บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

บัวเป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีหลักฐานพบว่ามีมานานแล้วประมาณ 3,000 - 4,000 ปี จากภาพเขียนสีและภาพสถาปัตยกรรมโบราณของชาวอียิปต์ และพบหลักฐานเมล็ดบัวที่ก้นทะเลสาบในจีนมีอายุถึง 1,228 ปี ซึ่งสามารถเจริญเป็นต้นได้ มีถิ่นกำเนิดในประเทศแถบเมืองร้อน บัวมีความเกี่ยวข้องกับวิถีชีวิต วัฒนธรรมและประเพณีของหลายชาติ ชาวอียิปต์โบราณเชื่อว่าโลกเกิดขึ้นจากบัว ชาวตะวันออกถือว่าบัวเป็นสัญลักษณ์ของแสงสว่างหรือการบรรลุแห่งชีวิต รวมทั้งความอุดมสมบูรณ์และการเจริญพันธุ์ ยุโรปตะวันตกใช้ดอกบัวในพิธีศักดิ์สิทธิ์และเกี่ยว ข้องกับเทพธิดา ชาวพุทธเชื่อว่าบัวหลวงเป็นสัญลักษณ์ที่ดีของความบริสุทธิ์ และความพากเพียรต่อความยากลำบาก บัวมีความสำคัญทางด้านจิตใจต่อคนไทย เช่นการตั้งชื่อคน สถานที่รวมทั้งยังได้ถ่ายทอดไปสู่วรรณกรรมและศิลปกรรมรูปแบบต่างๆมากมาย บัวเป็นพืชที่นำไปใช้ประ- โยชน์หลายด้านได้แก่ บูชาพระ รับประทาน หรือปลูกไว้เพื่อประดับความสวยงาม และเป็นพืชสมุนไพร (Shen, 2002)

ประเทศไทยนิยมปลูกบัวหลวงเป็นจำนวนมากเพื่อการค้าที่เรียกว่า “นาบัว” ซึ่งสามารถสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรเป็นอันมาก และส่งเป็นสินค้าส่งออกนอกประเทศ ปัจจุบันความต้องการบัวของตลาดโลกมีอยู่มากและต่อเนื่อง โดยเฉพาะเกสรบัวหลวงตัวผู้ เป็นวัตถุ ดิบที่บริษัทผลิตเครื่องสำอางต้องการเป็นจำนวนมาก เนื่องจากมีสารที่ต่อต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดจากบรรดาสมุนไพรที่ผ่านการวิจัยในปัจจุบัน (รจนา, 2548) จังหวัดที่ปลูกนาบัวมากได้แก่ นครปฐม ปทุมธานีและนนทบุรีเป็นต้น บัวเป็นพืชที่สามารถให้ผลผลิตทั้งปีจึงทำให้เกษตรกรมีรายได้ดี แต่เกษตรกรประสบปัญหาหลายด้าน เกี่ยวกับคุณภาพของดอกซึ่งช้ำง่าย รูปทรงและสีของดอกที่ให้เลือก (จินตนาและลาวัลย์, 2536) รวมทั้งเรื่องโรคซึ่งระบาดในช่วงฤดูฝน คือโรคใบจุดและโรคเน่า สำหรับแมลงศัตรูพืชที่สำคัญของบัวหลวงคือเพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน และหนอนพับใบ ซึ่งแมลงเหล่านี้จะกัดกินใบเพราะบัวหลวงเป็นพืชที่ชูใบขึ้นมาเหนือน้ำ จึงถูกกัดกินได้ง่ายกว่าบัวชนิดอื่น (ไชยา, 2541) ในฐานะที่ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม การพัฒนาบัวให้เป็นพืชเศรษฐกิจหลักที่สำคัญจึงมีความเป็นไปได้ถ้าหากมีการพัฒนาที่จริงจัง และร่วมมือกันหลายฝ่าย ในการปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงเพื่อให้ได้ดอกคุณภาพดีมีรูปทรงและสีของดอกที่หลากหลาย จำนวน

เกสรมาก รวมทั้งต้านทานต่อโรคและศัตรูพืชจึงน่าจะเป็นสิ่งที่จำเป็น โดยลักษณะที่เกิดขึ้นอาจเป็นที่ต้องการของตลาดทำให้ได้ราคาสูงขึ้น

ปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์นิยมใช้รังสีหรือสารเคมี เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ทำให้ได้พืชที่มีลักษณะใหม่ซึ่งแตกต่างไปจากเดิม เช่น ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของดอกแกลดิโอลัส (Buiatti *et al.*, 1965) พุทธรักษา (Nakornthap, 1965) คาร์เนชั่น (ชัยชุมพล, 2526) ขิงแดง (สิรนุชและคณะ, 2539) หรือเปลี่ยนแปลงด้านขนาดและสีของดอกบีโกเนีย (สุมนา, 2528) รวมทั้งการเกิดใบด่างของไม้น้ำ (ดาวสวรรค์, 2545) เป็นต้น ทั้งนี้การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์อาจจะกระทำร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น อีกทั้งช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย แรงงาน เวลาและพื้นที่ในการเพาะปลูกด้วย ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จะฉายรังสีแกมมากับเมล็ดบัวหลวงสายพันธุ์บุณฑริกดอกสีขาว และนำ ไปเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในสภาพปลอดเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวน สำหรับต้นบัวหลวงที่ผ่านการฉายรังสีแล้วเกิดลักษณะผิดปกตินั้น จะนำมาตรวจสอบจำนวนโครโมโซมและวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ โดยคาดว่าผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นแนวทางหนึ่งในการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ของบัวหลวงต่อไป

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของบัวหลวง

1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

บัวหลวงจัดอยู่ในวงศ์ Nymphaeaceae สกุล *Nelumbo* มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเอเชียเขตร้อน และเขตกึ่งร้อนแถบอินเดีย จีน ทิเบต (Hutchinson, 1959) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่สำคัญคือ เป็นพืชน้ำอายุหลายปี มีเหง้าและไหลอยู่ใต้ดิน ใบเป็นใบเดี่ยวขนาดใหญ่ชูเหนือน้ำรูปกลม ขอบใบเรียบและเป็นคลื่น ก้านใบและก้านดอกแข็งยาวมีตุ่มเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไป เมื่อหักจะมีน้ำยางขาวและเป็นสายใย ดอกเป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่ชูสูงพ้นผิวน้ำ มีทั้งดอกทรงป้อมและรูปไข่ กลีบดอกมีทั้งชนิดซ้อนและไม่ซ้อน สีขาว ชมพู หรือเหลือง แล้วแต่ชนิดพันธุ์ เกสรตัวผู้มีจำนวนมาก เมล็ดรูปกลมรีจำนวนมากอยู่ในฝักรูปกรวย บัวหลวงมีเพียง 2 ชนิด คือ *Nelumbo lutea* Pers. (บัวหลวงอเมริกัน) และ *Nelumbo nucifera* Gaertn. (บัวหลวงไทย) (Suvatabandhu, 1958 ; Lawrence, 1967) มีชื่อสามัญว่า sacred lotus ในประเทศไทยพบบัวหลวงไทยทั้งหมด 6 สายพันธุ์ (คณิตา, 2535 ; อัญชลีและคณะ, 2547) คือ

