บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ถั่วฝักยาว (*Vigna unguiculata* var. *sesquipedalis*) เป็นพืชผักเศรษฐกิจตระกูลถั่วที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่งต่อการบริโภคภายในประเทศและการส่งออก (ขวัญจิตร และวัลลภ, 2541) มีการส่งออกถั่วฝักยาวในรูปฝักสดและฝักสดแช่แข็งไปยังตลาดยุโรปและเอเชีย โดยเฉพาะประเทศมาเลเซีย มีการนำเข้าถั่วฝักยาวจากประเทศไทยเป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตามการผลิตในประเทศส่วนใหญ่จะผลิตเพื่อการบริโภคในท้องถิ่นโดยเฉพาะในรูปฝักสด เนื่องจากถั่วฝักยาวมีอัตราการหายใจสูง ทำให้ไม่สามารถขนส่งไปไกลได้ ยกเว้นฝักสดแช่เข็ง การผลิตถั่วฝักยาวมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ผลผลิตต่ำ การเข้าทำลายของแมลงและโรค ทำให้ต้องมีพันธุ์ที่เหมาะสมกับแต่ละท้องที่ (กรมวิชาการเกษตร, 2539; ขวัญจิตร และวัลลภ, 2537; สมปอง, 2530) สำหรับปัญหาการเข้าทำลายของแมลงมีความสำคัญต่อการผลิตถั่วฝักยาว เพราะนอกจากจะทำลายผลผลิตโดยตรงแล้ว แมลงยังเป็นพาหะของโรคที่เกิดจากไวรัสหลายชนิด เช่น โรคพุ่มฝอย โรคใบเหลือง เป็นต้น ซึ่งการป้องกันแมลงที่นิยมทำกันคือ การใช้สารเคมี หรือการเขตกรรม โดยเฉพาะการใช้สารเคมีจะก่อให้เกิดปัญหาสารพิษตกค้างในผลผลิต ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค รวมทั้งมีผลต่อสภาพแวดล้อม ดังนั้นการหาสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง มีลักษณะดี และต้านทานการเข้าทำลายของแมลงจึงเป็นสิ่งจำเป็น อย่างไรก็ตามการหาแหล่งพันธุกรรมของแต่ละลักษณะที่จำเพาะเจาะจงในปัจจุบันยังค่อนข้างจำกัด เนื่องจากพันธุ์ในกลุ่มนี้มีฐานพันธุกรรมค่อนข้างแคบ วิธีการหนึ่งที่จะสร้างความแปรปรวนให้เกิดขึ้นกับต้นพืช และสามารถใช้เป็นแหล่งในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ได้ คือการชักนำการกลายพันธุ์ ตามด้วยการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ

การชักนำการกลายพันธุ์สามารถทำได้หลายวิธี เช่นการฉายรังสี การใช้สารเคมี เป็นต้น พบว่าวิธีการชักนำการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการฉายรังสี เป็นวิธีการที่ให้ผลดีและเป็นที่นิยมใช้ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช เนื่องจากสามารถทำได้ทุกส่วนขยายพันธุ์ เช่น เมล็ดพันธุ์ หัว ราก ไหล กิ่ง กิ่งตอน กิ่งปักชำ พืชทั้งต้น หรือเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง ซึ่งการนำส่วนใดมาใช้จะขึ้นกับชนิดของพืช รังสีที่นิยมใช้ได้แก่ รังสีเอกซ์ (X – rays) รังสีแกมมา (gamma rays) อนุภาคนิวตรอน (neutron) และรังสีอัลตราไวโอเลต (ultraviolet rays) อย่างไรก็ตามรังสีแต่ละชนิดมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของยีนแตกต่างกัน เช่น รังสีเอกซ์และรังสีแกมมาเป็นรังสีประเภทคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า มีผลทำให้

เกิดการเปลี่ยนแปลงในอนุภาคและโมเลกุลของสาย DNA นิวตรอนซึ่งเป็นรังสีประเภทอนุภาค ที่มีความรุนแรงกว่ารังสีแกมมา และรังสีเอกซ์ประมาณ 10 เท่า รังสีนิวตรอนมีผลต่อการเพิ่มของจำนวนโครโมโซม ความผิดปกติของการเรียงตัวของ DNA และการหักของโครโมโซม ส่วนรังสีอัลตราไวโอเลต เป็นรังสีที่มีอยู่ในธรรมชาติ มีผลต่อโครงสร้างของเบสกลุ่มไพริมิดีน ทำให้เกิดความผิดพลาดในการจำลองสาย DNA และการ crosslinks ระหว่าง DNA – protein และ DNA – DNA เป็นต้น รังสีแกมมาเป็นรังสีที่นิยมใช้สำหรับการชักนำการกลายพันธุ์ในพืช และประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด อย่างไรก็ตามพืชแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อรังสีแตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาปริมาณรังสีที่เหมาะสมต่อการชักนำการกลายพันธุ์ในถั่วฝักยาวพันธุ์คัด – มอ. เพื่อการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ในลักษณะที่ดีต่อไป

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของถั่วฝักยาว

ถั่วฝักยาว (yardlong bean หรือ asparagus bean) มีถิ่นกำเนิดในบริเวณเขตร้อนของทวีปแอฟริกา หรือในประเทศจีน ปลูกแพร่หลายในประเทศอินเดียและทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Herklots, 1972; Rubatzky and Yamaguchi, 1997) ถั่วฝักยาวมีการเจริญเติบโตแบบเลื้อย ต้องมีการขึ้นค้าง โดยพันในทิศทางทวนเข็มนาฬิกา (ขวัญจิตร และวัลลภ, 2539; ขวัญจิตร และวัลลภ, 2540) ตายอด (terminal bud) พัฒนาเป็นตาใบเท่านั้น ไม่พัฒนาเป็นตาดอก ใบเป็นใบประกอบ จำนวน 3 ใบย่อย (trifoliate compound leaves) แต่ใบจริงคู่แรกเป็นใบเดี่ยว (simple leaf) (กองขยายพันธุ์พืช, 2536) ใบมีสีเขียวเข้ม บางครั้งพบบางส่วนของใบมีสีม่วง ถั่วฝักยาวเป็นพืชผสมตัวเองโดยธรรมชาติ โดยผสมเกสรก่อนดอกบาน (cleistogamy) มีอัตราการผสมข้าม 1 – 5 % โดยมีแมลงเป็นพาหะสำคัญ (กองขยายพันธุ์พืช, 2536; ขวัญจิตร และวัลลภ, 2540) ลักษณะช่อดอกเป็นแบบ raceme เกิดตามซอกใบ เป็นดอกสมบูรณ์เพศ (perfect flower) ในช่อดอกประกอบด้วยดอกย่อย 1 – 6 ดอก ดอกมีขนาด 1 – 3 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงมีสีเขียว ลักษณะเป็นกรวยล้อมรอบกลีบดอก กลีบดอกแบ่งเป็น 5 กลีบ มี 2 กลีบขนาดใหญ่ เรียกว่า standards ห่อหุ้มกลีบดอกชั้นใน (wing) 2 กลีบ และกลีบดอกชั้นในสุดห่อหุ้มเกสรตัวเมียและเกสรตัวผู้ มีลักษณะเป็นกรวยหรือหลอด เรียกว่า keel เกสรตัวผู้มีอับละอองเกสร 10 อับ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม โดยมีอับละอองเกสร 9 อับ เชื่อมติดกับเกสรตัวเมีย และอีก 1 อับ แยกออกมาต่างหาก เกสรตัวเมียประกอบด้วยรังไข่รูปร่างยาวสีเขียว ก้านชูเกสรตัวเมีย และปลายยอดเกสรตัวเมียมีขนฟูสีขาวติดอยู่ เกสรตัวเมียพร้อมรับการผสมก่อนดอกบาน 2 วัน ดอกบานในตอนเช้า และหุบในตอนบ่ายของวันเดียวกัน หลังจากนั้นจะมีการพัฒนาของฝัก กลีบดอกและดอกจะร่วง ฝักมีลักษณะตรงหรือโค้ง ยาวประมาณ 20 – 60 เซนติเมตร (กองขยายพันธุ์พืช, 2536; Tindall, 1983) ฝักสีเขียวอ่อนถึงเข้มและเขียวปลายม่วง เมื่อแก่มีสีน้ำตาล เมล็ดเกิดเรียงอยู่ภายในตามความยาวของฝัก เมล็ดมีลักษณะรูปไต สีขาว น้ำตาล ดำ และสีสลับ น้ำตาล – ขาว ดำ – ขาว และแดง – ขาว ตามสายพันธุ์ เมล็ดยาวประมาณ 0.8 – 1.2 เซนติเมตร จำนวน 15 – 20 เมล็ดต่อฝัก (กองขยายพันธุ์พืช, 2536; Rubatzky and Yamaguchi, 1997)

