกไปใช้ประโยชน์ในหลายด้าน เช่น ประยุกต์รสชาติของอาหาร และยารักษาโรค (พืทยา, 2551) การปรับปรุงพันธุ์พริกเพื่อให้รองรับกับความต้องการของตลาดในลักษณะที่แตกต่างกันทั้งรูปร่าง สี สัน หรือคุณสมบัติต่างๆ ให้มีความหลากหลายตรงความต้องการจึงเป็นสิ่งสำคัญ และมีการพัฒนาลักษณะใหม่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง (สุชีลา, 2557) เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พริกมีหลายวิธี หนึ่งในขั้นตอนที่มีการนำมาใช้คือการทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี หรือรังสี (นพพร, 2546) การเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยใช้รังสี นิยมใช้รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา และรังสีนิวตรอน ซึ่งรังสีแกมมานิยมใช้มากที่สุด รังสีแกมมาเป็นหนึ่งในสารก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพที่ใช้ในการกระตุ้นให้เกิดประโยชน์ตลอดจนทำให้เกิดผลกระทบกับเซลล์ในพืชหลายชนิด (สิรินุช, 2540) โดยการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในเซลล์และเนื้อเยื่อพืช ด้านชีวเคมี สรีรวิทยา และพันธุศาสตร์ (Verma *et al.*, 2017) มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับผลของการใช้รังสีแกมมากับการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่างๆ เช่น ลักษณะด้านทานโรค ทนต่อสภาพความเค็ม และเพิ่มคุณภาพผลผลิต (Kiong *et al.*, 2008) จึงมีการใช้เทคนิคดังกล่าวอย่างมากในทางการเกษตร (Minisi *et al.*, 2013) และเพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมพริกที่ฉายรังสีแกมมา ปัจจุบันนักปรับปรุงพันธุ์มีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพมาช่วยในการคัดเลือกพืช โดยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์หรือความแตกต่างของสายพันธุ์ (Pal and Singh, 2013) ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการช่วยคัดเลือกในบางลักษณะที่อาจรับอิทธิพลจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม (Bahurupe *et al.*, 2013) เครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมใช้ได้แก่ RFLP, AFLP, RAPD และ SSR (Tilahun *et al.*, 2013) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของพริกที่ได้รับการฉายรังสีแกมมา และประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพริกที่ได้รับรังสีแกมมาโดยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเก็บไว้เพื่อใช้เป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พริกต่อไป

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

- 1) เพื่อตรวจสอบปริมาณรังสีแกมมาต่ออัตราการรอดชีวิตของพริก
- 2) เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของพริกที่ถูกชักนำโดยรังสีแกมมา
- 3) เพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมในพริกที่เกิดจากการฉายรังสีแกมมาด้วยเทคนิคซีโมเลกุล

ขอบเขตการศึกษา

ในการศึกษาใช้เมล็ดพันธุ์พริกลูกผสม เพื่อศึกษาปริมาณรังสีแกมมาสำหรับเมล็ดพริก ลักษณะสัณฐานวิทยาของพริกที่ถูกชักนำโดยรังสีแกมมา และตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของพริกที่ได้รับรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M_0 และประชากรรุ่น M_1

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลที่ได้ในด้านสัณฐานวิทยา และความหลากหลายของพริกที่ถูกชักนำด้วยรังสีแกมมาจะเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พริกต่อไป



บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

ลักษณะทั่วไป และถิ่นกำเนิดของพริก

พริกเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ อยู่ในวงศ์ Solanaceae ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับมะเขือเทศ (กองบรรณาธิการเฉพาะกิจฐานเกษตรกรรม, 2531) มีแหล่งกำเนิดในแถบอเมริกาใต้ ประเทศเม็กซิโก มนุษย์ใช้ประโยชน์จากพริกในการเป็นพืชเครื่องเทศมานานกว่า 9,000 ปีมาแล้ว ชนิดที่ถูกเผยแพร่ไปมากที่สุด คือ *Capsicum annuum* และ *Capsicum frutescens* (พิทยา, 2551) ในปัจจุบันพริกมีการปลูกทั่วไปในพื้นที่ต่างๆ ของโลก แต่มีสายพันธุ์ที่แตกต่างกันไปจึงมีการจำแนกพันธุ์พริกโดยนิยมใช้ลักษณะรูปร่าง สีสัณ และขนาดผลเป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนก การจัดจำแนกพริกพันธุ์ปลูก โดยใช้ลักษณะที่แตกต่างกันของต้น ดอกและผล สามารถแบ่งพริกออกได้เป็น 5 กลุ่ม คือ *Capsicum annuum* L., *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum frutescens* L., และ *Capsicum pubescens* (Dewitt and Bosland, 2009)

1. กลุ่ม *Capsicum annuum* L. เป็นพริกที่นิยมปลูกกันอย่างแพร่หลายทั่วโลก มีถิ่นกำเนิดในบริเวณตอนใต้ของอเมริกาเหนือ และตอนเหนือของอเมริกาใต้ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งทรงต้น รูปร่างผล สีผล ความเผ็ด ตลอดจนการเจริญเติบโตทั้งแบบล้มลุก และแบบยืนต้น มีลักษณะเด่น คือ กลีบดอกมีสีขาว สีมี่ทั้งสีเขียว สีเหลือง และสีแดง สามารถเจริญเติบโตได้ดีในเกือบทุกสภาพแวดล้อม เช่น พริกหยวก พริกชี้ฟ้า และพริกชี้หนูผลใหญ่

2. กลุ่ม *Capsicum baccatum* เป็นพริกที่ชาวสเปนนำไปเผยแพร่สู่บริเวณอเมริกากลางถึงอเมริกาใต้ มีลักษณะเด่น คือ กลีบดอกมีสีขาวครีม มีจุดสีเหลืองหรือน้ำตาลตรงโคนดอก มีรูปร่างผลที่ค่อนข้างแตกต่างกับพริกพันธุ์ปลูกทั่วไป ผลมักขี้ล่งและมีกลิ่นฉุน เช่น พันธุ์ Bishop's Crown และพันธุ์ Aji peruano

3. กลุ่ม *Capsicum chinense* Jacq. เป็นพริกพื้นเมืองของอเมริกา มีทั้งผลใหญ่ และผลเล็ก โดยผลเล็กมีรสเผ็ดจัด มีลักษณะเด่นคล้ายกับกลุ่ม *Capsicum frutescens* L. แต่แตกต่างกันตรงรอยคอดบริเวณรอยต่อของกลีบเลี้ยงกับก้านดอก ส่วนใหญ่มี 2 ดอกเกิดบนช่อเดียวกันและมีความเผ็ดสูงที่สุดในโลก เช่น พันธุ์ Habanero พันธุ์ Bhut Jolokia และพันธุ์ Scotch Bonnet

4. กลุ่ม *Capsicum frutescens* L. เป็นพริกพันธุ์ที่นิยมปลูกในเม็กซิโก อเมริกากลาง และอเมริกาใต้มีลักษณะเด่น คือ ออกดอกและผลเป็นทั้งแบบเดี่ยว แบบคู่ หรือ 3-6 ดอกบนช่อเดียวกัน กลีบดอกมีสีเหลืองอมเขียวจนถึงสีขาวอมเขียว ส่วนใหญ่ผลมีขนาดเล็ก พันธุ์ที่รู้จักกันคือ พริกชี้หนูสวน และพริกกะเหรี่ยง

5. กลุ่ม *Capsicum pubescens* พบในอเมริกากลาง และอเมริกาใต้ เป็นพันธุ์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่เขตนานสูงเหนือระดับน้ำทะเลประมาณ 1,500-3,000 เมตร ลักษณะเด่นของพริกในกลุ่มนี้จะออกดอก และผลทั้งแบบเดี่ยวและคู่ หรือไม่เกิด 4 ดอกบนข้อเดียวกัน กลีบดอกมีสีม่วงอมน้ำเงิน ตรงโคนกลางกลีบดอกมีสีขาว อับเรณูมีสีม่วงปนขาว เช่น พันธุ์ Rocoto

นอกจากการจำแนกจากการใช้ลักษณะต้น ดอก และผลเป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกแล้ว ในพริกยังพบว่ามีสารที่สำคัญที่ทำให้พริกมีคุณลักษณะที่ต่างกันคือ สารแคโรทีนอยด์ (carotenoid) เป็นส่วนที่ทำให้พริกมีสี และมีคุณค่าอาหาร และสารแคปไซซินอยด์ (capsaicinoid) คือ สารแคปไซซิน (capsaicin) ซึ่งเป็นสารกลุ่มหลักที่กำหนดความเผ็ดของพริก โดยความเผ็ดเป็นคุณภาพที่สำคัญเกี่ยวข้องกับสายพันธุ์ สภาพแวดล้อม และการดูแล (Zewdie and Bosland, 2000) ความเผ็ดของพริกขึ้นอยู่กับปริมาณสารแคปไซซินในผลส่วนใหญ่จะอยู่ในบริเวณเยื่อแกนกลางสีขาวเรียกว่า รก (อภัย, 2557) โดยความเผ็ดสามารถแบ่งระดับความเผ็ดตามหน่วย Scoville Heat Unit (SHU) การจำแนกพริกตามความเผ็ดนี้ พริกที่มีสารแคปไซซินอยู่ร้อยละ 1 ของน้ำหนักเป็นพริกที่มีความเผ็ดสูงสุดหรือมีความเผ็ด 100 เปอร์เซ็นต์เท่ากับ 175,000 สโควิลล์ ส่วนพริกที่มีความเผ็ดน้อยลงไปจะมีสารแคปไซซิน และหน่วยความเผ็ดลดน้อยลงตามลำดับ โดยสามารถแบ่งพริกตามความเผ็ดออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มที่มีความเผ็ดมาก เป็นพริกที่มีความเผ็ดตั้งแต่ 70,000-175,000 สโควิลล์ พริกกลุ่มนี้จะมีผลขนาดเล็ก นำมาใช้สกัดน้ำมันหอมระเหย เนื่องจากมีความเผ็ดสูง ส่วนใหญ่เป็นพริกในกลุ่ม *Capsicum frutescens* L. และ *Capsicum baccatum* (ธำรงค์, 2551)

2. กลุ่มที่มีความเผ็ดปานกลาง เป็นพริกที่มีความเผ็ดตั้งแต่ 35,000-70,000 สโควิลล์ นิยมนำมาผสมกับเครื่องเทศชนิดอื่น มีทั้งลักษณะปน และผลแห้ง พริกที่มีความเผ็ดปานกลางนี้เป็นพริกในกลุ่ม *Capsicum annuum* L. (ธำรงค์, 2551)

3. กลุ่มที่มีความเผ็ดน้อย เป็นพริกที่มีความเผ็ดน้อยกว่า 35,000 สโควิลล์ จนถึงไม่มีความเผ็ด (0 สโควิลล์) ผลมีขนาดใหญ่ ทรงผลกลม หรือกลมรี เนื้อหนา นิยมนำมาใช้ทำพริกป่น และเครื่องเทศ แต่งสีส้ม และทำเป็นเครื่องปรุงอาหาร ได้แก่ พริกหยวก พริกหวาน และพริกปาปริกา (ธำรงค์, 2551)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

พริกมีจำนวนโครโมโซม $2n=24$ เป็นพืชที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในลักษณะพืชผสมตัวเองตามธรรมชาติ แต่มีอัตราการผสมข้ามสูง 9-68 เปอร์เซ็นต์ มีแมลงและลมเป็นพาหะ (จานุลักษณ์, 2541)

ราก ระบบรากของพริกมีรากแก้ว ต้นพริกที่โตเต็มที่รากฝอยจะแพร่ออกไปด้านข้างมีรัศมีเกินกว่า 1.20 เมตร รากฝอยพบอยู่อย่างหนาแน่นบริเวณรอบๆ ต้นใต้ดินลึกประมาณ 60 เซนติเมตร (ปรีชญา, 2551)

ลำต้นและกิ่ง ลำต้นพริกตั้งตรง สูงประมาณ 1-2 ฟุต มีการเจริญเติบโตของกิ่งจากลำต้นเพียง 1 กิ่ง แล้วแตกออกเป็น 2 กิ่ง และเพิ่มเป็น 4 กิ่ง 8 กิ่ง 16 กิ่ง ไปเรื่อยๆ และมักพบต้นพริกที่สมบูรณ์จะมีกิ่งแตกขึ้นมาจากต้นที่ระดับดินหลายกิ่ง จนดูคล้ายกับว่ามีหลายต้นรวมอยู่ที่เดียวกัน ทั้งลำต้นและกิ่งนั้นในระยะแรกจะเป็นไม้เนื้ออ่อน แต่เมื่ออายุมากขึ้นกิ่งก็จะยิ่งแข็งมากขึ้น (ปรีชญา, 2551)

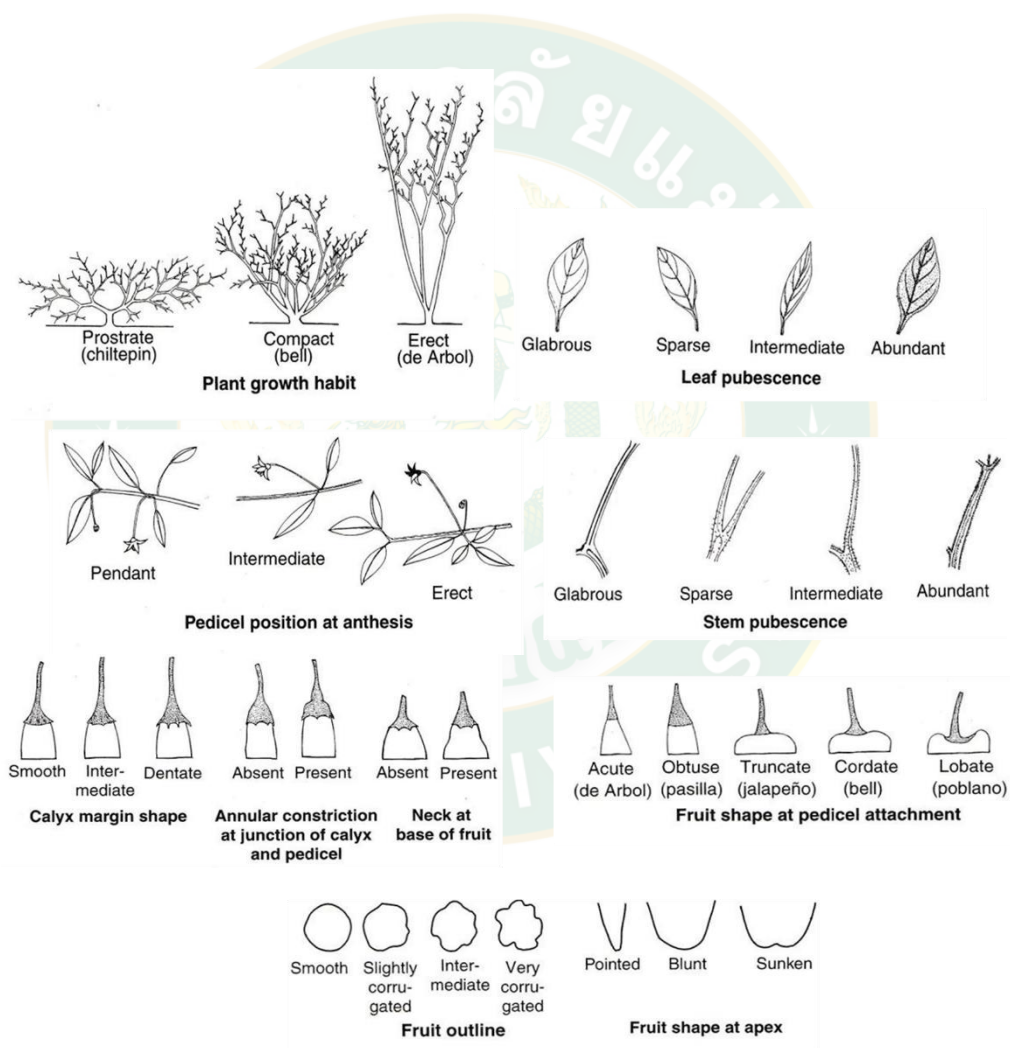
ใบ พริกเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ เป็นแบบใบเดี่ยว มีลักษณะแบนเรียบผิวมัน มีขนเล็กน้อย ใบมีรูปร่างตั้งแต่รูปไข่ไปจนถึงเรียวยาว มีขนาดแตกต่างกันไป ใบของพริกหวานมีขนาดค่อนข้างใหญ่ ส่วนใบพริกชี้หูทั่วไปมีขนาดเล็ก แต่ในระยะเป็นต้นกล้าและใบที่ตำแหน่งล่างของต้นโตเต็มที่จะมีขนาดค่อนข้างใหญ่ (ปรีชญา, 2551)

ดอก ดอกของพริกมีลักษณะเป็นดอกสมบูรณ์เพศ คือมีเกสรเพศผู้ และเกสรเพศเมียอยู่ในดอกเดียวกัน ปกติเป็นดอกเดี่ยว แต่อาจพบมีหลายดอกเกิดตรงจุดเดียวกันได้ ดอกเกิดที่ข้อตรงมุมที่เกิดใบ หรือกิ่งก้านดอกอาจตรงหรือโค้ง ส่วนประกอบของดอกประกอบด้วย กลีบรองดอก 5 พู กลีบดอกสีขาว 5 กลีบ แต่บางพันธุ์อาจมีสีม่วงและอาจมีกลีบดอกตั้งแต่ 4-7 กลีบ มีเกสรเพศผู้ 5 อัน ซึ่งแตกต่างจากตรงโคนของชั้นกลีบดอก อับเกสรเพศผู้มีสีน้ำเงิน แยกตัวเป็นกระเปาะเล็กๆ เกสรเพศเมียชูสูงขึ้นเหนือเกสรเพศผู้ รังไข่มี 3 พู แต่อาจพบได้ตั้งแต่ 2-4 พู (ปรีชญา, 2551)

ผล เป็นผลเดี่ยว มีลักษณะเป็นกระเปาะ มีฐานขั้วผลสั้น และหนา โดยปกติผลอ่อนมักชี้ขึ้นเมื่อเป็นผลแก่พันธุ์ที่มีลักษณะขั้วผลอ่อนจะให้ผลที่ห้อยลง แต่บางพันธุ์ทั้งผลอ่อน และผลแก่ชี้ขึ้น ผลมีลักษณะทั้งแบน กลม ยาว จนถึงอ้วนสั้น ขนาดของผลมีตั้งแต่ขนาดเล็กไปจนกระทั่งมีผลใหญ่ ผงังผลมีตั้งแต่บางจนถึงหนาขึ้นอยู่กับพันธุ์ ผลอ่อนมีทั้งสีเหลืองอ่อน สีเขียวอ่อน สีเขียวเข้ม และสีม่วง เมื่อผลสุกอาจเปลี่ยนเป็นสีแดง ส้ม หรือเหลือง พร้อมกับการแก่ของเมล็ดในผลควบคู่กันไป ผลพริกมีความเผ็ดแตกต่างกันตั้งแต่ความเผ็ดมากจนถึงไม่มีความเผ็ด ฐานของผลอาจแบ่งเป็น 2-4 ห้อง เห็นได้ชัดเจนในพริกหวาน แต่พริกที่มีผลขนาดเล็กอาจสังเกตได้ยากและบางพันธุ์เหมือนว่า

ภายในผลมีเพียงห้องเดียว เมล็ดจะเกิดขึ้นและเกาะรวมกันอยู่ที่รก ซึ่งมีตั้งแต่โคนจนถึงปลายผลในระหว่างการเจริญเติบโตของผล (ปรัชญา, 2551)

เมล็ด เมล็ดพริกมีขนาดค่อนข้างใหญ่กว่าเมล็ดมะเขือเทศ แต่มีรูปร่างที่คล้ายกัน คือ มีรูปร่างกลมแบน มีสีเหลืองไปจนถึงสีน้ำตาล ผิวเรียบ ผิวไม่ค่อยมีขนเหมือนเมล็ดมะเขือเทศ มีร่องลึกอยู่ทางด้านหนึ่งของเมล็ด เมล็ดจะติดอยู่กับรก โดยเฉพาะทางด้านฐานของผลพริก เมล็ดจะติดอยู่มากกว่าปลายผล สำหรับจำนวนของเมล็ดต่อผลพริก 1 ผลจะไม่แน่นอน เมล็ดพริกมีชีวิตอยู่ได้นานประมาณ 2-4 ปี (ภาพที่ 1) (ปรัชญา, 2551)



ภาพที่ 1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของ *Capsicum* spp.

