หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมาของคำฝอย

คำฝอย (safflower) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Carthamus tinctorius* Linn. มีแหล่งกำเนิดอยู่ในอัฟกานิสถาน ลุ่มแม่น้ำไนล์และเอธิโอเปีย (Purseglove, 1974) มีการเพาะปลูกมานานในอินเดีย อัฟกานิสถานและอาระเบีย แล้วขยายไปสู่จีน เปอร์เซีย อียิปต์ และอิตาลี ต่อมาจึงนำเข้าไปปลูกจากเยอรมันนี สเปน ไปสู่ออสเตรเลียและสหรัฐอเมริกา ทางด้านความสำคัญในเชิงเศรษฐกิจของคำฝอย หลายประเทศที่อยู่ในเขตร้อนและเขตอบอุ่นมีการปลูกเป็นพืชไร่เพื่อนำเมล็ดไปผลิตน้ำมัน (Chavan, 1961) ประมาณว่าทั้งโลกผลิตเมล็ดคำฝอยได้ปีละ 0.7 ล้านตัน จากเนื้อที่เพาะปลูกทั้งสิ้นประมาณ 6.25 ล้านไร่ ทำรายได้ให้กับประเทศที่ผลิตเพื่อส่งออกเป็นอย่างมาก ได้แก่ สหรัฐอเมริกา, เม็กซิโกและแคนาดา สำหรับประเทศไทยมีการเพาะปลูกมานานในแถบภาคเหนือ แต่ปลูกในปริมาณน้อย โดยส่วนใหญ่ปลูกแซมกับพืชชนิดอื่นในนาหลังเก็บเกี่ยวข้าวนาปีเพื่อนำกลีบดอกไปขายและเก็บเมล็ดไว้ทำพันธุ์ในฤดูต่อไป (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2531)

1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของคำฝอย

คำฝอย คำแสด หรือคำยุ่ง เป็นพืชชั้นสูงที่อยู่ในสกุล Carthamus L. และวงศ์ Compositae ซึ่งมีพืชสำคัญหลายชนิดจัดอยู่ในวงศ์นี้ ได้แก่ ทานตะวัน (*Helianthus annuus*), ไพรีทรัม (*Chrysanthemum cinerariifolium*), ไนเจอร์ (*Guizotia abyssinica*) และผักกาดแก้ว (*Lactuca sativa*) (Cobley, 1976) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของคำฝอย (Chavan, 1961 ; Purseglove, 1974) เป็นดังนี้

ลำต้นมีลักษณะเป็นทรงพุ่ม จัดเป็นไม้ล้มลุกพวกปีเดียว (annual) มีความสูงประมาณ 0.5-1.5 เมตร ในขณะที่ต้นยังเล็กอยู่มีลักษณะเป็นพุ่มแจ้ (rosette) แตกกิ่งก้านมากบริเวณลำต้นใกล้ส่วนโคน กิ่งก้านแข็งแรง รูปทรงกระบอก มีสีค่อนข้างซีด

ใบม้วนอ่อน ไม่มีก้านใบหรือก้านใบสั้น รูปหอกแกมขอบขนาน รูปขอบขนานแกมรูปไข่หรือรูปรี มีสีเขียวเข้ม มีความกว้าง 1-5 เซนติเมตร ยาว 3-15 เซนติเมตร ปลายใบแหลมหรือมน ขอบใบหยักเป็นหนามแหลมหรือเรียบเกลี้ยงทั้งสองข้าง เห็นเส้นใบชัดเจน