สายพันธุ์ที่ 1 ดอกขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่ปลายเรียว ดอกสีชมพู มีชื่อว่า บัวหลวงชมพู ปทุม ปัทมา หรือโกกระณต

สายพันธุ์ที่ 2 ดอกขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปไข่เหมือนสายพันธุ์ที่ 1 ดอกสีขาว มีชื่อว่า บัวหลวงบุณฑริกหรือปุณฑริก

สายพันธุ์ที่ 3 ดอกขนาดใหญ่ ดอกตูมเป็นรูปทรงป้อม ดอกสีชมพูมีชื่อว่าบัวหลวงชมพูซ้อนหรือสัตตบงกช หรือบัวฉัตรชมพู

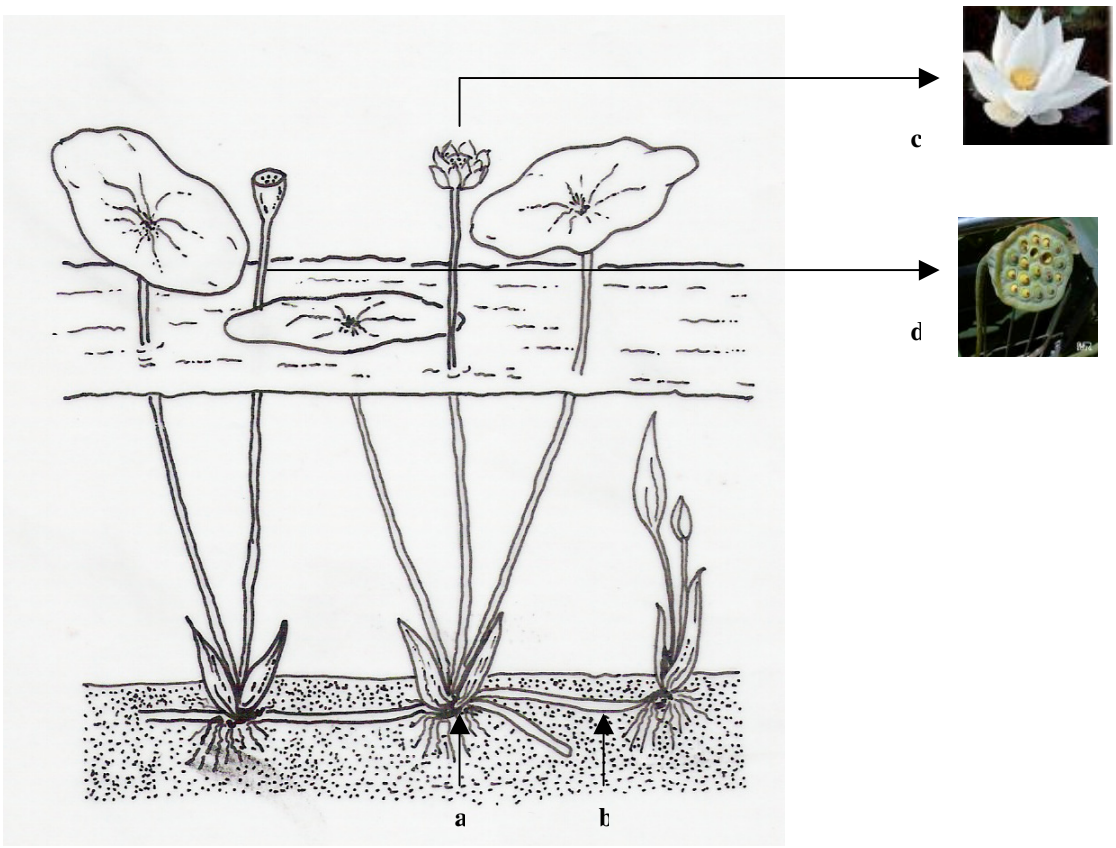
สายพันธุ์ที่ 4 ดอกขนาดใหญ่ ดอกตูมเหมือนสายพันธุ์ที่ 3 ดอกสีขาว มีชื่อว่า บัวหลวงขาวซ้อน สัตตบุษย์ หรือบัวฉัตรขาว

สายพันธุ์ที่ 5 ดอกขนาดเล็ก ดอกตูมเป็นรูปไข่เหมือนสายพันธุ์ที่ 1 ดอกสีขาว มีชื่อว่า บัวเข็มขาว บัวปักกิ่งขาว หรือบัวหลวงจีนขาว

สายพันธุ์ที่ 6 ดอกขนาดเล็ก ดอกตูมเป็นรูปไข่เหมือนสายพันธุ์ที่ 1 ดอกสีชมพู มีชื่อว่า บัวเข็มชมพู บัวปักกิ่งชมพู หรือบัวหลวงจีนชมพู

สายพันธุ์ที่ศึกษาครั้งนี้คือ บัวหลวงสายพันธุ์บุณฑริก (ภาพที่ 1) ชื่อสามัญเรียก

บัวขาว มีลักษณะไหลใต้ดินยาว ตรงข้อส่วนบนมีตาใบและตาดอก ส่วนล่างมีราก ซึ่งเป็นระบบรากฝอยแตกออกจากข้อมีจำนวนมาก ดอกตูมขนาดใหญ่เป็นรูปไข่ปลายเรียว กลีบดอกสีขาว บางไม่ซ้อน ช้ำง่าย ก้านดอกแข็งและยาวผิวเป็นตุ่มเล็กๆ ใบเป็นใบเดี่ยวทรงกลมโต ขอบใบเป็นคลื่นเล็กน้อย ใบเมื่อยังอ่อนจะลอยปิ่มน้ำ ส่วนใบแก่ก้านใบแข็งยาวชูขึ้นมาเหนือน้ำ เกสรตัวผู้เล็กเป็นฝอย ฝักเมื่อแก่จะโตขึ้นเพื่อรองรับเมล็ด เมล็ดรูปรีสีเขียว มีเปลือกหนา เจริญเติบโตได้ดีในแหล่งน้ำที่มีความลึกอย่างน้อย 75 - 100 เซนติเมตร ใช้เวลาในการเจริญเติบโตประมาณ 5 เดือน จึงออกดอก โดยพันธุ์บัวหลวงที่ให้ผลผลิตสูง จะเกิด 1 ดอกต่อใบที่แตกออกมา 1 ใบ การขยายพันธุ์มี 2 วิธี คือการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดและการขยายพันธุ์ด้วยไหล (สุรเชษฐ และปัญญา, 2533)



ภาพที่ 1 บัวหลวงสายพันธุ์บุณฑริก

(a) เหง้า (ศรชี้) (b) ไหล (ศรชี้) (c) ดอก (d) ฝัก

1.2 ประโยชน์ของบัวหลวง

จากการศึกษาวิจัยพบสารชนิดต่างๆ ในส่วนประกอบของบัวหลวงไทยที่มีสรรพ
คุณต่อการบำรุงร่างกายหรือนำมาปรุงเป็นยารักษาโรคได้ เช่น เมล็ดและเอ็มบริโอ มีสารอัลคา-ลอยด์ (alkaloids) หลายชนิดที่มีฤทธิ์ต่อการขยายหลอดเลือดหัวใจ เกสรตัวผู้พบสารฟลาโวนอยด์ (flavornoids) ที่มีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด (มากกว่าชาเขียวถึง 2 เท่า) ช่วยบำรุงผิวพรรณ บำรุงหัวใจและบำรุงครรภ์ และมีประสิทธิภาพยับยั้งการเกิดเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) อันเป็นสาเหตุให้เกิดผิวหมองคล้ำ ฝ้าและจุดด่างดำ เหง้าและเปลือกผลพบสารแทนนิน (tannin) เป็นสารรสฝาด ที่มีฤทธิ์ยับยั้งอาการท้องเดิน รากมีแคลเซียม ช่วยบำรุงร่างกาย เมล็ดบัวมีไขมัน ช่วยเพิ่มพลังงาน บำรุงไขข้อและเอ็น (เสริมลาภ, 2537)