ที่มา : Bosland and Votava, 2012

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

การกลาย หรือการกลายพันธุ์ หมายถึง การเปลี่ยนแปลงทุกชนิดที่เกิดขึ้นกับสารพันธุกรรม (genetic material) หรือดีเอ็นเอ (DNA) ในเซลล์ ซึ่งไม่ได้เกิดจากการรวมตัว (recombination) หรือ การแยกตัว (segregation) ของสารพันธุกรรมปกติ และสามารถถ่ายทอดลักษณะการเปลี่ยนแปลงนั้นๆ จากเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปยังเซลล์ลูกได้ด้วยกระบวนการแบ่งเซลล์ (อรุณี, 2550) การกลายเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางพันธุกรรม (gene mutation) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม (chromosomal aberration) และการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม (polyploidy) ที่เกิดขึ้นอย่างใดอย่างหนึ่งหรือหลายอย่างรวมกันได้โดยมีวัตถุประสงค์ของการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อสร้างลักษณะดีใหม่ๆ ที่ยังไม่พบในสภาพธรรมชาติให้เกิดขึ้นในระยะเวลาอันรวดเร็ว (บุญหงส์, 2548)

1. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยีน (gene mutation) เกิดจากการเปลี่ยนของยีนจากอัลลีลหนึ่งเป็นอัลลีลหนึ่ง เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ในดีเอ็นเอ เช่น เบสในกลุ่มพิวรีน (purine) คือ Adenine (A) และ Guanine (G) ตัวใดตัวหนึ่งเข้าแทนที่เบสตัวอื่นในกลุ่มพิวรีนเช่นกัน หรือ การเข้าแทนที่ของเบสต่างกลุ่ม เช่น เบสกลุ่มพิวรีนเข้าแทนที่เบสในกลุ่มไพริมิดีน (pyrimidine) คือ Cytosine (C) และ Thymine (T) จากการเปลี่ยนแปลงนี้ทำให้ลำดับเบสบน mRNA เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (นพพร, 2546)

2. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม (chromosomal aberration) โดยเกิดในลักษณะการขาดหายไปของส่วนโครโมโซม (deficiency) หรือการเพิ่มเข้ามาบางส่วนของโครโมโซม (duplication) หรือการที่โครโมโซมหักและกลับเข้ามาต่อในสภาพกลับทิศทางจากเดิม (inversion) หรืออาจเกิดการสลับตำแหน่งกันของชิ้นส่วนโครโมโซม (translocation) (นพพร, 2546)

2.1 การขาดหายไปของส่วนโครโมโซม (deficiency) คือ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซม เนื่องจากชิ้นส่วนของโครโมโซมขาดหายไป การขาดหายไปนี้อาจเกิดกับโครโมโซมแท่งเดียว หรือโครโมโซมทั้งสองแท่งที่เป็นคู่กัน (homologous chromosome) ก็ได้

2.2 การเพิ่มเข้ามาบางส่วนของโครโมโซม (duplication) คือ การเปลี่ยนรูปร่างของโครโมโซม เนื่องจากชิ้นส่วนของโครโมโซมเกินจากสภาพปกติ โครโมโซมส่วนที่เกินอาจมาจากโครโมโซมที่เป็นคู่กัน หรือจากโครโมโซมต่างคู่ (non-homologous chromosome) และชิ้นส่วนของโครโมโซมที่เกินมาอาจอยู่เป็นอิสระ โดยไม่ได้เชื่อมต่อกับโครโมโซมใดๆ พืชมีชิ้นส่วนของโครโมโซมเกิดแบบนี้จะมีโอกาสเจริญให้ผลผลิต และขยายพันธุ์ได้มากกว่าเมื่อมีชิ้นส่วนของโครโมโซมขาดหายไป

2.3 การกลับเข้ามาต่อในสภาพกลับทิศทางจากเดิม (inversion) คือ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซม เนื่องจากมีชิ้นส่วนของโครโมโซมขาดออกและกลับมาต่อกันใหม่แบบสลับด้าน ซึ่งมีผลทำให้การเรียงลำดับของยีนบนโครโมโซมผิดไปจากเดิม ในกรณีที่เกิดการเปลี่ยนแปลงกับโครโมโซมทั้งคู่ เซลล์นั้นก็ยังคงแบ่งตัวให้เซลล์สืบพันธุ์ได้ตามปกติ แต่จะมีปัญหาในเซลล์ที่นิวเคลียสเกิดจากการรวมตัวระหว่างนิวเคลียสดังกล่าวกับนิวเคลียสที่แบ่งตัวตามปกติ

2.4 การสลับตำแหน่งของชิ้นส่วนโครโมโซม (translocation) คือ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซม เนื่องจากมีชิ้นส่วนของโครโมโซมหนึ่งขาดออกไปต่อกับโครโมโซมต่างคู่กัน หรือเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมต่างคู่กัน ซึ่งส่งผลให้การแบ่งเซลล์ต่อไปผิดปกติ

3. การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม (polyploidy) โดยอาจเพิ่มขึ้นเป็น 2 หรือหลายเท่า ซึ่งทำให้พืชมีขนาดใหญ่ขึ้น หรือลดลงเหลือครึ่งหนึ่ง (n) ซึ่งสามารถนำไปเพิ่มโครโมโซมเป็น 2 เท่า ($2n$) เพื่อสร้างสายพันธุ์แท้ หรือสายพันธุ์บริสุทธิ์ได้ (นพพร, 2546)

สารก่อกลายพันธุ์ (mutagen หรือ mutagenic agent)

สารก่อกลายพันธุ์ที่นิยมนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชแบ่งเป็น 2 กลุ่มได้แก่ รั้งสี (physical mutagens) และสารเคมี (chemical mutagens)

1. รั้งสี (physical mutagens) ประกอบด้วยอนุภาคขนาดเล็กที่เคลื่อนที่ด้วยความเร็วและแรงขนาดต่างกัน เมื่ออนุภาคดังกล่าวกระทบกับสารพันธุกรรม จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับส่วนของสารพันธุกรรมนั้น ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของลักษณะ และพฤติกรรม การถ่ายทอดลักษณะนั้นๆ เนื่องจากการกระทบเป็นแบบการสุม การใช้รั้งสีจึงมักให้ผลที่แตกต่างกันบ้างในการปฏิบัติแต่ละครั้ง จึงมีคำแนะนำคือควรทำกับพืชจำนวนมากเพื่อเพิ่มโอกาสที่จะพบลักษณะที่พึงประสงค์ รั้งสีที่นำมาใช้แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ แบบก่อก่อไอออน (ionizing radiation) และแบบไม่ก่อก่อไอออน (non-ionizing radiation) (นพพร, 2546)

1.1 แบบก่อก่อไอออน (ionizing radiation) เป็นรั้งสีที่มีอำนาจทะลุทะลวงสูง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับโครโมโซมได้ รั้งสีที่นิยมใช้คือ รั้งสีเอ็กซ์ รั้งสีนิวตรอน และรั้งสีแกมมา

1.2 แบบไม่ก่อก่อไอออน (non-ionizing radiation) เป็นรั้งสีที่มีอำนาจทะลุทะลวงน้อย นิยมใช้รั้งสีอุลตราไวโอเลต (UV)

2. สารเคมี (chemical mutagens) สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยีนมากกว่าโครงสร้างโครโมโซม หรือจำนวนชุดของโครโมโซม สารเคมีที่นิยมใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์คือ โคลชิซิน และอีเอ็มเอส (EMS; ethyl methane sulfonate) (นพพร, 2546)

วิธีการเหนี่ยวนำให้พืชมีการเปลี่ยนแปลงด้วยรังสีแกมมา

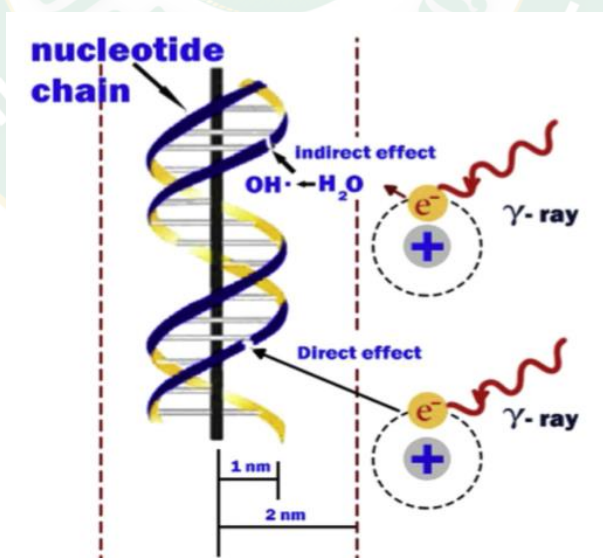
รังสีแกมมา (gamma ray) เป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าชนิดหนึ่ง มีระดับพลังงานตั้งแต่ 10 กิโลอิเล็กตรอนโวลต์จนถึงหลายร้อยอิเล็กตรอนโวลต์ (Kovacs and Keresztes, 2002) มีการแผ่รังสีเป็นแบบก่อกอไอออน มีพลังทะลุทะลวงสูง ความยาวคลื่นสั้น และมีความถี่สูง เป็นรังสีที่มีผลกับอะตอม หรือโมเลกุลในการสร้างอนุมูลอิสระ (free radicals) ภายในเซลล์ โดยอนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถสร้างความเสียหาย หรือทำให้ส่วนประกอบที่สำคัญของพืชมีการเปลี่ยนแปลงได้ในด้านสรีรวิทยา สันฐานวิทยา และชีวเคมี (Jan *et al.*, 2012) ผลกระทบนี้รวมถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ (cellular structure) และเมตาบอลิซึม (metabolism) (Wi *et al.*, 2005) มีการใช้ประโยชน์จากรังสีแกมมาในการปรับปรุงพันธุ์พืช มีข้อดีคือ การใช้งานง่าย สามารถปฏิบัติงานได้สะดวกและปลอดภัย และสามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์สูง (Roslim *et al.*, 2015) นักปรับปรุงพันธุ์พืชนิยมใช้รังสีแกมมาในการเหนี่ยวนำกับพืช รังสีแกมมาสามารถฉายกับตัวอย่างพืชได้ 2 แบบ คือ การฉายแบบเฉียบพลัน (acute irradiation) คือ ให้อัตรา (dose rate) และปริมาณรังสีสูง (total dose) และใช้ระยะเวลาในการฉายสั้น หน่วยเป็นนาทิจหรือชั่วโมง ส่วนที่นำมาฉาย ได้แก่ เมล็ด ท่อนพันธุ์ หรือเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง และการฉายรังสีแบบโครนิก (chronic irradiation) โดยฉายรังสีในปริมาณที่ต่ำ และให้พืชได้รับรังสีนานเป็นสัปดาห์ เดือน หรือปี (อรุณี, 2550)

การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เมื่อได้รับรังสี

เซลล์พืชประกอบด้วยชีวโมเลกุลต่างๆ ที่มีความสำคัญต่อการเป็นโครงสร้างและการทำหน้าที่แตกต่างกันภายในเซลล์ เมื่อเซลล์พืชได้รับรังสี เช่น รังสีเอ็กซ์ หรือรังสีแกมมา รังสีจะถ่ายพลังงานให้กับโมเลกุลของเซลล์ กระบวนการถ่ายพลังงาน ทำให้โมเลกุลที่ได้รับพลังงานแตกตัวเป็นไอออน และอนุมูลอิสระ (free radical) มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลใหม่ที่ทำปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างกันเกิดเป็นโมเลกุลที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างไปจากเดิม รังสีสามารถถ่ายพลังงานให้กับโมเลกุลได้ทั้งแบบทางตรง (direct action) หรือแบบทางอ้อม (indirect action) (ภาพที่ 2) (สิรินุช, 2540) ความเสียหายของเซลล์จากรังสีมีทั้งผลจากทางตรงที่เกิดจากรังสีกระทบกับดีเอ็นเอโดยตรง ทำให้โครงสร้างดีเอ็นเอถูกทำลาย จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างดังกล่าวนำไปสู่การเกิดความเสียหายของเซลล์หรือสามารถทำให้เซลล์ตายได้ ซึ่งเซลล์ที่ได้รับ ความเสียหายแล้วรอดชีวิตอาจเกิดความผิดปกติขึ้น (Desouky *et al.*, 2015) ในผลกระทบทางอ้อม เกิดจากรังสีกระทบกับโมเลกุลของน้ำที่เป็นองค์ประกอบหลักอยู่ภายในเซลล์เป็นจำนวนมาก ส่งผลให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระ

เกิดขึ้น ส่วนใหญ่ความเสียหายของเซลล์ที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากกลไกการกระทำทางอ้อม เพราะถือน้ำเป็นองค์ประกอบหลักเกือบ 70 เปอร์เซ็นต์ขององค์ประกอบในเซลล์ (Saha, 2013)

ผลที่เกิดขึ้นหลังการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์จากรังสีทั้งรังสีแกมมาและรังสีไมก้าไอออน เมื่อใช้ในอัตราที่สูงจะสามารถทำให้สิ่งมีชีวิตตายได้ เมื่อเซลล์ได้รับไอออนและอนุมูลอิสระของออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) พันธะเคมีในดีเอ็นเอจะถูกทำลาย เกิดการแตกหักของโครโมโซม และการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซม (ช่อทิพา, 2560) ถ้าใช้ในอัตราที่ไม่สูงจนเกินไปจะกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตามภายในเซลล์มีกลไกการซ่อมแซมโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เสียหายให้กลับคืนสู่สภาพเดิมได้ (ประดิษฐ์, 2541) ความเสียหายของดีเอ็นเอ ถ้าไม่รุนแรงนักก็จะได้รับการซ่อมแซมให้กลับคืนเป็นปกติ แต่ความสามารถในการแบ่งเซลล์อาจเปลี่ยนไป เช่น เกิดความล่าช้าในการเข้าสู่การแบ่งเซลล์ เกิดการเปลี่ยนแปลงในสารพันธุกรรมที่สามารถส่งต่อไปยังเซลล์ลูกได้ ส่วนดีเอ็นเอที่มีความรุนแรง หรือเป็นความเสียหายชนิดซับซ้อนเซลล์ไม่สามารถซ่อมแซมให้กลับคืนได้จะส่งผลให้เกิดการตายกับเซลล์ขึ้น นอกจากนี้ในกระบวนการซ่อมแซมยังเกิดความผิดพลาดขึ้นได้ เช่น การซ่อมแซมที่นำเอานิวคลีโอไทด์ที่ต่างจากเดิมเข้ามา หรือการเชื่อมต่อผิดพลาดทำให้เกิดการหายไปของดีเอ็นเอ หรือการเชื่อมต่อสลับที่ หรือมีการเชื่อมต่อระหว่างส่วนของดีเอ็นเอที่ต่างโมเลกุลกัน ความผิดพลาดที่เกิดขึ้นนี้นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ที่เรียกว่า การกลายพันธุ์ (สิรินุช, 2536)



ภาพที่ 2 ผลกระทบทางตรงและทางอ้อมของรังสีกับนิวคลีโอไทด์

ที่มา : Desouky *et al.*, 2015

วิธีการฉายรังสีแกมมากับเมล็ดพืช และการกำหนดปริมาณรังสีที่ใช้

เมล็ดเป็นส่วนที่นิยมนำมาฉายรังสี เพราะในการฉายรังสีแต่ละครั้งสามารถทำได้ในปริมาณมาก มีโอกาสที่จะพบต้นที่มีลักษณะเปลี่ยนแปลงสูง นอกจากนี้ ยังง่ายต่อการปฏิบัติ การขนส่ง และเมล็ดมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมในขณะที่ฉายรังสีได้ดีกว่าการใช้ส่วนอื่นแม้ว่าจะต้องใช้ปริมาณรังสีสูงกว่าส่วนอื่นๆ เมล็ดพืชต่างชนิดกันมีความไวต่อรังสีไม่เท่ากัน ซึ่งสาเหตุที่พืชมีความไวต่อรังสีต่างกันเนื่องจาก สภาพแวดล้อม และลักษณะทางชีววิทยาของเมล็ด (นพพร, 2546)

พืชแต่ละชนิดมีความไวต่อรังสี (radio sensitivity) แตกต่างกัน ลักษณะความไวหรือต้านทานต่อรังสีขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ลักษณะต้านทานหรือไวต่อรังสีส่วนหนึ่งควบคุมด้วยยีนสามารถถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์ได้ การพิจารณาใช้รังสีในปริมาณที่เหมาะสม วิธีการเริ่มด้วยการนำเมล็ดพืชมาฉายรังสีในปริมาณต่างกัน ตั้งแต่ปริมาณต่ำจนถึงปริมาณรังสีที่สูงมาก นำเมล็ดไปปลูกและหาเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของต้นกล้าที่ปริมาณรังสีต่างกัน คิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์กับต้นที่ไม่ได้รับรังสีเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ หาค่าความสัมพันธ์ของปริมาณรังสีกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของต้นกล้าเทียบเป็นปริมาณรังสีที่ทำให้พืชตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เรียกปริมาณรังสีนี้ว่า ค่า LD₅₀ (สิรินุช, 2540)

เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช

เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker techniques) คือ เทคนิคที่ใช้บอกความแตกต่างระหว่าง 2 สิ่ง สามารถนำมาใช้กับสิ่งมีชีวิตได้เช่นกัน สำหรับเครื่องหมายโมเลกุลเป็นสิ่งที่บอกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ สามารถตรวจสอบได้ทั้งทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) ตรวจสอบระดับชีวเคมี (biochemical marker) และตรวจสอบระดับโมเลกุล (molecular marker หรือ DNA marker) (อรรัตน์, 2548)

1. การตรวจสอบระดับสัณฐานวิทยา (morphological marker) เป็นเครื่องหมายที่สามารถมองเห็นได้ทันที เป็นลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันของสิ่งมีชีวิต เช่น ลักษณะของเมล็ด สีของดอก ลักษณะการเจริญเติบโต เป็นต้น เครื่องหมายชนิดนี้จัดว่าเป็นเครื่องหมายที่มีความต้องการมากในการปรับปรุงพันธุ์พืช เพราะถ้าเป็นเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ผลผลิตสูง หรือต้านทานต่อโรคแมลง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกได้ และมีข้อได้เปรียบคือ เป็นวิธีที่ง่ายในการใช้ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีความเฉพาะเจาะจง เพราะสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Nadeem *et al.*, 2001) เครื่องหมายชนิดนี้มีข้อจำกัดคือ การแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยามักได้รับผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง เช่น

ความสูงต้น ผลผลิต หรือสีดอก ผลกระทบจากความอุดมสมบูรณ์ของดินหรือปุ๋ย รวมทั้งลักษณะบางลักษณะมีการแสดงออกที่บางระยะการเจริญเติบโตเท่านั้น เช่น ลักษณะสีดอกมีการแสดงออกที่ระยะที่ต้นพืชมีดอก (อรรถรัตน์, 2548)

2. การตรวจสอบระดับชีวเคมี (biochemical marker) เป็นเครื่องหมายที่สร้างขึ้นจากการศึกษาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในสิ่งมีชีวิต ได้แก่ เอนไซม์ต่างๆ (อรรถรัตน์, 2548) มีข้อจำกัดคือ การแสดงออกของเอนไซม์ได้รับผลกระทบโดยตรงจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงและระยะการเจริญเติบโตของพืช กล่าวคือ โพรตีนมีความแปรปรวนตามสภาพแวดล้อม อายุ และเนื้อเยื่อที่นำมาสกัด ฉะนั้นต้องใช้พืชที่มีอายุเท่ากันมีการปลูกและสกัดในเวลาเดียวกัน และใช้เนื้อเยื่อบริเวณเดียวกันที่มีอายุเท่ากัน (เฉลิมศรี, 2549)

3. การตรวจสอบระดับโมเลกุล (molecular marker) เป็นเครื่องหมายที่สร้างมาจากรหัสพันธุกรรม DNA ดังนั้นเครื่องหมายชนิดนี้จึงถูกเรียกว่า DNA marker การตรวจสอบระดับโมเลกุลนี้มีหลายเทคนิค เป็นที่ทราบกันว่าขนาดจีโนมของพืชมีประมาณ 10^8 - 10^9 nucleotides ในบางจีโนมของพืชพบว่าการเกิด single nucleotide mutation ทุก 1 kb และสภาพแวดล้อมและระยะการเจริญเติบโตของพืชไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของเครื่องหมายชนิดนี้ จากจุดเด่นของเครื่องหมายนี้จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากในการศึกษาจีโนม และในทางการเกษตรเพื่อการจำแนกสิ่งมีชีวิตและการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต (อรรถรัตน์, 2548)

การตรวจสอบระดับโมเลกุล (molecular marker) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่

1. Hybridization-based marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเข้าคู่ของลำดับเบสดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ โดยใช้เทคนิค hybridization ได้แก่ เครื่องหมาย restriction fragment length polymorphism (RFLP) (อนุรุทธิ์, 2560)

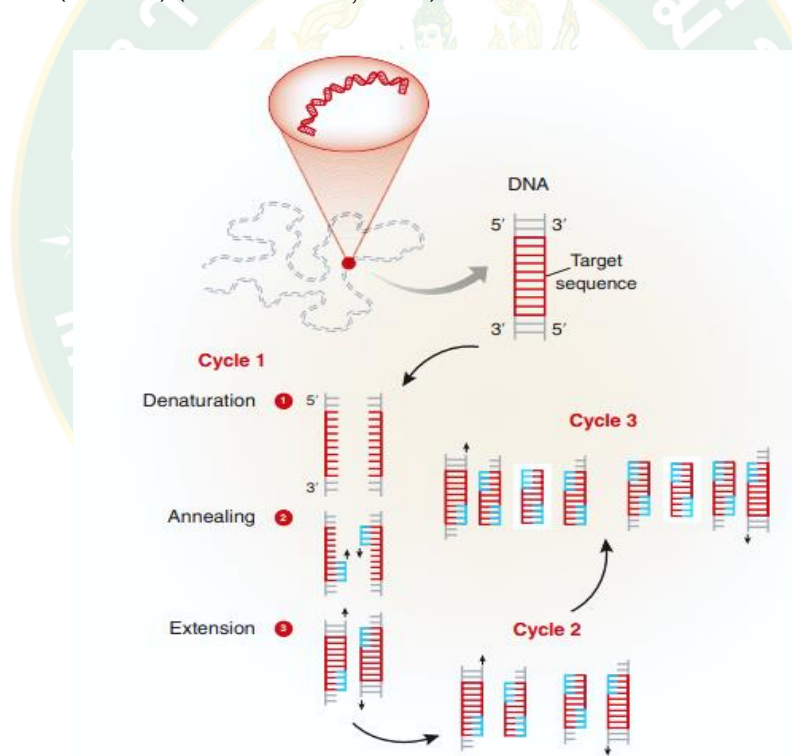
2. PCR- based marker เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายให้ได้ปริมาณมากขึ้นเป็นหลายเท่าในเวลาไม่นาน ซึ่งต้องอาศัยองค์ประกอบของปฏิกิริยา คือ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่แบบ เรียกว่า DNA template นิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ เรียกว่า ไพรมเมอร์ (primer) เอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อระหว่างนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรมเมอร์ หรือ DNA polymerase นิวคลีโอไทด์หน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (deoxynucleotide triphosphate, dNTPs) และ บัฟเฟอร์ที่มีแมกนีเซียม ($MgCl_2$) เป็นองค์ประกอบเพื่อช่วยให้การทำงานของเอนไซม์ดีขึ้น (สุรินทร์, 2552)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการ PCR เป็นการเลียนแบบกระบวนการ DNA replication ในเซลล์ โดยใช้อุณหภูมิควบคุมปฏิกิริยาให้เป็นไปตามขั้นตอน ดังนี้

1. Denaturing ช่วงอุณหภูมิระหว่าง 90-95 องศาเซลเซียส ทำให้ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่เป็นเกลียวคู่ (double standard DNA) แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว และแต่ละสายทำหน้าที่เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอที่ต้องการ

2. Annealing ช่วงอุณหภูมิระหว่าง 37-60 องศาเซลเซียส โพรเมอร์ 2 สายที่ถูกสังเคราะห์ให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นคู่สมกับปลาย 3' ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์แต่ละสายเข้าไปจับตรงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมสายดีเอ็นเอแม่พิมพ์

3. Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของ *Taq*DNA polymerase ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยใช้ dNTPs ในปฏิกิริยาเป็น substrate เมื่อปฏิกิริยาดำเนินครบทั้ง 3 ขั้นตอนหมายถึงการครบ 1 รอบปฏิกิริยาจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ (PCR product) เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าจากที่มีอยู่เดิม โดยปกติจะให้ปฏิกิริยาเกิดซ้ำๆ จำนวน 20-30 รอบ (ภาพที่ 3) (วัชรวิ และมนตรี, 2536)



ภาพที่ 3 หลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ที่มา : Garibyan and Avashia, 2013

ตัวอย่างเทคนิคที่มีการใช้ เช่น random amplified polymorphic DNA (RAPD), sequence characterized amplified region (SCAR), simple sequence repeat (SSR) และ amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Gupta *et al.*, 1999)

เครื่องหมาย Random amplified polymorphic DNA (RAPD) เป็นวิธีวิเคราะห์หลายพิมพ์ ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์อีกแบบหนึ่ง โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอ เป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary primer) โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายในบริเวณที่เป็นคู่สมกัน โอกาสที่พบลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับไพรเมอร์ คือ 1 ใน 4^{10} โดยประมาณ ข้อดีของเทคนิค RAPD คือ ทำได้ง่าย และรวดเร็ว เป็นเทคนิคพื้นฐานที่ดีสำหรับผู้ที่เริ่มงานทางด้านดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2545)

การสกัดจีโนมดีเอ็นเอ (genomic DNA)

ในการศึกษาทางด้านเครื่องหมายโมเลกุล จีโนมดีเอ็นเอของพืชเป็นวัสดุพื้นฐานอันดับแรกที่มีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งที่ผู้ศึกษาต้องสกัดออกมาจากเซลล์พืชให้ได้ ลำดับต่อมาขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ว่าต้องการปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอมากเพียงใด (อรรรัตน์, 2548) วิธีการสกัดดีเอ็นเอมีอยู่หลายวิธีขึ้นอยู่กับสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด และองค์ประกอบทางชีวเคมีที่แตกต่างกัน วิธีการสกัดดีเอ็นเอส่วนใหญ่ใช้การสกัดจากใบพืช ซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิมที่อธิบายไว้โดย Doyle and Doyle ในปี 1987 ที่ใช้สาร cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) และเพื่อป้องกันปัญหาที่เกี่ยวกับการเกิดสารกลุ่มฟีนอลิก (phenolics) และ กลุ่มโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) จึงมีการประยุกต์วิธีการสกัดโดยใช้ polyvinylpyrrolidone (PVP) และ สารละลายเกลือความเข้มข้นสูงร่วมด้วย (Healey *et al.*, 2014) ซึ่งสารกลุ่มฟีนอลิกพวกแทนนิน (tannins) และเทอร์พีนอยด์ (terpenoids) จะทำให้เนื้อเยื่อใบของพืชเกิดสีน้ำตาล (Sahu *et al.*, 2012) โดยหลักการทั่วไปวิธีการสกัดดีเอ็นเอประกอบด้วยขั้นตอนหลักดังนี้

