การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเอ็มบริโอของบัวหลวงชมพูและบัวหลวงขาวและการตรวจสอบความไวของต้นกล้าต่อรังสีแกมมา

Embryo of Pink Lotus and White Lotus (*Nelumbo Nucifera* Gaertn.) tissue culture and determination of seedling sensitivity to gamma rays

อติกานต์ แย้มปู่[1], มนัสวี เดชกล้า[1], นฤมล บุญมั่น[1], ธราธร ทีรฆฐิติ[2], ศิริรัตน์ พักปากน้ำ[1*]
Atikan Yampul[1], Manussawee Dechkla[1], Narumon Boonman[1],
Tharathon Teerakathiti[2], Sirirat Phakpaknam[1*]

Received: 25 July 2019 ; Revised: 20 January 2020 ; Accepted: 18 February 2020

บทคัดย่อ

บัวหลวงเป็นพรรณไม้น้ำที่มีสีสันสวยงาม มีมูลค่าทางเศรษฐกิจและหากกลายพันธุ์จนได้พันธุ์ใหม่จะส่งผลให้มีราคาสูง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวงชมพูและบัวหลวงขาว มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา 1) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเอ็มบริโอของบัวหลวงชมพูและบัวหลวงขาวเพื่อการขยายพันธุ์ และ 2) ตรวจสอบความไวต่อรังสีแกมมาของต้นอ่อนบัวหลวงชมพูและบัวหลวงขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำเมล็ดบัวหลวงทั้ง 2 ชนิด มาทำให้ปลอดเชื้อด้วยวิธีการเผา แล้วทำการแยกเฉดสีของเอ็มบริโอโดยเทียบกับแม่แบบเฉดสีมาตราฐาน RAL ได้เป็น 4 กลุ่ม คือ Fern green, Yellow green, May green และ Leaf green หลังจากเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ทำการวัดการเจริญเติบโตของต้นอ่อน พบว่าความยาวก้านใบกับจำนวนรากของต้นอ่อนบัวหลวงชมพูและบัวหลวงขาวที่ได้จากเอ็มบริโอเฉดสีต่าง ๆ วัดการเจริญเติบโตของต้นอ่อนจากความยาวก้านใบได้ค่าอยู่ระหว่าง 15.48-16.45 เซนติเมตร จำนวนรากเฉลี่ยระหว่าง 8.25-8.67 ราก/ต้น และต้นอ่อนมีจำนวนยอด 1 ยอด/ต้น ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากเททับด้วยอาหารเหลวสูตร BA ที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 8 สัปดาห์ นำต้นอ่อนของบัวหลวงทั้ง 2 ชนิดไปฉายรังสีแกมมาที่ 0, 20, 30 และ 40 เกรย์ แล้วเพาะเลี้ยงต่อในอาหาร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำข้อมูลการรอดชีวิตของต้นอ่อนมาวิเคราะห์ด้วยวิธี probit พบค่า LD_{50} ของบัวหลวงชมพูและบัวหลวงขาวมีค่าเท่ากับ 36.99 เกรย์ และ 35.34 เกรย์ ตามลำดับ

คำสำคัญ: บัวหลวงชมพู บัวหลวงขาว เอ็มบริโอ รังสีแกมมา และ LD_{50}

Abstract

Nelumbo Nucifera Gaertn. is a colorful water plant which has economic value and if mutates into a new species it's price will increase . This research aims to 1) culture tissues from embryos of Pink Lotus and White Lotus and 2) determine the sensitivity of their seedlings from tissue culture to gamma rays. Seeds of both Lotus varieties were sterilized with the sintering method. Then, their embryos were separated based on the standard color template RAL into 4 shades including Fern green, Yellow green, May green, and Leaf green. After culturing the embryos on MS agar for 8 weeks, the growth of seedlings was measured. The results showed no statistical significance of the petiole length and root number of the seedlings obtained from each shade of embryos. All seedlings had only 1 shoot/plant, therefore 3 mg/L BA broth was added onto MS agar. After further culturing for 8 weeks, the shoot numbers were increased in all plants. Then, the seedlings of both Lotus varieties were treated with different dosages of gamma rays at 0, 20, 30,

[1] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา แขวงวชิระ เขตดุสิต กรุงเทพฯ 10300
[2] ห้องปฏิบัติการอณูพันธุศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพพืช บ้านวิทยาศาสตร์สิรินธร สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120
[1] Faculty of Science and Technology, Suan Sunandha Rajabhat University, Vajira, Dusit, Bangkok, 10300, Thailand
[2] Laboratory Molecular Genetics and Plant Biotechnology, Siridhorn Science Home, National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani, 12120, Thailand
* Corresponding author: Phakpaknam S. Tel.:+66815533069 e-mail: sirirat.ph@ssru.ac.th

and 40 Gy. The treated seedlings were cultured on MS agar for 4 weeks and their survival rate was determined. The probit curve analysis revealed that the LD_{50} of Pink Lotus and White Lotus were 36.99 and 35.34 Gy, respectively.