1.3 โครโมโซมของบัวหลวง

การศึกษาจำนวนโครโมโซมของบัวหลวง มีรายงานทั้งในและต่างประเทศ ได้แก่
Darlington และ Wylie (1955) รายงานเกี่ยวกับ *Nelumbo lutea* Pers. และ *Nelumbo nucifera* Gaertn.ทั้งสองชนิดมีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 16 โดยมีจำนวนโครโมโซมที่ไม่ซ้ำกันใน 1 ชุด (basic number, x) เท่ากับ 8 สำหรับในประเทศไทย ศิริลักษณ์ (2543) ศึกษาจำนวนโครโมโซมบัวหลวงไทย 3 สายพันธุ์ คือ บุณฑริก ปทุม สัตตบงกช พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n = 16 เท่ากัน นอกจากนี้ Arunyanart และ Soontronyatara (2002) ศึกษาจำนวนโครโมโซมของบัวหลวงพันธุ์สัตตบุษย์ พบว่า 2n = 16 เช่นกัน

2. การขยายพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวง

การขยายพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นวิธีที่สามารถเพิ่มปริมาณของพืชให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น โดยขั้นตอนแรกของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือ การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของชิ้นส่วนพืชด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) หรือแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ [$Ca(OCl)_2$] หรือเพื่อความสะดวกอาจใช้คลอรอกซ์ หรือพิวเรกซ์แทน ความเข้มข้นและระยะเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อ ขึ้นกับประสิทธิภาพของสารเคมี ชิ้นส่วนพืชและชนิดของพืช สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดมี 2 ขั้นตอน คือจุ่มเมล็ดลงในเอธทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เขย่าเป็นเวลา 1-2 นาที จากนั้นแช่ในสารละลาย ไฮโปคลอไรต์ เป็นเวลา 10-30 นาที โดยหยดสารจับใบ (tween 20) ลงไป 1-2 หยด เพื่อช่วยให้สารฆ่าเชื้อจับผิวเมล็ดได้ดียิ่งขึ้น สำหรับเมล็ดที่มีเปลือกหนา เช่น บัวหลวง อาจเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ โดยนำเมล็ดเผาด้วยเปลวไฟโดยตรงหลังจากที่จุ่มในเอธทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (พวงชมพู, 2546) เมื่อได้ชิ้นส่วนพืชที่ปราศจากการปนเปื้อนแล้ว จึงศึกษา

หาสูตรอาหาร รวมทั้งชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดรวมและการเกิดรากของพืชชนิดนั้นๆ ต่อไป

สูตรอาหารและสภาวะควบคุมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของบัวหลวงแต่ละส่วน เช่น เอ็มบริโอ ตาที่ไหล และปลายยอด ดังนี้

เอ็มบริโอ : Kane และคณะ (1988) เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอจากเมล็ดของบัวหลวงอเมริกัน บนอาหารแข็งและในอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่เติม ไมโออิโนซิทอล (myo-inositol) 0.56 ไมโครโมลาร์ ไทอามีน (thiamine) 1.2 ไมโครโมลาร์ น้ำตาลซูโครส 87.6 ไมโครโมลาร์ และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตคือ BA zeatin GA_3 และ ABA ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเอ็มบริโอในอาหารเหลวมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ในขณะที่เอ็มบริโอบนอาหารแข็งไม่พัฒนา ส่วนการยืดของใบเกิดได้ดีในอาหารเหลวที่มี GA_3 ความเข้มข้น 2.9 และ 29 ไมโครโมลาร์ ทั้งนี้เอ็มบริโอไม่แสดงอาการตอบสนองในอาหารที่เติม BA และ zeatin ส่วน ABA มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอ ณราวุฒิ (2539) นำเอ็มบริโอบัวหลวงไทยมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเกิดยอดรวมได้ เมื่อนำยอดชักนำให้เกิดราก พบว่าอาหารแข็งสูตร MS เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยสูงสุด 3.3 ราก ซึ่งรากที่ได้มีขนาดใหญ่และมีแขนงมาก วิชัย (2543) เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอบัวหลวง 2 ชนิดคือ บัวหลวงไทยและบัวหลวงอเมริกันบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเอ็มบริโอบัวหลวงทั้ง 2 ชนิด มีการเจริญเติบโตเกิดเป็นต้นได้ดีที่สุด บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และเททับด้วยอาหารเหลวสูตรเดียวกัน ส่วนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เอ็มบริโอบัวหลวงไทยและบัวหลวงอเมริ- กันเกิดแคลลัสได้

ตาที่ไหล : สุเมธ (2537) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาที่ไหลของบัวหลวงบุณฑริก พบว่าอาหารแข็งสูตร ½ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และ BA ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ที่เททับด้วยอาหารเหลวสูตรเดียวกัน สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้มากที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พรทิพย์ (2537) พบว่า อาหารแข็งสูตร ½ MS เติม NAA 1 ไมโครโมลาร์ และ BA 7.5 ไมโครโมลาร์ ที่เททับด้วยอาหารเหลวสูตรเดียวกัน ทำให้ตาที่ไหลมีการเจริญเติบโตแตกยอดได้ดี และอาหารแข็งสูตร MS เติม NAA 1.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดรากได้ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 16 สัปดาห์ ธนพรรณ (2538) พบว่าอาหารแข็ง

สูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ร่วมกับ 2iP ความเข้มข้น 10 โมลาร์ ทำให้เพิ่มปริมาณต้นได้ดี ศิริศักดิ์ (2539) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวงสัตตบุษย์จากชิ้นส่วนตาที่ไหล พบ ว่าอาหารแข็งสูตร ½ MS เติม IAA ความเข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ และ 2iP 15 ไมโครโมลาร์ ทำให้เกิดยอดรวมได้ดีที่สุด หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 สัปดาห์