2. การชักนำการกลายพันธุ์

การชักนำการกลายพันธุ์ช่วยให้พืชสามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ และทำให้เกิดพืชพันธุ์ต่างๆ โดยการกลายพันธุ์เป็นกระบวนการหนึ่งที่ทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม (Hancock, 1992) การกลายพันธุ์คือ การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมที่สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ (de Vries, 1901 อ้างโดย Donini and Sonnino, 1998) ซึ่งสามารถแบ่งการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้ 3 ระดับ คือ

1. การกลายพันธุ์ระดับยีน (gene mutation) เป็นการเปลี่ยนแปลงของเบสที่เป็นส่วนประกอบของยีน

2. การกลายพันธุ์ระดับโครโมโซม (chromosomal mutation) เป็นการเปลี่ยนแปลงขนาดของโครโมโซม ลำดับของเบสในโครโมโซม เป็นผลมาจากการหักของโครโมโซม การสอดแทรกของสายนิวคลีโอไทด์เข้าสู่โครโมโซม

3. การกลายพันธุ์ระดับจีโนม (genome mutation) เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ทำให้จำนวนโครโมโซมในเซลล์มีจำนวนเพิ่มหรือลดลง ได้แก่ โพลีพลอยด์ แฮพลอยด์ และอนิวพลอยด์ เป็นต้น

ในสภาพธรรมชาติ การกลายพันธุ์สามารถเกิดได้ตลอดเวลา เรียกว่าการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) เป็นการเกิดอย่างช้าๆ ซึ่งสามารถเกิดได้กับทุกเซลล์และทุกระยะการเจริญเติบโต เป็นผลมาจากความผิดปกติในการแบ่งเซลล์ หรือถูกกระตุ้นจากสภาพแวดล้อมทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของหน่วยพันธุกรรม ถ้าการกลายพันธุ์เกิดขึ้นจากการกระทำของมนุษย์เรียกว่า การชักนำให้กลายพันธุ์ (induced mutation) ซึ่งสามารถทำได้โดยการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการกลายพันธุ์โดยวิธีการแทรก DNA การชักนำให้กลายพันธุ์โดยใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

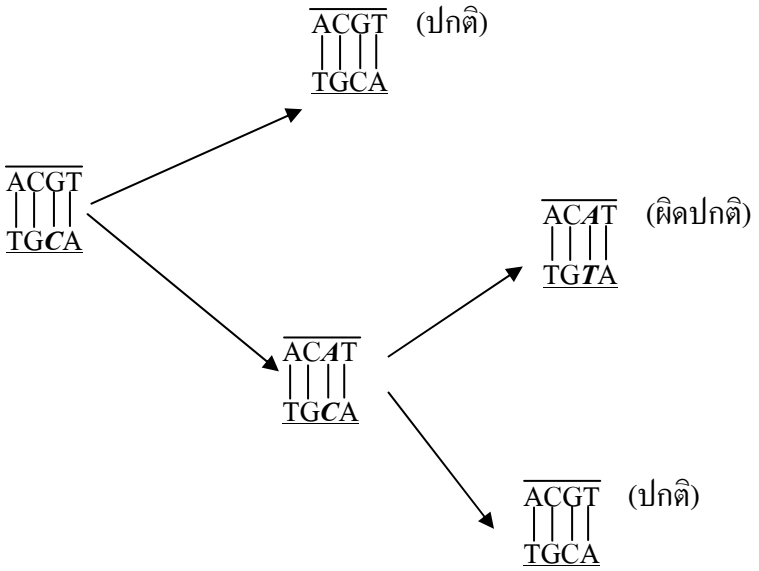
1. สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี (chemical mutagen) โดยใช้สารเคมีชนิดต่าง ๆ เช่น Ethyl methanesulphonate (EMS), Ethyleneimine (EI), Diethyl sulphate (DES) เป็นต้น

2. สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ (physical mutagen) เป็นพวกรังสีต่างๆ ที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แ รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา อนุภาคนิวตรอน และรังสีอัลตราไวโอเลต เป็นต้น

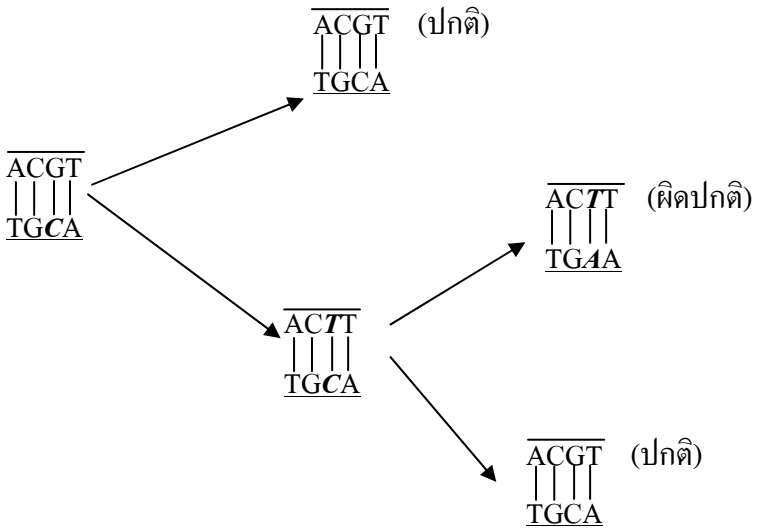
3. การกลายพันธุ์ในระดับโมเลกุล

การกลายพันธุ์ในระดับโมเลกุล คือการเปลี่ยนแปลงที่เกิดกับ DNA แบ่งได้เป็น 6 ประเภท ดังนี้ (Anonymous, 2003)