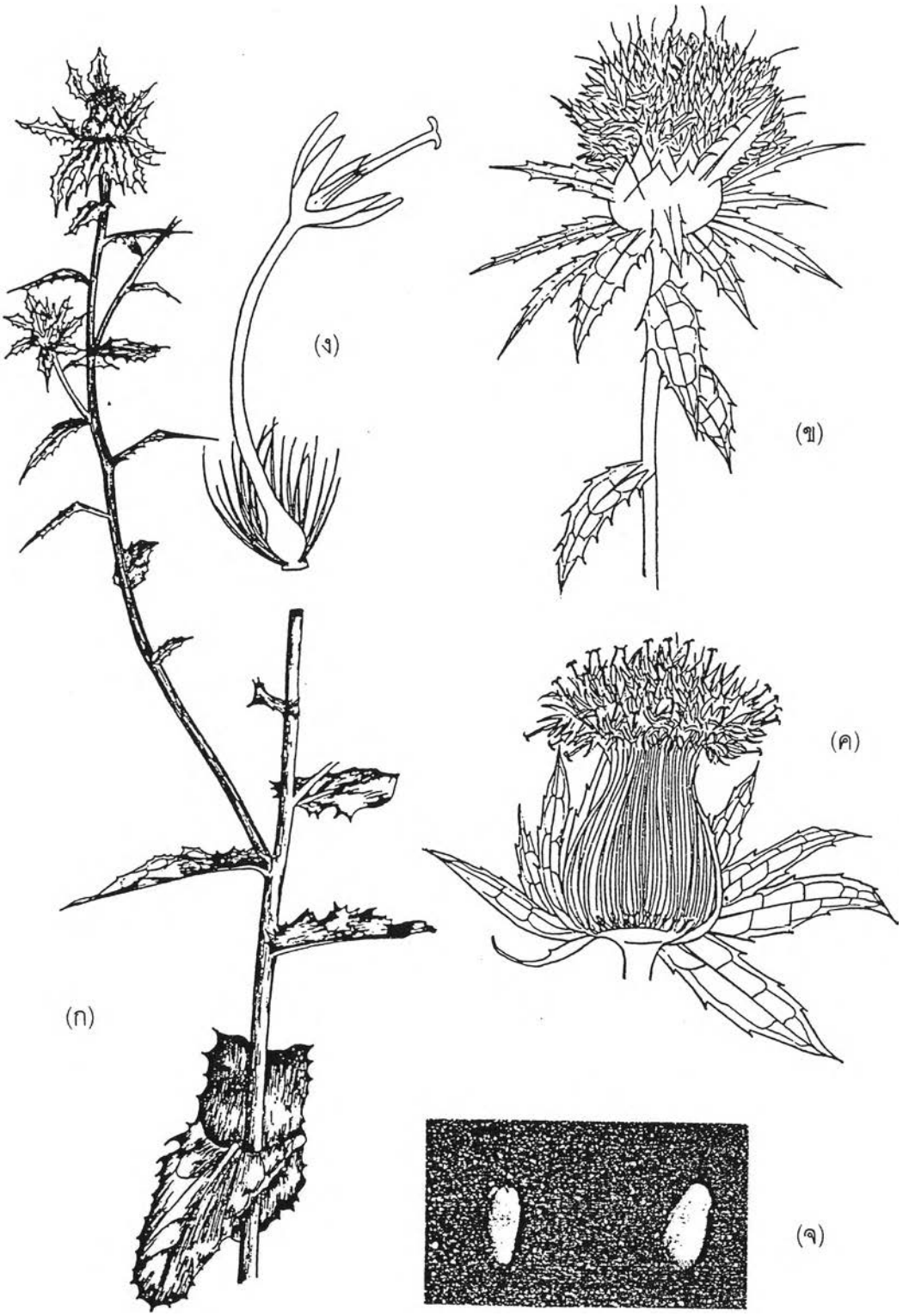
ดอกออกเดี่ยว ๆ ที่ปลายยอด เป็นดอกช่อ เรียกว่า capitula ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-4 เซนติเมตร ประกอบด้วยดอกย่อย (florets) ขนาดเล็กจำนวนมากประมาณ 30-90 ดอก ลักษณะเป็นหลอดยาว ไม่มีกลีบเลี้ยง มีริ้วประดับล้อมรอบดอกช่อสองชั้น ชั้นในเป็นรูปสามเหลี่ยมปลายแหลม ชั้นนอกรูปร่างคล้ายใบและมีหนามล้อมรอบ ดอกยาวพ้นริ้วประดับ กลีบดอกในตอนแรกมีสีขาวหรือเหลือง ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีแดงส้มเมื่อแก่

ผลเป็นเมล็ดแห้งไม่แตกออกเมื่อแก่ เมล็ดเป็นรูปไข่กลับเบี้ยว ๆ มี 4 สัน ยาว 6-8 มิลลิเมตร ปลายตัด มีสีขาวนวลหรือเทาจาง ดังแสดงในรูปที่ 1.1

1.3 <u>สภาพภูมิประเทศ ภูมิอากาศและฤดูปลูกที่เหมาะสม</u>

คำฝอยเป็นพืชที่ปลูกได้ทั่วไปทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น จัดเป็นพืชในเขตน้ำฝน สามารถเจริญเติบโตได้ดี ต้านทานต่อความแห้งแล้งและลมได้ (Purseglove, 1974) พืชชนิดนี้ไม่เหมาะที่จะปลูกในพื้นที่ลุ่มและมีอากาศชุ่มชื้นมาก เนื่องจากต้องการสภาพอากาศค่อนข้างแห้งและเย็น ในระยะแรกของการออกรากและระหว่างการออกช่อดอกต้องการอุณหภูมิเฉลี่ย 15-20 องศาเซลเซียส สำหรับการเจริญเติบโตทางลำต้นและการสร้างผลผลิตต้องการอุณหภูมิที่สูงขึ้น คือ เฉลี่ยประมาณ 20-30 องศาเซลเซียส

ฤดูปลูกที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วงปลายฤดูฝน ประมาณปลายเดือนกันยายนถึงเดือนตุลาคม เนื่องจากเป็นพืชที่ไม่ไวต่อช่วงแสงกลางวัน การปลูกในฤดูใบไม่ร่วงจะมีอายุการเจริญเติบโต 200-300 วัน หากปลูกในฤดูใบไม้ผลิจะมีอายุ 120-160 วัน (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2531) ออกดอกเมื่ออายุ 50-60 วัน และจะทยอยออกดอกไปเรื่อย ๆ ตั้งแต่วันที่ออกดอกไปจนกระทั่งเก็บเกี่ยว (สถาปัตย์ ปรีดา, 2519)



รูปที่ 1.1 คำฝอย (*Carthamus tinctorius* L.) (ก) ต้น, (ข) ดอกหรือ capitulum, (ค) ภาคตัดขวางของดอก, (ง) ดอกย่อย จาก Purseglove (1974) และ (จ) เมล็ด จาก Chavan (1961)

1.4 พันธุ์ การขยายพันธุ์ การเพาะปลูก โรคและแมลงศัตรูที่สำคัญ

คำฝอยมีหลายพันธุ์ ทำให้มีความแตกต่างของลักษณะทางพฤกษศาสตร์ โดยเฉพาะลักษณะของหนาม (spininess) ปริมาณน้ำมัน (oil content) และสีย้อม (dye content) สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ พันธุ์ที่มีหนามและพันธุ์ไร้หนาม (Chavan, 1961) โดยพันธุ์ที่มีหนามมักจะใช้ในการผลิตเมล็ด ส่วนพันธุ์ไร้หนามเหมาะสำหรับใช้ผลิตสีย้อม (Purseglove, 1974) เมื่อปี 2527 โครงการสาธิตการเกษตรในเขตน้ำฝนซึ่งเป็นหน่วยงานของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้ขอเมล็ดคำฝอยพันธุ์ Munjira จากสถาบัน ICRISAT (The International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropic) ประเทศอินเดียมาทดลองปลูกในประเทศไทย โดยใช้พันธุ์นี้เป็นพันธุ์หลักในการทดลองและส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกในพื้นที่เกษตรน้ำฝนที่ถูกปล่อยทิ้งว่างเปล่าในฤดูแล้งทั้งทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่า สามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตดีในบางพื้นที่ ทนความแห้งแล้ง ความสม่ำเสมอในแปลงปลูกค่อนข้างดี มีทรงพุ่มและความสูงพอประมาณ ดอกสีเหลือง ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มและสีส้มในที่สุด เมล็ดสีขาว มีปริมาณน้ำมัน 30-32% (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2531)