Keywords: Pink Lotus, White Lotus, embryo, gamma rays and LD_{50}

บทนำ

ในประเทศไทยนิยมปลูกบัวหลวงเพื่อตัดดอก และเก็บฝักสด โดยเฉลี่ยหนึ่งกำมี 6-10 ฝัก ราคากำละ 10-20 บาท บัวหลวงจัดได้ว่าเป็นพืชไม้น้ำเศรษฐกิจของประเทศไทย เนื่องจากสามารถนำทุกส่วนของบัวหลวงมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น ไหลและเหง้าใช้ประกอบอาหารได้ทั้งคาวหวาน ใบอ่อน ใบแก่และดอกบำรุงโลหิต เกสรใช้ชงเป็นชามีสรรพคุณบำรุงหัวใจ เมล็ดแก้ร้อนใน [1]

ปัจจุบันกลุ่มคนที่ชื่นชอบการปลูกบัวทั่วโลกให้ความสนใจกับบัวสายพันธุ์ใหม่ แต่ปัญหาที่พบในวงการบัว คือ แม้จะมีผู้คิดค้นผลิตบัวพันธุ์ใหม่อยู่ตลอดก็ตามแต่ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด [2] โดยสังเกตได้จากราคาการขายดอกบัวประดับ หากพบสีสันที่แปลกตาหรือพันธุ์ใหม่ จะมีราคาสูงถึงต้นละ 300-2,000 บาท ในขณะที่บัวหลวงชมพูและบัวหลวงขาวสายพันธุ์ดั้งเดิม มีราคาประมาณ 80-200 บาท ซึ่งบัวพันธุ์แปลกใหม่ส่วนใหญ่ล้วนถูกนำเข้าจากต่างประเทศทั้งสิ้น [3] ดังนั้นจะเป็นการดีหากคนไทยสามารถผลิตบัวหลวงพันธุ์ใหม่ได้เอง ตลอดจนปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงพันธุ์ดั้งเดิมภายในประเทศให้มีมูลค่าเพิ่มขึ้น การทำให้เกิดบัวหลวงที่มีลักษณะแปลกใหม่ด้วยวิธีการผสมเกสรปรากฏว่าผสมติดยาก เมล็ดบัวลูกผสมส่วนใหญ่อ่อนแอและตายไปในที่สุด[6]

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนยอดอ่อน,ใบอ่อน พบมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ พืชมีการปนเปื้อนสูงเนื่องจากชิ้นส่วนพืชที่มีการเจริญเติบโตใต้ในน้ำมีการปนเปื้อนสูงกว่าพรรณไม้น้ำที่มีการเจริญเติบโตเหนือน้ำ [4] และเนื้อเยื่อไม่สามารถทนต่อความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อในระดับความเข้มข้นสูงได้ [5] การฉายรังสีแกมมาเพื่อก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ เป็นการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ได้พันธุ์ใหม่ๆ ซึ่งถูกนำมาใช้ทดแทนการผสมเกสร เนื่องจากใช้เวลาสั้นกว่า ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาการเพิ่มจำนวนบัวหลวงชมพูและบัวหลวงขาว โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเอ็มบริโอ และการนำต้นอ่อนที่ได้มาฉายรังสีแกมมา ซึ่งเป็นกระบวนการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อเป็นแนวทางในการขยายพันธุ์บัวหลวง และหาปริมาณรังสีแกมมาที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาบัวหลวงให้เกิดพันธุ์ใหม่ ซึ่งเป็นการเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรที่ปลูกบัวหลวงต่อไปในอนาคต

วิธีการศึกษา

1. การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการทดลองคือเมล็ดบัวหลวง ชื่อวิทยาศาสตร์ (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) โดยแบ่งเป็นบัวหลวงชมพู (Pink Lotus) หรือบัวปทุม และบัวหลวงขาว (White Lotus) หรือบัวปุณฑริก จัดอยู่ในวงศ์ Nelumbonaceae โดยเมล็ดบัวทั้งสองพันธุ์ได้จากฝักบัวที่มีอายุ 4 สัปดาห์ ซึ่งฝักบัวหลวงชมพูมาจากสวนคุณมังกร ปานสมรักษ์ และฝักบัวหลวงขาวมาจากสวนคุณสมศรี เกร็ดทอง เกษตรกรที่ปลูกบัวหลวงในจังหวัดนครปฐม

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเอ็มบริโอบัวหลวงชมพู และบัวหลวงขาว

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้ในงานวิจัยนี้ดัดแปลงจากงานวิจัยของวิชัย [6] โดยนำฝักบัวทั้งสองพันธุ์มาแกะเมล็ดออก ปอกเปลือกเมล็ด แล้วใส่ลงขวดเปล่าที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วย 70% ethyl alcohol เป็นเวลา 1 นาที แล้วเททิ้ง เช็ดทำความสะอาดขวดภายนอกด้วย 70% ethyl alcohol ก่อนนำเข้าตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ และทำให้ปลอดเชื้ออีกครั้งโดยนำเมล็ดบัวหลวงจุ่ม 95% ethyl alcohol แล้วลนไฟตะเกียง พักเมล็ดบัวบนตะแกรงเหล็ก ทำซ้ำ 2 ครั้ง ใช้มีดตัดตกแต่งชิ้นเนื้อเยื่อ โดยไม่ให้โดนเอ็มบริโอข้างในเสียหาย จากนั้นแยกเฉดสีเอ็มบริโอโดยเทียบกับแม่แบบเฉดสีมาตรฐาน RAL (German Reichs-Ausschuβ far Lieferbedingungen and Gatesicherung) (Figure 1) นำเอ็มบริโอแต่ละเฉดสีเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ระยะเวลา 16 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส โดยเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกผลการเจริญเติบโตของต้นอ่อนบัวหลวงจากความยาวก้านใบ จำนวนราก และจำนวนยอด จากนั้นเททับด้วยอาหารเหลว BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตรขวดละ 5 มิลลิลิตร แล้วเพาะเลี้ยงต่ออีกเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกผลจำนวนยอด

3. การตรวจสอบความไวต่อรังสีแกมมาของต้นอ่อนบัวหลวงชมพู และบัวหลวงขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำต้นอ่อนบัวหลวงทั้งสองพันธุ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารแข็ง MS ที่เททับด้วยอาหารเหลว BA เข้าตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ คัดเลือกต้นอ่อนที่สมบูรณ์ ทำการตัดแต่งเอาก้านใบและรากออก ให้เหลือเฉพาะลำต้นและยอด แล้วใส่

ลงในขวดเปล่าขนาด 8 ออนซ์ นำเข้าเครื่องฉายรังสีแกมมา โดยใช้ปริมาณรังสีที่ 0, 20, 30 และ 40 เกรย์ ในระยะเวลาการฉายรังสีแตกต่างกัน คือ 0, 27, 41 และ 55 วินาที ตามลำดับ จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชหลังฉายรังสีแกมมาแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS และพรางแสง 50% ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ที่เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นจึงหยุดการพรางแสง โดยให้รับความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ เพาะเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกผลอัตราการรอดชีวิต และอัตราการตายของต้นอ่อน

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 23.0 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังนี้

- เปรียบเทียบผลของเฉดสีเอ็มบริโอต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อน ทำการทดลองละ 5 ซ้ำ โดยนำข้อมูลความยาวก้านใบ จำนวนราก และจำนวนยอดมาวิเคราะห์ด้วยวิธี One-way ANOVA (CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยทีละคู่โดยวิธีของเชฟเฟ (Scheffe)

- ทดสอบหาปริมาณอัตราการฉายรังสีแกมมาที่เหมาะสม ทำการทดลองละ 5 ซ้ำ โดยคำนวณหาค่า LD_{50} (ปริมาณรังสีแกมมาที่ทำให้พืชตาย 50%) จากความสัมพันธ์ของปริมาณรังสีกับอัตราการตายของต้นอ่อนบัวหลวง ด้วยวิธี probit

Figure 1 The standard color template RAL (German Reichs-Ausschuβ far Lieferbedingungen and Gatesicherung)
Source: https://psscolorguide.com

ผลการศึกษา

1. ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเอ็มบริโอของบัวหลวงชมพูและบัวหลวงขาว

เมื่อนำเอ็มบริโอของบัวหลวงชมพูและบัวหลวงขาวทั้ง 4 เฉดสี มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทำการวัดการเจริญเติบโตของต้นอ่อนจากความยาวก้านใบ จำนวนราก และจำนวนยอด พบความยาวก้านใบของบัวหลวงชมพู มีค่าระหว่าง 15.28-16.18 เซนติเมตร จำนวนรากอยู่ระหว่าง 7.35-7.94 ราก/ต้น และทุกต้นมีจำนวนยอดเพียง 1 ยอดเท่านั้น ซึ่ง พบว่าต้นอ่อนที่ได้จากการใช้เอ็มบริโอบัวหลวงชมพูทั้ง 4 เฉดสี มีค่าเฉลี่ยความยาวก้านใบ จำนวนราก และจำนวนยอด ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1 และ Figure 2A-2D) ส่วนบัวหลวงขาว วัดการเจริญเติบโตของต้นอ่อนจากความยาวก้านใบได้ค่าอยู่ระหว่าง 15.48-16.45 เซนติเมตร จำนวนรากเฉลี่ยระหว่าง 8.25-8.67 ราก/ต้น และทุกต้นมีจำนวนยอดเพียง 1 ยอด เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย พบว่าเฉดสีของเอ็มบริโอบัวหลวงขาวที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่มีผลต่อความยาวก้านใบ จำนวนรากและจำนวนยอดของต้นอ่อนบัวหลวงขาวเช่นเดียวกับบัวหลวงชมพู (Table 1 และ Figure 2E-2H) เนื่องจากต้นอ่อนของทั้งบัวหลวงชมพูและบัวหลวงขาวมีจำนวนยอดเพียง 1 ยอด/ต้น ซึ่งมีปริมาณน้อย ไม่เพียงพอสำหรับการนำไปฉายรังสีแกมมา จึงทำการเททับด้วยอาหารเหลวสูตร BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นนับจำนวนยอดของต้นอ่อนบัวหลวงทั้งสองชนิด พบว่าต้นอ่อนของบัวหลวงชมพูมีจำนวนยอดเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 3.88-4.46 ยอด/ต้น พบว่าการใช้เอ็มบริโอของบัวหลวงชมพูทั้ง 4 เฉดสีให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 2 และ Figure 3A-3D) ส่วนบัวหลวงขาวพบจำนวนยอดเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 2.22-2.85 ยอด/ต้น เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่าง พบว่าการใช้เอ็มบริโอของบัวหลวงขาวทั้ง 4 เฉดสีในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่มีผลต่อจำนวนยอดของต้นอ่อนบัวหลวงขาวเช่นเดียวกับบัวหลวงชมพู (Table 2 และ Figure 3E-3H)

2. ผลการศึกษาความไวต่อรังสีแกมมาของต้นอ่อนบัวหลวงชมพูและบัวหลวงขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำต้นอ่อนของบัวหลวงชมพูและบัวหลวงขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาฉายรังสีแกมมาโดยใช้ปริมาณรังสีที่ 0, 20, 30 และ 40 เกรย์ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นวัดอัตราการรอดชีวิตและอัตราการตายของบัวหลวงทั้งสองชนิด (Table 3) แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาค่า LD_{50} ด้วยวิธี probit พบว่า เมื่อใช้ปริมาณรังสีแกมมาเพิ่มสูงขึ้น บัวหลวงทั้งสองชนิดมีอัตราการรอดชีวิตลดลง โดยค่า LD_{50} ของบัวหลวงชมพูมีค่าเท่ากับ 36.99 เกรย์ (Figure 4) และค่า LD_{50} ของบัวหลวงขาวมีค่าเท่ากับ 35.34 เกรย์ (Figure 5) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าบัวหลวงชมพูและบัวหลวงขาวมีความไวต่อรังสีแกมมาในระดับใกล้เคียงกัน

Table 1 Petiole length, root number, and shoot number of Pink Lotus and White Lotus seedlings obtained from tissue culture of 4 embryo shades on MS agar for 8 weeks.