1. **การย่อยสลายเซลล์** ขั้นตอนนี้ทำเพื่อดึงเอาองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ออกมา ซึ่งพืชมีผนังเซลล์จำเป็นต้องทำลายผนังเซลล์ก่อนด้วยวิธีการบดให้ละเอียด ตัวอย่างใบที่ใช้สกัดดีเอ็นเอควรเป็นตัวอย่างสด เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอคุณภาพดี หรือถ้าไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างสด ก็ควรแช่แข็งตัวอย่างใบระหว่างการรอสกัดดีเอ็นเอเพื่อยับยั้งกระบวนการย่อยสลายดีเอ็นเอ การบดอาจใช้ในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) เพื่อช่วยทำให้บดได้ง่ายขึ้น ภายหลังจากขั้นตอนนี้ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย องค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ ได้แก่ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตจะรวมอยู่ในสารละลายที่บดได้ นำไปสู่ขั้นตอนต่อไปเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ขึ้น

2. การกำจัดโปรตีนและอาร์เอ็นเอ การกำจัดโปรตีนเป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่ง เนื่องจากภายในเซลล์มีเอนไซม์หลายชนิดที่สามารถย่อยดีเอ็นเอ รวมทั้งมีโปรตีนชนิดต่างๆ ที่อาจขัดขวางปฏิกิริยาทางเคมี สารละลายที่ใช้กำจัดโปรตีนคือ สาร chloroform-isoamylalcohol ซึ่งเมื่อนำตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนการบดตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) กับสารละลาย chloroform- isoamylalcohol ส่งผลให้โปรตีนเสื่อมสภาพและตกตะกอนอยู่ในบริเวณชั้นตรงกลางของสารผสม ส่วนดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอละลายอยู่ในสารละลายส่วนบนสุด การกำจัดอาร์เอ็นเอสามารถทำได้โดยใช้เอนไซม์ RNase

3. การตกตะกอนดีเอ็นเอ ภายหลังจากขั้นตอนที่ใช้สาร chloroform-isoamylalcohol สารละลายจากส่วนบนที่มีดีเอ็นเออยู่ค่อนข้างสะอาดไม่มีโปรตีน การแยกดีเอ็นเอออกจากสารละลายใช้วิธีตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยแอลกอฮอล์ (alcohol) ได้แก่ isopropanol และ ethanol ในขั้นตอนนี้อาจเติม Na^+ หรือ K^+ หรือ NH_4^+ เพื่อช่วยตกตะกอนเกลือต่างๆ เกลือเหล่านี้สามารถกำจัดออกไปด้วยการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol (อรรถัน, 2548)

การวัดปริมาณและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอในการสกัดแต่ละครั้งนิยมใช้ 2 วิธี ได้แก่ spectrophotometry และ gel electrophoresis

1. spectrophotometry เป็นการวัดปริมาณดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer ซึ่งคำนวณจากการวัดค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 2 คลื่นแสง คือ 260 (A_{260}) และ 280 (A_{280}) นาโนเมตร แสดงปริมาณ DNA โดยที่ทุก 1 หน่วยที่อ่านได้เท่ากับปริมาณดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และ A_{280} แสดงปริมาณโปรตีนที่ปนเปื้อนในตัวอย่างดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอที่สะอาดควรมีค่าอัตราส่วน A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วง 1.8-2.0

2. gel electrophoresis เป็นวิธีที่ใช้วัดปริมาณดีเอ็นเอจากความเข้มแสงของแถบดีเอ็นเอใน agarose gel ภายหลังจากที่ย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide โดยที่ ต้องมีการเปรียบเทียบกับความเข้มแสงของดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแล้ว

Ethidium bromide เป็นสารที่ปลดปล่อยพลังงานแสงออกมาเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง UV ด้วยเหตุที่ ethidium bromide เข้าไปแทรกอยู่ในโมเลกุลดีเอ็นเอ ดังนั้นปริมาณแสงที่วัดได้จากปริมาณ ethidium bromide ย้อมสะท้อนถึงปริมาณโมเลกุลดีเอ็นเอที่ ethidium bromide เข้าไปแทรกจับ ในการใช้สามารถเติมลงใน agarose gel หรือเพิ่มลงในตัวอย่างดีเอ็นเอก่อนที่จะทำการโหลดเพื่อให้สามารถมองเห็นชิ้นส่วนภายในเจลได้ (Thermo scientific, 2008)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Jo *et al.* (2016) ทำการศึกษาการสร้างประชากรกลายพันธุ์โดยการฉายรังสีแกมมาและการฉายคาร์บอนปีมในพริกพันธุ์ Yuwol-cho รังสีแกมมาปริมาณแตกต่างกันได้แก่ 50, 100, 150, 200, 250, 300 และ 350 เกรย์ พบว่า อัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของยอดที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาในปริมาณที่ต่อเนื่องพบว่า LD₅₀ อยู่ที่ประมาณ 140 และปริมาณรังสีแกมมาที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการกลายพันธุ์อยู่ที่ประมาณ 80-100 เกรย์ และจากการสร้างประชากรรุ่น M₂ จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 100 เกรย์ เพื่อศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ที่แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ การกลายพันธุ์และการพัฒนาด้านโครงสร้างของพืช ใบ ดอก และผล พบว่า ประชากรในชั่วที่ 2 มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นในลักษณะต้นเตี้ยและเกสรตัวผู้เป็นหมัน

Mendoza *et al.* (2011) ทำการศึกษาผลของการฉายรังสีแกมมากับเมล็ดต่อการงอกและการพัฒนาในพริกพันธุ์ Chile de Agua ที่ปลูกในโรงเรือน ปริมาณรังสีแกมมาได้แก่ 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 เกรย์ ด้านการเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้น พบว่า การงอกและดัชนีความแข็งแรงของต้นมีรูปแบบที่แตกต่างกันระหว่างพืชที่ได้รับการฉายรังสีแกมมา และไม่ได้รับการฉายรังสีแกมมา ต้นที่ไม่ได้รับรังสีแกมมามีการงอกอยู่ที่ 41 เปอร์เซ็นต์ และในกลุ่มที่ได้รับรังสีแกมมาอยู่ที่ 24-44 เปอร์เซ็นต์ ความยาวใบ ความกว้างใบ วันที่เริ่มติดดอก 50 เปอร์เซ็นต์ การติดผล ความยาวผล น้ำหนักผลต่อต้น พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่พบลักษณะที่แตกต่างกันในความสูงของต้นหลังการย้ายปลูก 30 วัน และจำนวนผลต่อต้น

Omar *et al.* (2008) ทำการศึกษาความไวของรังสีแกมมาต่อพริก โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาค่า LD₅₀ และผลของรังสีแกมมาต่อการงอกของเมล็ด ความสูงของต้น เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ความยาวราก น้ำหนักแห้งของราก และน้ำหนักแห้งของต้นกล้า ฉายรังสีแกมมาปริมาณ 300, 400, 500, 600 และ 800 เกรย์ พบว่า รังสีแกมมาปริมาณต่ำ (300 และ 400 เกรย์) ไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ดโดยไม่อ้างอิงถึงระยะเวลาเมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับรังสีแกมมา ซึ่งตรงกันข้ามกับในปริมาณรังสีที่สูงขึ้น (500, 600 และ 800 เกรย์) ที่ส่งผลกระทบต่ออย่างมากกับต้นพริก โดยเฉพาะรังสีแกมมาปริมาณ 800 เกรย์ ที่มีผลยับยั้งการงอกของเมล็ด และที่ปริมาณรังสีแกมมาสูงส่งผลกระทบต่อความสูงของต้นและน้ำหนักแห้งของยอด และค่า LD₅₀ สำหรับพริกในงานทดลองนี้อยู่ที่ประมาณ 445 เกรย์

วิชัย และคณะ (2550) ศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีผลต่อการกลายพันธุ์พริก โดยการฉายรังสีแกมมากับเมล็ดพริกพันธุ์ หัวเรือห้วยทราย ด้วยปริมาณรังสี 0, 400 และ 600 เกรย์ และนำไปปลูกทดสอบทั้งสิ้น 6 รุ่น พบว่า การปลูกรุ่นที่ 2 ต้นพริกที่ได้รับการฉายรังสีแกมมา 400 เกรย์ มีลักษณะเปลี่ยนแปลง 2 ต้น คือ มีลักษณะใบเป็นลอนคลื่น ผิวใบไม่เรียบ มีรอยหยักทั่วใบ และไม่

ออกดอกติดผลตลอดอายุปลูก อีกต้นหนึ่งมีลักษณะต้นเป็นพุ่มและใบหนา จึงทำการเก็บเมล็ดไปปลูก ในรุ่นที่ 3 พบว่า ต้นพริกมีใบหนา มีความต้านทานต่อแมลงปากดูดแทบทุกชนิดที่เข้ามารบกวน แปลงปลูกได้ดีกว่าต้นปกติ และยังมีผลผลิตดีกว่าเมื่อเทียบกับพันธุ์เดิม ต่อมาปลูกทดสอบในรุ่นที่ 6 พบว่า มีลักษณะใหม่เกิดขึ้น คือ เกิดพริกใบต่างจำนวน 1 ต้น

ในการตรวจสอบพันธุกรรมของพริกด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล Tomlekova *et al.* (2016) ทำการศึกษาการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD ของพริกบัลแกเรียที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการวิเคราะห์ลักษณะที่แตกต่างกันของพริกที่เกิดการกลายพันธุ์ เช่น ปริมาณเบต้าแคโรทีน เกสรตัวผู้เป็นหมัน และระยะเวลาสุกแก่ โดยเทคนิค RAPD ใช้ไพรเมอร์ 40 ไพรเมอร์ พบว่า มีไพรเมอร์จำนวน 16 ไพรเมอร์ที่สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง และไพรเมอร์ทั้งหมดสามารถสร้างรูปแบบตั้งแต่ 5 ถึง 16 แถบ ขนาด 300 ถึง 3,000 bp และพบว่า ไพรเมอร์ A13, A18, B01 และ B10 สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันได้

Pal and Singh (2013) ทำการศึกษาการตรวจสอบสายพันธุ์พ่อแม่และลูกผสมของพริกโดยใช้เทคนิค RAPD กับไพรเมอร์จำนวน 15 ไพรเมอร์ พบว่า มีทั้งหมด 3 ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างของพริกได้ คือ ไพรเมอร์ OPC-08, OPL-12 และ OPV-14 ซึ่งจากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการนำเทคนิค RAPD มาใช้ในการเริ่มตรวจสอบความแตกต่างของการผลิตพันธุ์ลูกผสมของพริกต่อไปได้

Bhadragoudar and Patil (2011) ทำการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพริกโดยใช้เครื่องหมาย RAPD ตรวจสอบกับพริก 45 สายพันธุ์กับไพรเมอร์ 16 ไพรเมอร์ พบว่า มีความแตกต่างกันของความหลากหลายทางพันธุกรรมในรูปแบบของแถบดีเอ็นเอกับพริกทั้งหมดที่เป็น polymorphic 63.33% และเป็น monomorphic 36.36% จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่ถูกแยกได้ต่อไพรเมอร์ คือ 6 แถบ เป็น polymorphic 3.90 และ monomorphic 2.25 ของไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา ไพรเมอร์ OPC-07 (88%) และ OPC-03 (83.33%) แสดงความหลากหลายสูง ในขณะที่ไพรเมอร์ OPA-03 มีเปอร์เซ็นต์การแสดงความหลากหลายต่ำ (33.33%) และไพรเมอร์ OPI-01, OPI-02 และ OPI-06 ไม่แสดงความแตกต่างในแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

สถานที่ทำการทดลอง

การศึกษาผลของการฉายรังสีแกมมาที่มีต่อพริก (*capsicum* spp.) ทำการฉายรังสีแกมมา ณ สาขาฟิสิกส์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ และบันทึกข้อมูล ณ สาขาไม้ผล คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุอุปกรณ์

1. ถาดเพาะเมล็ด
2. ถุงดำ
3. ดินปลูก (ดิน : แกลบดิบ : แกลบดำ อัตราส่วน 1 : 1 : 1)
4. ไม้บรรทัด
5. เวอร์เนียคาลิเปอร์ (Vernier Caliper)
6. เครื่องวัดสีดิจิตอล (Digital Colorimeter ยี่ห้อ KONIKA MINOLTA รุ่น CR-10 Plus)
7. โกร่งบดตัวอย่าง
8. Micro centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
9. PCR tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
10. ทิป (Tip) ขนาดต่างๆ
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสาร (Spin down)
13. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR Thermal cycle รุ่น Biometratone 96G)
13. Micropipette ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
14. เครื่องแก้วสำหรับเตรียมสาร (ปิเกตอร์ขนาดต่าง ๆ และกระบอกตวงขนาดต่าง ๆ)
15. เครื่องซั่งอิเล็กทรอนิกส์ ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
16. อ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้
17. ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
18. ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
19. เครื่องถ่ายภาพเจล (UV-Transilluminator รุ่น Geneflash)

สารเคมี

1. สาร 2XmCTAB buffer (Cetyl trimethyl ammonium bromide + mercaptane)
2. Chloroform: Isoamyl alcohol อัตราส่วน 24: 1
3. Ethanol 75 เปอร์เซ็นต์
4. Isopropanol
5. น้ำกลั่นบริสุทธิ์
6. 1X TAE Buffer
7. Tris-Hydrochloride buffer pH 8.0
8. Sodium chloride 1.4 M
9. TE buffer
10. Agarose
11. สีย้อม (loading dye)
12. เอ็มไซม์ RNase A
13. ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder)
14. บัฟเฟอร์สำเร็จรูป 2X My taq HS Red Mix (Red PCR master mix)

วิธีการทดลอง

การวิจัยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาปริมาณของการฉายรังสีแกมมาสำหรับเมล็ดพริก

ใช้เมล็ดพันธุ์พริกลูกผสม วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) มี 5 สิ่งทดลองๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 52 เมล็ด โดยนำเมล็ดแช่น้ำแล้วไปฉายรังสีแกมมา ใช้แหล่งกำเนิดรังสีแกมมาจากโคบอลต์-60 กำหนดปริมาณการฉายรังสีแกมมา ดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่ฉายรังสีแกมมา)

สิ่งทดลองที่ 2 ฉายรังสีแกมมา 150 เกรย์

สิ่งทดลองที่ 3 ฉายรังสีแกมมา 300 เกรย์

สิ่งทดลองที่ 4 ฉายรังสีแกมมา 450 เกรย์

สิ่งทดลองที่ 5 ฉายรังสีแกมมา 600 เกรย์

จากนั้นนำไปเพาะในสภาพเพาะเมล็ด และเลี้ยงไว้ในโรงเรือน ดูแลรักษาโดยการรดน้ำ และบันทึกข้อมูลดังนี้

ระยะเวลาในการงอกของเมล็ด (Seed germination time)

ทำการบันทึกจำนวนวันที่เมล็ดพริกเริ่มงอกในแต่ละซ้ำของสิ่งทดลองแล้วหาค่าเฉลี่ยระยะเวลาในการงอกของเมล็ดในแต่ละสิ่งทดลอง

การงอกของเมล็ด (Seed germination)

การงอกของเมล็ดนับที่ 2 สัปดาห์ และ 3 สัปดาห์หลังการเพาะเมล็ด ทำการนับจำนวนเมล็ดที่มีการงอกในแต่ละสิ่งทดลอง นำมาคำนวณการงอกของเมล็ด (เปอร์เซ็นต์) โดยใช้สูตร

$$\text{การงอกของเมล็ด (\%)} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่งอก}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะ}} \times 100$$

การรอดชีวิตของต้นกล้า (Survival of seedling) และปริมาณรังสีแกมมาที่ทำให้ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD₅₀)

การรอดชีวิตของต้นกล้านับที่ 8 สัปดาห์หลังการเพาะเมล็ด โดยนับจำนวนต้นที่รอดแต่ละสิ่งทดลอง มาคำนวณการรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์) โดยใช้สูตร

$$\text{การรอดชีวิตของต้นกล้า (\%)} = \frac{\text{จำนวนต้นที่รอดชีวิต}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะทั้งหมด}} \times 100$$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance ; ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiply Range Test (DMRT)

การทดลองที่ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของพริกที่ถูกชักนำโดยการฉายรังสีแกมมา

ทำการบันทึกข้อมูลลักษณะต้นพริกในระยะเจริญเติบโตเต็มที่ (120 วันหลังการย้ายปลูก) ในประชากรรุ่น M_0 และประชากรรุ่น M_1 ดังนี้

1. ความสูงของต้น (เซนติเมตร)
2. เส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่ม (เซนติเมตร)
3. เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น (มิลลิเมตร)
4. ความกว้างใบ (มิลลิเมตร)
5. ความยาวใบ (มิลลิเมตร)
6. จำนวนใบต่อต้น (ใบ)
7. จำนวนดอกต่อต้น (ดอก) ที่ระยะการออกดอก 90 วันหลังจากการย้ายปลูก
8. จำนวนผลต่อต้น (ผล)
9. น้ำหนักผลผลิตต่อต้น (กรัม)
10. น้ำหนักสดต่อผล (กรัม)
11. ความกว้างผล (มิลลิเมตร)
12. ความยาวผล (มิลลิเมตร)
13. สีผล ($L^*a^*b^*$)
14. จำนวนเมล็ดต่อผล (เมล็ด)

การวิเคราะห์ข้อมูล

จากการปลูกทดสอบการแสดงออกของลักษณะฟีโนไทป์ในประชากรรุ่น M_0 และ M_1 เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ฉายรังสีแกมมา โดยประชากรรุ่น M_1 ทำการจัดแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ ต้นพริกที่มีค่าฟีโนไทป์มากกว่าต้นที่ไม่ฉายรังสีแกมมา และต้นพริกที่มีค่าฟีโนไทป์น้อยกว่าต้นที่ไม่ฉายรังสีแกมมา

การทดลองที่ 3 การตรวจสอบรูปแบบทางพันธุกรรมของพริกโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

โดยศึกษารูปแบบพันธุกรรมของพริกที่ฉายรังสีแกมมาในประชากร M_0 และประชากร M_1 ดังนี้

สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีดัดแปลง CTAB

1. เก็บใบตัวอย่างพริกประมาณ 0.2 กรัม ใส่ในโกร่งบดให้ละเอียด
2. เติมสารละลาย mCTAB (1% (v/v) 2-mercaptoethanol) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยผสมให้เข้ากันทุก 10 และ 20 นาที
4. เติม chloroform isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
5. ย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติมเอมไซม์ RNaseA ปริมาณ 2 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
6. เติม chloroform isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม Iso-propanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม 1.4 M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
7. นำไปเก็บไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือบ่มข้ามคืน
8. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
9. เทสารในหลอดทิ้ง แล้วเติมเอทานอลเย็น ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างตะกอน (ล้างตะกอน 2 ครั้ง) ขั้นตอนการล้างปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
10. ตากตะกอน DNA ให้แห้ง แล้วละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

การทำปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR)

การเตรียมปฏิกิริยา PCR

1. เตรียมดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
2. เติมบัฟเฟอร์สำเร็จรูป 2X My taq HS Red Mix (Red PCR master mix) จากนั้นเติม น้ำกลั่นบริสุทธิ์ และเติมไพรเมอร์ RAPD (ความเข้มข้น 5 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของสารใน 1 ปฏิกริยา

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
DNA templet (5 ng/ μ l)	4 μ l
บัฟเฟอร์สำเร็จรูป 2X My taq HS Red Mix (RedPCR master mix)	10 μ l
RAPD Primer (5 μ M/ μ l)	1 μ l
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	5 μ l
ปริมาตรรวม	20 μ l

3. นำหลอด PCR ที่เตรียมไว้ไปปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารเป็นเวลา 5 วินาที และนำไปใส่เครื่อง PCR Thermal cycle เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้เวลาและอุณหภูมิแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปฏิกริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	
1) Pre-denature	94 องศาเซลเซียส	4 นาที	} 44 รอบ
2) Denature	94 องศาเซลเซียส	1 นาที	
3) Annealing	37 องศาเซลเซียส	1 นาที	
4) Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที 30 วินาที	
5) Final extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	

4. ตรวจสอบผล PCR โดยวิธี Agarose gel electrophoresis

ขั้นตอนการเตรียม 1% Agarose gel และการตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ดังนี้

1. ชั่งเจล 0.5 กรัม ละลายด้วย TAE buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
2. โหลดตัวอย่างดีเอ็นเอผสมกับสีย้อม loading dry
3. รันเจลที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที
4. นำผลของ PCR มาตรวจสอบด้วยการถ่ายภาพกับเครื่อง UV-Transilluminator

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การทดลองที่ 1 การศึกษาปริมาณของการฉายรังสีแกมมาสำหรับเมล็ดพริก

ระยะเวลาในการงอกของเมล็ด (Seed germination time)

ระยะเวลาในการงอกของเมล็ดพริกหลังจากฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ พบว่า ระยะเวลาในการงอกมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) โดยเมล็ดที่ไม่ได้ฉายรังสีแกมมาเริ่มงอกเร็วกว่าเฉลี่ยที่ 5.67 วันหลังจากเพาะเมล็ด ส่วนเมล็ดที่ฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณ 150, 300, 450 และ 600 เกรย์ ระยะเวลาในการเริ่มงอกเฉลี่ยคือ 8.33, 10.33, 11.33 และ 11.67 วันตามลำดับ ซึ่งเมล็ดที่ฉายรังสีแกมมา 600 เกรย์ ใช้ระยะเวลาในการเริ่มงอกนานมากที่สุดถึง 11.67 วัน (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลของการฉายรังสีแกมมาต่อระยะเวลาในการงอกของเมล็ด การงอกของเมล็ด และการรอดชีวิตของต้นกล้า

สิ่งทดลอง	ระยะเวลาในการงอกของเมล็ด (วัน)	การงอกของเมล็ด (%)		การรอดชีวิต (%)
		2 สัปดาห์	3 สัปดาห์	8 สัปดาห์
0 เกรย์	5.67 ^c	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a
150 เกรย์	8.33 ^b	55.13 ^b	57.69 ^c	11.53 ^b
300 เกรย์	10.33 ^a	71.15 ^b	76.92 ^b	1.28 ^c
450 เกรย์	11.33 ^a	55.77 ^b	87.17 ^{ab}	0
600 เกรย์	11.67 ^a	73.08 ^b	75.64 ^b	0
F-test	**	**	**	**
CV. (%)	14.69	13.61	11.33	17.18