คำฝอยสามารถขยายพันธุ์ได้โดยการใช้เมล็ด การปลูกส่วนใหญ่ปลูกเป็นพืชเดี่ยว ๆ เหมือนกับพืชไร่ทั่วไป แต่ในอินเดียปลูกคำฝอยร่วมกับพืชชนิดอื่น ๆ เช่น ข้าวบาร์เลย์ และข้าวสาลี วิธีปลูกทำโดยหยอดเป็นหลุม ความลึก 3-5 เซนติเมตร ระยะระหว่างแถว 50-70 เซนติเมตร และระหว่างต้น 30-40 เซนติเมตร ใช้เมล็ดต่อไร่ 1.5-2 กิโลกรัมต่อไร่ จำนวนต้นที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 8,000-10,000 ต้นต่อไร่ หรือทำโดยโรยเมล็ดเป็นแถว แต่วิธีนี้สิ้นเปลืองเมล็ดมากกว่าการหยอดหลุม (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2531) ได้ผลผลิตประมาณ 125-250 กิโลกรัมต่อไร่ การปลูกในเขตชลประทานได้ผลผลิตมากถึง 400-500 กิโลกรัมต่อไร่ (สถาปัตย์ ปรีดา, 2519)

โรคพืชที่สำคัญของคำฝอย คือ โรคราสนิม (*Puccinia carthami*) และโรคเหี่ยว (*Sclerotinia sclerotiorum*) ซึ่งระบาดและทำความเสียหายเป็นอย่างมาก ส่วนโรคอื่น ๆ ได้แก่ โรคใบจุด (*Cercospora carthami*) และโรคใบจุดอัลเทอนาเรีย (*Alternaria carthami*) เป็นต้น แมลงศัตรูที่ทำลายคำฝอยมีหลายชนิด ที่สำคัญ คือ แมลงวันคำฝอย (*Acanthiophilus helianthi*) และเพลี้ยอ่อนคำฝอย (*Dactynotus carthami*) ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากในยุโรปและอินเดีย ส่วนแมลงศัตรูที่มีความสำคัญรองลงมา ได้แก่ หนอนผีเสื้อ (*Perigea*

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

capensis, *Heliothis armigera*) และหนอนกระทู้ (*Laphygma exigua*) (Chavan, 1961 ; Purseglove, 1974)

1.5 คุณประโยชน์ของคำฝอย

ส่วนต่าง ๆ ของคำฝอยสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน ดังต่อไปนี้

ดอกแห้งใช้ทำสีย้อมและสีผสมอาหาร มีส่วนประกอบที่ให้สีอยู่ 2 ส่วน คือ carthamin ให้สีแดงสด และ safflower yellow ให้สีเหลือง (Chavan, 1961) นอกจากนั้นยังมีสรรพคุณทางยา ได้แก่ บำรุงโลหิต, บำรุงระดู, บำรุงหัวใจ, บำรุงประสาท, แก้น้ำเหลืองเสีย, แก้ปวดแสบปวดร้อนตามผิวหนัง, แก้ดีพิการ, ฟอกโลหิต, ลดไขมันในเลือดและป้องกันไขมันอุดตันเป็นต้น (มหาวิทยาลัยมหิดล, คณะเภสัชศาสตร์, ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร, 2529)

เมล็ดใช้เป็นยาขับถ่ายเสมหะ ทาแก้โรคผิวหนังและแก้บวม ขับประจำเดือน น้ำมันจากเมล็ดใช้ทาแก้อัมพาตและขัดตามข้อต่าง ๆ (มหาวิทยาลัยมหิดล, คณะเภสัชศาสตร์, ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร, 2529) และยังสกัดน้ำมันจากเมล็ดมาใช้บริโภค ทำน้ำมันชักเงาและสีได้ (Janick *et al.*, 1974)

น้ำมันของเมล็ดคำฝอยมีปริมาณเฉลี่ย 30% ขึ้นกับชนิดของพันธุ์ ในบางพันธุ์อาจมีปริมาณสูงถึง 40% ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) ในปริมาณต่ำประมาณ 9% แต่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงประมาณ 90% (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2531) นิยมนำน้ำมันคำฝอยมาประกอบอาหารเนื่องจากมีค่าไอโอดีนสูง มีสีเหลืองใส รสชาดดี คุณภาพดีเหมาะสำหรับนำมาบริโภค (Salunkhe *et al.*, 1992) กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันคำฝอยมีหลายชนิด โดยพบว่า กรดไขมันลิโนเลอิก (linoleic acid) มีปริมาณสูงที่สุด มากกว่า 70% ขึ้นไป ดังแสดงในตารางที่ 1.1 กรดไขมันชนิดนี้เป็นชนิดที่ไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) และมีความจำเป็นต่อร่างกาย เนื่องจากร่างกายไม่สามารถผลิตขึ้นมาเองได้ แต่พบมากในไขมันจากพืช จึงต้องรับประทานเข้าไปเท่านั้น ไขมันจากพืชแต่ละชนิดมีปริมาณกรดลิโนเลอิกแตกต่างกัน แต่น้ำมันคำฝอยมีกรดไขมันชนิดนี้สูงมากกว่าน้ำมันจากเมล็ดพืชชนิดอื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1.2 (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2531) นอกจากนี้กรดไขมันลิโนเลอิกยังมีคุณสมบัติเพิ่มฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ย่อยไขมันในหลอดโลหิตแดงใหญ่ หัวใจ ตับ และเนื้อเยื่อไขมัน เพิ่มการขับถ่ายสเตอรอลและเกลือของน้ำดีทางอุจจาระ ช่วยลดปริมาณคอเลสเทอรอลในเลือดและไทรกลีเซอไรด์ในเนื้อเยื่อ ดังนั้นจึงสามารถใช้น้ำมันคำฝอยเป็นอาหารแก่คนไข้ที่มีภาวะ