	Pink Lotus			Write Lotus		
embryo shades	**petiole length**	**No. of root/plant**	**No. of shoot/plant**	**petiole length**	**No. of root/plant**	**No. of shoot/plant**
Fern green	15.28 ±1.77[a]	7.71 ± 3.12[a]	1.00 ± 0.00[a]	15.47 ± 1.83[a]	8.60 ± 1.19[a]	1.00 ± 0.00[a]
Yellow green	15.97 ± 2.00[a]	7.43 ± 2.63[a]	1.00 ± 0.00[a]	16.35 ± 0.70[a]	8.42 ± 1.92[a]	1.00 ± 0.00[a]
May green	16.18 ± 2.15[a]	7.94 ± 3.43[a]	1.00 ± 0.00[a]	16.45 ± 0.68[a]	8.67 ± 2.02[a]	1.00 ± 0.00[a]
Leaf green	15.58 ± 1.66[a]	7.35 ± 3.14[a]	1.00 ± 0.00[a]	15.95 ± 0.50[a]	8.25 ± 1.83[a]	1.00 ± 0.00[a]
Total	**15.73 ± 1.93[a]**	**7.60 ± 3.07[a]**	**1.00 ± 0.00[a]**	**16.02 ± 1.17[a]**	**8.71 ± 1.81[a]**	**1.00 ± 0.00[a]**

* Data was analyzed by using one-way ANOVA and determined the differences among means withScheffe's test.
* values are mean± SD (n=5) same letters within a coluum indicate 0.05 level.

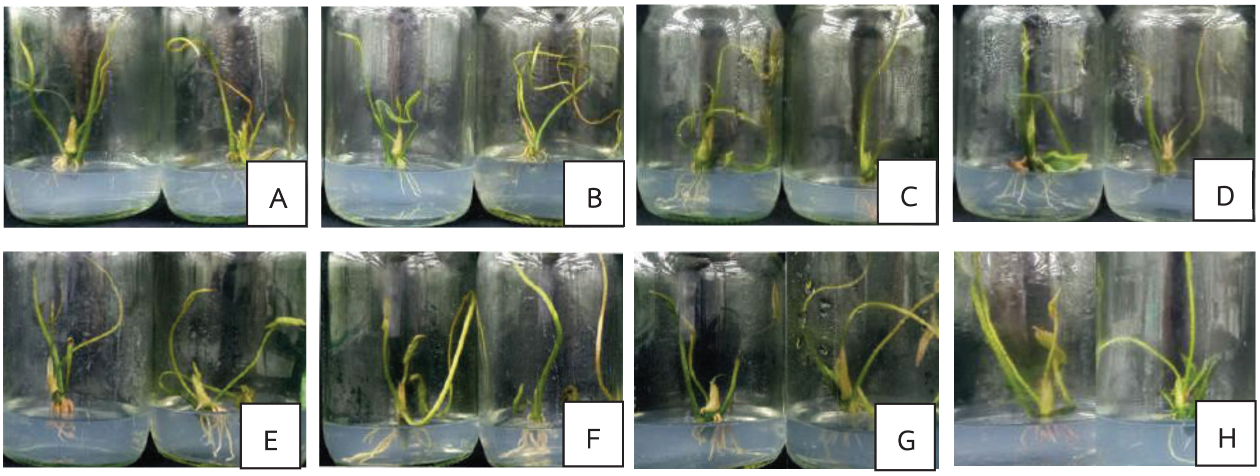

Figure 2 Seedlings of Pink Lotus (A, B, C, D) and White Lotus (E, F, G, H) obtained from 4 embryo shades, including Fern green (A,E), Yellow green (B, F), May green (C, G) and Leaf green (D, H) cultures on MS agar for 8 weeks.

Table 2 Shoot number of Pink Lotus and White Lotus seedlings obtained from tissue culture of 4 embryo shades on MS agar and 3 mg/L BA broth for further 8 weeks.

	Pink Lotus		Write Lotus	
embryo shades	**No. of seedlings**	**No. of shoot/plant**	**No. of seedlings**	**No. of shoot/plant**
Fern green	24	4.46 ± 1.74[a]	13	2.85 ± 1.63[a]
Yellow green	25	3.88 ± 1.99[a]	9	2.22 ± 1.48[a]
May green	28	4.21. ± 1.73[a]	12	2.75 ± 1.42[a]
Leaf green	23	4.09 ± 1.38[a]	9	2.67 ± 1.80[a]
Total	**100**	**4.16 ± 1.72[a]**	**43**	**2.65. ± 1.54[a]**

* Data was analyzed by using one-way ANOVA and determined the differences among means withScheffe's test.
* values are mean± SD (n=5) same letters within a coluum indicate 0.05 level.