3.1 Substitution คือการเปลี่ยนแปลงของเบสในสายนิวคลีโอไทด์ ทำให้มีผลต่อวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต การกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ ส่วนใหญ่เป็นการกลายพันธุ์แบบนี้ เนื่องจากเป็นการเปลี่ยนแปลงของเบสเพียงเล็กน้อย และไม่มีกลไกสลับซับซ้อน เรียกอีกชื่อว่า point mutation เช่น เกิดจากความผิดพลาดในการจำลองสาย DNA ความผิดพลาดขณะซ่อมแซมสาย DNA เป็นต้น (Anonymous, 2003; Hartwell *et al*., 2004) การแทนที่ด้วยเบสในกลุ่มเดียวกัน เช่น adenine (A) แทนที่ด้วย guanine (G) หรือ cytosine (C) แทนที่ด้วย thymine (T) หรือในทางกลับกัน เรียกการแทนที่แบบนี้ว่าทรานซิชัน (transition) (รูปที่ 1) ซึ่งเกิดในช่วงที่ DNA จำลองตัวเอง และเรียกการแทนที่เบสด้วยเบสต่างกลุ่มว่า ทรานสเวอร์ชัน (transversion) (รูปที่ 2) เกิดจากความผิดพลาดขณะซ่อมแซมสาย DNA (สิรนุช, 2540; Hartwell *et al*., 2004)

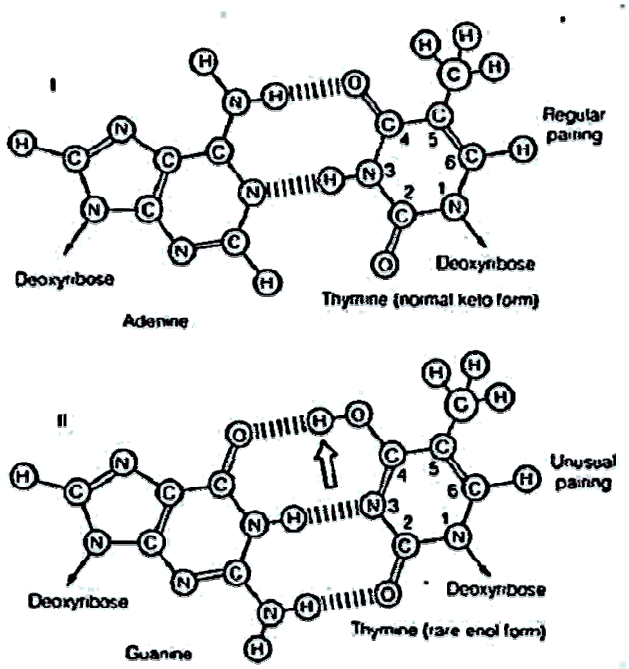


รูปที่ 1 การแทนที่ของเบสแบบทรานซิชัน ที่เกิดความผิดปกติที่ C (***C***) ทำให้คู่เบสเปลี่ยนจาก C–G ไปเป็น T–A



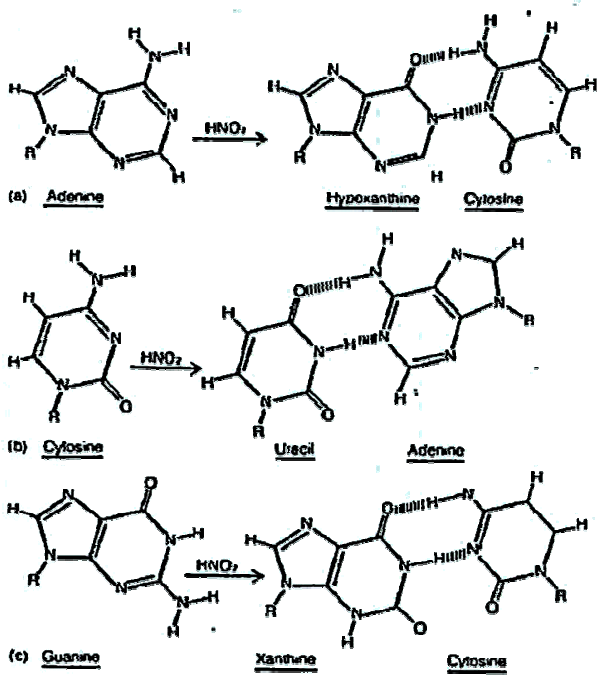
รูปที่ 2 การแทนที่ของเบสแบบทรานสเวอร์ชัน ที่เกิดความผิดปกติที่ C (***C***) ทำให้คู่เบสเปลี่ยนจาก C–G ไปเป็น A–T

การแทนที่ของเบสเกิดจากการเคลื่อนย้ายโปรตอนหรืออิเล็กตรอนระหว่างเบส เรียกว่าทอโทเมริกชิฟต์ (tautomeric shift) ซึ่งเป็นการย้ายโปรตอนจากหมู่ – NH_2 ไปยังหมู่ – N ซึ่งเกิดเฉพาะเบส A หรือ C ส่วนเบส G หรือ T เป็นการเคลื่อนย้ายโปรตอนจากหมู่ = NH ไปยังหมู่ =O กลายเป็นหมู่ OH ส่งผลให้คุณสมบัติในการจับคู่ของเบสเปลี่ยนไปด้วย (รูปที่ 3) ถ้าเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเบสกับสารเคมีที่เป็นผลผลิตข้างเคียงจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ เช่น peroxides, nitrous acid, formaldehyde และ purine analogues เป็นต้น ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของเบสแบบทรานซิชันแบบเดียวเรียกกระบวนการนี้ว่า base deamination เช่น การรวมตัวของ nitrous acid กับ adenine, cytosine และ guanine ได้ hypoxanthine, uracil และ xanthine ตามลำดับ ซึ่ง hypoxanthine และ uracil มีการจับคู่ของเบสต่างไปจากเดิม ส่วน xanthine ไม่มีผลต่อการจับคู่ของเบส แต่มีผลต่อการหักของพันธะฟอสเฟต (รูปที่ 4) (สิรนุช, 2540; Anonymous, 2003; Klug and Cummings, 2005)



รูปที่ 3 การเคลื่อนย้ายของโปรตอนจากหมู่ = NH ไปยังหมู่ =O กลายเป็น OH ใน thymine ทำให้ thymine ไปเข้าคู่กับ guanine แทนที่จะเข้าคู่กับ adenine

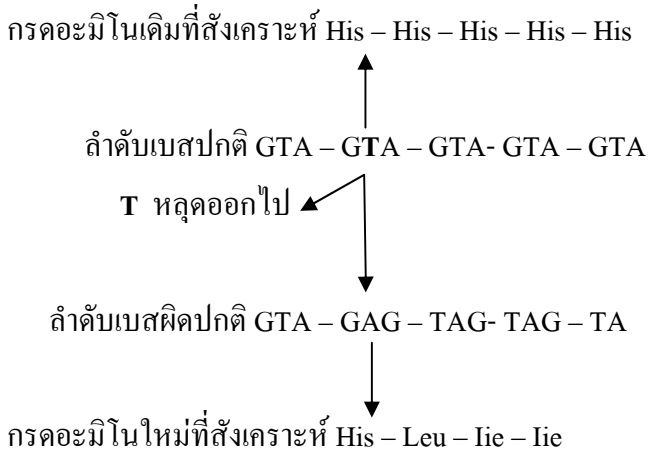
ที่มา : Anonymous (2003)