คอเลสเทอรอลสูงและช่วยป้องกันไม่ให้ระดับคอเลสเทอรอลในเลือดสูงขึ้น (มหาวิทยาลัยมหิดล, คณะเภสัชศาสตร์, ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย, 2534)

ตารางที่ 1.1 ปริมาณกรดไขมันในน้ำมันจากเมล็ดคำฝอย[1]

กรดไขมัน	ร้อยละปริมาณกรดไขมัน (%)
ปาล์มิติก (C16:0)	6.61
สเตียริก (C18:0)	2.32
โอเลอิก (C18:1)	12.97
ลิโนเลอิก (C18:2)	78.10

[1]ดัดแปลงจาก กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2531)

ตารางที่ 1.2 ปริมาณกรดลิโนเลอิกในน้ำมันจากเมล็ดพืชบางชนิด[1]

เมล็ดพืช	ร้อยละปริมาณกรดลิโนเลอิก (%)
คำฝอย	72
ทานตะวัน	63
ข้าวโพด	55
ถั่วเหลือง	52
งา	44

[1]ดัดแปลงจาก กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2531)

1.6 การปรับปรุงพันธุ์คำฝอย

การปรับปรุงพันธุ์คำฝอยมีการดำเนินงานอยู่ในหลายประเทศที่เพาะปลูกพืชชนิดนี้ โดยมีวัตถุประสงค์ของการปรับปรุงพันธุ์แตกต่างกันออกไป การปรับปรุงพันธ์เพื่อให้มีปริมาณน้ำมันสูงมักจะเกี่ยวข้องกับการผสมให้ได้พันธุ์ที่มีปริมาณเปลือก (hull content) ต่ำ ซึ่งจะทำให้มีปริมาณน้ำมันสูงขึ้น (Knowles, 1975) การปรับปรุงพันธุ์ในระยะแรกส่วนใหญ่ใช้วิธีการแบบดั้งเดิม (conventional breeding) โดยในอินเดียปรับปรุงพันธุ์โดยคัดเลือก pure lines จากการปลูกให้ผสมตัวเองในสภาพไร่และคัดเลือกอยู่นานหลายรุ่น (generation) จนได้พันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและมีปริมาณน้ำมันสูง (Chavan, 1961) รวมถึงการปรับปรุงปริมาณกรดไขมันบางชนิดในเมล็ดคำฝอยด้วย (Fuller, Kohler and Applewhite, 1966 ; Knowles, 1969) ในด้านการพัฒนาปรับปรุงให้ได้คำฝอยพันธุ์ต้านทานโรคมีรายงาน ได้แก่ พันธุ์ต้านทานโรคราสนิมที่เกิดจากเชื้อรา *Puccinia carthami*, พันธุ์ด้านทานโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora drechsleri* และโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum f.sp. carthami* เป็นต้น (Knowles, 1975) ส่วนการปรับปรุงลักษณะทางเศรษฐกิจอื่น ๆ มีรายงาน ดังนี้ พันธุ์ต้านทานแมลงวันคำฝอย, พันธุ์ต้านทานเพลี้ยอ่อนคำฝอย, พันธุ์ไร้หนาม, พันธุ์ทนต่อฝนตกหนักและความเย็นแข็ง, พันธุ์ที่มีปริมาณสีย้อมสูง, พันธุ์ที่มีโปรตีนสูง เป็นต้น (Chavan, 1961)

ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีชีวภาพด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชที่ให้น้ำมันจากเมล็ดหลายชนิด (Sharp, 1985) ด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น ความแปรปรวนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (somaclonal and gametoclonal variation), การรวมโพรโท-พลาสต์ (protoplast fusion) และการโคลนยีน (cloning) มาใช้ปรับปรุงทั้งทางด้านปริมาณน้ำมัน คุณภาพน้ำมัน และลักษณะเศรษฐกิจอื่น ๆ (James, 1985) เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีข้อดีหลายประการ คือ สามารถดำเนินการได้ตลอดเวลาโดยไม่ขึ้นกับฤดูกาล ใช้เนื้อที่ปฏิบัติการน้อย แต่ขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนพืชได้มาก และใช้ระยะเวลารวดเร็วกว่าวิธีการดั้งเดิมหลายเท่า (สิรินุช ลามศรีจันทร์, 2536)

1.7 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคำฝอย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นวิธีการที่สามารถนำมาขยายพันธุ์คำฝอยได้ โดย George และ Rao (1982) รายงานว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช (explants) ได้แก่ ใบเลี้ยง (cotyledon) และลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) บนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog' s medium) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ BA (N_6-benzyladenine) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA (Naphthalene acetic acid) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส (callus) และมีการพัฒนาไปเป็นยอด (shoot regeneration) ได้มากที่สุด โดยชิ้นส่วนใบเลี้ยงมีการพัฒนาไปเป็นยอดดีกว่าลำต้นใต้ใบเลี้ยง ซึ่งคำฝอยแต่ละพันธุ์มีการเจริญเติบโตบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแตกต่างกัน และพบว่าอาหารที่มีความเข้มข้นของซูโครสสูงสามารถชักนำให้ยอดเกิดรากได้