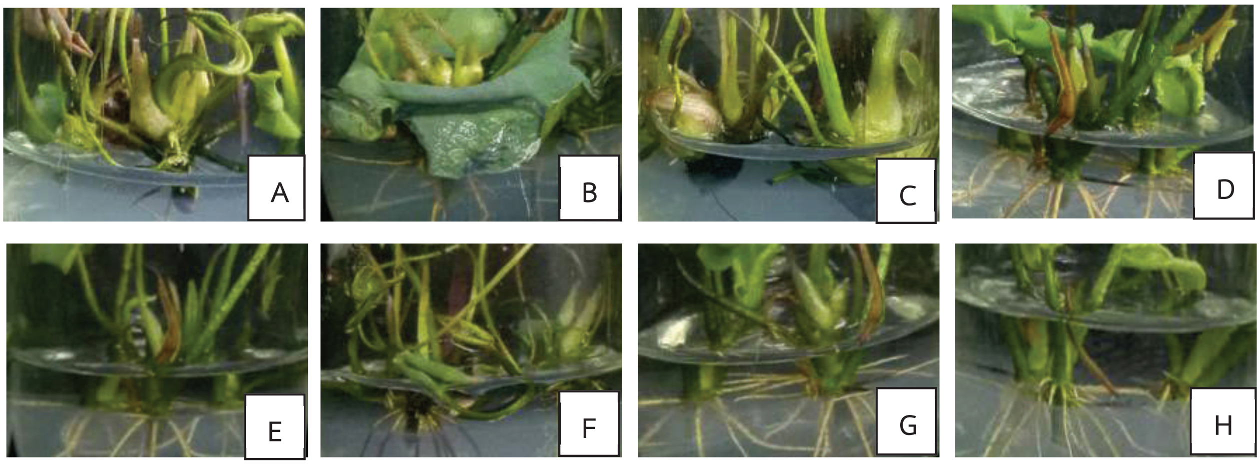

Figure 3 Increasing shoots of Pink Lotus (A, B, C, D) and White Lotus (E, F, G, H) seedlings obtained from 4 embryo shades, including Fern green (A,E), Yellow green (B, F), May green (C, G) and Leaf green (D, H) cultures on MS agar and 3 mg/L BA broth for further 8 weeks.

Table 3 Gamma ray dosages, irradiation period, total treated seedlings, survival and dead seedling numbers after gamma ray treatment of Pink Lotus and White Lotus.

Rediation dose (Gy)	Time (second)	Pink Lotus			White Lotus		
		Total	No. Of Survival	No. Of Dead	Total	No. Of Survival	No. Of Dead
0	0	20	20	0	3	3	0
20	27	40	40	0	20	20	0
30	41	20	17	3	10	6	4
40	55	20	7	13	10	4	6

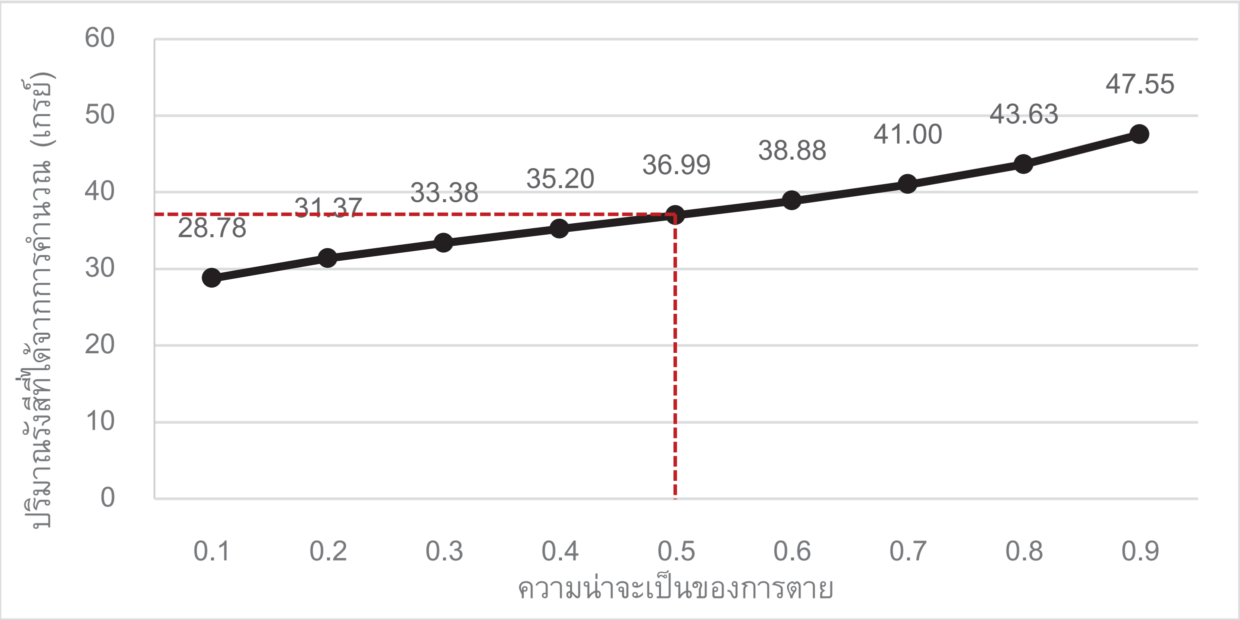

Figure 4 The probit curve analysis of Pink Lotus.