ปลายยอด : Yamamoto และ Matsumoto (1988) นำปลายยอดบัวหลวงบุณฑริกที่เจริญจากเหง้า เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าใบมีขนาดใหญ่ขึ้น และเมื่อนำต้นที่เกิดขึ้นไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเกิดยอดรวมได้ดี หลังจากนั้นย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เททับด้วยอาหารเหลวสูตรเดียวกัน พบว่ามีรากเกิดขึ้น Matsumoto (1990) รายงานว่าการเจริญปลายยอดของบัวหลวงบุณฑริก เกี่ยวข้องกับปริมาณน้ำตาลซูโครสในอาหาร โดยพบว่าปริมาณน้ำตาลซูโครส 8 เปอร์เซ็นต์ ทำให้อัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น ต้นที่ได้มีการเจริญเติบโต ใบและลำต้นเป็นปกติ ณราวุฒิ (2539) นำปลายยอดบัวหลวงมาเพาะเลี้ยง พบว่าอาหารแข็งสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้มากที่สุด และอาหารแข็งสูตร MS เติม NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ยอดอ่อนเกิดแคลลัสได้มากที่สุด กุลวราและจันทิมา (2543) ได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณยอดอ่อนบัวหลวงสัตตบงกช ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ และ NAA ทำให้เกิดยอดรวมและมีการเจริญเติบโตดีกว่าอาหารที่เติม IAA และ 2iP โดยยอดอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ 0.005 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 5 ไมโครโมลาร์ เกิดยอดรวมได้ดีที่สุด จันทร์อัมพร (2544 ก) พบว่าอาหารแข็งสูตร ½ MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ร่วมกับ 2iP ความเข้มข้น 10 โมลาร์ เกิดยอดรวมได้ดีที่สุด สุพัตราและอติรูป (2544) ศึกษาการเพิ่มปริมาณบัวหลวงปทุม ในสภาพปลอดเชื้อพบว่าหลังจากนำยอดเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ½ MS ที่เติม IAA ปริมาณ 6 โมลาร์ ร่วมกับ 2iP ปริมาณ 15 โมลาร์ และเททับด้วยอาหารเหลวอีกหนึ่งชั้น สามารถชักนำให้เกิดไหลและรากจำนวนมาก

3. การกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์หมายถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงยีน (gene mutation) หรือโครโมโซม (chromosomal mutation) ผลจากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจจะทำให้พืชแสดงลักษณะใหม่ๆ ซึ่งแตกต่างจากลักษณะเดิมโดยสามารถถ่ายทอดจากรุ่นที่หนึ่งไปยังรุ่นต่อไปได้ (Ram, 2000)

3.1 สาเหตุของการกลายพันธุ์มี 2 ประการ (Sigurbjorhsson, 1983) คือ

3.1.1 การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) พบในอัตราที่ต่ำ เช่น ยีน Y ที่ควบคุมการเกิดสีเหลืองของเมล็ดข้าวโพด มีอัตราเกิดการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติเพียง 0.000002 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น

3.1.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induced mutation) โดยสิ่งก่อกลายพันธุ์ ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี (chemical mutagen) และสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ (physical mutagen)

3.1.2.1 สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี ได้แก่สารเคมีที่สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น EMS (ethylmethane sulphonate) EES (ethylethane sulphonate) และคอลชิซีน (colchicine) เป็นต้น

3.1.2.2 สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ ได้แก่รังสี ซึ่งจำแนกเป็น 2 ประเภท คือ

ก. รังสีที่ไม่ทำให้เกิดการแตกตัวของประจุ (non - ionizing radiation) เป็นรังสีที่พบในชีวิตประจำวัน เช่น คลื่นเสียง คลื่นวิทยุ ไมโครเวฟ รวมทั้งรังสีอุลตร้า-ไวโอเลต (ultraviolet ray) ซึ่งเป็นรังสีที่มีพลังงานสูง สามารถทำให้เชื้อโรคบางชนิดตายได้

ข. รังสีที่ทำให้เกิดการแตกตัวของประจุ (ionizing radiation) มีคุณสมบัติที่สำคัญคือ เมื่อรังสีผ่านเข้าไปในสสารหรือวัตถุใด สามารถก่อให้เกิดปรากฏการณ์ไอออไนเซชั่น (ionization) คือรังสีจะผลักอิเล็คตรอนให้กระเด็นออกจากอะตอมของสาร ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ทำให้อะตอมนั้นขาดอิเล็คตรอนไป จึงกลายเป็นประจุบวก (positive ion) ส่วนอิเล็คตรอนที่ถูกผลักออกจะไปเกาะกับอะตอมอื่นๆ กลายเป็นประจุลบ (negative ion) ทำให้โมเลกุลที่ถูกไอออไนซ์เปลี่ยนสภาพไป ส่งผลให้ปฏิกิริยาทางเคมีภายในเซลล์เปลี่ยนแปลง รังสีที่ทำให้เกิดประจุมี 2 กลุ่มคือ กลุ่มแรกเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความถี่สูงมากเคลื่อนที่ไปในลักษณะของคลื่น (photon energy) ได้แก่ รังสีแกมมา (gamma rays) เกิดจากการสลายตัวของสารกัมมันตรังสีต่างๆ ซึ่งอาจเป็นสารกัมมันตรังสีที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ เช่น แร่เรเดียม (Radium) หรือสารกัมมันตรังสีที่มนุษย์ประดิษฐ์ขึ้นมา เช่น โคบอลท์ 60 (Cobalt 60) ไอโอดีน 131 (Iodine 131) และ ซีเซียม 137 (Cesium 137) เป็นต้น รังสีแกมมาที่นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้จากการสลายแร่โคบอลท์ 60 และซีเซียม 137 โดยเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นสั้นมากแต่มีอำนาจทะลุทะลวงสูง ซึ่งสามารถทะลุผ่านคอนกรีตหนาประมาณ 1 ฟุตได้ และรังสีเอ็กซ์ (x-rays) เกิดจากคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าแผ่ออกมาจากวงโคจรของอิเล็คตรอน โดยวิ่งจากขั้วลบด้วยความเร็วสูงมากไปกระทบเป้าหมายซึ่งเป็นขั้วบวก การหยุดอิเล็คตรอนทันที

ทันใดทำให้เกิดพลังงานออกมา รังสีเอ็กซ์มีพลังงานต่ำกว่ารังสีแกมมา มีประโยชน์ทางการแพทย์และอุตสาหกรรมตรวจหารอยร้าวภายในชิ้นส่วนโลหะขนาดใหญ่ เป็นต้น ส่วนรังสีที่ทำให้เกิดประจุกลุ่มที่สอง คือ อนุภาค ส่วนใหญ่เกิดจากการสลายของสารกัมมันตรังสีและจากเตาปรมาณู มีอำนาจทะลุทะลวงต่ำกว่าพลังงานกลุ่มแรกมาก อนุภาคที่สำคัญได้แก่ อนุภาคแอลฟา มีประจุไฟฟ้าเป็นบวก อนุภาคค่อนข้างใหญ่เมื่อเทียบกับอนุภาคชนิดอื่น จึงไม่สามารถทะลุผ่านวัตถุหนาได้ สามารถยับยั้งได้ด้วยกระดาษเพียง 1 ชิ้น ส่วนอนุภาคบีต้า เป็นอนุภาคขนาดเล็กและมีความเร็วสูง จึงสามารถทะลุผ่านวัตถุหนาได้ดีกว่าอนุภาคแอลฟา โดยสามารถทะลุเข้าในเนื้อเยื่อได้ถึง 1-2 เซนติเมตร และอนุภาคนิวตรอน ไม่มีประจุและเป็นกลาง ใช้ผลิตไอโซโทปรังสีสำหรับรักษาโรค