Anupan Kongbangkerd (1995) รายงานว่า ภาวะที่เหมาะสมในการชักนำคำฝอยให้เกิดแคลลัสและมีการพัฒนาไปเป็นยอด คือ การนำใบเลี้ยงคำฝอยที่ได้จากต้นกล้าอายุ 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ NAA และ BA ความเข้มข้นเท่ากัน คือ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 2.0% เลี้ยงในสภาพที่ไม่ให้แสงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วจึงนำไปเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อชักนำให้เกิดยอด ต่อมานำยอดมาชักนำให้เกิดรากโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

Mandal, Chatterji และ Dutta-Gupta (1995) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี NAA 5.37-10.74 ไมโครโมลาร์ และ BA 2 22 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อน (somatic embryos) บนแคลลัสได้ โดยต้นที่เจริญเติบโตมาจากต้นอ่อนจะเกิดรากได้เมื่อแยกไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งครึ่งสูตร MS ที่มี NAA 1.07 ไมโครโมลาร์

ในการศึกษาเกี่ยวกับการชักนำให้เกิด capitula ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ Tejovathi และ Anwar (1984) พบว่า capitula ที่เกิดในสภาพ *in vitro* เกิดจากผนังด้านในของใบเลี้ยงตรงบริเวณปลายตัด ลักษณะของ capitula มีความแปรปรวนไปหลากหลายรูปแบบ เมื่อ capitula พัฒนาขึ้นมาจนสมบูรณ์ มีการถ่ายละอองเกสรในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 90-95% ต่อมาเกิดการพัฒนาของ embryo และได้เมล็ดจำนวนเล็กน้อย มีขนาดเล็กกว่าปกติ 5 เท่า

งานวิจัยอื่น ๆ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคำฝอย ที่น่าสนใจจะนำมาใช้ประโยชน์ ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเซลล์คำฝอยเพื่อผลิต tocopherols (Furuya *et al.*, 1987)

และรงควัตถุสีแดง (Hanagata *et al.*, 1992) การผลิตต้นแฮพพลอยด์จากการเลี้ยงอับละอองเรณู (Prasad *et al.*, 1991) เป็นต้น

1.8 <u>ความแปรปรวนที่เกิดขึ้นในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเกิดจากการชักนำด้วยสิ่งก่อกลายพันธุ์</u>

การที่พืชสามารถปรับตัวให้อยู่รอดในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ จะต้องเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variability) เป็นผลเนื่องมาจากการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) ทำให้พืชเกิดลักษณะใหม่ ๆ ขึ้นมา ซึ่งมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะตามต้องการ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยการชักนำให้เกิดแคลลัสหรือการเลี้ยงในสภาพเซลล์แขวนลอย เมื่อเซลล์หรือกลุ่มเซลล์เกิดการพัฒนาไปเป็นต้น พบว่า ในบางครั้งพืชที่เกิดขึ้นใหม่มีลักษณะที่ไม่เคยปรากฏในพืชชนิดเดิมมาก่อน ซึ่งบางลักษณะสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกหลานได้ แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมเกิดขึ้น (Evans and Sharp, 1983) เรียกลักษณะความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นเองในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชว่า somaclonal variation (Larkin and Scowcroft, 1981) ดังนั้นจึงสามารถนำลักษณะที่ดีที่เกิดขึ้นจากความแปรปรวนดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ในด้านการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์พืชได้ (Evans, Sharp and Medina-Filho, 1984) ดังแสดงในตารางที่ 1.3

ความแปรปรวนต่าง ๆ ของพืชที่เกิดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีหลายรูปแบบ เช่น การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและสรีระวิทยาของแคลลัสที่ชักนำให้เกิดขึ้น, ความแปรปรวนที่เกิดในกระบวนการออร์แกโนเจเนซีส (organogenesis), ความเปลี่ยนแปลงที่ปรากฏอย่างเด่นชัดกับต้นพืชที่พัฒนาขึ้นมา และการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม เป็นต้น (Skirvin, 1978) ดังแสดงในตารางที่ 1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อความแปรปรวนนี้มีหลายประการ ได้แก่ สภาพทางพันธุศาสตร์ของเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยง, องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ, ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Lal and Lal, 1990) และการตอบสนองของจีโนม (genome) พืชต่อความเครียด (stress) ต่าง ๆ ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Orton, 1983)

ตารางที่ 1.3 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจาก somaclonal variation ในพืชชนิดต่าง ๆ[1]

พืช	การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจาก somaclonal variation
alfalfa	yield, disease resistance, multifoliate leaves, plant habit, plant height
barley	plant height, tillering, fertility, haploidy introgression
carrot	resistance to glyphosate
celery	disease resistance, flower morphology, leaf shape, size and form, plant height, essential oil composition
rape seed	seed color, flowering time, growth habit, waxiness, glucosinate content
rice	yield component, plant height, heading date, salt tolerance
sorghum	fertility, leaf morphology, growth habit
tobacco	leaf color, plant size, yield, alkaloids, reducing sugars, resistance to *Pseudomonas tabaci*, resistance to *Peronospora tabacina*

[1]คัดลอกบางส่วนจาก Lal and Lal (1990)

ตารางที่ 1.4 ความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดจาก somaclonal variation ในพืชชนิดต่าง ๆ[1]