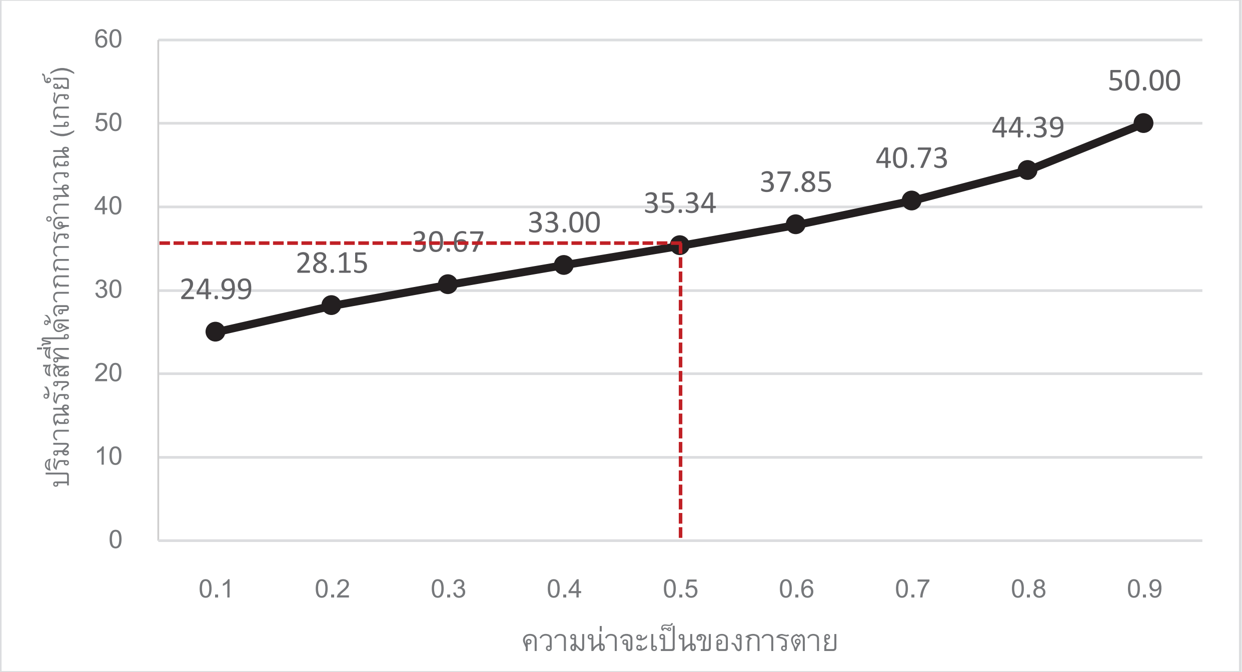

Figure 5 The probit curve analysis of White Lotus.

วิจารณ์และสรุปผล

งานวิจัยนี้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเอ็มบริโอของบัวหลวงชมพูและบัวหลวงขาว โดยแยกเฉดสีของเอ็มบริโอได้ 4 กลุ่ม คือ Fern green, Yellow green, May green และ Leaf green แล้วเพาะเลี้ยงลงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าเฉดสีของเอ็มบริโอไม่มีผลต่อความยาวก้านใบ จำนวนราก และจำนวนยอดของต้นอ่อนบัวหลวงทั้งสองพันธุ์ โดยปกติเอ็มบริโอจะมีคลอโรฟิลล์ในใบเลี้ยง เอพิคอทิล และไฮโพคอทิลเพื่อใช้สำหรับการสังเคราะห์ด้วยแสงในการเจริญเติบโตของต้นอ่อน ซึ่งสุภาณีและสายัณฑ์[7] ได้ใช้เครื่องมือ SPAD-502 เพื่อประเมินปริมาณคลอโรฟิลล์รวมและไนโตรเจนในใบลองกองและเงาะ พบว่าใบที่มีสีเขียวเข้มจะมีปริมาณคลอโรฟิลล์และปริมาณไนโตรเจนมาก ซึ่งน่าจะสังเคราะห์ด้วยแสงได้มากกว่าใบที่มีสีเขียวอ่อน แต่ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้พบว่าการเจริญเติบโตของต้นอ่อนบัวหลวงชมพูและบัวหลวงขาวที่ได้จากการใช้เอ็มบริโอทั้ง 4 เฉดสีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเป็นผลมาจากเฉดสีเอ็มบริโอทั้ง 4 กลุ่มค่อนข้างใกล้เคียงกัน จึงอาจมีปริมาณคลอโรฟิลล์ไม่แตกต่างกันมากพอที่จะเห็นผลต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนได้อย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับสุภาณีและสายัณฑ์ [7] ที่พบว่าใบเงาะมีความเข้มของสีไม่ต่างกันมาก จึงมีการกระจายตัวของปริมาณคลอโรฟิลล์และปริมาณไนโตรเจนน้อยกว่าใบลองกองที่มีความเข้มสีต่างกันชัดเจนกว่า

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเอ็มบริโอบัวหลวงชมพูและบัวหลวงขาวบนอาหาร MS เป็นเวลา 8 สัปดาห์ต้นอ่อนบัวหลวงทั้งสองชนิดเกิดยอด 1 ยอด/ต้น ทำให้ต้นอ่อนบัวหลวงมีลักษณะไม่แข็งแรง จึงทำการเททับด้วยอาหารเหลวสูตร BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อทำการเพิ่มยอด ปรากฏว่าต้นอ่อนบัวหลวงชมพูและบัวหลวงขาวทั้งหมดมีจำนวนยอดเพิ่มมากขึ้น สอดคล้องกับวิชัย[6] ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวงชมพูบนอาหารแข็ง MS ที่เททับด้วยอาหารเหลว BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสัปดาห์ที่ 8 พบจำนวนยอดเพิ่มมากขึ้นจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS อย่างเดียว เนื่องจาก BA จัดเป็นสารในกลุ่มไซโตไคนินซึ่งส่งเสริมการสังเคราะห์โปรตีน กระตุ้นการแบ่งเซลล์ และกระตุ้นการสร้างยอด เมื่อเพิ่มปริมาณ BA มากขึ้นก็ส่งผลให้ต้นอ่อนผลิตยอดเพิ่มขึ้น แต่อาจเป็นเหตุให้จำนวนใบ และความยาวก้านใบลดลง เพราะธาตุอาหารต่างๆ ถูกนำไปใช้ในการสร้างยอด[8,9] ดังนั้นจึงต้องใช้ BA ในปริมาณที่เหมาะสม เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าจำนวนยอดจากการใช้เอ็มบริโอทั้ง 4 เฉดสีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเฉดสีของเอ็มบริโอไม่ต่างกันมากนัก ดังกล่าวในข้างต้น