รูปที่ 4 Base deamination ของ DNA ด้วย nitrous acid

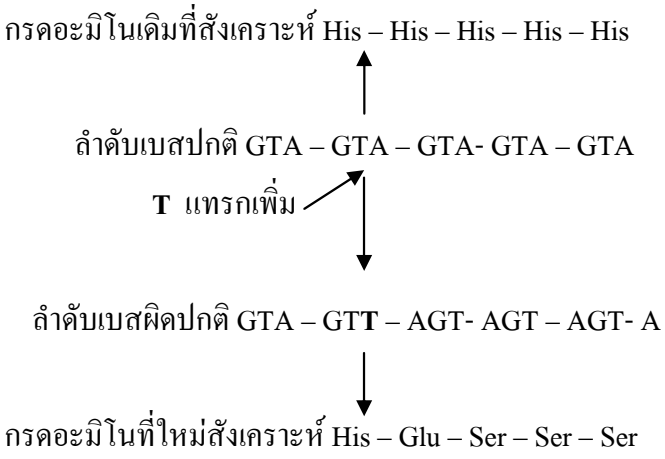
ที่มา : Anonymous (2003)

3.2 Nucleotide deletion คือการที่นิวคลีโอไทด์หลุดออกจากสาย DNA ซึ่งการหลุดของนิวคลีโอไทด์ส่งผลให้ลำดับเบสในสาย DNA มีการเปลี่ยนแปลง ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนของ DNA เช่น ในสาย DNA ที่มีการเรียงตัวของ GTA จำนวน 5 ตัว ซึ่งปกติจะสังเคราะห์อะมิโน histidine เมื่อมี T หลุดออกไปจะทำให้กรดอะมิโนที่สังเคราะห์เปลี่ยนไปจากเดิม (รูปที่ 5) (สิรนุช, 2540; Anonymous, 2003; Hartwell *et al*., 2004)



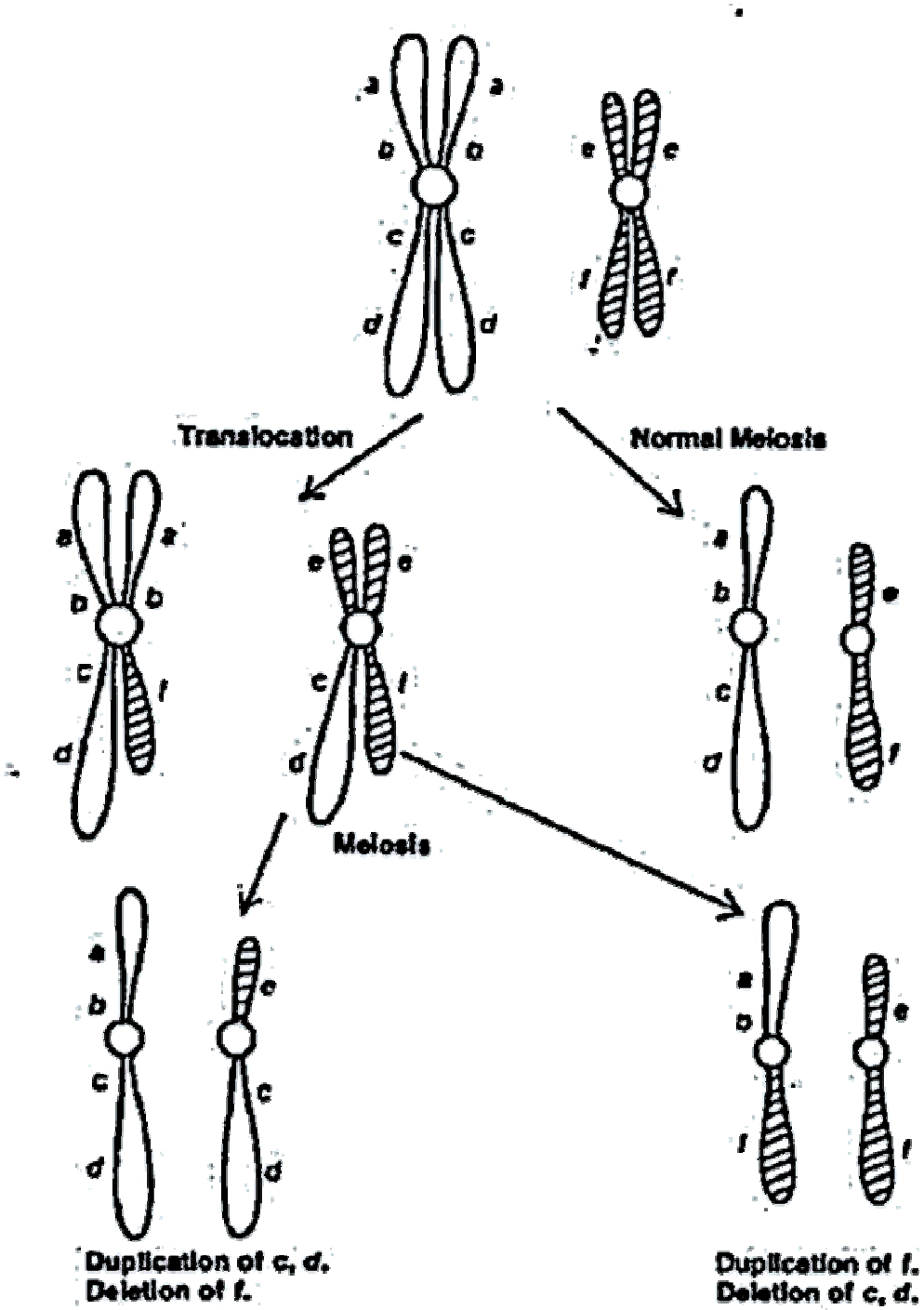
รูปที่ 5 การหลุดออกของ thymine ออกจากสาย DNA

3.3 Nucleotide Insertion คือการสอดแทรกของเบสหรือกลุ่มนิวคลีโอไทด์เข้าสู่สาย DNA ทำให้ลำดับของเบสในสาย DNA มีการเปลี่ยนแปลง เช่น ในสาย DNA ที่มีการเรียงตัวของ GTA จำนวน 5 ตัว ซึ่งปกติจะสังเคราะห์อะมิโน histidine เมื่อมี T แทรกเพิ่มจะทำให้กรดอะมิโนที่สังเคราะห์เปลี่ยนไปจากเดิม (รูปที่ 6) (สิรนุช, 2540; Anonymous, 2003; Hartwell *et al*., 2004)