พืช	ความแปรปรวนทางพันธุกรรม
Avena sativa	monosomics, trisomics, bivalents, multivalents, telecentrics, deletions
Hordeum jubatum	polyploids, aneuploids
Nicotiana tabacum	mutation for chlorophyll deficiency, polyploidy, chromosomal rearrangement
Saccharum officinarim	chromosomal mosaics
Triticum aestivum	chromatid exchange, deletion in chloroplast genome
Solanum tuberosum	polyploidy, aneuploidy

[1]คัดลอกบางส่วนจาก Lal and Lal (1990)

การชักนำให้พืชเกิดการกลายพันธุ์ (induced mutation) ด้วยการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ (mutagens) ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ รังสี และสารเคมี เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้พืชเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมได้เช่นเดียวกัน (International Atomic Energy Agency [IAEA], 1977) ลักษณะของสายพันธุ์กลายพันธุ์ (mutants) ที่ได้มีความแปรปรวนคล้ายคลึงกับการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ แต่มีความถี่ของการกลายพันธุ์สูงกว่า (Skirvin, 1978) การใช้สารเคมีก่อกลายพันธุ์ในกลุ่ม alkylating agents เป็นกลุ่มที่นิยมใช้มากที่สุด และมีประสิทธิภาพสูงในการชักนำให้พืชกลายพันธุ์ สารกลุ่มนี้มี reactive alkyl group ซึ่งจะถ่ายทอดให้กับโมเลกุลอื่นตรงตำแหน่งที่มีความเข้มข้นของอิเลคตรอนสูง โดยจะเกิดปฏิกิริยา alkylation กับหมู่ฟอสเฟต (phosphate group) ในส่วนของดีเอ็นเอ (DNA) สารเคมีในกลุ่มนี้ ได้แก่ EMS (Ethylmethanesulphonate), DES (Diethyl sulphate) และ ENS (Ethyl nitroso urea) เป็นต้น (IAEA, 1977)

1.9 <u>การใช้สาร EMS ชักนำให้พืชเกิดการกลายพันธุ์</u>

สาร EMS เป็นสารเคมีในกลุ่ม alkylating agents ที่นิยมใช้มากที่สุดชนิดหนึ่งในการชักนำให้พืชชั้นสูงเกิดการกลายพันธุ์ คุณสมบัติของสารมีดังนี้

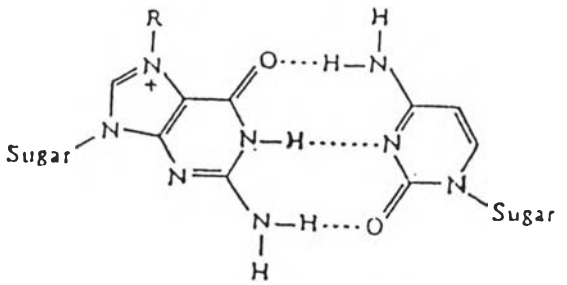
สูตรเคมี	$CH_3SO_2OC_2H_5$ ของเหลวใสไม่มีสี
มวลโมเลกุล	124
ความหนาแน่น	1.203 กรัมต่อลิตร ที่ 25 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	85-86 องศาเซลเซียส ที่ 10 มิลลิเมตรปรอท
การละลายน้ำ	8%
ครึ่งชีวิตในน้ำ	93 ชั่วโมง ที่ 20 องศาเซลเซียส
	26 ชั่วโมง ที่ 30 องศาเซลเซียส
	10.4 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส

เมื่อสาร EMS ทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซีส (hydrolysis reaction) กับน้ำแล้วจะกลายเป็นสารประกอบที่ไม่มีคุณสมบัติก่อกลายพันธุ์ แต่จะมีความเป็นพิษเกิดขึ้น ในการทำปฏิกิริยา alkylation พบว่า หมู่เอทิล (ethyl group ; $-C_2H_5$) จะถูกถ่ายให้กับโมเลกุลของดีเอ็นเอตรงส่วนของเบสเพียวรีน (purine bases), เบสไพริมิดีน (pyrimidine bases) และหมู่ฟอสเฟต โดยจะเกิดปฏิกิริยานี้มากที่สุดที่ตำแหน่ง N-7 ของ guanine (G) ภายหลังทำปฏิกิริยาแล้วกลายเป็น 7-ethylguanine หรือเรียกว่า alkylated guanine (IAEA, 1977)

วิธีการที่สาร EMS ทำให้เกิดการกลายพันธุ์มีดังต่อไปนี้ (IAEA, 1977)

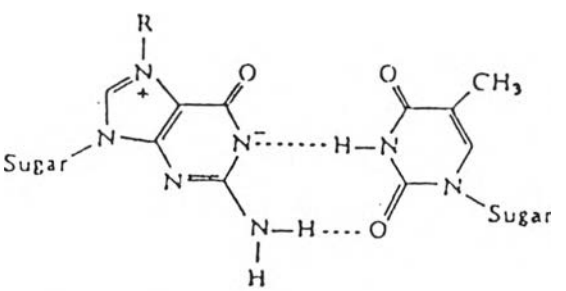
1. ทำให้เกิดการเข้าแทนที่คู่เบส (single base substitution)

การมีหมู่เอทิลเข้ามาอยู่ในโมเลกุลของ guanine ทำให้คุณสมบัติในการเกิด ionization แตกต่างไปจากปกติ จึงเกิดการจับคู่เบสที่ผิดไปจากเดิมได้ เช่น กรณีที่ 7-ethylguanine สามารถจับคู่เบสกับ thymine (T) ซึ่งจะนำไปสู่การกลายพันธุ์ชนิด transition ($G \equiv C \longrightarrow A = T$) ดังแสดงในรูปที่ 1.2



alkylated guanine cytosine

(ก)