เมื่อนำต้นอ่อนบัวหลวงชมพูและบัวหลวงขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาฉายรังสีแกมมาในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 0, 20, 30 และ 40 เกรย์ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าบัวหลวงชมพูมีค่า LD_{50} เท่ากับ 36.99 เกรย์ และบัวหลวงขาวมีค่า LD_{50} เท่ากับ 35.34 เกรย์ ก่อนหน้านี้ได้มีรายงานการทดลองฉายรังสีแกมมากับเมล็ดบัวหลวงขาวหรือบุณฑริก โดยมีค่า LD_{50} เท่ากับ 60 เกรย์ [10] และการทดลองฉายรังสี

แกมมากับไหลของบัวหลวงสัตตบุษย์ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ พบว่ามีค่า LD_{50} เท่ากับ 20 เกรย์ [9] การทดลองฉายรังสีเหง้าบัวหลวงสีเหลือง พบว่าปริมาณรังสีที่ก่อให้เกิดการตายครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) มีค่าประมาณ17 เกรย์ ความทนทานต่อรังสีค่อนข้าง ต่ำ[6] แสดงให้เห็นว่าปริมาณรังสีที่เหมาะสมขึ้นกับชนิดพันธุ์ของบัวหลวงและชิ้นส่วนที่นำมาฉายรังสี การที่เมล็ดบัวหลวงขาวมีค่า LD_{50} มากกว่าไหลและต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นผลมาจากเมล็ดมีเปลือกหนาหุ้มช่วยป้องกันการทำลายจากรังสีได้ดีกว่าการฉายเนื้อเยื่อโดยตรง จึงสามารถใช้ปริมาณฉายรังสีที่สูงกว่า ส่วนไหลบัวหลวงสัตตบุษย์นั้นถูกฉายรังสีแกมมาโดยตรง จึงมีค่า LD_{50} น้อยกว่าต้นอ่อนบัวหลวงที่ถูกฉายรังสีผ่านตัวกลางคือขวดเพาะเลี้ยงเปล่าขนาด 8 ออนซ์

การฉายรังสีแกมมาเพื่อก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ เป็นการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ได้พันธุ์ใหม่ๆ ซึ่งถูกนำมาใช้ทดแทนการผสมเกสร เนื่องจากใช้เวลาสั้นกว่าและได้เป็นจำนวนมากจากการฉายรังสีแต่ละครั้ง การฉายรังสีเพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นวิธีการหนึ่งที่จะก่อให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม[6] ปริมาณรังสีที่ใช้ต้องมีความเหมาะสม เนื่องจากปริมาณรังสีสูงขึ้นยิ่งส่งผลให้เกิดอัตราการตายของเนื้อเยื่อมากขึ้นด้วย เนื่องจากรังสีแกมมามีผลการทะลุทะลวงต่อวัตถุทุกชนิด เมื่อปริมาณรังสีเข้มขึ้นพลังงานในการทำลายล้างสูงจึงส่งผลให้เนื้อเยื่อพืชตาย เมื่อทำการฉายรังสีแกมมาจะเกิดคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีพลังงานสูงมากพอที่จะทำให้อิเล็กตรอนวงนอกสุดของวงโคจรหลุดออกจากอะตอมหรือโมเลกุล เมื่อรังสีนั้นชนกับอะตอมหรือเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปในวัตถุ เกิดการสูญเสียอิเล็กตรอนหรือได้รับเพิ่มขึ้น เรียกว่า การไอออไนซ์เซชัน[12,13] ดังนั้นเมื่อฉายรังสีแกมมาให้กับชิ้นส่วนพืชจะเกิดกระบวนการไอออไนซ์เซชันภายในเซลล์ [12] อนุมูลอิสระปฐมภูมิและอนุมูลอิสระทุติยภูมิที่ถูกสร้างขึ้น เรียกว่า อนุมูลอิสระของออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) [15] การสะสมของ ROS ภายในเซลล์พืชส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและปฏิกิริยาต่างๆ ภายในเซลล์พืช เนื่องจาก ROS สร้างความเสียหายให้กับไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรตและ DNA ที่อาจนำไปสู่การตายของเซลล์ อย่างไรก็ตามเซลล์มีกระบวนการซ่อมแซม DNA เพื่อลดอันตรายจากรังสีหรือสิ่งที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์อื่นๆ ให้กลับคืนเป็นปกติหรือทำหน้าที่เดิมได้ แต่ในกระบวนการซ่อมแซม DNA ยังเกิดความผิดพลาดขึ้นได้ เช่น การซ่อมแซมที่นำเอานิวคลิโอไทด์ที่ต่างจากเดิมเข้ามา หรือการเชื่อมต่อผิดพลาดทำให้เกิดการหายไปของ DNA หรือการเชื่อมต่อสลับที่ซึ่งก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ แต่หาก DNA มีความเสียหายรุนแรงหรือเป็นความเสียหายชนิดซับซ้อน จนเซลล์ไม่สามารถซ่อมแซมกลับคืนสภาพเดิมได้ ทำให้เซลล์เกิดการตายขึ้น[16]