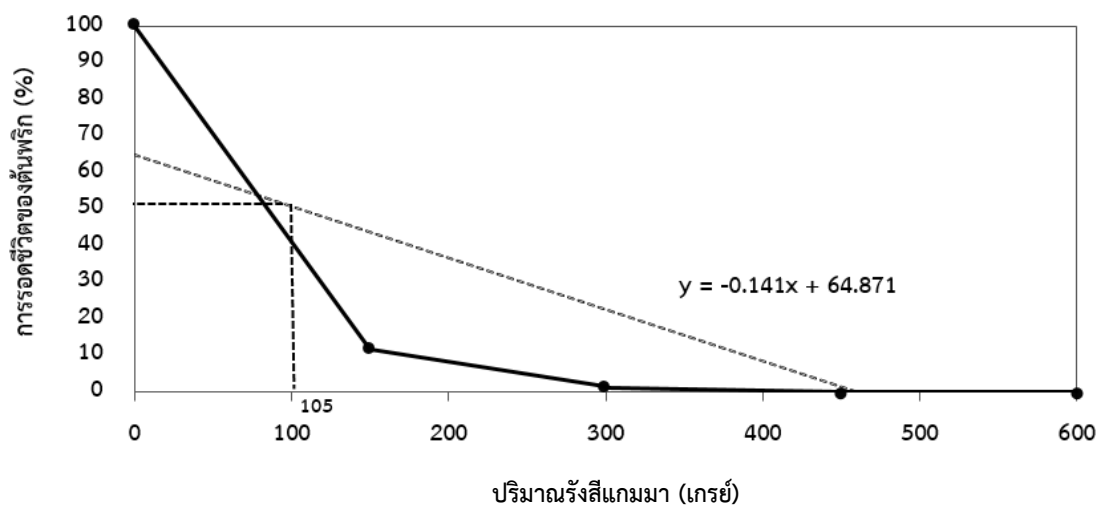
หมายเหตุ ** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ความเชื่อมั่น 99% ($p < 0.01$) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธีการ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

การงอกของเมล็ด (Seed germination)

ทำการตรวจสอบการงอกที่ 2 สัปดาห์ และ 3 สัปดาห์หลังการเพาะเมล็ด พบว่า การงอกของเมล็ดที่ไม่ฉายรังสีแกมมามีการงอก 100 เปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ 2 หลังการเพาะเมล็ด และในเมล็ดที่ไม่ฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างกัน การงอกของเมล็ดลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดไม่ฉายรังสีแกมมา เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 2 สัปดาห์ และ 3 สัปดาห์หลังการเพาะเมล็ด เมล็ดมีการงอกเพิ่มมากขึ้นในทุกะดับของการฉายรังสีแกมมา การฉายรังสีแกมมา 150 เกรย์ ที่ 2 สัปดาห์ การงอกของเมล็ดอยู่ที่ 55.13 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มเป็น 57.69 เปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ 3 ปริมาณรังสีแกมมาที่ 300 เกรย์ การงอกที่ 2 สัปดาห์หลังการเพาะเมล็ดอยู่ที่ 71.15 เปอร์เซ็นต์ และที่ 3 สัปดาห์อยู่ที่ 76.92 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลาเดียวกันที่ตรวจสอบ ปริมาณรังสี 450 เกรย์ อยู่ที่ 55.77 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มเป็น 87.17 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณการฉายรังสีแกมมาที่ 600 เกรย์ อยู่ที่ 73.08 เปอร์เซ็นต์ และ 75.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

การรอดชีวิตของต้นกล้า (Survival of seedling) และปริมาณรังสีแกมมาที่ทำให้ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD₅₀)

การรอดชีวิตของต้นกล้า ตรวจสอบการรอดชีวิตที่ 8 สัปดาห์หลังการเพาะเมล็ด พบว่า พริกที่ไม่ฉายรังสีแกมมามีการรอดชีวิตของต้นกล้า 100 เปอร์เซ็นต์ และการฉายรังสีแกมมาส่งผลต่อการรอดชีวิตของต้นกล้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) การรอดชีวิตในงานทดลองนี้ พบว่าการฉายรังสีแกมมา 150 เกรย์ และ 300 เกรย์ มีการรอดชีวิตของต้นกล้าอยู่ที่ 11.54 เปอร์เซ็นต์ และ 1.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนรังสีแกมมาปริมาณ 450 เกรย์ และ 600 เกรย์ ต้นพริกไม่มีการรอดชีวิต (ตารางที่ 3) จากการบันทึกการรอดชีวิตของต้นกล้า นำค่าที่ได้จากการรอดชีวิตไปหาปริมาณของรังสีแกมมาที่ทำให้ถึงแก่ความตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD₅₀) พบว่า ปริมาณรังสีแกมมาที่ทำให้ถึงความตาย 50 เปอร์เซ็นต์ อยู่ที่ 105 เกรย์ ต้นกล้าพริกแสดงลักษณะการเจริญเติบโตแตกต่างกัน รวมถึงต้นกล้าที่งอกผิดปกติด้วย (ภาพที่ 4-6)



ภาพที่ 4 ปริมาณรังสีแกมมาที่ทำให้ถึงความตาย 50% (LD₅₀)



ภาพที่ 5 ลักษณะต้นกล้าพริกที่ฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ ที่ 8 สัปดาห์หลังการเพาะเมล็ด



ภาพที่ 6 ลักษณะต้นกล้าพริกที่มีการงอกผิดปกติหลังได้รับการฉายรังสีแกมมา

การทดลองที่ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของพริกที่ถูกชักนำโดยการฉายรังสีแกมมา

ลักษณะสัณฐานวิทยาของพริกที่ถูกชักนำโดยการฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M_0

จากการตรวจสอบการรอดชีวิตของต้นพริกในประชากรรุ่น M_0 หลังการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณ 150-600 เกรย์ พบว่า ต้นพริกที่รอดชีวิตมีจำนวน 20 ต้น โดยเป็นต้นพริกที่ฉายรังสีแกมมา 150 เกรย์ จำนวน 18 ต้น และฉายรังสีแกมมา 300 เกรย์ จำนวน 2 ต้น พบว่า ลักษณะสัณฐานวิทยาในระยะเจริญเติบโตเต็มที่ (120 วันหลังการย้ายปลูก) ทั้ง 20 ต้น มีลักษณะที่แตกต่างกัน คือ ความสูงสูงสุดอยู่ที่ 83 เซนติเมตร (G150/4) และค่าความสูงต่ำที่สุดคือ 35 เซนติเมตร (G150/11) เส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่มมากที่สุด คือ 54 เซนติเมตร (G150/14) และน้อยที่สุดคือ 16 เซนติเมตร (G150 /11) เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นมากที่สุด คือ 7.97 มิลลิเมตร (G150/12) และน้อยที่สุดคือ 5.58 มิลลิเมตร (G150/2) ความกว้างใบ พบว่า ค่ามากที่สุดคือ 23.62 มิลลิเมตร (G150/1) และน้อยที่สุดอยู่ที่ 15.11 มิลลิเมตร (G300/1) ความยาวใบมากที่สุดคือ 84.27 มิลลิเมตร (G150/11) และน้อยที่สุดคือ 48.45 มิลลิเมตร (G150/16) จำนวนใบต่อต้นมากที่สุดคือ 370 ใบ (G150/14) และน้อยที่สุดอยู่ที่ 89 ใบ (G150/11) จำนวนดอกต่อต้นค่ามากที่สุดคือ 43 ดอก (G300/1) และจำนวนดอกต่อต้นที่น้อยที่สุดคือ 8 ดอก (G150/7) จำนวนผลต่อต้น พบว่า มากที่สุดอยู่ที่ 23 ผล (G150/13) และจำนวนผลต่อต้นน้อยที่สุดคือ 2 ผล พบในต้นพริก จำนวน 2 ต้น คือ G150/14 และ G150/15 และในงานทดลองครั้งนี้ในต้น G150/2 ต้นพริกสามารถออกดอกได้แต่ไม่มีการติดของผล และน้ำหนักผลผลิตต่อต้นมากที่สุดอยู่ที่ 23.14 กรัม (G150/8) และน้ำหนักผลผลิตต่อต้นน้อยที่สุด คือ 0.98 กรัม (G150/14) ตามลำดับ (ภาพที่ 7 และ ตารางที่ 4)



ภาพที่ 7 ตัวอย่างต้นพริกในประชากรรุ่น M_0 ที่ระยะการเก็บเกี่ยว 120 วันหลังการย้ายปลูกลง



ตารางที่ 4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของพริกที่ฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M₀ ระยะเก็บเกี่ยว 120 วันหลังการย้ายปลูก

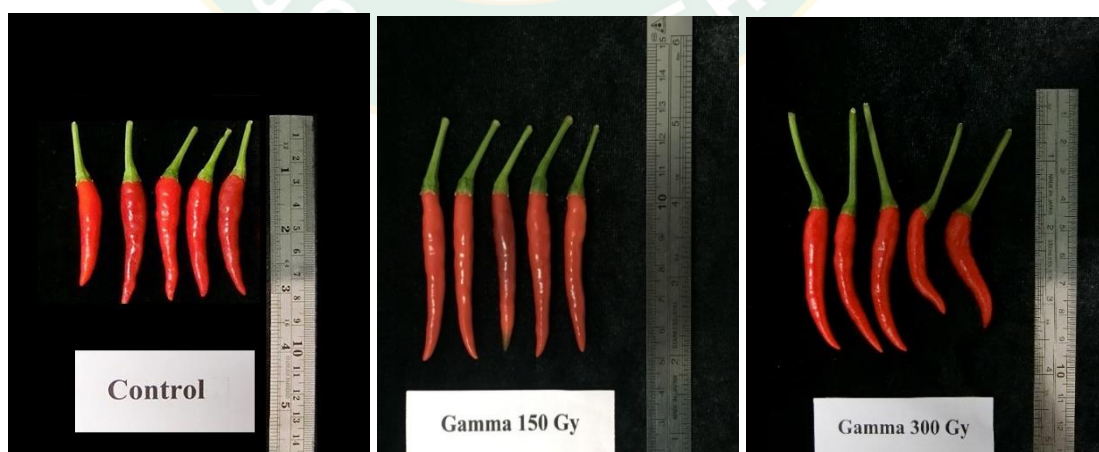
ต้น	ความสูง		เส้นผ่าศูนย์กลาง		เส้นผ่าศูนย์กลาง กลางลำต้น (มม.)	ความกว้างใบ		ความยาวใบ		จำนวนใบ		จำนวนดอก		จำนวนผล		น้ำหนักผลผลิต	
	(ซม.)	(ซม.)	ทรงพุ่ม (ซม.)	(ซม.)		(มม.)	(มม.)	(มม.)	(มม.)	(มม.)	ต่อต้น (ใบ)	ต่อต้น (ใบ)	ต่อต้น (ดอก)	ต่อต้น (ดอก)	ต่อต้น (ผล)	ต่อต้น (ผล)	ต่อต้น (กรัม)
Control	54.00	22.00	22.00	6.03	16.94	68.32	358.00	12.00	10.00	14.69							
G150/1	72.50	40.00	40.00	6.96	23.62	82.21	168.00	15.00	9.00	9.66							
G150/2	61.00	27.00	27.00	5.58	20.37	60.17	131.00	13.00	0.00	0.00							
G150/3	69.50	39.00	39.00	7.17	21.60	80.28	201.00	33.00	9.00	11.01							
G150/4	83.00	50.00	50.00	7.29	20.89	55.62	163.00	20.00	8.00	7.01							
G 150/5	63.00	29.00	29.00	6.66	22.78	77.82	153.00	39.00	13.00	12.11							
G150/6	75.50	47.00	47.00	7.07	22.18	70.76	124.00	19.00	8.00	12.06							
G150/7	64.00	26.00	26.00	5.88	22.03	77.22	131.00	8.00	9.00	11.30							
G150/8	57.00	25.00	25.00	7.10	19.41	82.18	273.00	28.00	19.00	23.14							
G150/9	60.50	37.00	37.00	6.88	17.95	60.55	302.00	21.00	17.00	21.80							
G150/10	60.00	25.00	25.00	6.29	17.82	57.73	248.00	20.00	4.00	4.51							
G150/11	35.00	16.00	16.00	6.51	20.52	84.27	89.00	16.00	4.00	3.38							

ตารางที่ 4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของพริกที่ฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M₀ ระยะเก็บเกี่ยว 120 วันหลังการย้ายปลูก (ต่อ)

ต้น	เส้นผ่าศูนย์กลาง		เส้นผ่าศูนย์กลางกลางทรงพุ่ม (ซม.)	เส้นผ่าศูนย์กลางกลางลำต้น (มม.)	ความกว้างใบ (มม.)		ความยาวใบ (มม.)		จำนวนใบต่อต้น (ใบ)	จำนวนดอกต่อต้น (ดอก)	จำนวนผลต่อต้น (ผล)	น้ำหนักผลผลิตต่อต้น (กรัม)
	ความสูง (ซม.)	เส้นผ่าศูนย์กลาง			ความกว้างใบ (มม.)	ความยาวใบ (มม.)						
G150/12	50.00	26.00	7.97	18.93	61.54	130.00	25.00	7.00	7.76			
G150/13	74.50	47.00	7.51	21.41	61.35	284.00	21.00	23.00	22.95			
G150/14	78.50	54.00	7.59	16.99	61.33	370.00	32.00	2.00	0.98			
G150/15	65.50	36.00	6.24	20.20	70.36	359.00	22.00	2.00	1.52			
G150/16	70.00	44.00	6.54	16.89	48.45	215.00	26.00	14.00	14.74			
G150/17	67.00	29.00	6.61	18.97	75.21	175.00	22.00	6.00	6.52			
G150/18	74.40	30.00	6.57	19.16	59.51	299.00	37.00	19.00	13.91			
G300/1	71.00	38.00	7.43	15.11	48.62	248.00	43.00	13.00	11.13			
G300/2	70.00	29.00	6.72	21.27	64.09	139.00	33.00	12.00	18.59			

ลักษณะคุณภาพผลของพริกที่ฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M_0 พบว่า น้ำหนักสดต่อผลมากที่สุดอยู่ที่ 1.72 กรัม (G300/2) และน้ำหนักสดต่อผลน้อยที่สุดคือ 0.49 กรัม (G150/14) ความกว้างผล มีความกว้างมากที่สุดคือ 8.91 มิลลิเมตร (G150/9) และน้อยที่สุดคือ 4.38 มิลลิเมตร (G150/14) ค่าความยาวผลมากที่สุดอยู่ที่ 57.82 มิลลิเมตร (G150/6) และน้อยที่สุดอยู่ที่ 33.36 มิลลิเมตร (G150/14) สีผล ตรวจสอบค่าความสว่าง (L^*) ค่าสีแดงและสีเขียว (a^*) และค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (b^*) พบว่า พริกทั้งหมด 20 ต้น ค่าความสว่าง (L^*) อยู่ในช่วง 33.83-41.85 โดยค่า L^* ที่เข้าใกล้ 100 สีของผลจะสว่างมากจนเป็นสีขาว แต่ถ้าค่า L^* เข้าใกล้ 0 หมายถึงความสว่างน้อยลงจนเป็นสีคล้ำ ส่วนค่าสีแดงและสีเขียวในพริกที่ตรวจสอบคุณภาพอยู่ในช่วง 39.65-46.60 ซึ่งค่า a^* ที่เกิดขึ้นเป็นค่าบวกแสดงให้เห็นว่าสีผลของพริกอยู่ในช่วงของสีแดง และค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (b^*) อยู่ในช่วง 20.05-32.70 และจำนวนเมล็ดต่อผล ค่ามากที่สุดคือ 49.00 เมล็ด (G300/2) และจำนวนเมล็ดต่อผลที่น้อยที่สุด 2.50 เมล็ด (G150/14) ตามลำดับ (ภาพที่ 8 และตารางที่ 5)

จากการบันทึกข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาของพริกและตรวจสอบคุณภาพของผลพริกที่ถูกชักนำโดยรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M_0 ระยะเจริญเติบโตเต็มที่ (120 วันหลังการย้ายปลูก) จำนวน 20 ต้น ทำการเลือกต้นพริกจำนวน 6 ต้น จากพริกที่ฉายรังสีแกมมา 150 เกรย์ จำนวน 4 ต้น คือ G150/6, G150/8, G150/11 และ G150/13 และที่ฉายรังสีแกมมา 300 เกรย์ จำนวน 2 ต้น คือ G300/1 และ G300/2 ตามลักษณะความยาวผล น้ำหนักผลผลิตต่อต้น ต้นเดี่ยว จำนวนผลต่อต้น จำนวนดอกต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อผล เพื่อนำไปปลูกทดสอบการแสดงออกด้านฟีโนไทป์ในประชากรรุ่น M_1



ภาพที่ 8 ตัวอย่างผลพริกในประชากรรุ่น M_0 ที่ระยะเก็บเกี่ยว 120 วันหลังการย้ายปลูก

ตารางที่ 5 ลักษณะคุณภาพผลของพริกที่ฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M_0 ที่ระยะเก็บเกี่ยว 120 วัน หลังการย้ายปลูก

ต้น	น้ำหนักสด ต่อผล(กรัม)	ความกว้าง ผล (มม.)	ความยาว ผล (มม.)	สีผล			จำนวนเมล็ด ต่อผล (เมล็ด)
				L*	a*	b*	
Control	1.74	8.20	53.33	37.50	45.27	30.77	41.00
G150/1	1.12	8.18	43.97	35.50	42.07	21.70	22.00
G150/2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G150/3	1.10	6.97	51.18	36.87	43.53	25.00	17.67
G150/4	0.95	6.98	43.60	34.60	42.70	22.73	19.67
G 150/5	0.76	5.82	38.84	39.43	46.47	26.97	10.00
G150/6	1.66	7.47	57.82	39.57	46.27	27.93	44.33
G150/7	1.31	7.33	50.50	35.83	43.53	23.60	37.33
G150/8	1.01	6.55	44.54	34.10	43.50	23.53	30.00
G150/9	1.39	8.91	46.75	36.23	43.57	23.33	32.67
G150/10	1.42	7.72	48.37	35.40	39.65	20.05	8.00
G150/11	0.92	5.40	50.37	40.80	46.53	32.70	16.33
G150/12	1.12	5.77	48.08	38.70	45.97	26.03	11.33
G150/13	0.98	6.87	43.47	38.03	41.30	24.30	25.00
G150/14	0.49	4.38	33.36	39.40	43.95	25.35	2.50
G150/15	0.76	5.60	39.97	41.85	46.60	32.55	7.50
G150/16	1.25	7.32	44.51	36.40	44.73	25.30	19.33
G150/17	1.17	6.05	51.06	39.03	45.50	27.00	25.33
G150/18	1.39	7.14	40.39	34.10	45.07	24.40	12.00
G300/1	0.78	7.58	37.49	34.07	43.53	23.20	18.33
G300/2	1.72	8.02	53.63	33.83	42.30	23.20	49.00

การทดสอบการแสดงออกด้านฟีโนไทป์ของพริกที่ฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M_1

จากการปลูกทดสอบการแสดงออกด้านฟีโนไทป์ในประชากรรุ่น M_1 เปรียบเทียบกับพริกที่ไม่ฉายรังสีแกมมา จากต้นพริกฉายรังสีแกมมา จำนวน 6 ต้น ที่ฉายรังสีแกมมา 150 เกรย์ จำนวน 4 ต้น คือ G150/6, G150/8, G150/11 และ G150/13 และที่ฉายรังสีแกมมา 300 เกรย์ จำนวน 2 ต้น คือ G300/1 และ G300/2 พริกต้น G150/6 ที่คัดเลือกลักษณะจากค่าความยาวผลมากที่สุด มีประชากรรุ่น M_1 ทั้งหมด 89 ต้น พบว่า จำนวนต้นที่มีค่ามากและค่าน้อยเปรียบเทียบกับลักษณะฟีโนไทป์ของต้นที่ไม่ฉายรังสีแกมมา ในความสูงต้นมีค่ามากจำนวน 43 ต้น และค่าน้อยจำนวน 46 ต้น เส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่มมีค่ามากจำนวน 66 ต้น และค่าน้อยจำนวน 23 ต้น เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นมีค่ามากจำนวน 56 ต้น และค่าน้อยจำนวน 33 ต้น ความกว้างใบมีค่ามากจำนวน 20 ต้น และค่าน้อยจำนวน 69 ต้น ความยาวใบมีค่ามากจำนวน 2 ต้น และค่าน้อยจำนวน 87 ต้น จำนวนดอกต่อต้นมีค่ามากจำนวน 43 ต้น และค่าน้อยจำนวน 46 ต้น จำนวนผลต่อต้นมีค่ามากจำนวน 11 ต้น และค่าน้อยจำนวน 78 ต้น น้ำหนักผลผลิตต่อต้นมีค่ามากจำนวน 3 ต้น และค่าน้อยจำนวน 86 ต้น ความกว้างผลมีค่ามากจำนวน 2 ต้น และค่าน้อยจำนวน 87 ต้น ความยาวผลมีค่ามากจำนวน 10 ต้น และค่าน้อยจำนวน 79 ต้น ค่าความสว่าง (L^*) มีค่ามากจำนวน 11 ต้น และค่าน้อยจำนวน 78 ต้น และจำนวนเมล็ดมีค่ามากจำนวน 4 ต้น และมีค่าน้อยจำนวน 85 ต้น ส่วนจำนวนใบต่อต้น น้ำหนักสดต่อผล ค่าสีแดงและสีเขียว (a^*) และค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (b^*) พบว่า ประชากร M_1 ทั้งหมด 89 ต้น ลักษณะฟีโนไทป์มีค่าน้อยกว่าต้นไม่ฉายรังสีแกมมาทั้งหมด (ตารางที่ 6)

พริกต้น G150/8 ที่คัดเลือกลักษณะจากค่าน้ำหนักผลผลิตต่อต้นมากที่สุด มีประชากรรุ่น M_1 ทั้งหมด 91 ต้น พบว่า การแสดงออกทางฟีโนไทป์เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ฉายรังสีแกมมา มีต้นที่มีความสูงมากกว่าต้นที่ไม่ฉายรังสีแกมมาทั้งหมด 40 ต้น และมีค่าน้อยกว่าจำนวน 51 ต้น เส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่มมีค่ามากจำนวน 74 ต้น และค่าน้อยจำนวน 17 ต้น เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นมีค่ามากจำนวน 59 ต้น และค่าน้อยจำนวน 32 ต้น ความกว้างใบมีค่ามากจำนวน 30 ต้น และค่าน้อยจำนวน 61 ต้น ความยาวใบมีค่ามากจำนวน 1 ต้น และค่าน้อยจำนวน 90 ต้น จำนวนใบต่อต้นมีค่ามากจำนวน 8 ต้น และค่าน้อยจำนวน 83 ต้น จำนวนดอกต่อต้นมีค่ามากจำนวน 46 ต้น และค่าน้อยจำนวน 45 ต้น จำนวนผลต่อต้นมีค่ามากจำนวน 19 ต้น และค่าน้อยจำนวน 72 ต้น น้ำหนักผลผลิตต่อต้นมีค่ามากจำนวน 8 ต้น และค่าน้อยจำนวน 83 ต้น ส่วนในความกว้างผลและความยาวผลมีจำนวนเท่ากันคือ มีค่ามากจำนวน 3 ต้น และค่าน้อยจำนวน 88 ต้น ตามลำดับ ค่าความสว่าง (L^*) มีค่ามากจำนวน 14 ต้น และค่าน้อยจำนวน 77 ต้น ค่าสีแดงและสีเขียว (a^*) มีค่ามากจำนวน 1 ต้น และค่าน้อยจำนวน 90 ต้น ค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (b^*) มีค่ามากจำนวน

7 ต้น และค่าน้อยจำนวน 84 ต้น จำนวนเมล็ดมีค่ามากจำนวน 4 ต้น และค่าน้อยจำนวน 87 ต้น และน้ำหนักสดต่อผล พบว่า มีค่าน้อยกว่าต้นที่ไม่ฉายรังสีแกมมาทั้งหมด (ตารางที่ 7)