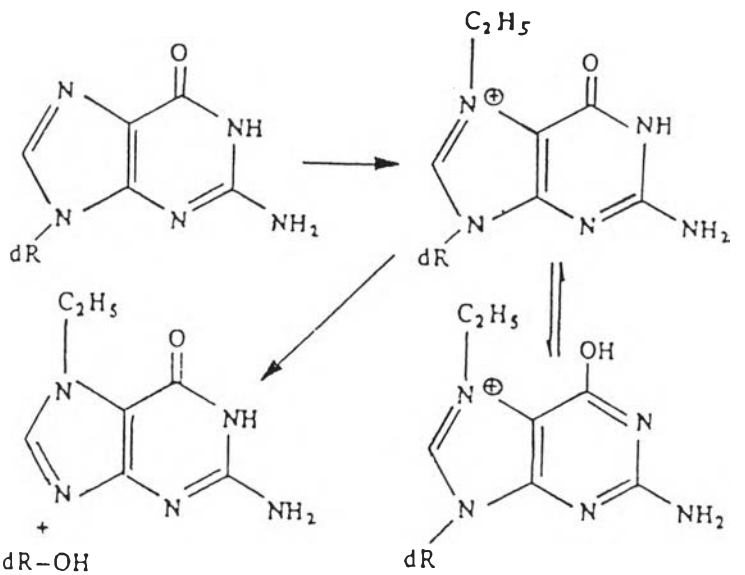
alkylated guanine thymine

(ข)

รูปที่ 1.2 การจับคู่กันของ (ก) alkylated guanine กับ cytosine และ (ข) ionized form (N-7) กับ thymine จาก IAEA (1977)

2. การหลุดหายไปของเบสเพียวรีนจากสายดีเอ็นเอ (depurination)

การมีหมู่เอทิลเข้าไปจับอยู่ในตำแหน่งต่าง ๆ ในเบสเพียวรีน จึงทำให้เกิดการตัดขาดของพันธะที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลกับเบสจึงเกิดการหลุดออกไปของเบสเพียวรีนและเกิดช่องว่างขึ้น ต่อมาเมื่อเซลล์มีกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเออาจจะเกิดความผิดพลาดได้เบสที่แตกต่างไปจากเดิม ซึ่งนำไปสู่การกลายพันธุ์แบบ transition และ transversion ได้ ดังแสดงในรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 การเข้าไปจับของหมู่เอทิลที่ตำแหน่ง N-7 ของ guanine อาจทำให้เกิดดีเพียวริเนชัน (depurination) หรือเทาโทเมริกชิพท์ (tautomeric shift) (ล่างขวา) ได้ จาก IAEA (1977)

3. การตัดขาดของดีเอ็นเอสายเดี่ยวและคู่ (single or double strand break)

เมื่อเกิดดีเพียวริเนชันทำให้ phosphodiester bond ณ ตำแหน่งนั้นไม่คงตัว เกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซีส มีการตัดขาดของหมู่ฟอสเฟตและน้ำตาล ทำให้เกิดการขาดจากกันของดีเอ็นเอสายเดี่ยวและสายคู่ ซึ่งนำไปสู่การหลุดหายไปของส่วนดีเอ็นเอและเกิดการกลายพันธุ์ในที่สุด

การให้สาร EMS กับส่วนต่าง ๆ ของพืช ปฏิบัติได้หลายวิธี ได้แก่ การจุ่มหรือแช่ นิยมใช้กับเมล็ดหรือตาที่กำลังพักตัว เช่น ซูการ์บีท (Brears and Lonsdale, 1990), ข้าวโอ๊ต (Cummings, Stuthman and Green, 1978), ข้าวสาลี (Williams, Miller and Klindworth, 1992) การนำสำลีจุ่มสารมาวางตรงบริเวณรอยแผลที่ทำไว้บนลำต้นหรือช่อดอก การฉีดสารเข้าไปยังอวัยวะใกล้เคียงหรืออวัยวะที่ต้องการจะชักนำให้กลายพันธุ์ การผสมสาร EMS กับอาหารสังเคราะห์แบบเหลวหรือบัฟเฟอร์เพื่อให้สารกับเซลล์แขวนลอย แคลลัส และชิ้นส่วนพืช การใส่สารความเข้มข้นต่ำผสมกับอาหารเทียมแบบแข็งเพื่อให้พืชรับสารเข้าไปทางราก วิธีการนี้สามารถใช้ศึกษาการกลายพันธุ์แบบเรื้อรัง (chronic mutation) และผลของสารก่อกลายพันธุ์ที่มีต่อการเจริญเติบโตของพืชในระยะต่าง ๆ ได้ (IAEA, 1977)

สาร EMS สามารถก่อกลายพันธุ์ได้ดีกับพืชหลายชนิดทั้งในสภาพ *in vivo* และ *in vitro* โดยความถี่ของการกลายพันธุ์ที่ถูกชักนำด้วยการใช้สาร EMS มีค่าสูงกว่าการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติหลายเท่า (Sung, 1976) สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ได้สามารถถ่ายทอดลักษณะกลายพันธุ์ต่อไปได้อีกหลายรุ่น (Osorio *et al.*, 1995) โดยมีรายงานเกี่ยวกับการใช้สาร EMS ชักนำให้พืชชั้นสูงเกิดการกลายพันธุ์ ดังต่อไปนี้