เมล็ดพืชเป็นอวัยวะที่มีความแข็งแรงทนทานกว่าส่วนอื่นๆ ประกอบกับเนื้อเยื่อต่างๆ ที่อยู่ในเมล็ด คือคัพภะและใบเลี้ยง มีสภาพที่ปลอดเชื้อสูงจึงเหมาะแก่การใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ[17] เมื่อเททับด้วยอาหารเหลวสูตร BA ความเข้มข้น3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนยอดบัวหลงชมพูเฉลี่ย 3.88 – 4.46 ยอดต่อต้นจำนวนมากกว่าบัวหลวงขาว ความไวต่อรังสีแกรมมาของต้นอ่อนบัวหลวงนั้นมีความใกล้เคียงกัน โดยค่า LD_{50} ของบัวหลวงชมพูเท่ากับ 36.99 เกรย์ และค่า LD_{50} ของบัวหลวงขาวเท่ากับ 35.34 เกรย์ ปริมาณรังสีที่เหมาะสมขึ้นกับชนิดพันธุ์ของบัวหลวงและชิ้นส่วน[6]

ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณบัวหลวงชมพูและบัวหลวงขาวให้เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่ละครั้งสามารถผลิตต้นอ่อนบัวหลวงได้เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังช่วยลดความเสียหายของบัวจากโรคต่างๆ เนื่องจากบัวเหล่านี้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ และการนำต้นอ่อนบัวหลวงชมพูและบัวหลวงขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปฉายรังสีแกมมายังเป็นแนวทางการพัฒนาบัวหลวงสายพันธุ์ใหม่ๆ ออกสู่ท้องตลาด เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับบัวหลวง โดยไม่ต้องนำส่วนเมล็ดหรือไหลที่สามารถขายได้มาใช้ฉายรังสี อย่างไรก็ดีลักษณะการกลายพันธุ์ของบัวหลวงที่เกิดขึ้น และการรอดชีวิตหลังการอนุบาลและปลูกในแปลงจริงยังต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

วิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก อาจารย์ ผศ.ดร.วชิราภาณ์ พิกุลทอง สำหรับคำปรึกษาและแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง นอกจากนี้ยังได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ(องค์การมหาชน) ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

1. ศิริลักษณ์ กมลวรรณสิทธิ์. ประโยชน์ของบัวหลวง. วารสารคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัย บูรพา. พฤศจิกายน (2): 2561 ได้จาก: http://agri-tech.sakaeo.buu.ac.th/index.php/component/k2/item/93-2560-8-21-10-56. January 10 2018.
2. นพชัย ชาญศิลป์. เทคนิคผสมบัวพันธุ์ใหม่ ปั้นแต่งโฉมป้อนตลาดโลก. ไทยรัฐ 7 เมษายน 2560.
3. สวนบัวฟ้า. ราคาบัวหลวง. ได้จาก: https://www.buafahgarden.com/category/25853.

4. รสา หงษ์รัตน์ และคณะ. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นใบพาย (*Cryptocoryne cordata* GriFF.) ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43: กรุงเทพ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์: 2548.
5. ภัณฑิลา อุดร. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวจงกลนี (Nymphaea sp.). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: 2551.
6. วิชัย ภูริปัญญวานิช. การเพาะเลี้ยงคัพภะของ บัวหลวง 2 ชนิด (*Nelumbo nucifera* และ N. lutea). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: 2543.
7. สุภาณี และสายัณห์. การใช้เครื่องมือ SPAD-502 เพื่อประเมินปริมาณครอโรฟิลล์รวมและไนโตรเจนในใบของลองกองและเงาะ. ว.สงขลาครินทร์ วทท. 2545 ; 24(1): 9-14.
8. McGaw,B.A. Plant hormones and there role in plant development. Dordrecht: Martinus Nihoff Publishers ; 1987. P.76-93 (New York State college of agriculture and life sciences ; vol 28)
9. Brock,T.G. and P.B. Kaufman. Growth regulato-rs: an account of hormones and growth regula-tion. London: Acadamic Press Inc ; 1991. P. 277-340. (Growth and Development ; vol 88)
10. ไซนีย๊ะ ละมะ. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในบัวหลวงสายพันธุ์บุณฑริก (*Nelumbo nucifera* Gaerth.) โดยการฉายรังสีแกมมา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์: 2549.
11. Arunyanart, S. and Sootronyatara, S. Mutation. induction by γ and x-ray irradiation in tissue cultured Lotus. Plant cell Tissue and Organ Cultur. PCTOC. 2002 ; 70(1): 119-122.
12. Jan S, Parween T, Siddiqi To, Mahmooduzza-far. Effects of persowing gamma irradiation on the photosynthetic pigments, sugar content and carbon gain of *Cullen corylifolium* (L.) Medik. Chl J. 2013 ; 73(1): 343-50.
13. Wi SG, Chung BY, Kim JH, Baek MH, Lee JW, Kim YS. Effects of gamma irradiation on morpgological changes and biological responses in plants. Micron. 2007 ; 38(1): 553-64.
14. Ismavhin M. Sejarah ilmu pemuliaan mutasi. Jakarta. Universitas Halu Oleo. 2016.
15. Esnault MA, Legue F, Chenal C. Ionizing radiation: advances in plant response. Environ Experimental Botany. 2010 ; 68(1): 231-237.
16. สิรนุช ลามศรีจันทร์. การกลายพันธุ์ของพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์: 2540.
17. ประศาสตร์ เกื้อมณี. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ: 2538.