พริกต้น G150/11 ที่ถูกคัดเลือกด้วยลักษณะความสูงของต้นน้อยที่สุด มีประชากรรุ่น M_1 จำนวน 50 ต้น พบว่า ในลักษณะความสูงต้นมีค่ามากกว่าต้นที่ไม่ฉายรังสีแกมมาจำนวน 7 ต้น และค่าน้อยจำนวน 43 ต้น เส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่มมีค่ามากจำนวน 44 ต้น และค่าน้อยจำนวน 6 ต้น เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นมีค่ามากจำนวน 28 ต้น และค่าน้อยจำนวน 22 ต้น ความกว้างใบมีค่ามากจำนวน 11 ต้น และมีค่าน้อย 39 ต้น จำนวนดอกต่อต้นมีต้นที่มีค่ามากจำนวน 25 ต้น และค่าน้อยจำนวน 25 ต้น จำนวนผลต่อต้นมีค่ามากจำนวน 4 ต้น และค่าน้อยจำนวน 46 ต้น น้ำหนักผลผลิตต่อต้นมีค่ามากเพียง 1 ต้น และค่าน้อยจำนวน 49 ต้น ส่วนลักษณะคุณภาพผลในน้ำหนักสดต่อผล ค่ามากจำนวน 4 ต้น และค่าน้อย 46 ต้น ความกว้างผลมีค่ามากจำนวน 8 ต้น และค่าน้อยมีจำนวน 42 ต้น ความยาวผลมีค่ามากจำนวน 4 ต้น และค่าน้อยจำนวน 46 ต้น ค่าความสว่างสีผล (L^*) มีค่ามากจำนวน 5 ต้น และค่าน้อย 45 ต้น จำนวนเมล็ดต่อผลมีค่ามากจำนวน 10 ต้น และค่าน้อยจำนวน 40 ต้น ส่วนลักษณะความยาวใบ จำนวนใบต่อต้น สีผลในค่าสีแดงและสีเขียว (a^*) และค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (b^*) พบว่า ประชากรทั้งหมด 50 ต้น มีค่าน้อยกว่าทั้งหมดเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ฉายรังสีแกมมา (ตารางที่ 8)

พริกต้น G150/13 ถูกคัดเลือกด้วยลักษณะจำนวนผลต่อต้นมากที่สุด มีประชากรรุ่น M_1 จำนวน 100 ต้น พบว่า ในประชากรรุ่น M_1 มีลักษณะความสูงต้นที่มากกว่าต้นที่ไม่ฉายรังสีแกมมาจำนวน 80 ต้น และค่าน้อยจำนวน 20 ต้น เส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่มมีค่ามากกว่าต้นที่ไม่ฉายรังสีแกมมาทั้งหมด เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นมีค่ามากจำนวน 94 ต้น และค่าน้อยจำนวน 6 ต้น ความกว้างใบ และความยาวใบมีค่ามากจำนวน 59 ต้น และ 3 ต้น ส่วนค่าน้อยมีจำนวน 41 ต้น และ 97 ต้น ตามลำดับ จำนวนใบต่อต้นมีค่ามากจำนวน 8 ต้น และมีค่าน้อยจำนวน 92 ต้น จำนวนดอกต่อต้นมีค่ามากจำนวน 77 ต้น และมีค่าน้อยจำนวน 23 ต้น จำนวนผลต่อต้นมีค่ามากจำนวน 24 ต้น และค่าน้อยมี 76 ต้น น้ำหนักผลผลิตต่อต้นมีค่ามากจำนวน 12 ต้น และค่าน้อยจำนวน 88 ต้น ส่วนในลักษณะคุณภาพผล พบว่า น้ำหนักสดต่อผลค่ามากมีจำนวน 5 ต้น และค่าน้อยมีจำนวน 95 ต้น ความกว้างผล และความยาวผลมีค่ามากจำนวน 16 ต้น และ 17 ต้น ส่วนค่าน้อยมีจำนวน 84 และ 83 ต้น ตามลำดับ สีผลในค่าความสว่าง (L^*) ค่าสีแดงและสีเขียว (a^*) และค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (b^*) พบว่า มีค่ามากจำนวน 20, 3 และ 3 ต้น ส่วนค่าน้อยมีจำนวน 80 ต้น, 97 ต้น และ 97 ต้น ตามลำดับ และจำนวนเมล็ดต่อผลมีค่ามากจำนวน 17 ต้น และค่าน้อย 83 ต้น (ตารางที่ 9)

พริกต้น G300/1 ที่ถูกคัดเลือกจากลักษณะจำนวนดอกต่อต้นมากที่สุด มีประชากรรุ่น M_1 จำนวน 77 ต้น พบว่า ในประชากรรุ่น M_1 ลักษณะความสูงต้นที่มากกว่าต้นที่ไม่ฉายรังสีแกมมาจำนวน 44 ต้น และค่าน้อยจำนวน 33 ต้น เส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่มมีค่ามากจำนวน 74 ต้น และ

ค่าน้อยจำนวน 3 ต้น เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นมีค่ามากจำนวน 59 ต้น และค่าน้อยจำนวน 18 ต้น ความกว้างใบมีค่ามากจำนวน 10 ต้น และค่าน้อยจำนวน 67 ต้น จำนวนใบต่อต้นมีค่ามากจำนวน 4 ต้น และค่าน้อยจำนวน 73 ต้น จำนวนดอกต่อต้นมีค่ามากจำนวน 55 ต้น และค่าน้อยจำนวน 22 ต้น จำนวนผลต่อต้นค่ามากมีจำนวน 18 ต้น และค่าน้อยจำนวน 59 ต้น น้ำหนักผลผลิตต่อต้น พบค่ามากจำนวน 4 ต้น และค่าน้อย 73 ต้น ความกว้างผล และความยาวผลมีค่ามากจำนวน 8 และ 7 ต้น ส่วนค่าน้อยมีจำนวน 70 และ 73 ต้น ตามลำดับ ค่าความสว่าง (L^*) มีค่ามากจำนวน 4 ต้น และค่าน้อยมีจำนวน 73 ต้น ส่วนค่าสีแดงและสีเขียว (a^*) และค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (b^*) พบว่า ประชากรรุ่น M_1 ทั้งหมดมีค่าน้อยกว่าต้นที่ไม่ฉายรังสีแกมมา รวมถึงลักษณะความยาวใบ และ น้ำหนักสดต่อผลเช่นกัน และจำนวนเมล็ดต่อผล พบว่า ค่ามากมีจำนวน 7 ต้น และค่าน้อยมีจำนวน 70 ต้น (ตารางที่ 10)

พริกต้น G300/2 ที่คัดเลือกจากลักษณะน้ำหนักสดต่อผลผล และจำนวนเมล็ดมากที่สุด มีประชากรรุ่น M_1 จำนวน 92 ต้น พบว่า ความสูงต้นมีค่ามากจำนวน 42 ต้น และค่าน้อยจำนวน 50 ต้น เส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่มมีค่ามากจำนวน 83 ต้น และมีค่าน้อย 9 ต้น เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น ค่ามากมีจำนวน 72 ต้น และค่าน้อย 20 ต้น ความกว้างใบมีค่ามากจำนวน 51 ต้น และค่าน้อย 41 ต้น จำนวนใบต่อต้นค่ามากมีจำนวน 8 ต้น และค่าน้อย 84 ต้น จำนวนดอกต่อต้น พบว่า มีค่ามากจำนวน 59 ต้น และค่าน้อยจำนวน 33 ต้น จำนวนผลต่อต้นมีค่ามากจำนวน 24 ต้น และค่าน้อยจำนวน 68 ต้น น้ำหนักผลผลิตต่อต้นมีค่ามากจำนวน 12 ต้น และมีค่าน้อย 80 ต้น ส่วนลักษณะคุณภาพผลในน้ำหนักสดต่อผล ความกว้างผล ความยาวผล มีค่ามากจำนวน 1, 5 และ 2 ต้น ส่วนค่าน้อยมีจำนวน 91, 87 และ 90 ต้น ตามลำดับ ส่วนในลักษณะสีผล ค่าความสว่าง (L^*) ค่ามากมีจำนวน 13 ต้น และมีค่าน้อยจำนวน 79 ต้น ส่วนค่าสีแดงและสีเขียว (a^*) ประชากรรุ่น M_1 มีค่าน้อยกว่าต้นที่ไม่ฉายรังสีแกมมาทั้งหมด ค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (b^*) มีค่ามากจำนวน 5 ต้น และ มีค่าน้อยจำนวน 87 ต้น และจำนวนเมล็ดต่อผลมีค่ามากจำนวน 9 ต้น และค่าน้อยจำนวน 83 ต้น (ตารางที่ 11)

จากการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาในพริกประชากรรุ่น M_0 และจากการปลูกทดสอบ การแสดงออกด้านลักษณะฟีโนไทป์ในประชากรรุ่น M_1 ทำการคัดเลือกสายต้น G150/8 ซึ่งแสดง ค่าน้ำหนักผลผลิตต่อต้นมากที่สุดในประชากรรุ่น M_0 โดยมีประชากรรุ่น M_1 จำนวน 91 ต้น เพื่อตรวจสอบรูปแบบพันธุกรรมของพริกด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

ตารางที่ 6 การแสดงออกด้านฟีโนไทป์ของพริกที่ฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M₁ ต้น G150/6

ฟีโนไทป์	จำนวนต้น (ต้น)	
	ค่ามาก	ค่าน้อย
ความสูงต้น (เซนติเมตร)	43	46
เส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่ม (เซนติเมตร)	66	23
เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น (มิลลิเมตร)	56	33
ความกว้างใบ (มิลลิเมตร)	20	69
ความยาวใบ (มิลลิเมตร)	2	87
จำนวนใบต่อต้น (ใบ)	0	89
จำนวนดอกต่อต้น (ดอก)	43	46
จำนวนผลต่อต้น (ผล)	11	78
น้ำหนักผลผลิตต่อต้น (กรัม)	3	86
น้ำหนักสดต่อผล (กรัม)	0	89
ความกว้างผล (มิลลิเมตร)	2	87
ความยาวผล (มิลลิเมตร)	10	79
สีผล (L*)	11	78
สีผล (a*)	0	89
สีผล (b*)	0	89
จำนวนเมล็ดต่อผล (เมล็ด)	4	85

ตารางที่ 7 การแสดงออกด้านฟิโนไทป์ของพริกที่ฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M_1 ต้น G150/8

ฟิโนไทป์	จำนวนต้น (ต้น)	
	ค่ามาก	ค่าน้อย
ความสูงต้น (เซนติเมตร)	40	51
เส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่ม (เซนติเมตร)	74	17
เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น (มิลลิเมตร)	59	32
ความกว้างใบ (มิลลิเมตร)	30	61
ความยาวใบ (มิลลิเมตร)	1	90
จำนวนใบต่อต้น (ใบ)	8	83
จำนวนดอกต่อต้น (ดอก)	46	45
จำนวนผลต่อต้น (ผล)	19	72
น้ำหนักผลผลิตต่อต้น (กรัม)	8	83
น้ำหนักสดต่อผล (กรัม)	0	91
ความกว้างผล (มิลลิเมตร)	3	88
ความยาวผล (มิลลิเมตร)	3	88
สีผล (L*)	14	77
สีผล (a*)	1	90
สีผล (b*)	7	84
จำนวนเมล็ดต่อผล (เมล็ด)	4	87

ตารางที่ 8 การแสดงออกด้านฟิโนไทป์ของพริกที่ฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M_1 ต้น G150/11

ฟิโนไทป์	จำนวนต้น (ต้น)	
	ค่ามาก	ค่าน้อย
ความสูงต้น (เซนติเมตร)	7	43
เส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่ม (เซนติเมตร)	44	6
เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น (มิลลิเมตร)	28	22
ความกว้างใบ (มิลลิเมตร)	11	39
ความยาวใบ (มิลลิเมตร)	0	50
จำนวนใบต่อต้น (ใบ)	0	50
จำนวนดอกต่อต้น (ดอก)	25	25
จำนวนผลต่อต้น (ผล)	4	46
น้ำหนักผลผลิตต่อต้น (กรัม)	1	49
น้ำหนักสดต่อผล (กรัม)	4	46
ความกว้างผล (มิลลิเมตร)	8	42
ความยาวผล (มิลลิเมตร)	4	46
สีผล (L^*)	5	45
สีผล (a^*)	0	50
สีผล (b^*)	0	50
จำนวนเมล็ดต่อผล (เมล็ด)	10	40

ตารางที่ 9 การแสดงออกด้านฟีโนไทป์ของพริกที่ฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M_1 ต้น G150/13

ฟีโนไทป์	จำนวนต้น (ต้น)	
	ค่ามาก	ค่าน้อย
ความสูงต้น (เซนติเมตร)	80	20
เส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่ม (เซนติเมตร)	100	0
เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น (มิลลิเมตร)	94	6
ความกว้างใบ (มิลลิเมตร)	59	41
ความยาวใบ (มิลลิเมตร)	3	97
จำนวนใบต่อต้น (ใบ)	8	92
จำนวนดอกต่อต้น (ดอก)	77	23
จำนวนผลต่อต้น (ผล)	24	76
น้ำหนักผลผลิตต่อต้น (กรัม)	12	88
น้ำหนักสดต่อผล (กรัม)	5	95
ความกว้างผล (มิลลิเมตร)	16	84
ความยาวผล (มิลลิเมตร)	17	83
สีผล (L*)	20	80
สีผล (a*)	3	97
สีผล (b*)	3	97
จำนวนเมล็ดต่อผล (เมล็ด)	17	83

ตารางที่ 10 การแสดงออกด้านฟิโนไทป์ของพริกที่ฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M_1 ต้น G300/1

ฟิโนไทป์	จำนวนต้น (ต้น)	
	ค่ามาก	ค่าน้อย
ความสูงต้น (เซนติเมตร)	44	33
เส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่ม (เซนติเมตร)	74	3
เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น (มิลลิเมตร)	59	18
ความกว้างใบ (มิลลิเมตร)	10	67
ความยาวใบ (มิลลิเมตร)	0	77
จำนวนใบต่อต้น (ใบ)	4	73
จำนวนดอกต่อต้น (ดอก)	55	22
จำนวนผลต่อต้น (ผล)	18	59
น้ำหนักผลผลิตต่อต้น (กรัม)	4	73
น้ำหนักสดต่อผล (กรัม)	0	77
ความกว้างผล (มิลลิเมตร)	8	69
ความยาวผล (มิลลิเมตร)	7	70
สีผล (L*)	4	73
สีผล (a*)	0	77
สีผล (b*)	0	77
จำนวนเมล็ดต่อผล (เมล็ด)	7	70

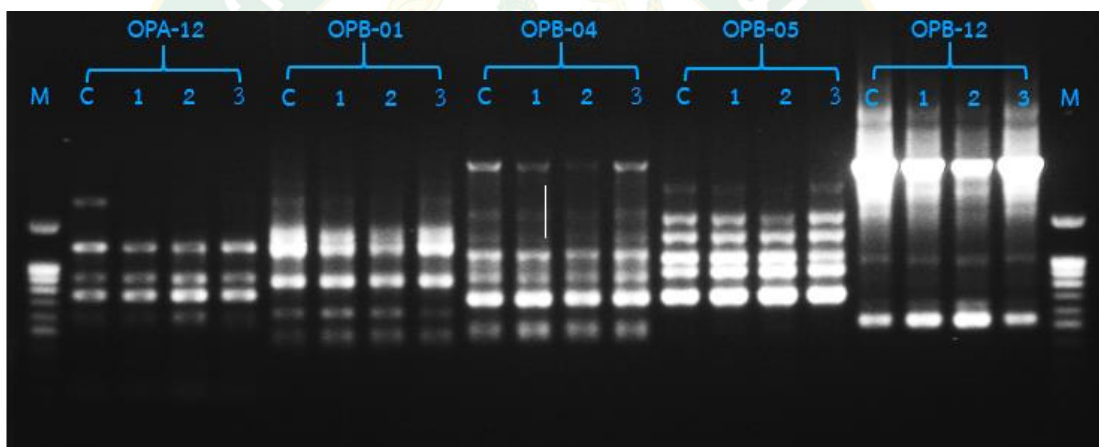
ตารางที่ 11 การแสดงออกด้านฟิโนไทป์ของพริกที่ฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M_1 ต้น G300/2

ฟิโนไทป์	จำนวนต้น (ต้น)	
	ค่ามาก	ค่าน้อย
ความสูงต้น (เซนติเมตร)	42	50
เส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่ม (เซนติเมตร)	83	9
เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น (มิลลิเมตร)	72	20
ความกว้างใบ (มิลลิเมตร)	51	41
ความยาวใบ (มิลลิเมตร)	0	92
จำนวนใบต่อต้น (ใบ)	8	84
จำนวนดอกต่อต้น (ดอก)	59	33
จำนวนผลต่อต้น (ผล)	24	68
น้ำหนักผลผลิตต่อต้น (กรัม)	12	80
น้ำหนักสดต่อผล (กรัม)	1	91
ความกว้างผล (มิลลิเมตร)	5	87
ความยาวผล (มิลลิเมตร)	2	90
สีผล (L*)	13	79
สีผล (a*)	0	92
สีผล (b*)	5	87
จำนวนเมล็ดต่อผล (เมล็ด)	9	83

การทดลองที่ 3 การตรวจสอบรูปแบบทางพันธุกรรมของพริกที่ฉายรังสีแกมมาโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

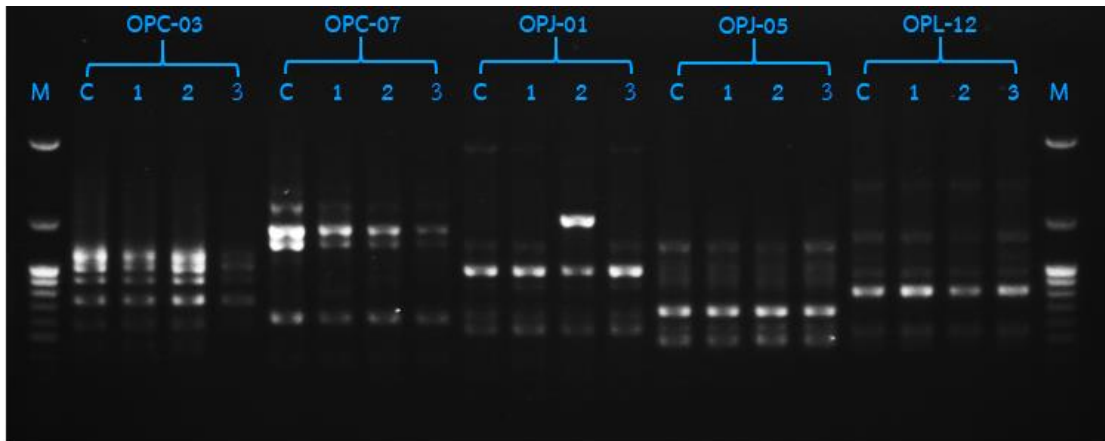
การคัดเลือกไพรเมอร์จากเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD

ผลการทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD จำนวน 30 ไพรเมอร์ พบว่ามีเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD จำนวน 3 ไพรเมอร์ ที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างต้นพริกชุดควบคุมกับต้นพริกที่ฉายรังสีแกมมา ได้แก่ ไพรเมอร์ OPA-12 (ภาพที่ 9) ไพรเมอร์ OPJ-01 (ภาพที่ 10) และไพรเมอร์ OPAB-20 (ภาพที่ 11) และมีจำนวน 27 ไพรเมอร์ ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชุดควบคุมกับต้นที่ฉายรังสีแกมมาได้ จากนั้นนำเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD จำนวน 3 ไพรเมอร์ ทดสอบกับประชากรรุ่น M_0 และประชากรรุ่น M_1 เพื่อใช้เป็นข้อมูลด้านจีโนไทป์สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์



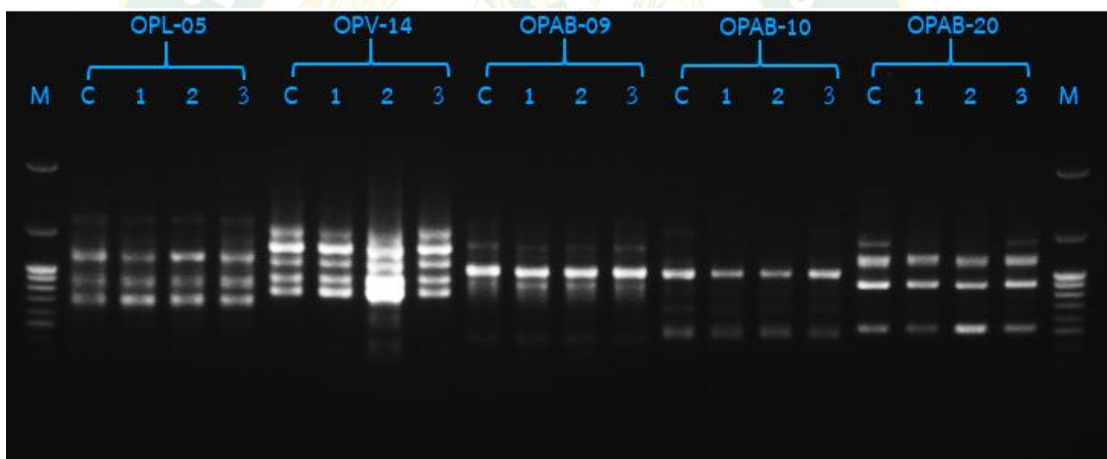
ภาพที่ 9 ผลการคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD กับไพรเมอร์ OPA-12

หมายเหตุ M: DNA Ladder, C: ชุดควบคุม, 1, 2 และ 3: ตัวอย่างต้นพริกที่ฉายรังสีแกมมา



ภาพที่ 10 ผลการคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD กับไพรเมอร์ OPJ-01

หมายเหตุ M: DNA Ladder, C: ชุดควบคุม, 1, 2 และ 3: ตัวอย่างต้นพริกที่ฉายรังสีแกมมา

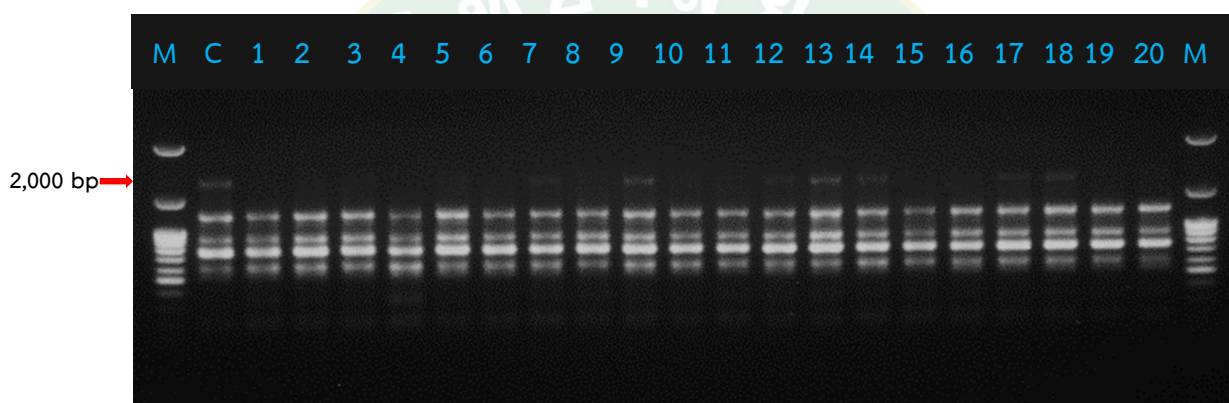


ภาพที่ 11 ผลการคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD กับไพรเมอร์ OPAB-20

หมายเหตุ M: DNA Ladder, C: ชุดควบคุม, 1, 2 และ 3: ตัวอย่างต้นพริกที่ฉายรังสีแกมมา

การตรวจสอบความแตกต่างของพริกที่ฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M_0 ด้วยเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD

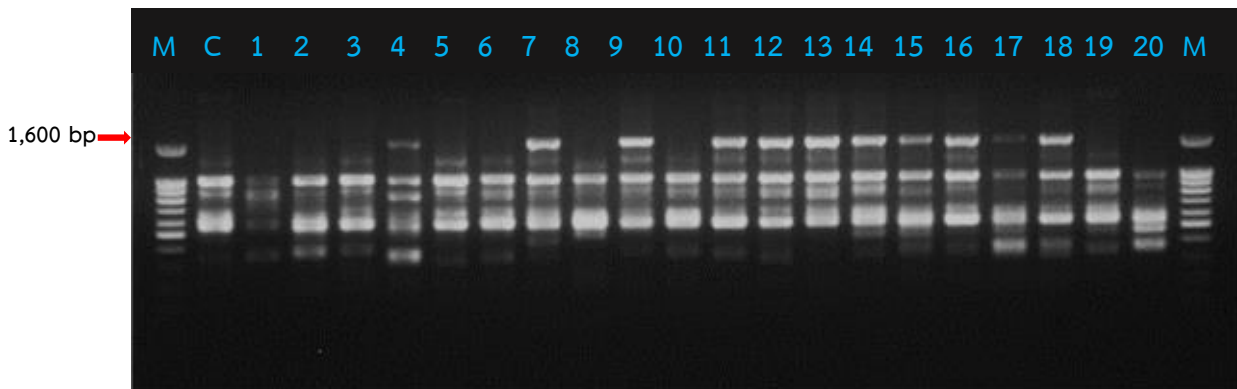
จากการตรวจสอบรูปแบบพันธุกรรมของพริกที่ฉายรังสีแกมมาเปรียบเทียบกับพริกไม่ฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M_0 จำนวน 20 ต้น ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD จำนวน 3 ไพรเมอร์ ที่แสดงความแตกต่างได้ พบว่า ไพรเมอร์ OPA-12 แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างชุดควบคุมกับต้นพริกที่ฉายรังสีแกมมา ที่ดีเอ็นเอขนาด 2,000 bp จำนวน 13 ต้น คิดเป็น 65 เปอร์เซ็นต์ คือ ต้น G150/1, G150/2 G150/3, G150/4, G150/5, G150/6, G150/8, G150/10, G150/11, G150/15, G150/16, G300/1 และ G300/2 (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 ผลการทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD ในพริกประชากรรุ่น M_0 กับไพรเมอร์ OPA-12

หมายเหตุ M: DNA ladder, C: ชุดควบคุม, 1 ถึง 20: ตัวอย่างต้นพริกที่ฉายรังสีแกมมา

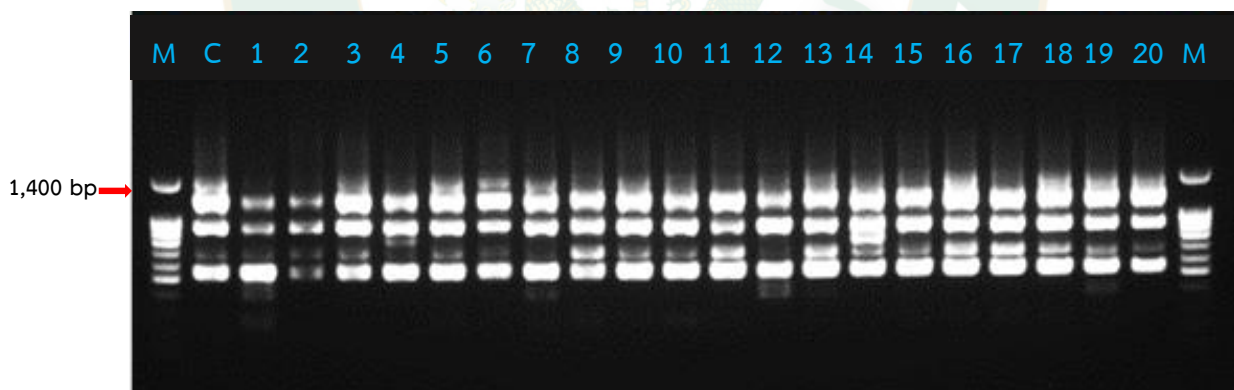
ไพรเมอร์ OPJ-01 แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างชุดควบคุม (C) กับต้นพริกที่ฉายรังสีแกมมาที่ดีเอ็นเอขนาด 1,600 bp ได้จำนวน 11 ต้น คิดเป็น 55 เปอร์เซ็นต์ คือ ต้น G150/4, G150/7 G150/9, G150/11, G150/12, G150/13, G150/14, G150/15, G150/16, G150/17 และ G150/18 (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 ผลการทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD ในพริกประชากรรุ่น M_0 กับไพรเมอร์ OPJ-01

หมายเหตุ M: DNA ladder, C: ชุดควบคุม, 1 ถึง 20: ตัวอย่างต้นพริกที่ฉายรังสีแกมมา

ไพรเมอร์ OPAB-20 สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างชุดควบคุม (C) กับต้นพริกที่ฉายรังสีแกมมาดีเอ็นเอขนาด 1,400 bp ได้จำนวน 3 ต้น คิดเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ คือ ต้น G150/1, G150/2 และ G150/4 (ภาพที่ 14)

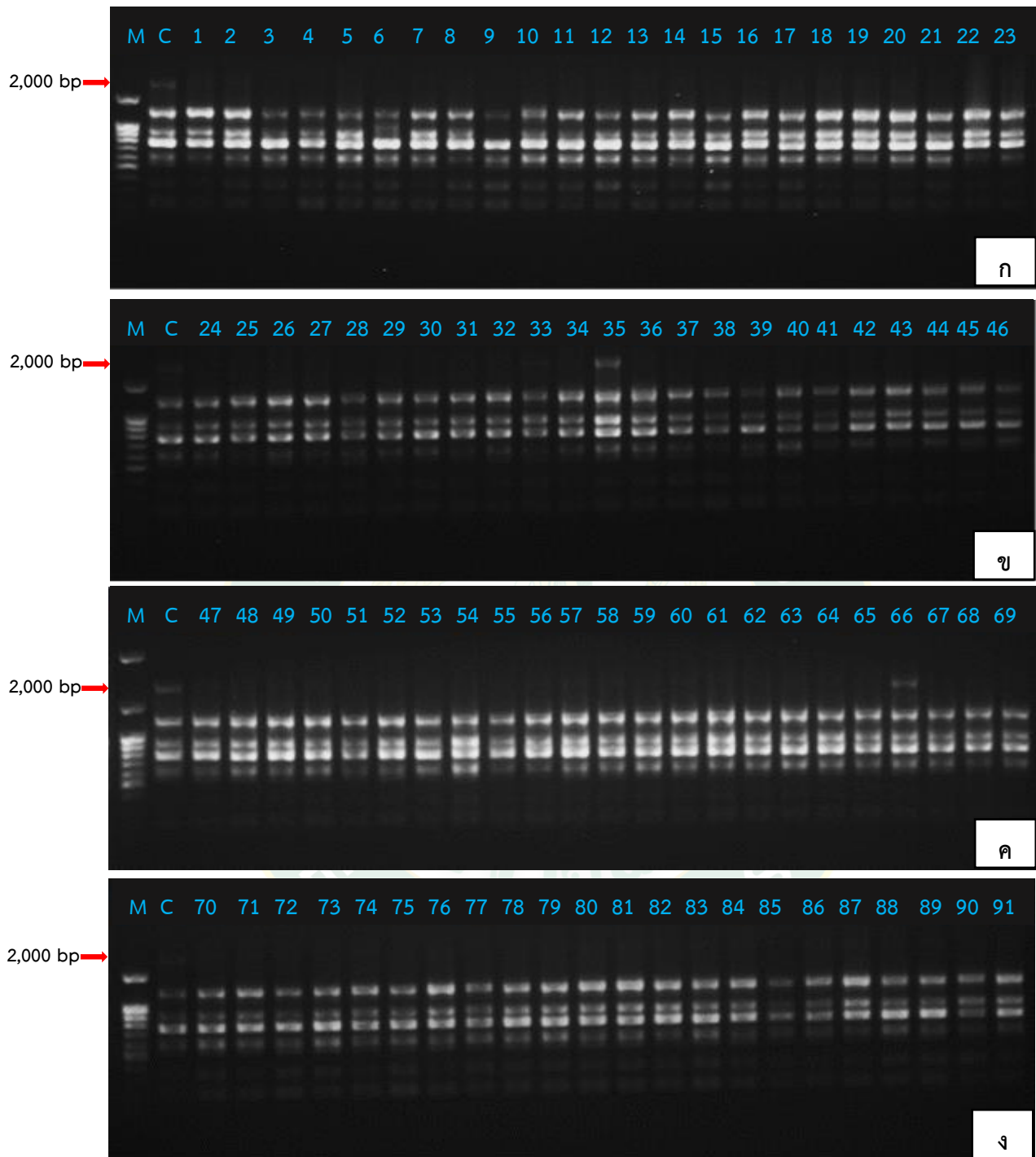


ภาพที่ 14 ผลการทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD ในพริกประชากรรุ่น M_0 กับไพรเมอร์ OPAB-20

หมายเหตุ M: DNA ladder, C: ชุดควบคุม, 1 ถึง 20: ตัวอย่างต้นพริกที่ฉายรังสีแกมมา

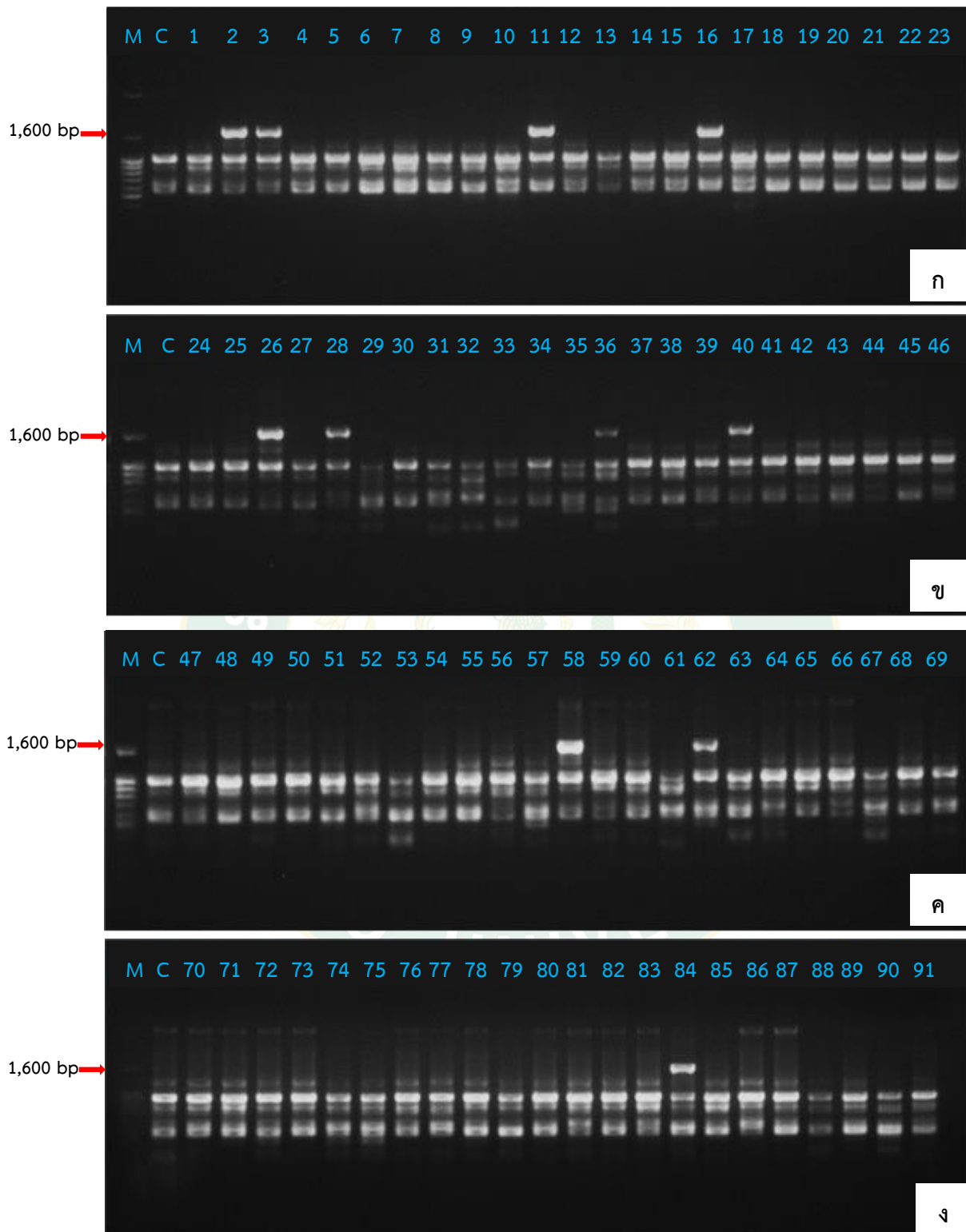
การตรวจสอบรูปแบบพันธุกรรมของพริกที่ฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M_1 จากเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD

จากการตรวจสอบรูปแบบการแสดงออกทางพันธุกรรมของพริกในประชากรรุ่น M_1 ในต้นที่ถูกคัดเลือกจากประชากรรุ่น M_0 ที่มีลักษณะน้ำหนักผลผลิตต่อต้นมากที่สุด (G150/8) มาปลูกเป็นประชากรรุ่น M_1 มีจำนวนประชากรทั้งหมด 91 ต้น และทดสอบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD จำนวน 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ OPA-12, ไพรเมอร์ OPJ-01 และไพรเมอร์ OPAB-20 พบว่า ไพรเมอร์ OPA-12 สามารถแสดงรูปแบบทางพันธุกรรมที่ดีเอ็นเอขนาด 2,000 bp (ภาพที่ 15) ไพรเมอร์ OPJ-01 แสดงความแตกต่างที่ดีเอ็นเอขนาด 1,600 bp (ภาพที่ 16) และไพรเมอร์ OPAB-20 สามารถแสดงความแตกต่างที่ดีเอ็นเอขนาด 1,400 bp และที่ดีเอ็นเอขนาด 900 bp (ภาพที่ 17) เมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่แสดงไปเปรียบเทียบเพื่อหาความสัมพันธ์กับการแสดงออกด้านฟีโนไทป์เกี่ยวกับผลผลิตและคุณภาพของผล คือ ลักษณะจำนวนผลต่อต้น น้ำหนักผลผลิตต่อต้น น้ำหนักสดต่อผล ความกว้างผล และความยาวผล พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏยังไม่สอดคล้องกับลักษณะฟีโนไทป์ โดยความสัมพันธ์ของลักษณะฟีโนไทป์และจีโนไทป์ที่ตรวจสอบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏไม่เป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงความเฉพาะเจาะจงกับลักษณะของจำนวนผลต่อต้น น้ำหนักผลผลิตต่อต้น น้ำหนักสดต่อผล ความกว้างผล และความยาวผล (ตารางที่ 12) ดังนั้น ไพรเมอร์ที่คัดเลือกที่นำมาใช้ในการตรวจสอบครั้งนี้ยังไม่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับลักษณะของจำนวนผลต่อต้น น้ำหนักผลผลิตต่อต้น น้ำหนักสดต่อผล ความกว้างผล และความยาวผลในงานทดลองนี้



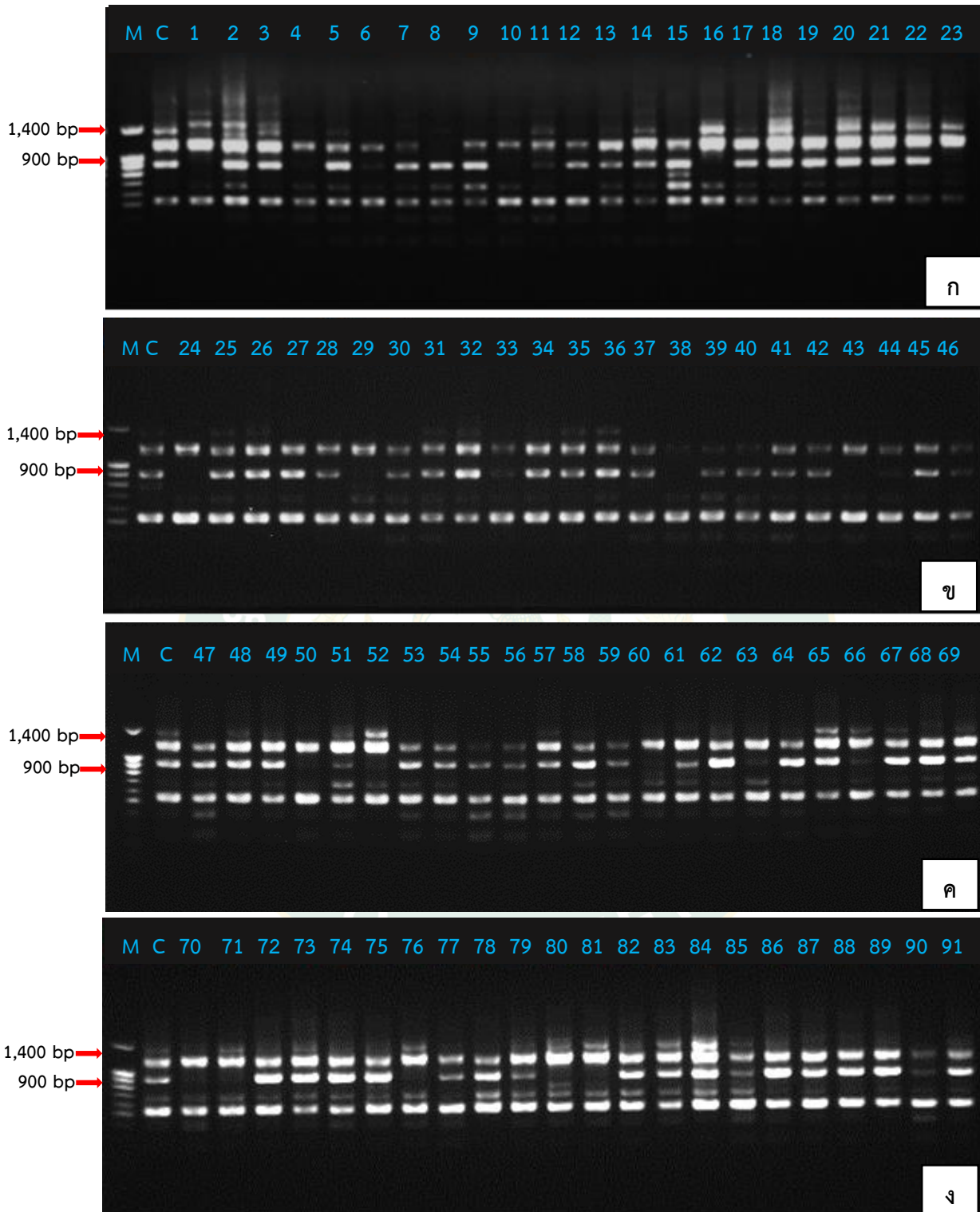
ภาพที่ 15 รูปแบบการแสดงออกทางพันธุกรรมของพริกประชากรรุ่น M_1 กับไพรเมอร์ OPA-12

หมายเหตุ M: DNA ladder, C: ชุดควบคุม, ก: พริกต้นที่ 1-23, ข: พริกต้นที่ 24-46, ค: พริกต้นที่ 47-69 และ
ง: พริกต้นที่ 70-91



ภาพที่ 16 รูปแบบการแสดงออกทางพันธุกรรมของพริกประชากรรุ่น M_1 กับไพรเมอร์ OPJ-01

หมายเหตุ M: DNA ladder, C: ชุดควบคุม, ก: พริกต้นที่ 1-23, ข: พริกต้นที่ 24-46, ค: พริกต้นที่ 47-69 และ
ง: พริกต้นที่ 70-91



ภาพที่ 17 รูปแบบการแสดงออกทางพันธุกรรมของพริกประชากรรุ่น M_1 กับไพรเมอร์ OPAB-20

หมายเหตุ M: DNA ladder, C: ชุดควบคุม, ก: พริกต้นที่ 1-23, ข: พริกต้นที่ 24-46, ค: พริกต้นที่ 47-69 และ ง: พริกต้นที่ 70-91

ตารางที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบผลของฟีโนไทป์กับจีโนไทป์ของประชากรรุ่น M₁

ต้นที่	ฟีโนไทป์					จีโนไทป์			
	จำนวนผลต่อต้น	น้ำหนักผลผลิตต่อต้น	น้ำหนักผลต่อผล	ความกว้างผล	ความยาวผล	OPA-12 (2,000 bp)	OPJ-01 (1,600 bp)	OPAB-20 (1,400 bp)	OPAB-20 (900 bp)
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18									
19									
20									

หมายเหตุ ■ คือ ลักษณะฟีโนไทป์มีค่ามากกว่าชุดควบคุม ■ คือ ไม่แสดงแถบดีเอ็นเอ

■ คือ ลักษณะฟีโนไทป์มีค่าน้อยกว่าชุดควบคุม ■ คือ แสดงแถบดีเอ็นเอ

ตารางที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบผลของฟีโนไทป์กับจีโนไทป์ของประชากรรุ่น M_1 (ต่อ)


ต้นที่	ฟีโนไทป์					จีโนไทป์			
	จำนวนผลต่อต้น	น้ำหนักผลสดต่อต้น	น้ำหนักสดต่อผล	ความกว้างผล	ความยาวผล	OPA-12 (2,000 bp)	OPJ-01 (1,600 bp)	OPAB-20 (1,400 bp)	OPAB-20 (900 bp)
21									
22									
23									
24									
25									
26									
27									
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									
35									
36									
37									
38									
39									
40									

หมายเหตุ


- คือ ลักษณะฟีโนไทป์มีค่ามากกว่าชุดควบคุม
- คือ ไม่แสดงแถบดีเอ็นเอ
- คือ ลักษณะฟีโนไทป์มีค่าน้อยกว่าชุดควบคุม
- คือ แสดงแถบดีเอ็นเอ


ตารางที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบผลของฟีโนไทป์กับจีโนไทป์ของประชากรรุ่น M_1 (ต่อ)

ต้นที่	ฟีโนไทป์					จีโนไทป์			
	จำนวนผลต่อต้น	น้ำหนักผลสดต่อต้น	น้ำหนักสดต่อผล	ความกว้างผล	ความยาวผล	OPA-12 (2,000 bp)	OPJ-01 (1,600 bp)	OPAB-20 (1,400 bp)	OPAB-20 (900 bp)
41	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Green	Yellow
42	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Green	Yellow
43	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Green	Green
44	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Green	Yellow
45	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Green	Yellow
46	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Green	Yellow
47	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Green	Yellow
48	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Yellow	Yellow
49	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Yellow	Yellow
50	Red	Red	Blue	Red	Blue	Green	Green	Green	Yellow
51	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Yellow	Yellow
52	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Yellow	Yellow
53	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Green	Yellow
54	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Green	Yellow
55	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Green	Yellow
56	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Green	Yellow
57	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Yellow	Yellow
58	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Green	Yellow	Green	Yellow
59	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Green	Yellow
60	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Yellow	Yellow

หมายเหตุ  คือ ลักษณะฟีโนไทป์มีค่ามากกว่าชุดควบคุม

 คือ ไม่แสดงแถบดีเอ็นเอ

 คือ ลักษณะฟีโนไทป์มีค่าน้อยกว่าชุดควบคุม

 คือ แสดงแถบดีเอ็นเอ

ตารางที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบผลของฟีโนไทป์กับจีโนไทป์ของประชากรรุ่น M_1 (ต่อ)