การใช้รังสีเพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เริ่มตั้งแต่ ปี ค.ศ.1927 โดย Muller ได้ทดลองใช้รังสีเอ็กซ์กับแมลงหวี่ พบว่ารังสีเอ็กซ์ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแมลงหวี่สูงกว่าการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ สำหรับพืชเริ่มมีการใช้รังสีมาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ในปี ค.ศ. 1928 โดย Stadler ทดลองฉายรังสีเอ็กซ์กับข้าวโพด พบว่ารังสีเอ็กซ์สามารถทำให้ข้าวโพดเกิดการกลายพันธุ์ในอัตราที่สูงได้ และรังสีที่นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้แก่ รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา รังสีอุลตร้าไวโอเลต และอนุภาคนิวตรอน (Sigurbjorhsson, 1983)

3.2 ผลของรังสีแกมมา

รังสีแกมมามีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยมีผลตั้งแต่ระดับโมเลกุลไปจนกระทั่งถึงระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ และระบบอวัยวะ ผลทางตรงได้แก่การที่รังสีแกมมาทำลายโมเลกุลของสารต่างๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ หรือเป็นองค์ประกอบของเซลล์ เช่น ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลิอิก โดยเฉพาะดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นสารที่เก็บข้อมูลและถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรม ส่วนผลทางอ้อมคือ รังสีแกมมาจะทำให้น้ำซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของเซลล์สิ่งมีชีวิตถูกไอออไนซ์ ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นอาจรวมตัวกับโมเลกุลอื่นๆ ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์หรืออยู่ภายในเซลล์ ทำให้โครงสร้างทางเคมีของสารนั้นเปลี่ยนแปลงไป หรืออนุมูลอิสระอาจรวมตัวกันใหม่กลายเป็นสารอื่นๆ ที่เป็นอันตรายต่อเซลล์หรือสารต่างๆ ภายในเซลล์ จากผลของอนุมูลอิสระดังกล่าว อาจทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต จนกระทั่งถึงตายได้ (Constantin, 1975) รังสีแกมมาทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดแตกต่างกัน และ ในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันก็ยังแตกต่างกันตามปริมาณรังสีที่ได้รับ ขนาด อายุ และอวัยวะของสิ่งมีชีวิตที่ได้รับรังสีนั้น (Bender *et al*., 1974) ผลของรังสีจะเกิดมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณรังสีที่ใช้คือเมื่อเพิ่มปริมาณรังสีสูงขึ้น พืชก็จะมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาสูงตามไปด้วย จนในที่สุดจะถึงจุด

หนึ่งที่ปริมาณรังสีสามารถทำให้พืชตาย 100 เปอร์เซ็นต์ (Gaul, 1977) เช่น ต้นเก๊กฮวยพันธุ์หังโจว (เสริมศิริและคณะ, 2532) ต้นเบญจมาศ (ชุติทร, 2532) และต้นหน้าวัว (วิชชุดา, 2537) มีอัตราการรอดชีวิต การเกิดยอดใหม่และความสูงลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณรังสีสูงขึ้น

3.2.1 การเปลี่ยนแปลงในระดับยีน : เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับโมเลกุลของดีเอ็นเอซึ่งอาจมีหลายรูปแบบ เช่น อาจมีการเพิ่มขึ้นของเบส (addition) มีการขาดหายไปของเบส (deletion) หรือการถูกแทนที่เบสด้วยเบสตัวอื่น (substitution) จนทำให้ลำดับของเบสเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้อาจทำให้มีการขาดที่สายใดสายหนึ่ง หรือทั้งสองสายของโพลีนิวคลิโอไทด์ กรณีที่ขาดเพียงหนึ่งสาย มีดีเอ็นเอที่จะเป็นแม่พิมพ์ซ่อมแซมส่วนที่ขาดหายไปใหม่ได้ เมื่อมีการซ่อมแซมดีเอ็นเอเสร็จสิ้น ผลที่เกิดขึ้นอาจจะปกติเหมือนเดิม หรือถ้าซ่อมแซมผิดพลาดก็ส่งผลให้เกิดความผิดปกติได้ กรณีที่ขาดทั้งสองสาย ทำให้สายของโพลีนิวคลิโอไทด์ที่ถูกรังสีทำลายหายไป ไม่สามารถซ่อมแซมได้ เหล่านี้เป็นผลให้ยีนขาดหายไป การเปลี่ยนแปลงในระดับยีนสามารถสังเกตจากที่มีการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์ เช่น ลักษณะของดอก ใบ ลำต้น การเจริญเติบโต ตลอดจนการเจริญพันธุ์ที่ผิดไปจากเดิม (fertility) เป็นต้น (Sigurbjorhsson, 1983)

3.2.2 การเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซม : เป็นการเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดขึ้นที่โครงสร้างหรือจำนวนของโครโมโซม ซึ่งสามารถศึกษาได้จากกล้องจุลทรรศน์ โดยสังเกตการแบ่งตัวของเซลล์หลังจากได้รับรังสีแล้วในระยะเมทาเฟสและแอนาเฟส การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซมมีหลายแบบ ได้แก่ การขาดของโครโมโซม (deletion) การเพิ่มส่วนของโครโม-โซม (duplication) การแลกส่วนของโครโมโซม (translocation) และการสลับของยีนบนโครโมโซม (inversion) เป็นต้น (Endo, 1990) สำหรับการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม มี 2 แบบ คือ ยู-พลอยด์ (euploid) และอะนูพลอยด์ (aneuploid) โดยยูพลอยด์ เป็นการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดโครโมโซม คือ มีการเปลี่ยนแปลงทั้งจีโนม ซึ่งโดยปกติแล้วสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด หรือดิพลอยด์ ถ้ามีจำนวนโครโมโซมเพิ่มมากกว่า 2 ชุด ได้แก่ 3 ชุด 4 ชุด 5 ชุด เรียกว่าพอลิพลอยด์ (polyploid) เช่นสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 10 ($2n = 2x = 10$) ถ้ามี 3 ชุด จะเท่ากับ 15 และถ้ามี 4 ชุด จะเท่ากับ 20 เป็นต้น ส่วนอะนูพลอยด์ คือการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมภายในชุดโครโมโซม เช่น มีจำนวนโครโมโซมขาดหรือเกินจากจำนวนปกติ ซึ่งจะเพิ่มหรือขาดเป็นแท่ง ($2n \pm 1$หรือ $2n \pm 2$) จำนวนโครโมโซมที่น้อยกว่าจำนวน ดิพลอยด์ เรียกว่าไฮโปดิพลอยด์ ส่วนจำนวนโครโมโซมที่มากกว่าดิพลอยด์ เรียกว่า ไฮเปอร์-

ดิพลอยด์ (Strickberger, 1990)