รูปที่ 6 การสอดแทรกของ thymine เข้าสู่สาย DNA

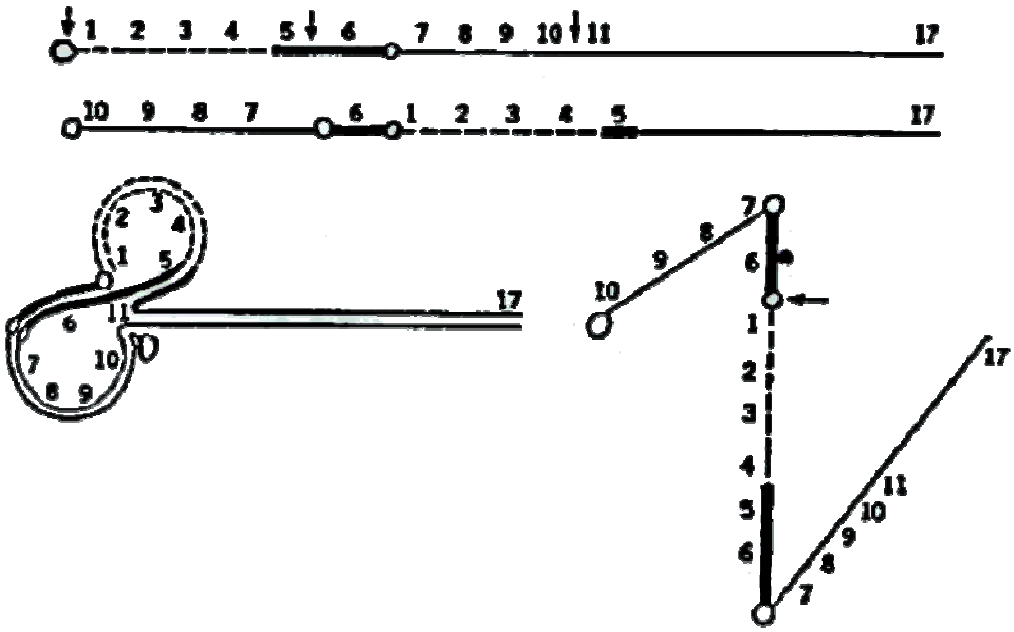
3.4 Translocation คือการย้ายตำแหน่งของกลุ่มนิวคลีโอไทด์ภายในสาย DNA หรือการเกิด crosslinks ระหว่างโครโมโซมต่างคู่กัน (รูปที่ 7 และ 8) (Anonymous, 2003; Hartwell *et al*., 2004)



รูปที่ 7 การ translocation ภายในสาย DNA

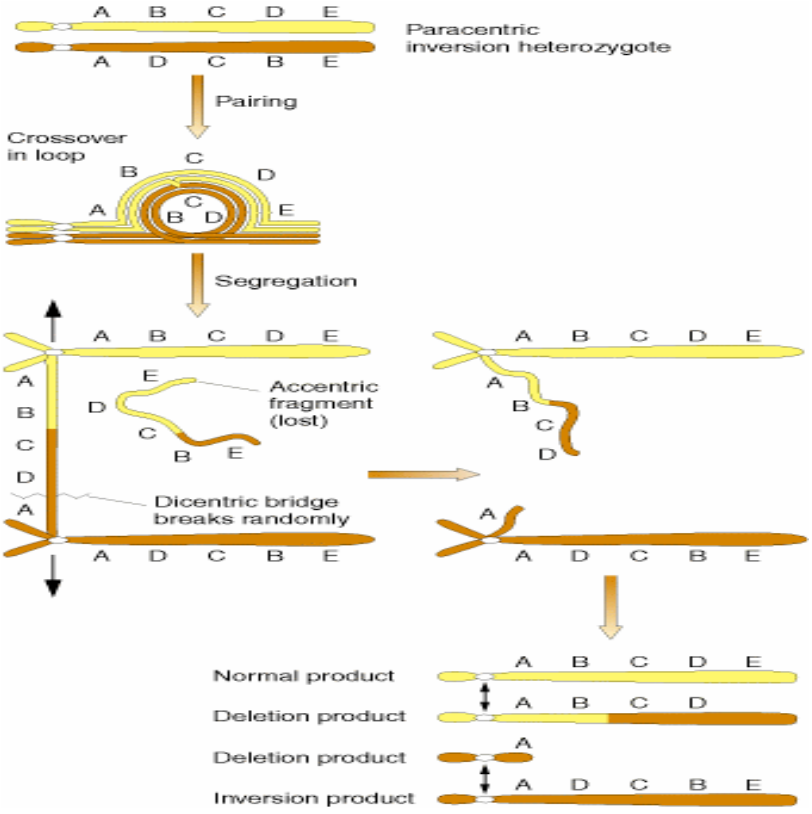
ที่มา : Hartwell และคณะ (2004)

3.5 Extended deletion คือการสูญหายของกลุ่มนิวคลีโอไทด์ในสาย DNA (รูปที่ 8) (Anonymous, 2003)



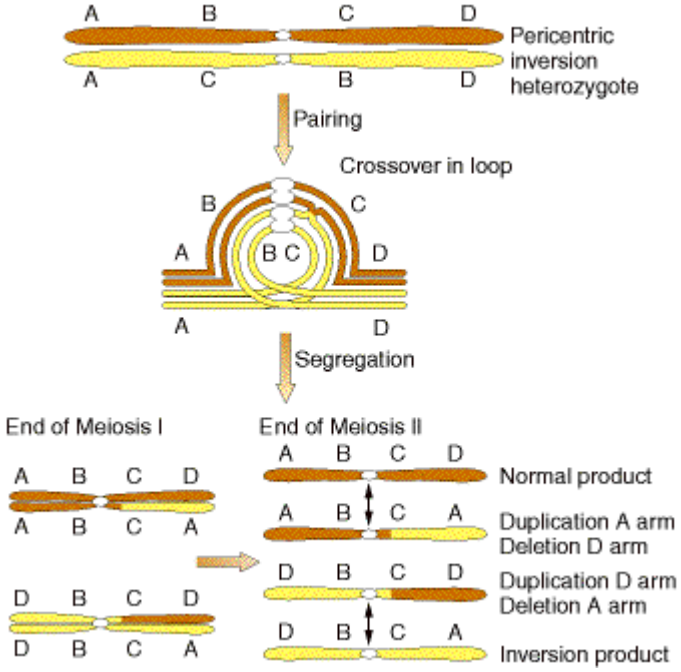
รูปที่ 8 การ extended deletion และการ translocation ที่เกิดระหว่างโครโมโซม
ที่มา : Anonymous (2003)

3.6 Inversion คือการเปลี่ยนแปลงลำดับของยีนบนโครโมโซม ที่เกิดจากการขาดบนโครโมโซม 2 จุด และเชื่อมต่อกันใหม่ แต่มีการเชื่อมต่อแบบผิดทิศทาง มี 2 แบบ คือ แบบที่รวมส่วนของเซ็นโทรเมียร์ (pericentric) และแบบที่ไม่รวมส่วนของเซ็นโทรเมียร์ (paracentric) (รูปที่ 9 และ 10) (Anonymous, 2003; Hartwell *et al*., 2004; Klug and Cummings, 2005; Strickberger, 1985)



รูปที่ 9 การเกิด inversion แบบ paracentric

ที่มา : Anonymous (2007)