ต้นที่	ฟีโนไทป์					จีโนไทป์			
	จำนวนผลต่อต้น	น้ำหนักผลผลิตต่อต้น	น้ำหนักผลต่อผล	ความกว้างผล	ความยาวผล	OPA-12 (2,000 bp)	OPJ-01 (1,600 bp)	OPAB-20 (1,400 bp)	OPAB-20 (900 bp)
61									
62									
63									
64									
65									
66									
67									
68									
69									
70									
71									
72									
73									
74									
75									
76									
77									
78									
79									
80									

หมายเหตุ

<p> คือ ลักษณะฟีโนไทป์มีค่ามากกว่าชุดควบคุม</p> <p> คือ ลักษณะฟีโนไทป์มีค่าน้อยกว่าชุดควบคุม</p>	<p> คือ ไม่แสดงแถบดีเอ็นเอ</p> <p> คือ แสดงแถบดีเอ็นเอ</p>
---	---

ตารางที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบผลของฟีโนไทป์กับจีโนไทป์ของประชากรรุ่น M_1 (ต่อ)

ต้นที่	ฟีโนไทป์					จีโนไทป์			
	จำนวนผลต่อต้น	น้ำหนักผลผลิตต่อต้น	น้ำหนักสดต่อผล	ความกว้างผล	ความยาวผล	OPA-12 (2,000 bp)	OPJ-01 (1,600 bp)	OPAB-20 (1,400 bp)	OPAB-20 (900 bp)
81									
82									
83									
84									
85									
86									
87									
88									
89									
90									
91									

หมายเหตุ



คือ ลักษณะฟีโนไทป์มีค่ามากกว่าชุดควบคุม



คือ ไม่แสดงแถบดีเอ็นเอ



คือ ลักษณะฟีโนไทป์มีค่าน้อยกว่าชุดควบคุม



คือ แสดงแถบดีเอ็นเอ

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ระยะเวลาในการงอกของเมล็ดหลังจากฉายรังสีแกมมาเปรียบเทียบกับเมล็ดที่ไม่ฉายรังสีแกมมา เมล็ดที่ผ่านการฉายรังสีใช้จำนวนวันในการงอกของเมล็ดเฉลี่ยอยู่ที่ 8.33-11.67 วัน มากกว่าเมล็ดปกติซึ่งอยู่ที่ 5.67 วัน สาเหตุที่เมล็ดพริกที่ฉายรังสีแกมมาใช้ระยะเวลาการงอกนานกว่าอาจเนื่องจากเมล็ดที่ผ่านการฉายรังสีทำให้เกิดความผิดปกติของการพัฒนาที่สมบูรณ์ของเอ็มบริโอ (Omar *et al.*, 2008) และมีแนวโน้มใช้ระยะเวลามากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณรังสีที่ฉาย ซึ่งอาจมีผลมาจากการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ (RNA) หรือโปรตีนระหว่างก่อนระยะการงอก (Chopra, 2005) โดยปกติเมล็ดที่มีความแข็งแรงขบวนการงอกของเมล็ดเกิดขึ้นเมื่อเมล็ดได้รับความชื้นส่งผลให้น้ำเยื่อของเอ็มบริโอพองและเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนตัวลง น้ำและแก๊สจะซึมผ่านไปสู่ภายในเมล็ด หลังจากนั้นขบวนการงอกจะเริ่มขึ้น โดยจะมีการย่อยสลายแป้งและการลำเลียงสารอาหารไปยังรากและยอดอ่อน (อัจฉรี, 2552) ในการงอกของเมล็ดพริกหลังฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ ทำการตรวจสอบความงอกที่ 2 สัปดาห์ และ 3 สัปดาห์หลังเพาะเมล็ด พบว่าการงอกมีเปอร์เซ็นต์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดที่ไม่ฉายรังสีอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ การฉายรังสีแกมมาที่ 150 เกรย์ การงอกของเมล็ดอยู่ที่ 55.13-57.69 เปอร์เซ็นต์ รังสีแกมมา 300 เกรย์ อยู่ที่ 71.15-76.92 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การฉายรังสี 450 เกรย์ อยู่ที่ 55.77-87.17 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณการฉายรังสีแกมมา 600 เกรย์ อยู่ที่ 73.08-75.64 เปอร์เซ็นต์ และในงานทดลองนี้มีการนำเมล็ดไปแช่น้ำเป็นเวลา 1 คืน ส่งผลให้เมล็ดอิมตัวไปด้วยน้ำ ทำให้การงอกของเมล็ดดี และมีการงอกทุกเมล็ดในสิ่งทดลองที่ไม่ฉายรังสีแกมมา ซึ่งตรงกันข้ามกับเมล็ดที่แช่น้ำแล้วนำไปฉายรังสีแกมมา ถึงแม้การงอกของเมล็ดเกิดขึ้นก็ตาม แต่ลักษณะต้นกล้าที่งอกนั้นมีบางต้นไม่สมบูรณ์และการงอกของเมล็ดให้เปอร์เซ็นต์ที่ลดลง สาเหตุเกิดจากผลของการฉายรังสีมีผลในทางตรง (direct) และทางอ้อม (indirect) ที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอ (Desouky *et al.*, 2015) เนื่องจากน้ำที่เป็นตัวกลางภายในเซลล์เมื่อกระทบกับรังสีทำให้แตกตัวเป็นไอออน และสร้างอนุมูลอิสระคือ reactive oxygen species (ROS) ที่ถูกสร้างเมื่อเซลล์อยู่ภายใต้ความเครียด ปัจจัยที่ทำให้พืชเกิดความเครียด เช่น สภาวะเครียดเนื่องจากน้ำ ความเค็ม อุณหภูมิสูง รังสี โรคและแมลง เป็นต้น (Das and Roychoudhury, 2014) ซึ่งการเกิดที่เกี่ยวข้องกับความชื้นในเมล็ดเป็นผลโดยทางอ้อมของการเกิดความเสียหายกับเซลล์ (Lee *et al.*, 2009) ผลจากความเสียหายของดีเอ็นเอในเซลล์ทำให้ยับยั้งวงจรเซลล์ (cell cycle) ที่ประกอบด้วย 4 ระยะ คือ ระยะ G1 (ระยะการเจริญของเซลล์ก่อนเกิดการสร้าง DNA ขึ้นใหม่) ระยะ S (เกิด DNA replication) ระยะ G2 (ระยะการเจริญเติบโตของเซลล์หลังสร้าง DNA) และระยะ mitosis (เป็นการแบ่งเซลล์เกิดเป็นเซลล์ลูก) (นพดล, 2555) จากความผิดปกติของกระบวนการแบ่งเซลล์นี้ ส่งผลยับยั้งการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้าหลังจากฉาย

รังสีแกมมา (Kim *et al.*, 2019) รวมไปถึงการถอดรหัส (transcription) กระบวนการซ่อมแซม ดีเอ็นเอ (DNA repair) ที่ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อเกิดความผิดพลาดในการซ่อมแซมตัวเองของดีเอ็นเอมีความผิดปกติที่สามารถส่งผลกระทบต่อประชากรลูกได้ (Cool and Veylder, 2009) และการป้องกันการตายของ เซลล์ (Nakano *et al.*, 2017) ในช่วงแรกที่ตรวจสอบต้นกล้าพริก พบว่า เมื่อระยะเวลาผ่านไปต้น พริกเกิดการตายขึ้นในต้นที่มีการงอกไม่สมบูรณ์ ต้นพริกสามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงระยะแรกของการเจริญเติบโต แต่ไม่สามารถรอดชีวิตในช่วงเวลาหนึ่งได้ จึงตรวจสอบการรอดชีวิตของต้นกล้าพริก ที่ 8 สัปดาห์หลังการเพาะเมล็ด พบว่า พริกที่ไม่ฉายรังสีแกมมามีการรอดชีวิตของต้นกล้า 100 เปอร์เซ็นต์ และในพริกที่ฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ มีต้นที่รอดชีวิตเพียงการฉายรังสีแกมมา 150 เกรย์ จำนวน 18 ต้น (11.54%) และกานฉายรังสีแกมมา 300 เกรย์ จำนวน 2 ต้น (1.28%) ส่วนการฉายรังสีแกมมา 450 เกรย์ และ 600 เกรย์ ต้นกล้าพริกตายทั้งหมด ซึ่งจากรายงานของ Jo *et al.* (2016) พบว่า เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและการเจริญเติบโตลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณการฉายรังสีแกมมา Tomlekova *et al.* (2006) ทำการศึกษาผลของการฉายรังสีแกมมาต่อการงอกของ เมล็ดและการรอดชีวิตของพริกสารพันธุ์ 'Herbar' พบว่า ในการฉายรังสีปริมาณ 60 เกรย์ มีต้นกล้ารอดชีวิตอยู่ที่ 83.6 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การฉายรังสีที่ 160 เกรย์พบเพียง 29.4 เปอร์เซ็นต์ และจากการรายงานของ Wi *et al.* (2007) รายงานว่าการฉายรังสีในปริมาณต่ำสามารถมีผลกระทบ กับกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมน กระตุ้นการงอกและการเจริญเติบโตได้ นอกจากนี้ยังมีรายงาน การลดลงของการรอดชีวิตเมื่อเพิ่มปริมาณรังสีแกมมาในมะเขือเทศ (Norfadzrin *et al.*, 2007) และข้าว (ธนพร และคณะ, 2560) จากข้อมูลการรอดชีวิตของต้นพริกในงานทดลองนี้ได้ทำการหา ปริมาณของรังสีแกมมาที่ทำให้ถึงความตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD₅₀) พบว่า ปริมาณรังสีแกมมาที่ทำให้ ถึงความตาย 50 เปอร์เซ็นต์อยู่ที่ 105 เกรย์ ซึ่งในการทดลองเกี่ยวกับการฉายรังสีแกมมากับเมล็ด พริกที่ผ่านมามีการรายงานค่า LD₅₀ ของการฉายรังสีแกมมากับเมล็ดพริกอยู่ระหว่าง 422.64-629.68 เกรย์ (Gaswanto *et al.*, 2016), 445 เกรย์ (Omar *et al.*, 2008) และ 17.8 กิโลแรม (Sood *et al.*, 2016) และยังมีรายงานของ Aisha *et al.* (2018) ได้ศึกษาสายพันธุ์ พริกกับปริมาณที่ทำให้พืชตาย 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่า พริกสายพันธุ์ 'Bangi 3' มีค่า LD₅₀ อยู่ที่ 310 เกรย์ ในขณะที่พันธุ์ 'Bangi 5' อยู่ที่ 447 เกรย์ ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ได้ว่า รังสีแกมมามีผลกับพืชได้ นอกจากปริมาณของรังสีที่ฉายกับเมล็ดและความชื้น ยังมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับชนิดและสายพันธุ์ของ พืชด้วย (Tabasum *et al.*, 2011)

จากการตรวจสอบการรอดชีวิตของต้นพริกในประชากรรุ่น M₀ หลังการฉายรังสีแกมมาที่ ปริมาณ 150-600 เกรย์ พบว่า ลักษณะสัณฐานวิทยาในระยะเจริญเติบโตเต็มที่ (120 วันหลังการย้าย ปลูกลง) มีลักษณะที่แตกต่างกันทั้งความสูงของต้น เส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่ม เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น ความกว้างใบ ความยาว จำนวนใบต่อต้น จำนวนดอกต่อต้น จำนวนผลต่อต้น น้ำหนักผลผลิตต่อต้น

ตลอดจนลักษณะคุณภาพผล ได้แก่ น้ำหนักสดต่อผล ความกว้างผล ความยาวผล สีผล และจำนวนเมล็ด จากการศึกษาของ Mendoza *et al.* (2011) ทำการศึกษาผลของการฉายรังสีแกมมาที่เมล็ดพริกพันธุ์ Chile de Agua กับการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 20-120 เกรย์ ด้านการเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้น พบว่า ลักษณะที่แตกต่างกันในความสูงของต้นหลังการย้ายปลูก 30 วัน และจำนวนผลต่อต้น วิชัย และคณะ (2550) ได้ศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีผลต่อการกลายพันธุ์พริก พันธุ์หัวเรือห้วยทราย ที่การฉายรังสีแกมมาปริมาณ 400 เกรย์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะจำนวน 2 ต้น คือ มีลักษณะใบเป็นลอนคลื่น ผิวใบไม่เรียบ มีรอยหยักทั่วใบ และไม่ออกดอกติดผลตลอดอายุปลูก อีกต้นหนึ่งมีลักษณะต้นเป็นพุ่มและใบหนา นอกจากการฉายรังสีแกมมาที่ฉายในพริก ยังมีการใช้ประโยชน์จากสารก่อกลายพันธุ์ในพืชชนิดอื่นด้วย Minisi *et al.* (2013) ทำการฉายรังสีในพืชวงศ์กะเพรา พบว่า การฉายรังสีส่งผลอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติต่อความสูงของต้น จำนวนกิ่ง และจำนวนดอกต่อต้นต่อกิ่ง และ Irfaq and Nawab (2001) ฉายรังสีแกมมาที่เมล็ดข้าวสาลี พบว่าการฉายรังสีแกมมาที่ 400 เกรย์ มีผลกับความสูงของต้น จากความหลากหลายของลักษณะต้นพริกที่เกิดขึ้นในงานวิจัยครั้งนี้ หรือจากการวิจัยอื่นๆ สาเหตุการกลายของพืชที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยรังสีแกมมาเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นแบบไม่จำเพาะเจาะจง หรือเป็นแบบสุ่มโดยขึ้นอยู่กับโอกาสและปัจจัยต่างๆ (อรุณี, 2550) ส่งผลให้ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่เกิดขึ้นสามารถเกิดได้หลายลักษณะ เนื่องจากการฉายรังสีแกมมาที่เมล็ดเป็นวิธีหนึ่งที่มีการใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืช สามารถทำให้พืชมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น ด้วยรังสีสามารถทำให้เกิดความแปรปรวนของพันธุกรรมเพื่อเลือกรูปแบบฟีโนไทป์ใหม่ที่น่าไปสู่การปรับปรุงลักษณะของพืช เช่น ลักษณะความต้านทาน ปริมาณผลผลิต และคุณภาพ เป็นต้น (Ashraf *et al.*, 2003) จากการเปลี่ยนแปลงลักษณะของพืชที่เกิดขึ้นในการวิจัยที่ผ่านมาเป็นตัวบ่งชี้ได้ว่าการฉายรังสีแกมมามีประโยชน์อย่างมากในการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืช (Kiong *et al.*, 2008) การฉายรังสีแกมมาทั้งในปริมาณต่ำ หรือปริมาณสูงสามารถมีผลทั้งในทางการส่งเสริมและการยับยั้งการงอก การเจริญเติบโต และการตอบสนองในทางชีวเคมีของพืชได้ (Wi *et al.*, 2005)

จากการบันทึกข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาของพริกในประชากรรุ่น M_0 ได้ทำการคัดเลือกพริกจำนวน 6 ต้น เพื่อนำไปปลูกทดสอบการแสดงออกด้านฟีโนไทป์ในประชากรรุ่น M_1 เปรียบเทียบต้นที่ไม่ฉายรังสีแกมมา พบว่า ลักษณะการแสดงออกของประชากรรุ่น M_1 มีความแตกต่างกันซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ต้นที่มีค่าลักษณะฟีโนไทป์มากกว่าต้นที่ไม่ฉายรังสีแกมมา และอีกกลุ่มคือต้นที่มีค่าลักษณะฟีโนไทป์ที่ปรากฏน้อยกว่าต้นที่ไม่ฉายรังสีแกมมา จากการแสดงออกทางฟีโนไทป์ในประชากรพริกที่เกิดขึ้น อาจเนื่องจากปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อรูปแบบการเจริญเติบโตของต้นพืชในลักษณะพันธุกรรมที่ควบคุมด้วยยีนมากกว่า 1 คู่ ซึ่งการแสดงออกของยีนแปรผันไปตามอิทธิพลของสภาพแวดล้อม ฟีโนไทป์หรือลักษณะที่ปรากฏมีการกระจายตัว (ประดิษฐ์, 2550) โดย

ปกติการเจริญเติบโตของพืชมีปัจจัยควบคุมการเจริญเติบโตและการพัฒนา ได้แก่ ปัจจัยทางพันธุกรรม ปัจจัยเกี่ยวกับสิ่งแวดล้อมภายนอก ปัจจัยภายในของพืช ซึ่งทั้ง 3 ปัจจัยมีอิทธิพลร่วมกัน โดยพันธุกรรมเป็นตัวกำหนดขอบเขตการเจริญเติบโต โดยมียีนควบคุมการทำงานระดับเซลล์ สภาพแวดล้อมภายใน ได้แก่ สารเคมีต่างๆ ในพืช และฮอร์โมน และปัจจัยภายนอก ได้แก่ แสง อุณหภูมิ น้ำ ธาตุอาหาร เป็นตัวกำหนดระดับของการเจริญที่ส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตและพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ (สมบุญ, 2548) นอกจากนี้ การคัดเลือกทั้งการคัดเลือกหมู่ และการคัดเลือกสายพันธุ์บริสุทธิ์ในลักษณะพันธุกรรมทางปริมาณ เช่น ผลผลิต หรือขนาด เป็นลักษณะที่แสดงออกให้เห็นถึงความแตกต่างที่สามารถประเมินด้วยสายตาได้น้อยมาก อาจไม่สามารถแบ่งแยกได้ชัดเจนว่าเป็นอิทธิพลความแตกต่างของพันธุกรรมหรือสภาพแวดล้อม (ศิริพร, 2537) จึงจำเป็นต้องมีวิธีการช่วยคัดเลือกอีกหลายวิธี เช่น การใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการคัดเลือกพืชเนื่องจากวิธีการนี้เป็นวิธีการที่ช่วยลดปัจจัยของสภาพแวดล้อม หรือปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับระยะเวลาการเจริญเติบโตของพืช (Collard *et al.*, 2005)

ผลการทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD จำนวน 30 ไพรเมอร์ พบว่า มีเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD จำนวน 3 ไพรเมอร์ ที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างต้นพริกชุดควบคุมกับต้นพริกที่ฉายรังสีแกมมา ได้แก่ ไพรเมอร์ OPA-12 ไพรเมอร์ OPJ-01 และไพรเมอร์ OPAB-20 และมีจำนวน 27 ไพรเมอร์ ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของต้นพริกชุดควบคุมกับพริกที่ฉายรังสีแกมมาในประชากรรุ่น M_0 ได้ จากการศึกษาของ Makari *et al.* (2009) สามารถใช้เทคนิค RAPD เพื่อแยกความหลากหลายทางพันธุกรรมพริกพันธุ์การค้าได้ Peeraullee and Sanmukhiya (2013) แยกความหลากหลายทางพันธุกรรมพริกได้โดยใช้ไพรเมอร์ OPW-04 ที่แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ และจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพริก มีไพรเมอร์จำนวนมากที่สามารถแสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้ เช่น ไพรเมอร์ OPV-14 และ OPL-12 (Pal and Singh, 2013) ไพรเมอร์ OPQ-01 ที่แยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 200 bp และ 500 bp ได้ (Cheema and Pant, 2013) จากการศึกษาของ Bahurupe *et al.* (2013) ใช้ไพรเมอร์ OPB-01, OPB-04 และ OPB-05 และ Mullainathan *et al.* (2014) ใช้ไพรเมอร์ OPC-07 ทั้งหมดนี้สามารถแสดงความหลากหลายของพันธุกรรมพริกได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และจากการคัดเลือกไพรเมอร์ในงานทดลองนี้ พบว่า ไพรเมอร์ OPA-12 สามารถแยกความแตกต่างได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sikora and Nowaczyk. (2014) ที่แยกความแตกต่างของพริกลูกผสมได้ โดยมีทั้งหมด 13 แถบดีเอ็นเอที่สามารถแสดงความแตกต่างได้ และ Bhadrageoudar and Patil (2011) ทดสอบไพรเมอร์ OPJ-01 สามารถแยกความแตกต่างได้ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ จากผลการทดลองในงานวิจัยนี้ ในประชากรรุ่น M_0 และประชากรรุ่น M_1 พริกมีความหลากหลายในการแสดงรูปแบบพันธุกรรมเกิดขึ้น บ่งชี้ได้ว่าการใช้เทคนิค RAPD ในการตรวจสอบความหลากหลายของพริกสามารถ

ทำได้ และเนื่องจากตัวอย่างที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์เป็นพริกที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาอาจมีผลทำให้พันธุกรรมของพริกมีความแปรปรวน และให้ลักษณะสัณฐานที่แตกต่างกัน จึงเลือกใช้เทคนิคนี้ด้วยข้อดีของเทคนิค RAPD คือ เป็นเทคนิคแบบหนึ่งที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด สามารถแสดงจำนวนของแถบความแตกต่างในตำแหน่งที่มีคู่สมได้ (Tilahun *et al.*, 2011) และเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว และให้ข้อมูลได้มาก แต่ยังมีข้อจำกัดที่แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากเทคนิค RAPD ยังแสดงการข่มสมบูรณ์ (dominance) ทำให้ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่าง homozygous หรือ heterozygous ได้ (Costa *et al.*, 2006)



บทที่ 5

สรุปผล และข้อเสนอแนะ

ระยะเวลาในการงอกของเมล็ดพริกหลังจากฉายรังสีปริมาณต่าง ๆ พบว่า เมล็ดที่ไม่ได้ฉายรังสีงอกมาเร็วกว่าเฉลี่ยที่ 5.67 วันหลังจากเพาะเมล็ด ส่วนเมล็ดที่ฉายรังสีงอกมาที่ปริมาณ 150-600 เกรย์ ระยะเวลาในการเริ่มงอกอยู่ในช่วง 8.33-11.67 วัน หลังการเพาะเมล็ด การงอกของเมล็ดตรวจสอบการงอกที่ 2 สัปดาห์ และ 3 สัปดาห์หลังการเพาะเมล็ด พบว่า เมล็ดที่ไม่ฉายรังสีงอกมาที่มีการงอก 100 เปอร์เซ็นต์ ที่การฉายรังสีงอกมา 150, 300, 450 และ 600 เกรย์ การงอกของเมล็ดอยู่ที่ 55.13-57.69, 71.15-76.92, 55.77-87.17 และ 73.08-75.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การรอดชีวิตของต้นกล้า ตรวจสอบการรอดชีวิตที่ 8 สัปดาห์หลังการเพาะเมล็ด พบว่า พริกที่ไม่ฉายรังสีงอกมาที่มีการรอดชีวิตของต้นกล้า 100 เปอร์เซ็นต์ และการฉายรังสีงอกมาพบเฉพาะปริมาณ 150 เกรย์ และ 300 เกรย์ มีอยู่ที่ 11.54 เปอร์เซ็นต์ และ 1.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนรังสีงอกมาปริมาณ 450 เกรย์ และ 600 เกรย์ ต้นพริกไม่มีการรอดชีวิต และจากการบันทึกการรอดชีวิตของต้นกล้าพบว่าปริมาณรังสีงอกมาที่ทำให้ถึงความตาย 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 105 เกรย์