3.3 วิธีการฉายรังสีและปริมาณรังสีที่เหมาะสม

การฉายรังสีแกมมากับพืชอาจทำได้ 2 วิธีคือ การฉายรังสีแบบเฉียบพลัน เป็นวิธีที่ใช้รังสีปริมาณสูงในระยะเวลาสั้น นิยมใช้กับส่วนของเมล็ด อีกวิธีหนึ่งคือ การฉายรังสีในปริมาณต่ำแต่ใช้ระยะเวลานาน นิยมใช้กับต้นหรือส่วนของพืชที่กำลังเจริญเติบโต เมล็ดเป็นส่วนที่นักปรับปรุงพันธุ์นิยมนำมาฉายรังสี เพราะฉายได้ครั้งละมากๆ โอกาสสูงที่จะพบต้นกลายพันธุ์ มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมในขณะที่ฉายรังสีได้สูงกว่าส่วนอื่นๆ ของพืช แม้ว่าจะต้องใช้ปริมาณที่สูงกว่า นอกจากนี้ยังง่ายต่อการขนส่ง เมล็ดพืชต่างชนิดกันจะมีความไวต่อรังสีไม่เท่ากัน เนื่องจากสภาพแวดล้อมและลักษณะทางชีววิทยาของเมล็ด เช่น ความชื้นในเมล็ด ระยะเวลาที่เก็บเมล็ดหลังจากฉายรังสีแล้ว เป็นต้น โดยเมล็ดที่มีความชื้นสูงเกิดการกลายพันธุ์ได้ดี เนื่องจากรังสีทำปฏิกิริยากับน้ำภายในเซลล์ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งอาจทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์หรือสารต่างๆ ภายในเซลล์ (Brigg and Konzak, 1997) สำหรับปริมาณรังสีแกมมาที่เหมาะ สมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ คือปริมาณรังสีที่ทำให้พืชที่นำมาฉายรังสีตายไป 30-50 เปอร์เซ็นต์ เรียกว่าค่า LD_{30} (30% lethal dose) และ LD_{50} (50% lethal dose) (Sigurbjorhsson, 1983)

4. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืช

4.1 การฉายรังสีแกมมากับชิ้นส่วนพืชแล้วนำไปปลูก : ส่วนต่างๆของพืชที่นำไป

ฉายรังสีแกมมาเพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์และนำไปปลูกตามธรรมชาติ มีได้หลายส่วน เช่น เมล็ด ไหล หัว ใบ ลำต้น เป็นต้น

เมล็ด : Steiner (1993) ได้ศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อเมล็ดของ *Lotus*

corniculatus L. ซึ่งมีดอกสีเหลือง พบว่าค่า LD_{50} เท่ากับ 20 กิโลแรด และต้นที่ได้ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีดอก อรุณี (2541) ปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมมะลิ 105 โดยฉายรังสีแกมมาปริมาณ 20 กิโลแรด พบว่าได้พันธุ์กลายซึ่งเรียกว่าพันธุ์ กข 6 มีลักษณะเป็นข้าวเหนียวคุณภาพดี ต้านทานโรคใบไหม้และโรคใบจุดสีน้ำตาล Oscar และคณะ (1998) พบว่าโครโมโซมของข้าวโพดที่ฉายรังสีแกมมาปริมาณ 30 กิโลแรด เกิดการขาดของโครโมโซม 76 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปริมาณรังสี 50 กิโลแรดทำให้โครโมโซมเกิดการขาด 86 เปอร์เซ็นต์ บังอร (2544) ใช้รังสีแกมมาที่ปริมาณ 20 กิโลแรด และโซเดียมอาไซด์ ความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ กับเมล็ดถั่วเหลือง พบว่าทั้งรังสีและสารเคมีมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอก ความอยู่รอด การเจริญเติบโต ตลอดจนสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ได้แก่ ใบเล็ก ใบหนา ใบหยาบ ใบเป็นคลื่นหรือย่น ขอบใบม้วน และเกิดการเปลี่ยนแปลงสีดอก

ไหล : จันทร์อำพร (2544 ข) ได้ฉายรังสีส่วนไหลของบัวหลวง เพื่อศึกษาผลของรังสีที่มีต่อการเจริญเติบโตของบัวสุธาสิโนบล พบว่าต้นที่ได้รับรังสีในระดับ 3 กิโลแรด มีการเจริญเติบโตดีกว่าในระดับรังสีอื่นๆ ส่วนต้นที่ได้รับรังสี 1 กิโลแรด มีการเจริญเติบโตจนออกดอกคล้ายกับต้นที่ไม่ได้รับรังสี สำหรับต้นที่ได้รับรังสีปริมาณ 5 15 และ 20 กิโลแรด ต้นเจริญไม่ดีและตายในที่สุด และจากการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของต้นที่ได้รับรังสี พบ ว่าไม่แตกต่างจากต้นควบคุม คือ 2n = 16

หัว : Buiatti และคณะ (1965) พบว่าหลังจากฉายรังสีแกมมาให้แก่หัวที่พักตัวของแกลดิโอลัสพันธุ์ Opera ในปริมาณ 15 20 และ 25 กิโลแรด ทำให้การเจริญเติบโตของแกลดิโอลัสลดลง และรังสีแกมมาในปริมาณสูงลดจำนวนดอกต่อช่อ แต่สามารถเปลี่ยนสีดอกแกลดิโอลัสจากแดงเป็นสีชมพูอ่อน จากการศึกษาจำนวนโครโมโซมของแกลดิโอลัสที่ฉายรังสี พบว่าจำนวนโครโมโซมไม่เปลี่ยนแปลง Cantor และคณะ (2002) พบว่าการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 1 เกรย์ กับหัวของแกลดิโอลัส ทำให้ต้นมีการเจริญเติบโตดีขึ้น และเกิดรากมากกว่าต้นควบคุม

ใบ : Benetka (1988) รายงานถึงการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้น หลังจากฉายรังสีแกมมาปริมาณ 1.5 2.0 และ 2.5 กิโลแรด กับใบของบีโกเนีย (*Begonia hiemalis* Fotch cv. Schwabenland) พบว่าประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ของต้นที่กลายพันธุ์ มีระยะการออกดอกล่าช้ากว่าปกติและมีการเปลี่ยนแปลงสีของดอกด้วย

ลำต้น : Nakornthap (1965) ฉายรังสีแกมมากับต้นพุทธรักษาซึ่งเป็นพันธุ์กลาย จำนวน 21 สายพันธุ์ พบว่าพันธุ์กลายนั้นมีการเปลี่ยนแปลงสีดอก มีตั้งแต่เป็นจุดกระ (spot) ลาย (streak) หรือเป็นแถบ (sector) บนกลีบดอก จนกระทั่งเปลี่ยนสีทั้งดอก Sharma (1977) ได้ศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อต้นกุหลาบหินพันธุ์ *Kalanchoe tubiflora* พบว่าการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน 3 และ 6 กิโลแรด ทำให้กุหลาบหิน มีลักษณะใบเปลี่ยนแปลงไปและออกดอกเร็วขึ้น นันทนา (2525) พบว่ารังสีแกมมาทำให้ต้นพุทธรักษาลูกผสม มีการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับความสูงของลำต้น ขนาดของใบ และเกิดแถบสีเหลืองขนาดต่างๆ ขนานกับเส้นใบ จากการศึกษาโครโมโซม พบว่ามีการขาดของโครโมโซม และเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีโครโมโซมผิด

ปกติเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณรังสีมากขึ้น Toshifumi และคณะ (1999) พบว่าปริมาณรังสี 1-3 กิโลเกรย์ ทำให้ต้น *Arabidopsis* มีขนใบเพิ่มจำนวนมากขึ้น อุไร (2544) ศึกษาการกลายพันธุ์ในต้นอเมซอน โดยใช้ต้นอ่อนฉายรังสีแกมมาปริมาณ 0 50 200 400 600 และ 800 แรด แล้วนำมาปลูกในกระถางพบว่าค่า LD_{50} มีค่าประมาณ 550 แรด และต้นอ่อนที่ผ่านการฉายรังสีเจริญช้ากว่าต้นอ่อนที่ไม่ผ่านการฉายรังสีอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ รวมทั้งจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นจากต้นควบคุมที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 22 Lapade และคณะ (2002) พบว่ารังสีแกมมาทำให้เปลี่ยนสีดอก mussaenda การสร้างคลอโรฟิลล์ในใบ *Dracaena* sp. ผิดปกติ และทำให้หนามของใบสัปปะรดมีจำนวนลดลง

4.2 การฉายรังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : ชิ้นส่วนพืชที่ฉายรังสีแกมมา ได้แก่ เมล็ด ไหล ลำต้น หน่อ ปลายยอด แคลลัส เป็นต้น

เมล็ด : กนกพร (2544) นำเมล็ดบัวหลวงบุณฑริก ฉายรังสีแกมมาปริมาณ 0 - 25 เกรย์ และเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอภายใต้สภาวะปลอดเชื้อบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าเอ็มบริโอบัวหลวงที่ได้รับรังสีมีอัตราการงอกน้อยกว่าเอ็มบริโอที่ไม่ได้รับรังสี และพบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเททับด้วยน้ำกลั่น เอ็มบริโอเกิดยอดได้ดี โดยเมล็ดบัวหลวงที่ได้รับรังสีปริมาณ 0 - 10 เกรย์ เอ็มบริโอเกิดยอดรวมได้มากกว่าเมล็ดที่ได้รับรังสีปริมาณ 15 - 25 เกรย์ และเอ็มบริโอเกิดรากได้ดีบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และเททับด้วยน้ำกลั่น พวงชมพู (2546) ฉายรังสีแกมมาปริมาณ 0 2 4 6 8 และ 10 เกรย์ กับเมล็ดบัวหลวงบุณฑริก และเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และเททับด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าเอ็มบริโอบัวหลวงที่ไม่ได้รับรังสีมีการเจริญเติบโตดีกว่าเอ็มบริโอที่ได้รับรังสี และเอ็มบริโอที่ได้รับรังสีปริมาณ 6 เกรย์ สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้ดีที่สุด และเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เททับด้วยอาหารเหลวสูตร MS เอ็มบริโอเกิดยอดรวมได้ดี แต่ยอดบวม ฉ่ำน้ำ ส่วนการชักนำให้เกิดรากเกิดได้ดีบนอาหารแข็งสูตร MS เติม NAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เททับด้วยอาหารเหลวสูตร MS

ไหล : Arunyanart และ Soontronyatara (2002) ศึกษาการชักนำให้เกิดการ
กลายพันธุ์ในบัวหลวงสัตตบุษย์ (2n = 16) โดยการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 0 2 3 4 5 และ 6 กิโลแรด กับต้นบัวหลวงที่ชักนำจากตาที่ไหลภายใต้สภาวะปลอดเชื้อโดยใช้อาหารแข็งสูตร ½ MS ที่เติม IAA 3 ไมโครโมลาร์ และ 2iP 15 ไมโครโมลาร์และเททับด้วยอาหารเหลวสูตรเดียวกัน พบว่าปริมาณรังสีแกมมา 2 กิโลแรดทำให้อัตราการอยู่รอดของบัวลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ การเจริญเติบ

โตของยอดเกิดได้ดีรวมทั้งเกิดรากยาวและมีจำนวนมากกว่าต้นควบคุม ส่วนปริมาณรังสี 3-5 กิโล-แรด ทำให้เกิดลักษณะผิดปกติ คือใบเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อน ขอบใบม้วนงอ ยับยั้งการเจริญของยอด ตาข้างและราก ส่วนรังสีแกมมา 6 กิโลแรดทำให้พืชตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายราก พบว่าต้นที่ได้รับรังสีปริมาณ 3 และ 4 กิโลแรด มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นจากเดิม คือ 2n = 18 และ 2n = 20 ตามลำดับ

ลำต้น : นงลักษณ์ (2541) ศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีต่อการเจริญเติบโตและการกลายพันธุ์ของบีโกเนียเร็กซ์ (*Begonia rex*) ในสภาพปลอดเชื้อ โดยฉายรังสีปริมาณ 0-100 เกรย์ พบว่าอัตราการอยู่รอดและการเจริญเติบโตลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น ลักษณะผิดปกติที่พบจากต้นที่ได้รับรังสีปริมาณ 20 เกรย์ ได้แก่ ใบกลม ใบเรียวยาว ใบมีสีแดงเข้มและมีประสีขาวมากกว่าปกติ แต่จำนวนโครโมโซมของต้นที่ได้รับรังสีเมื่อเปรียบเทียบกับต้นปกติ ไม่แตกต่างกัน Fereol และคณะ (1996) ฉายรังสีแกมมากับต้น *Alpinia purpurata* ในสภาพปลอดเชื้อ ปริมาณ 0 15 30 และ 45 เกรย์ พบว่าอัตราการอยู่รอด น้ำหนักสด และอัตราการเพิ่มของยอดรวมลดลงตามปริมาณรังสีที่เพิ่มขึ้น โดยค่า LD_{50} มีค่าประมาณ 30 เกรย์ และผลของรังสีทำให้เกิดลักษณะใบลาย (stripe) ใบสีขาวเผือก (albino) ใบเกิดภาวะบกพร่องของคลอโรฟิลล์ (chlorosis) และแผ่นใบสองข้างมีขนาดไม่เท่ากัน Datta และคณะ (2001) พบว่ารังสีแกมมาปริมาณ 1.5 2.0 และ 25 เกรย์ ทำให้อัตราการอยู่รอด ความสูงของลำต้น และจำนวนใบของเบญจมาศลดลง รวมทั้งสีของดอกเปลี่ยนจากสีม่วงเข้มเป็นสีเหลือง

หน่อ : De Guzman และคณะ (1976) ทดลองใช้รังสีแกมมากับหน่อกล้วยพันธุ์ Saba ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าปริมาณรังสี 200 เกรย์ นั้นทำให้ต้นตายทั้งหมด โดยปริมาณรังสี 100 เกรย์ เป็นปริมาณรังสีสูงสุดที่ต้นกล้วยสามารถทนทานได้ และปริมาณรังสี 10 เกรย์ และ 25 เกรย์ มีผลกระตุ้นในการเพิ่มน้ำหนักของเนื้อเยื่อและเพิ่มจำนวนหน่อได้ อรดี (2528) เพาะเมล็ดเยอบีราสายพันธุ์ยุโรป ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อบนอาหารแข็งสูตร MS เมื่อเกิดหน่อจำนวนมากแล้วนำไปฉายรังสีแกมมา 0 - 10 กิโลแรด พบว่าที่ปริมาณรังสี 1 - 4 กิโลแรด ต้นมีชีวิตรอดแต่เจริญไม่ดีเท่ากับต้นควบคุม ส่วนปริมาณรังสีที่เพิ่มขึ้นทำให้เกิดการตาย 100 เปอร์-เซ็นต์ สำหรับต้นที่อยู่รอดนั้น พบว่าปริมาณรังสี 1 กิโลแรด เกิดลักษณะผิดปกติต่างๆ เช่น ใบหนาขรุขระ บางดอกมีขีดสีแดงเกิดเป็นเส้นหรือแถบบนกลีบดอกกลีบใดกลีบหนึ่ง และบางดอกมีขนาดใหญ่กว่าปกติเล็กน้อย โดยจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของต้นผิดปกติไม่แตกต่างจากต้นปกติ