รูปที่ 10 การเกิด inversion แบบ pericentric

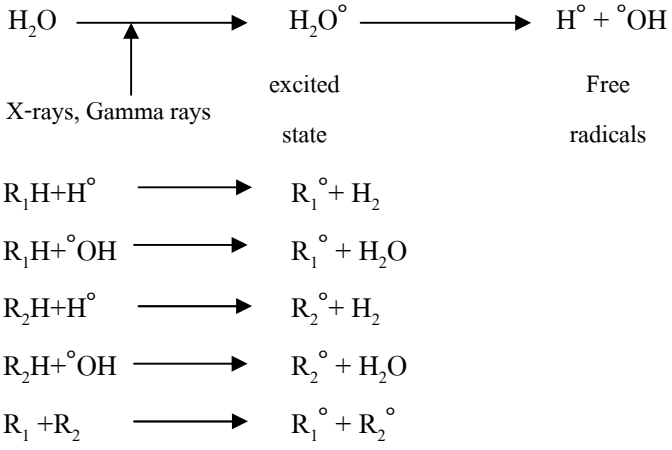
ที่มา : Anonymous (2007)

4. ผลของรังสีต่อการเปลี่ยนของโมเลกุล DNA

รังสีแต่ละชนิดทำให้การเปลี่ยนแปลงของโมเลกุล DNA แตกต่างกันตามประเภทของรังสี (สิรนุช, 2540; Anonymous, 2003; Hartwell *et al*., 2004; Klug and Cummings, 2005; Strickberger, 1985) ดังนี้

1. รังสีเอกซ์ (X-rays) เป็นรังสีประเภทคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ที่เกิดจากอิเล็กตรอนวิ่งด้วยความเร็วสูงจากขั้วลบไปชนเป้าโลหะที่เป็นขั้วบวก พลังงานจลน์ของอิเล็กตรอนจะเปลี่ยนเป็นรังสีเอ็กซ์ Stadler (1928) แสดงให้เห็นว่ารังสีเอกซ์ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในข้าวโพดและข้าวบาร์เลย์ โดยที่รังสีเอกซ์จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในอนุภาคและโมเลกุลของเซลล์

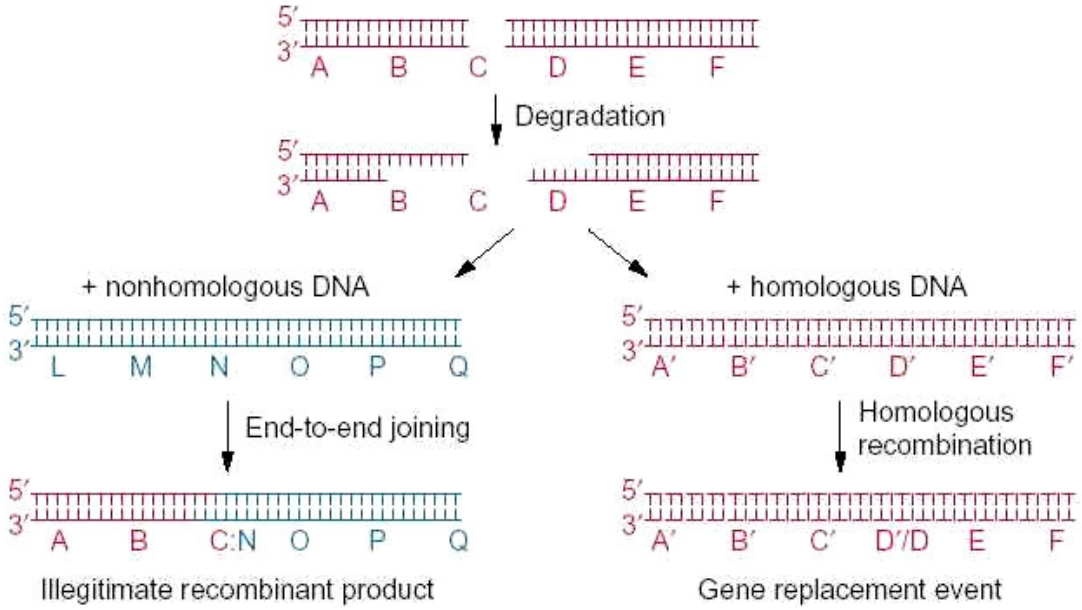
2. รังสีแกมมา (gamma rays) เป็นรังสีคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ทำให้เกิดไอออไนเซชันได้ รังสีแกมมาจากการสลายตัวของนิวเคลียสของเรดิโอนิวไคลด์ (radionuclide) ที่ไม่เสถียร พยายามปรับตัวให้เข้าสู่สภาพเสถียร โดยปลดปล่อยพลังงานส่วนเกินออกมาในรูปรังสีแอลฟา หรือรังสีบีตา และตามด้วยการสลายตัวให้รังสีแกมมา โดยเรดิโอนิวไคลด์ที่นิยมใช้คือ โคบอลท์ – 60 ซีเซียม – 137 การใช้รังสีแกมมาสามารถใช้ได้ 2 แบบ คือการฉายรังสีแบบเฉียบพลัน (acute irradiation) เป็นการให้รังสีในปริมาณสูงใช้ระยะเวลาสั้น และการฉายรังสีแบบเรื้อรัง (chronic irradiation) เป็นการใช้รังสีในปริมาณน้อยๆ แต่ให้เป็นระยะเวลานาน การทำปฏิกิริยาของรังสีแกมมาต่อ DNA จะเหมือนกับรังสีเอกซ์ ดังสมการ



จากสมการรังสีเอกซ์ และรังสีแกมมาจะกระตุ้นโมเลกุลของน้ำ ให้แตกตัวเป็นอนุมูลอิสระ (free radical) และเข้าทำปฏิกิริยาอย่างอิสระกับ organic molecule (R_1, R_2) ที่อยู่ที่ตำแหน่ง (locus) เดียวกัน ทำให้มีการหลุดออกของ H^+ และ OH^- ตามลำดับ และได้ organic

molecule ที่ผิดปกติ (R_1°, R_2°) ถ้าในเซลล์ที่ได้รับรังสีมีปริมาณน้ำมากเกินไปจะเกิด H_2O_2 ที่เป็นพิษต่อเซลล์