ลักษณะสัณฐานวิทยาในระยะเจริญเติบโตเต็มที่ (120 วันหลังการย้ายปลูก) ในประชากร M_0 ทั้ง 20 ต้น มีลักษณะที่แตกต่างกันทั้งความสูงของต้น เส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่ม เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น ความกว้างใบ ความยาวใบ จำนวนใบต่อต้นต่อต้น จำนวนดอกต่อต้นต่อต้น จำนวนผลต่อต้นต่อต้น น้ำหนักผลผลิตต่อต้นต่อต้น ตลอดจนลักษณะคุณภาพ ได้แก่ น้ำหนักสดต่อผลผลิต ความกว้างผล ความยาวผล สีผล และจำนวนเมล็ดต่อผล และทำการคัดเลือกต้นพริกจำนวน 6 ต้น จากพริกที่ฉายรังสีงอกมา 150 เกรย์ จำนวน 4 ต้น คือ G150/6, G150/8, G150/11 และ G150/13 และที่ฉายรังสีงอกมา 300 เกรย์ จำนวน 2 ต้น คือ G300/1 และ G300/2 ตามลักษณะความยาวผล น้ำหนักผลผลิตต่อ ต้นเดี่ยว จำนวนผลต่อต้น จำนวนดอกต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อผล จากนั้นปลูกทดสอบการแสดงออกด้านฟีโนไทป์ในประชากรรุ่น M_1 เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ฉายรังสีงอกมา สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ จำนวนต้นที่มีค่าลักษณะฟีโนไทป์มากกว่าต้นที่ไม่ฉายรังสีงอกมา และจำนวนต้นที่มีค่าลักษณะฟีโนไทป์ที่น้อยกว่าต้นที่ไม่ฉายรังสีงอกมา

ผลการทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD จำนวน 30 ไพรเมอร์ พบว่ามีเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD จำนวน 3 ไพรเมอร์ ที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างต้นพริกชุดควบคุมกับต้นพริกที่ฉายรังสีงอกมา ได้แก่ ไพรเมอร์ OPA-12 ไพรเมอร์ OPJ-01 และไพรเมอร์ OPAB-20 นำเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD จำนวน 3 ไพรเมอร์ ทดสอบกับประชากรประชากรรุ่น M_0 และประชากรรุ่น M_1 พบว่า ในประชากรประชากรรุ่น M_0 จำนวน 20 ต้น ไพรเมอร์ OPA-12 แสดงแถบ

ดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างชุดควบคุม ที่ดีเอ็นเอขนาด 2,000 bp กับต้นพริกที่ฉายรังสีแกมมาได้จำนวน 13 ต้น (65 เปอร์เซ็นต์) ไพรมเมอร์ OPJ-01 แสดงที่ขนาด 1,600 bp จำนวน 11 ต้น (55 เปอร์เซ็นต์) และไพรมเมอร์ OPAB-20 แสดงที่ขนาด 1,400 bp จำนวน 3 ต้น (15 เปอร์เซ็นต์) และจากการแสดงออกทางพันธุกรรมของพริกในประชากรรุ่น M_1 ที่มีลักษณะน้ำหนักผลผลิตต่อต้นมากที่สุด (G150/8) มีทั้งหมด 91 ต้น ทดสอบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD พบว่าไพรมเมอร์ OPA-12 แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างขนาด 2,000 bp ไพรมเมอร์ OPJ-01 แสดงที่ขนาด 1,600 bp และไพรมเมอร์ OPAB-20 แสดงที่ขนาด 1,400 bp และ 900 bp และเปรียบเทียบความสัมพันธ์กับการแสดงออกด้านฟีโนไทป์และจีโนไทป์ พบว่า ไพรมเมอร์ RAPD ทั้ง 3 ไพรมเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบสามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้ แต่ยังไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะฟีโนไทป์ของพริกที่เกิดขึ้นได้

ข้อเสนอแนะ

ในการเพิ่มโอกาสให้พริกมีการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น และเพิ่มโอกาสในการเกิดความหลากหลายจากการชักนำด้วยรังสีแกมมาควรเพิ่มปริมาณของเมล็ดในการทดลอง ในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะฟีโนไทป์ของพริก ควรเพิ่มจำนวนไพรมเมอร์ที่ใช้แยกความแตกต่าง หรือสามารถใช้เทคนิคอื่นๆ เพิ่มขึ้นเพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พริกต่อไป

บรรณานุกรม

- กองบรรณาธิการเฉพาะกิจฐานเกษตรกรรม. 2531. **พริก**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม.
- จานุลักษณะ ขนบตี. 2541. **การผลิตเมล็ดพันธุ์ผัก**. โอเดียนสโตร์: กรุงเทพฯ.
- เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี. 2549. **เอกสารประกอบการสอน วิชา พส.522 การปรับปรุงพันธุ์พืชสวน**
ชั้นสูง 2. คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์. 2560. **เอกสารคำสอน พธ. 501 พันธุ์ศาสตร์ชั้นกลาง. คณะวิทยาศาสตร์**
มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- ธนพร ฮัมดาหลี, ประภา ศรีพิจิตต์ และธานี ศรีวงศ์ชัย. 2560. **ผลของรังสีแกมมาต่อความงอกของ**
เมล็ด ความรอดชีวิตของต้นกล้า และความเป็นหมันของละอองเกสรตัวผู้ในข้าวพันธุ์
ชัยนาท 1 และ CH1. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 55.
- อัครงค์ เครือชุมพล. 2551. **พริก**. เกษตรสยามบุ๊คส์: กรุงเทพฯ.
- นพดล จรัสสัมฤทธิ์. 2555. **เอกสารคำสอนวิชา พส.432 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช**.
สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยแม่โจ้: เชียงใหม่.
- นพพร คล้ายพงษ์พันธ์. 2546. **เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์:
กรุงเทพฯ.
- บุญหงส์ จงคิด. 2548. **หลักและเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์:
กรุงเทพฯ.
- ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2541. **พันธุ์ศาสตร์**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.
- ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2550. **พันธุ์ศาสตร์ประชากรและปริมาณ**. สำนักพิมพ์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.
- ปรัชญา รัศมีธรรมวงศ์. 2551. **การปลูกและขยายพันธุ์ พริก พืชเศรษฐกิจร้อนแรง สร้างเงินล้าน**.
สำนักพิมพ์เพชรกะรัต จำกัด: กรุงเทพฯ.
- พิทยา สรวมศิริ. 2551. **อุตสาหกรรมพืชเครื่องเทศ**. วนิดาเพลส: เชียงใหม่.
- วัชร อัดถทิพพหลคุณ และมนตรี อัดถทิพพหลคุณ. 2536. **ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ : PCR**
technology. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยมหิดล: กรุงเทพฯ.
- วิชัย ภูริปัญญาวานิช, วิไลลักษณ์ แพทย์วิบูลย์ และ กนกพร บุญศิริชัย. 2550. **ผลของรังสีแกมมาที่มีต่อ**
การกลายพันธุ์พริก. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีนิเวศครั้งที่ 10.
- ศิริพร พงศ์ศุภสมิทธิ์. 2537. **การปรับปรุงพันธุ์พืช**. นพบุรีการพิมพ์: เชียงใหม่.
- สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2548. **สรีรวิทยาของพืช**. จามจุรีโปรดักท์: กรุงเทพฯ.

- สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2562. ปริมาณและมูลค่าการส่งออกเมล็ดพันธุ์ควบคุม. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.doa.go.th/ard/?page_id=1443.
- สิรินุช ลามศรีจันทร์. 2540. การกลายพันธุ์ของพืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.
- สุชีลา เตชะวงศ์เสถียร. 2557. พริก: นวัตกรรม จากทฤษฎีการปรับปรุงพันธุ์พืชสู่การใช้ประโยชน์. หจก. โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา: ขอนแก่น.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. ศูนย์หนังสือมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.
- อนุรุทธิ์ หมดเสี้ยน. 2560. เครื่องหมายดีเอ็นเอ. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา <https://www.scimath.org/lesson-biology/item/7022-2017-05-21-07-28-11>.
- อภัย ราษฎร์วิจิตร. 2557. แคปไซซิน (Capsaicin). [ออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://haamor.com/th/แคปไซซิน>.
- อรรรัตน์ มงคลพร. 2548. เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. จรัลสนิทวงศ์การพิมพ์: กรุงเทพฯ.
- อรุณี วงศ์ปิยะสถิต. 2550. การกลายพันธุ์ : เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์: กรุงเทพฯ.
- อัจฉรี พรพินิจสุวรรณ. 2552. คู่มือการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์. สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร.
- Aisha, A., Rafii, M., Rahim, H., Juraimi, A. & Misran, A. 2018. Radio-Sensitivity Test of Acute Gamma Irradiation Of Two Variety Of Chili Pepper Chili Bangi 3 And Chili Bangi 5. **International journal of science and thehnology research**. 7(12): 91-95.
- Ashraf, H., Cheema, A.A., Rashid, H., and Qamar Z.U. 2003. Effect of gamma ray on M₁ generation in Basmati rice. **Pakistan journal of biological sciences**. 35(5): 791-795.
- Bahurupe, J. V., Sakhare, S. B., Kulwal, P. L., Akhare, A. A., and Pawar, B. D. 2013. Genetic diversity analysis in chilli (*Capsicum annum* L.) using RAPD markers. **The Bioscan**. 8(3): 915-918.
- Bhadragoudar, M. R., and Patil, C. G. 2011. Assessment of genetic diversity among *Capsicum annum* L. genotypes using RAPD markers. **African Journal of Biotechnology**. 10(76): 17477-17483.

- Bosland, P. W., Votava, E. J., and Votava, E. M. 2012. **Peppers: vegetable and spice capsicums**. Cabi.
- Cheema, S. K., and Pant, M. R. 2013. RAPD analysis of the seven cultivated varieties of *Capsicum annuum* L. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**. 2(1): 152-158.
- Chopra V. L. 2005. Mutagenesis: Investigating the process and processing the outcome for crop improvement. **Current science**. 89 (2): 7.
- Collard, B. C., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B., and Pang, E. C. K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. **Euphytica**. 142(1-2): 169-196.
- Cools, T., and De Veylder, L. 2009. DNA stress checkpoint control and plant development. **Current opinion in plant biology**. 12(1): 23-28.
- Costa, F. R., Pereira, T. N. S., Vitória, A. P., de Campos, K. P., Rodrigues, R., da Silva, D. H., and Pereira, M. G. 2006. Genetic diversity among *Capsicum* accessions using RAPD markers. **Crop breeding and applied thechnology**. 6(1): 18.
- Das, K., and Roychoudhury, A. 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in environmental science**. 2(53): 1-13.
- Desouky, O., Ding, N., and Zhou, G. 2015. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**. 8(2): 247-254.
- Dewitt, D., and Bosland, P. W. 2009. **The complete chile pepper book: A gardener's guide to choosing, growing, preserving, and cooking**. Timber Press.
- Garibyan L. and Avashia N. 2013. Polymerase Chain Reaction. **Journal of Investigative Dermatology**. 133: 4.
- Gaswanto, R., Syukur, M., Purwoko, B. S., and Hidayat, S. H. 2016. Induced mutation by gamma ray irradiation to increase chilli resistance to Begomovirus. **AGRIVITA, Journal of Agricultural Science**. 38(1): 24-32.
- Gupta, P. K., Varshney, R. K., Sharma, P. C., and Ramesh, B. 1999. Molecular markers and their applications in wheat breeding. **Plant breeding**. 118(5): 369-390.
- Healey, A., Furtado, A., Cooper, T., and Henry R.J. 2014. Protocol: a simple method for

- extracting next generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. **Plant methods** 2014.
- Irfaq, M., and Nawab, K. 2001. Effect of gamma irradiation on some morphological characteristics of three wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **Journal of Biological Science**. 1(10): 935-945.
- Jan, S., Parween, T., and Siddiqi, T. O. 2012. Effect of gamma radiation on morphological, biochemical, and physiological aspects of plants and plant products. **Environmental Reviews**. 20(1): 17-39.
- Jo, Y. D., Kim, S. H., Hwang, J. E., Kim, Y. S., Kang, H. S., Kim, S. W., and Kang, S. Y. 2016. Construction of mutation populations by gamma-ray and carbon beam irradiation in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). **Horticulture, Environment, and Biotechnology**. 57(6): 606-614.
- Kim, J. H., Ryu, T. H., Lee, S. S., Lee, S., and Chung, B. Y. 2019. Ionizing radiation manifesting DNA damage response in plants: An overview of DNA damage signaling and repair mechanisms in plants. **Plant Science**. 278: 44-53.
- Kiong, A. L. P., Lai, A. G., Hussein, S., and Harun, A. R. 2008. Physiological responses of *Orthosiphon stamineus* plantlets to gamma irradiation. **American-Eurasian journal of sustainable agriculture**. 2(2): 135-149.
- Kovacs, E., and Keresztes, A. 2002. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. **Micron**. 33(2): 199-210.
- Lee, M. H., Moon, Y. R., Chung, B. Y., Kim, J. S., Lee, K. S., Cho, J. Y., and Kim, J. H. 2009. Practical use of chemical probes for reactive oxygen species produced in biological systems by γ -irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**. 78(5): 323-327.
- Makari, H. K., Patil, H. R., Abhilash, M., and Kumar, H. M. 2009. Genetic diversity in commercial varieties of chilli as revealed by RAPD method. **Indian Journal of Science and Technology**. 2(4): 91-94.
- Mendoza, H., Carrillo-Rodríguez, J. C., and Chavez-Servia, J. L. 2011. Effects of gamma-irradiated seeds on germination and growth in *Capsicum annuum* L. plants grown in a greenhouse. **International Symposium on Soilless Culture and**

Hydroponics. 947: 77-81.

Minisi, F. A., El-mahrouk, M. E., Rida, M. E. F., and Nasr, M. N. 2013. Effects of gamma radiation on germination, growth characteristics and morphological variations of *Moluccella laevis* L. Am.-Eurasian. **Journal of Agricultural Environmental Science.** 13: 696-704.

Mullainathan, L., Sridevi, A., Umavathi, S., and Gandhi, S. 2014. Genetic variation in mutants of chilli (*Capsicum annum*) Revealed by RAPD marker. **International Letters of Natural Sciences.** 6.

Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Dogan, Y., Comertpay, G., Yildiz, M., and Ozkan, H. 2018. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. **Biotechnology and Biotechnological Equipment.** 32(2): 261-285.

Nakano, T., Xu, X., Salem, A. M., Shoulkamy, M. I., and Ide, H. 2017. Radiation induced DNA–protein cross-links: Mechanisms and biological significance. **Free Radical Biology and Medicine.** 107: 136-145.

Norfadzrin, F., Ahmed, O. H., Shaharudin, S., and Rahman, D. A. 2007. A preliminary study on gamma radiosensitivity of tomato (*Lycopersicon esculentum*) and okra (*Abelmoschus esculentus*). **International Journal of Agricultural Research.** 2(7): 620-625.

Omar, S. R., Ahmed, O. H., Saamin, S., and Majid, N. M. A. 2008. Gamma radio sensitivity study on chili (*Capsicum annum*). **American journal of applied sciences.** 5(2): 67-70.

Pal, D., and Singh, M. 2013. Molecular profiling and RAPD analysis of commercial hybrid parental lines in tomato and chili. **International journal of innovative research in science, Engineering and Technology.** 2(9): 4288-4292.

Peeraullee, N., and Ranghoo-Sanmukhiya, V. M. 2013. Assessment of genetic diversity in Local Chilli (*Capsicum annum*) Varieties in Mauritius. **International Journal of Agriculture and Biology.** 15(5).

Roslim, D. I., and Fiatin, I. 2015. Lethal dose 50 (LD₅₀) of Mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) cultivar Kampar Sabrao. **Journal of Breeding and Genetics.** 47(4).

Sahu, S. K., Thangaraj, M., and Kathiresan, K. 2012. DNA extraction protocol for plants

- with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. **International Scholarly Research Notices**.
- Saha, G. B. 2013. **Internal radiation dosimetry**. In **Physics and Radiobiology of Nuclear Medicine** (243-261). Springer, New York, NY.
- Sikora, B., and Nowaczyk, P. 2014. Application of RAPD technique for identification of interspecific hybrids from genus *Capsicum*. **Acta Scientiarum Polonorum**. 13(1): 155-166.
- Sood, S., Jambulkar, S. J., Sood, A., Gupta, N., Kumar, R., and Singh, Y. 2016. Median lethal dose estimation of gamma rays and ethyl methane sulphonate in bell pepper (*Capsicum annuum* L.). **SABRAO Journal of Breeding and Genetics**. 48(4): 528-535.
- Tabasum, A., Cheema, A. A., Hameed, A., Rashid, M. U. H. A. M. M. A. D., and Ashraf, M. U. H. A. M. M. A. D. 2011. Radio sensitivity of rice genotypes to gamma radiations based on seedling traits and physiological indices. **Pakistan Journal of Botany**. 43(2): 1211-1222.
- Thermo Scientific. 2008. **260/280 and 260/230 Ratios**. T009-Technical Bulletin, 1-2.
- Tilahun, S., Paramaguru, P., and Bapu, J. K. 2013. Genetic diversity in certain genotypes of chilli and paprika as revealed by RAPD and SSR analysis. **Asian Journal of Agricultural Sciences**. 5(2): 25-31.
- Tomlekova, N., Todorova, V. and Daskalov, S. 2006. Creating variation in pepper (*Capsicum annuum* L.) through induced mutagenesis. **Plant science**. 44: 44-47.
- Tomlekova, N., Spasova-Apostolova, V., and Panchev, I. 2016. RAPD analysis of Bulgarian pepper induced mutant. **Comptes Rendus de'l Academie bulgare des Sciences**. 69(6): 731-738.
- Verma, R. C., Bhala, V. P., and Khah, M. A. 2017. Studies on mutagenic effects of gamma irradiation on chilli (*Capsicum annuum* L.). **Chromosome Botany**. 12(1): 13-16.
- Wi, S. G., Chung, B. Y., Kim, J. S., Kim, J. H., Baek, M. H., Lee, J. W., and Kim, Y. S. 2007. Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants. **Micron**. 38(6): 553-564.

- Wi, S. G., Chung, B. Y., Kim, J. H., Baek, M. H., Yang, D. H., Lee, J. W., and Kim, J. S. 2005. Ultrastructural changes of cell organelles in Arabidopsis stems after gamma irradiation. **Journal of Plant Biology**. 48(2): 195-200.
- Zewdie, Y. and Bosland, P. W. 2000. Evaluation of genotype, environment, and genotype by environment interaction for capsaicinoids in *Capsicum annuum* L. **Euphytica**. 111(3): 185-190.





การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR

ตารางภาคผนวกที่ 1 การเตรียมสารละลาย 2X CTAB buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ชนิดสารเคมี	ปริมาณ
1M Tris-HCl pH 8.0	100 มิลลิลิตร
0.5M EDTA pH 8.0	40 มิลลิลิตร
5M NaCl	280 มิลลิลิตร
PVP	10 กรัม
CTAB	20 กรัม
เติม Distilled water ให้ครบ	1,000 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 2 การเตรียมสารละลาย 1X TE buffer pH 8.0 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ชนิดสารเคมี	ปริมาณ
1M Tris-HCl pH 8.0	10 มิลลิลิตร
0.5M EDTA pH 8.0	2 มิลลิลิตร
เติม Distilled water ให้ครบ	1,000 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 3 การเตรียมสารละลาย 5M NaCl ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ชนิดสารเคมี	ปริมาณ
NaCl (MW=58.44 กรัมต่อโมล)	292.2 กรัม
เติม Distilled water ให้ครบ	1,000 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 4 การเตรียมสารละลาย 0.5M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ชนิดสารเคมี	ปริมาณ
EDTA (MW=372.2 กรัมต่อโมล)	186.1 กรัม
Distilled water (น้ำ DW)	800 มิลลิลิตร
0.5M NaOH	20 กรัม (เพื่อปรับ pH)
เติม Distilled water ให้ครบ	1,000 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 5 การเตรียมสารละลาย 1M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ชนิดสารเคมี	ปริมาณ
Tris base	121.1 กรัม
Distilled water (น้ำ DW) ปรับ pH ด้วย HCl	800 มิลลิลิตร
เติม Distilled water ให้ครบ	1,000 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 6 การเตรียมสารละลาย 50X TAE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ชนิดสารเคมี	ปริมาณ
Tris base	242 กรัม
Glacial acetic acid	57.1 มิลลิลิตร
0.5M EDTA pH 8.0	100 มิลลิเมตร
เติม Distilled water ให้ครบ	1,000 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 7 การเตรียมสารละลาย 1X TAE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ชนิดสารเคมี	ปริมาณ
50X TAE buffer	20 มิลลิลิตร
Distilled water	980 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 8 การเตรียมสารละลาย 1% Agarose gel ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชนิดสารเคมี	ปริมาณ
Agarose	1 กรัม
1X TAE buffer	100 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 9 การเตรียมสารละลาย Master mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา

ชนิดสารเคมี	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
DNA template	2
Buffer	5
RAPD primer	0.5
Distilled water	2.5
รวม	10

ตารางภาคผนวกที่ 10 RAPD primers ที่ใช้ในการทดลองจำนวน 30 ไพรมเมอร์

ลำดับ	ไพรมเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	แหล่งที่มา
1	OPA-02	TGCCGAGCTG	(Sikora and Nowaczyk, 2014)
2	OPA-04	AATCGGGCTG	(Sikora and Nowaczyk, 2014)
3	OPA-07	GAAACGGGTG	(Bhadragoudar and Patil (2011) <i>et al.</i> ,2011)
4	OPA-08	GTGACGTAGG	(Sikora and Nowaczyk, 2014)
5	OPA-11	CAATCGCCGT	(Bhadragoudar and Patil (2011) <i>et al.</i> ,2011)
6	OPA-12	TCGGCGATAG	(Sikora and Nowaczyk, 2014)
7	OPB-01	GTTTCGCTCC	(Bahurupe <i>et al.</i> , 2013)
8	OPB-04	GGA CTGGAGT	(Bahurupe <i>et al.</i> , 2013)
9	OPB-05	TGCGCCCTTC	(Bahurupe <i>et al.</i> , 2013)
10	OPB-12	CCTTGACGCA	(Bahurupe <i>et al.</i> , 2013)
11	OPC-03	GGGGGTCTTT	(Bhadragoudar and Patil,2011)
12	OPC-07	GTCCCCGACGA	(Mullainathan <i>et al.</i> ,2014)
13	OPJ-01	CCCCGCATAA	(Bhadragoudar and Patil,2011)
14	OPJ-05	CTCCATGGGG	(Bhadragoudar and Patil,2011)
15	OPL-12	GGGCGGTACT	(Pal and Singh, 2013)
16	OPM-01	GTTGGTGGCT	(Cheema and Pant, 2013)
17	OPO-01	GGGACGATGG	(Cheema and Pant, 2013)
18	OPT-04	CACAGAGGGA	(Cheema and Pant, 2013)
19	OPP-01	GTAGCACTCC	(Cheema and Pant, 2013)
20	OPN-05	ACTGAACGCC	(Cheema and Pant, 2013)
21	OPP-13	GGAGTGCCTC	(Makari <i>et al.</i> ,2009)
22	OPW-19	CAAAGCGCTC	(Makari <i>et al.</i> ,2009)
23	OPD-13	GGGGTGACGA	(Peeraullee and Sanmukhiya, 2013)
24	OPW-04	CAGAAGCGGA	(Peeraullee and Sanmukhiya, 2013)
25	OPB-11	GTAGACCCGT	(Peeraullee and Sanmukhiya, 2013)
26	OPL-05	ACGCAGGCAC	(Peeraullee and Sanmukhiya, 2013)
27	OPV-14	AGATCCCCGC	(Pal and Singh, 2013)
28	OPAB-09	GGGCGACTAC	(Makari <i>et al.</i> ,2009)
29	OPAB-10	TTCCCTCCCA	(Makari <i>et al.</i> ,2009)
30	OPAB-20	CTTCTCGGAC	(Makari <i>et al.</i> ,2009)

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวมลธิดา ธิศาเวช
เกิดเมื่อ	26 เมษายน 2537
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2555 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนอานาจเจริญ อำเภอมือง จังหวัดอานาจเจริญ พ.ศ. 2560 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชสวน (ไม้ผล) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่
ประวัติการทำงาน	-