ปลายยอด : Charbaji และ Nabulsi (1999) ฉายรังสีแกมมาปริมาณ 0 2 5

และ 7 เกรย์ กับปลายยอดและข้อเดี่ยวขององุ่นสำหรับทำไวน์ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง 2 สายพันธุ์ คือ Helwani และ Cabernet France พบว่าชิ้นส่วนทั้งสองสายพันธุ์ที่ได้รับรังสี 7 เกรย์ มีความยาวยอดเพิ่มขึ้น และปริมาณรังสี 2 และ 7 เกรย์ รากมีความยาวมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

แคลลัส : Degani และ Pickholz (1973) ศึกษาการพัฒนาเป็นยอดของแคลลัสยาสูบที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณ 0 5 25 และ 50 เกรย์ พบว่าที่ปริมาณรังสี 5 เกรย์ มีการพัฒนาไปเป็นยอดสูงสุด และเมื่อปริมาณรังสีสูงขึ้นการพัฒนาไปเป็นยอดจะลดลง ความแตกต่างที่เห็นได้ชัดเจนระหว่างแคลลัสที่ได้รับรังสีและไม่ได้รับรังสีคือ แคลลัสที่ได้รับรังสีมีการให้พัฒนาเป็นอวัยวะ และมีการเพิ่มระดับความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นได้ดีกว่ากลุ่มแคลลัสที่ไม่ได้รับรังสี ธัญญา (2532) ศึกษาผลของรังสีแกมมาปริมาณ 15 20 25 30 35 40 45 และ 50 เกรย์ กับแคลลัสบุก พบว่าเมื่อปริมาณรังสีสูงกว่า 15 เกรย์ แคลลัสตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นส่วนแคลลัสที่มีอายุมากกว่ามีอัตราการอยู่รอดสูงกว่า เมื่อได้รับรังสีปริมาณเท่ากัน วิทยาและสมปอง (2541) นำใบอ่อนสีแดงของมังคุด ชักนำให้เกิดแคลลัสในหลอดทดลอง หลังจากนั้นฉายรังสี แกมมาปริมาณ 0 5 10 20 และ 40 เกรย์ พบว่าแคลลัสที่ได้รับรังสี 20 และ 40 เกรย์ มีอัตราการอยู่รอดลดลงแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และแคลลัสที่ได้รับรังสีแกมมาปริ- มาณ 10 20 และ 40 เกรย์ พบว่าต้นมีขนาดเตี้ยลง อัตราการอยู่รอดหลังจากย้ายปลูกลดลง และเกิดลักษณะใบผิดปกติ เช่น ปลายใบสองแฉก ขอบใบมีรอยหยัก รวมทั้งการจัดเรียงตัวของใบผิดปกติจากเดิม

5. การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ

โฟลไซโทเมทรี (flow cytometry) เป็นเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยการแยกนิวเคลียสของเซลล์พืชที่ต้องการศึกษา ทำให้สามารถประมาณจำนวนนิวเคลียสและขนาดของจีโนมพืชที่ต้องการศึกษาได้ นอกจากนี้ยังสามารถบ่งชี้ถึงระดับการเปลี่ยนแปลงเพิ่มหรือลดของจำนวนชุดโครโมโซมหรือจำนวนเป็นแท่ง รวมทั้งสามารถยืนยันถึงความเสถียรของโครโมโซมพืชที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะปลอดเชื้อเป็นเวลานาน การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอสามารถปฏิบัติการได้อย่างรวดเร็วและให้ผลที่แม่นยำ (Galbraith *et al.*, 1983) โดยเฉพาะการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อบ่งชี้ถึงจำนวนชุดโครโมโซมที่เพิ่มจำนวนชุดมาก เนื่องจากจำนวนโครโมโซมที่เพิ่มจำนวนชุดมากและโครโมโซมมีขนาดเล็กนั้น เป็นการยากในการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้โฟลไซโทเมทรี ศึกษาจากเนื้อเยื่อเจริญของพืช ได้แก่ แคลลัส ยอด ใบอ่อน และเอ็มบริโอ เป็นต้น

แคลลัสและยอด : จากการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของแคลลัส sugarbeet (Jacq *et al*., 1992) และ *Cucumis sativus* (แตงกวา) (Kubalakova *et al*., 1996) พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นพอลิพลอยด์ คือจาก 2 ชุด เป็น 16 ชุด Barbara และ Elwira (2002) ใช้โฟลไซโทเมทรีกับ *Rubus chamaemorus* L. พบว่าปริมาณดีเอ็นเอ จากยอดที่เกิดจากเมล็ดเทียมซึ่งเก็บไว้เป็นเวลานานที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสภาวะปลอดเชื้อ มีจำนวนชุดโครโมโซมเท่าเดิม ส่วนแคลลัสที่เกิดขึ้นมีจำนวนชุดโครโมโซมเปลี่ยนเป็น 4 ชุด และ 8 ชุด Gajdosova และคณะ (1995) พบว่าปริมาณดีเอ็นเอของต้น *Abies* จากยอดที่ย้ายเลี้ยงเป็นเวลานานยังคงมีจำนวนชุดโครโมโซมเท่าเดิม

ใบอ่อน : Keiko และคณะ (1997) ชักนำต้นพริกหวาน (*Capsicum annuum* L.)
ให้เกิดพอลิพลอยด์โดยใช้คอลชิซีน พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงชุดโครโมโซมจาก 2 ชุด เป็น 4 ชุด Anthony และคณะ (2005) ศึกษาปริมาณดีเอ็นเอจากใบของต้นฮอป (*Humulus iupulus* L.) ที่ผ่านการแช่คอลชิซีนในสภาวะปลอดเชื้อ พบว่าจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มเป็น 2 เท่า คือจาก 2 ชุด เป็น 4 ชุด Roux และคณะ (2003) พบว่าปริมาณดีเอ็นเอของต้นกล้วยที่เกิดอะนูพลอยด์หลังจากได้รับรังสีแกมมา สอดคล้องกับจำนวนโครโมโซมที่ลดลงไป 2 แท่ง

เอ็มบริโอ : Rival และคณะ (1997) ศึกษาปริมาณดีเอ็นเอของเอ็มบริโอปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะปลอดเชื้อเป็นเวลานาน พบว่าจำนวนชุดโครโมโซมไม่เปลี่ยนแปลง

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ของต้นกล้าบัวหลวงสายพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ
2. ศึกษาปริมาณรังสีที่ทำให้เกิดการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ของเอ็มบริโอบัวหลวงสายพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ
3. ศึกษาความแปรปรวนของการเจริญเติบโต ของบัวหลวงสายพันธุ์บุณฑริกหลังจากได้รับรังสีในสภาพปลอดเชื้อ
4. ศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อจำนวนโครโมโซม และปริมาณดีเอ็นเอของบัวหลวงสายพันธุ์บุณฑริก หลังจากได้รับรังสี