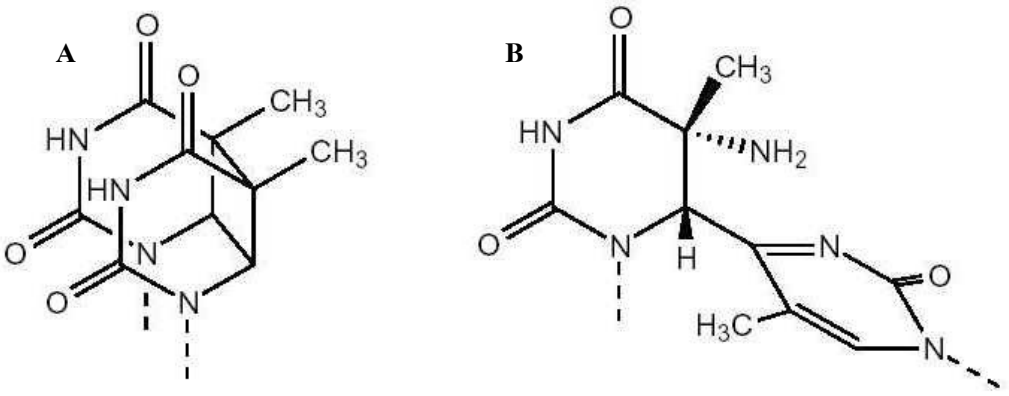
3. อนุภาคนิวตรอน (Neutron) เป็นอนุภาค นิวตรอนได้จากปฏิกรณ์นิวเคลียร์ เช่น การแตกตัวของยูเรเนียม – 235 หรือจากเครื่องนิวตรอนเจเนเรเตอร์ รังสีนิวตรอนมีความรุนแรงกว่ารังสีแกมมา และรังสีเอกซ์ประมาณ 10 เท่า และมีการใช้งานค่อนข้างยุ่งยาก ทำให้ได้รับความนิยมน้อยกว่ารังสีเอกซ์ และแกมมา แต่รังสีนิวตรอนมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวนโครโมโซม ความผิดปกติของการเรียงตัวของ DNA และการหักของโครโมโซมโดยอนุภาคนิวตรอน จะทำปฏิกิริยาต่อพันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสทำให้เกิดการหักที่หมู่ฟอสเฟต และการ crosslinks ระหว่างโพลีนิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 การหักของสาย DNA เนื่องจากนิวตรอน และการเข้ารวมตัวของส่วนที่หักกับสาย DNA สายใหม่

ที่มา : Britt (1999)

4. รังสีอัลตราไวโอเลต (ultraviolet rays) เป็นรังสีที่มีอยู่ในธรรมชาติ (มีความยาวคลื่น 250-290 nm) รังสีอัลตราไวโอเลต มีผลต่อเบสกลุ่ม pyrimidine และการ crosslinks ระหว่าง DNA –protein และ DNA-DNA (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 ผลของรังสี UV ต่อเบสกลุ่ม pyrimidine ที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็น cyclobutane pyrimidine dimer (T – T) (A) และ pyrimidine pyrimidinone dimer (T – C) (B)

ที่มา : Britt (1999)

5. การชักนำการกลายพันธุ์โดยรังสี

ในการฉายรังสีให้พืชสามารถทำได้ทุกส่วนขยายพันธุ์ เช่น เมล็ดพันธุ์ หัว ราก ไหล กิ่ง กิ่งตอน กิ่งปักชำ พืชทั้งต้น หรือเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง ซึ่งการนำส่วนใดมาใช้จะขึ้นกับชนิดของพืช วิธีการขยายพันธุ์และความสะดวกในการฉายรังสี ในปัจจุบันมีพืชหลายชนิดที่ประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี เช่น ข้าวพันธุ์ กข 15 ได้จากการฉายรังสีแกมมา 15 Krad ให้ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (กรมวิชาการเกษตร, 2543) ข้าวพันธุ์ กข 6 ซึ่งเป็นข้าวเหนียว ได้จากการฉายรังสีแกมมา 20 Krad ให้กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 (ผลิใบ, 2545) กลุ่มไม้ดอกได้แก่ เบญจมาศ (สิรนุช, 2545) แพรเซี่ยงไฮ้ (Wongpiyasatid and Hormchan, 2000) นอกจากนี้ยังมีในพืชชนิดอื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 สำหรับพืชตระกูลถั่วมีการใช้รังสีแกมมาในการปรับปรุงพันธุ์อย่างกว้างขวาง เช่น การฉายรังสีแกมมาปริมาณ 150 Gy (15 Krad) ให้กับถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 ทำให้ได้พันธุ์ดอยคำ ที่มีลักษณะต้านทานโรคราสนิม และการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 10 Krad ให้กับพันธุ์เชียงใหม่ 60 ทำให้ได้สายพันธุ์ CM60-10kr-71 ที่มีลักษณะต้านทานโรคราสนิมและให้ผลผลิตสูงกว่าเดิม (สมศักดิ์ และมณฑา, 2544) เป็นต้น

ตารางที่ 1 ตัวอย่างพืชที่ประสบความสำเร็จจากการใช้รังสีในการปรับปรุงพันธุ์ในลักษณะต่าง ๆ

Plant	**Mutagen**	**Character (s) improved**	**Yield increase above parent (%)[a]**
Barley	X-rays	number of spike / plant, length of spike, length of culm	29.9
	X-rays	plant weight, grain weight / plant, number of spike / plant, 1000 grain weight	23.9
	Gamma rays	number of kernels / plant	3.4
	X-rays	grain weight / plant	11.0
	X- rays	grain weight and grain number / plant, tillering, culm length, fresh and dry plant weight	13.5
Maize	Gamma rays, Fast neutrons	yield	46.8
	Gamma rays	leaf area, net assimilation rate, grain yield	35.5
Pea	X-rays	seed number / plant	300
	X-rays	seed protein	26.4
	X-rays	seed number / plant, plant height	200
Pearl millet	Gamma rays	seed yield	34.7
Rice	Gamma rays	yield / plant, 100 grain weight, number of productive tillers	97.6
	Gamma rays	grain weight / plant	8.1
	Gamma rays	grain weight / plant,1000 kernel weight	29.1
	In vitro mutagenesis		
Sesame	Gamma rays	seed yield	75.8
	Gamma rays	seed yield, branches/ plant, capsules/plant, 1000 seeds weight, plant height	31.0
Sweet clover	X-rays, Gamma rays, Thermal neutrons	plant weight, main shoot length, number of nodes / shoot, length of side brunches	155.9 and 138.9
Wheat	Gamma rays	plant height, grain number and weight / spike and plant	29.1
	Gamma rays	grain weight / plant, harvest index	71.3

[a] Maximal yield increase described in grain weight/plant

ที่มา : Maluszynski และคณะ (2001)

เมื่อเซลล์ได้รับรังสีต่าง ๆ เช่น รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา หรืออนุภาคนิวตรอน รังสีจะถ่ายทอดพลังงานให้กับโมเลกุลต่าง ๆ ของเซลล์ โมเลกุลที่ได้รับพลังงานจะแตกตัวให้ไอออน และอนุมูลอิสระ ทำให้มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลใหม่ (สิรนุช, 2540) การฉายรังสีแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ การฉายรังสีในอัตราสูงและใช้เวลาสั้น นิยมใช้กับเมล็ดพืช อีกวิธีคือการฉายรังสีแบบเรื้อรัง เหมาะกับการใช้กับชิ้นส่วนของพืชหรือพืชทั้งต้น (IAEA, 1977)

อัตราความเข้มข้นของรังสีที่ใช้กับพืช แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน เนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีความไวต่อรังสี (radiosensitivity) แตกต่างกัน (ธีระ, 2525 ; สิรนุช, 2540) ในการฉายรังสีให้กับพืชจะยึดจากระดับรังสีที่เรียกว่า LD_{50} (50% Lethal Dose หรือ Lethal Dose-50 หรือ Semi Lethal Dose) ของพืชที่นำมาฉายรังสี (IAEA, 1977) ในการศึกษา LD_{50} จะมีการนำเมล็ดมาฉายรังสีในปริมาณต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ปริมาณต่ำ จนถึงระดับสูงที่ทำให้เกิดการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ในรังสีแต่ละระดับใช้เมล็ดจำนวน 100-300 เมล็ด แล้วนำมาเพาะในกระบะดิน หลังจากเมล็ดงอกแล้ว บันทึกความงอกและความสูงของพืชทำประมาณ 4 สัปดาห์ (สิรนุช, 2540; FAO/IAEA, 1979)

ค่า LD_{50} ในแต่ละพืชเป็นตัวกำหนดปริมาณรังสีที่ใช้ในการชักนำให้พืชกลายพันธุ์ ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช เช่น เมล็ดถั่วเขียวพันธุ์อู่ทอง 1 มีค่า LD_{50} ของปริมาณรังสีแกมมาที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 69.34 – 72.00 Krad (ธีระ, 2525) พืชตระกูลถั่วที่มีการศึกษาปริมาณรังสีที่เหมาะสมดังแสดงในตารางที่ 2 (สิรนุช, 2540) และจากการศึกษาปริมาณ LD_{50} ของรังสีแกมมา ในเมล็ดถั่วฝักยาวพันธุ์คัด – มอ. พบว่า ค่า LD_{50} ที่ 21 วัน อยู่ในช่วงปริมาณ 38 – 42 Krad (สุรเชษฐ และคณะ, 2548)

ตารางที่ 2 ปริมาณรังสีแกมมาที่เหมาะสมในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วบางชนิดโดยชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

ชนิดพืช	ปริมาณรังสี (Krad)
Arachis hypgaea	20 – 30
Cajanus cajan	8 – 4
Cicer arietinum	12 – 18
Glycine max	10 – 20
Lens esculenta	10 – 17
Lupinus albus	15 – 25
Medicago sativa	40 – 60
Melilotus albus	50 – 70
Phaseolus lunatus	5 – 10
Phaseolus vulgaris	8 – 15
Pisum sativum	10 – 18
Vigna unguiculata	15 – 25
Vigna radiata	40 – 70

ที่มา : สิรนุช (2540)

6. การตอบสนองต่อรังสีของพืชในชั่วที่ 1 และชั่วต่อ ๆ ไป

พืชที่ได้จากการปลูกเมล็ดที่ผ่านการฉายรังสีครั้งที่ 1 (M_1 Plant) จะมีการเสียหายทางสรีรวิทยา (physiological damage) เกิดขึ้น เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนหรือโครโมโซม การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของรังสีที่เพิ่มขึ้น จนถึงระดับหนึ่งที่ทำให้พืชตาย 100 % (ธีระ, 2525)

รังสีส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงต้นพืชในชั่วที่ 1 คือพืชได้รับอันตราย (plant injury) จากรังสีทำให้เกิดการตายของต้นพืช (lethality) การเป็นหมัน (sterility) และผลกระทบของรังสีต่อองค์ประกอบในเซลล์ (cytological effect) สำหรับอันตรายที่พืชได้รับเป็นลักษณะที่ตอบสนองต่อระดับของรังสี ได้แก่ ความสูงของต้นกล้า ความยาวของราก ความงอกของเมล็ด จำนวนช่อดอกต่อต้น จำนวนดอกต่อช่อดอก จำนวนเมล็ดต่อฝัก และจำนวนเมล็ดต่อต้น ซึ่งอันตรายที่เกิดขึ้นเนื่องจากรังสีขึ้นอยู่กับระดับของรังสีที่ใช้ ระยะเวลาที่ฉายรังสี และอุณหภูมิระหว่างที่ฉายรังสี (IAEA, 1977) ในถั่วเขียวเมื่อได้รับรังสี พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของความสูงของต้น จำนวนข้อต่อต้น จำนวนฝักต่อต้น ความเสียหายของใบคู่แรกและใบเลี้ยง ดอกเป็นหมัน และลักษณะเมล็ด

ลีบ (ธีระ, 2525) สิรนุช (2540) รายงานว่า เมล็ดพืชเมื่อนำมาฉายรังสีแกมมา เอ็มบริโอภายในเมล็ด ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญ อาจได้รับความเสียหาย มีผลทำให้ เมล็ดไม่งอก หรืองอกได้ระยะหนึ่งแล้วตาย ต้นที่เหลือรอดบางต้นมีลักษณะแคระแกร็น การเจริญเติบโตไม่ดี ใบบิดเบี้ยว เกิดใบด่าง หรือใบจุด เป็นต้น

Smutkupt (1973) ฉายรังสีแกมมาระดับ 5, 10, 15, 20 และ 30 Krad ให้กับเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 2 และสันทราย แล้วนำไปปลูกทดสอบในเรือนเพาะชำ และสภาพแปลงทดลอง โดยศึกษาถึงเปอร์เซ็นต์ความงอก ความสูงของต้นกล้าเมื่ออายุ 20 วันหลังปลูก และการเกิดจุดสีเหลืองบนใบจริงคู่แรก (first single leaf) ของต้นกล้าถั่วเหลืองในชั่วที่ 1 พบว่า เปอร์เซ็นต์ความงอกและความสูงของต้นกล้าในทุก ๆ ระดับของรังสี ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และปริมาณการเกิดจุดสีเหลืองในต้นชั่วที่ 1 ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณการเกิดลักษณะต้นกล้าสีเหลืองในชั่วที่ 2 จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าระดับรังสี 5 – 15 Krad และ 15 Krad เป็นระดับที่เหมาะสมที่สุดที่จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 2 และสันทราย ตามลำดับ

Constantin และ Love (1967) ศึกษาการตอบสนองต่อรังสีของถั่วเหลืองในชั่วที่ 1 โดยใช้รังสีแกมมา และนิวตรอนฉายให้กับถั่วเหลืองพันธุ์ Forrest (D – 68 – 127) พบว่าระดับของรังสีแกมมา และนิวตรอนที่ต่ำกว่า 70 Krad ไม่มีผลต่อการอยู่รอดของพืชที่ปลูกในเรือนเพาะชำ แต่ความอยู่รอดของต้นพืชจะลดน้อยลงเมื่อระดับของรังสีเพิ่มขึ้น ลักษณะที่มีผลกระทบจากรังสีได้แก่ ความสูงของต้นกล้า น้ำหนักแห้งของต้น ในสภาพแปลงทดลองพบว่า ความสามารถในการอยู่รอดของถั่วเหลือง ความสูงต้น และผลผลิต ลดต่ำลงจากในเรือนเพาะชำประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาถึงผลผลิตของเมล็ดในชั่วที่ 1 พบว่ารังสีระดับ 20 – 30 Krad และ 1.5 – 2.5 Krad เป็นระดับรังสีที่เหมาะสมของรังสีแกมมา และนิวตรอน ตามลำดับ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการเจริญและพัฒนาการของถั่วฝักยาวพันธุ์คัด – มอ.
2. เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในถั่วฝักยาวพันธุ์คัด – มอ. และคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ เช่น อายุการเก็บเกี่ยวที่สั้นกว่า ผลผลิตสูง และการต้านทานแมลง เป็นต้น
3. สร้างแหล่งความแปรปรวนทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาวเพื่อใช้ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์