Medrano, Millo และ Guerri (1986) ใช้สาร EMS ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู (anther culture) ของยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) พบว่า เมื่อใช้สาร EMS ความเข้มข้นต่ำ คือ 0.005-0.01% และใช้ระยะเวลาแช่อับละอองเรณูสั้น คือ 1-3 ชั่วโมง มีผลทำให้จำนวนอับละอองเรณูที่สร้างต้นพืช (plantlets) ขึ้นใหม่ จำนวนต้นพืชเฉลี่ยต่ออับละอองเรณูและการสร้างต้นพืชในระยะต้นสูงขึ้น นอกจากนั้นยังปรากฏความแปรปรวนของโปรตีนและปริมาณคลอโรฟิลล์ (chlorophyll content) ในต้นยาสูบที่พัฒนามาจากอับละอองเรณูที่ได้รับสาร EMS ซึ่งมีความแตกต่างจาก control ในทั้งสองลักษณะ

Sung (1976) ได้รายงานเกี่ยวกับการใช้สาร EMS ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสภาพเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของถั่วเหลือง (*Glycine max*) และแครอต (*Daucus carota*) พบว่า ความถี่ของการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นโดยการชักนำด้วย EMS มีค่าสูงกว่าการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ 1-140 เท่า เซลล์กลายพันธุ์ (mutant cell lines) สามารถต้านทานยา

cycloheximide หรือ 5-fluorouracil ได้ เมื่อทดลองเลี้ยงในอาหารที่มียาทั้งสองชนิดนี้ และยังคงมีความต้านทานอยู่เมื่อเจริญอยู่ในอาหารที่ปราศจากยาหรือเมื่อนำกลับมาทดสอบใหม่ ต่อมาเมื่อแคลลัสของเซลล์กลายพันธุ์พัฒนาไปเป็นต้นก็ยังคงมีความต้านทานอยู่

ในการทำให้ถั่ว *Vicia faba* L. เกิดการกลายพันธุ์โดยการชักนำด้วยสาร EMS แสดงให้เห็นว่า การใช้สาร EMS มีประสิทธิภาพในการก่อกลายพันธุ์ได้ดีกว่าการใช้รังสีแกมมา (gamma ray) โดยมีความถี่ของการกลายพันธุ์สูงกว่าการใช้รังสี 2-4 เท่า ในถั่วรุ่น M_1 และ M_2 ถั่วพันธุ์กลายพันธุ์ที่ได้มีความแปรปรวนของคลอโรฟิลล์และลักษณะทางสรีรวิทยาต่าง ๆ เช่น ความสูง, ขนาดและรูปร่างใบ, ขนาดและสีของช่อดอก เป็นต้น (Filippetti and Deplace, 1986)

Reisch และ Bingham (1981) ได้รายงานไว้ว่า การให้สาร EMS กับเซลล์แขวนลอยของอัลฟาฟา (*Medicago sativa* L.) ที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น diploid สามารถชักนำให้เกิดเซลล์กลายพันธุ์ที่ต้านทานต่อ ethionine ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตได้ เซลล์กลายพันธุ์ที่ได้เมื่อเพาะเลี้ยงจนเกิดพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ พบว่า ต้นส่วนใหญ่ยังมีจำนวนโครโมโซมเป็น diploid แต่มีบางต้นที่มีจำนวนโครโมโซมเปลี่ยนไปเป็น tetraploid hexaploid หรือ aneuploid นอกจากนั้นยังพบความแปรปรวนของลักษณะต้น ได้แก่ ความสูง, ทรงพุ่ม, รูปร่างใบ, รูปแบบใบประกอบ, ความยาวก้านใบ และการแตกกิ่ง

ในพืชจำพวกป่าน (*Linum usitatissimum* L.) รายงานเกี่ยวกับการให้สาร EMS กับเมล็ดเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะปริมาณกรดอัลฟา-ลิโนเลนิก (∝-linolenic acid) ต่ำ โดยพบว่า มีสายพันธุ์กลายพันธุ์บางสายพันธุ์นอกจากจะมีปริมาณกรดอัลฟา-ลิโนเลนิกต่ำแล้ว ยังมีลักษณะปริมาณกรดปาล์มิติกหรือกรดลิโนเลอิกสูง หรือมีลักษณะปริมาณกรดโอเลอิกและกรดลิโนเลอิกสูงร่วมอยู่ด้วย (Rowland and Bhatty, 1990)

การศึกษาในทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) มีการปรับปรุงพันธุ์ให้มีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) ในน้ำมันจากเมล็ดสูงขึ้น โดยการใช้สาร EMS ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ปรากฏว่า ต้นกลายพันธุ์ที่ได้นอกจากจะมีกรดไขมันอิ่มตัว คือ กรดสเตียริกในปริมาณสูงกว่าต้นพ่อแม่หลายเท่าแล้วยังมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว คือ กรดลิโนเลอิกสูงขึ้นด้วย (Osorio *et al.*, 1995)

1.10 มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

คำฝอยมีความสำคัญจัดอยู่ในกลุ่มพืชที่สกัดน้ำมันได้จากเมล็ด น้ำมันเมล็ดคำฝอยเป็นน้ำมันที่มีคุณภาพดีเหมาะสำหรับนำมาบริโภค เนื่องจากประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณสูง โดยเฉพาะกรดลิโนเลอิกมีปริมาณสูงกว่าพืชชนิดอื่น ๆ และเป็นกรดไขมันจำเป็นที่ร่างกายไม่สามารถผลิตขึ้นเองได้ จึงต้องรับประทานเข้าไปเท่านั้น นอกจากนั้นยังมีคุณสมบัติช่วยลดและป้องกันไม่ให้ระดับไขมันและคอเลสเทอรอลในเลือดสูงขึ้น ในการปรับปรุงพันธุ์ของคำฝอยส่วนใหญ่จะพัฒนาให้ได้พันธุ์ที่มีลักษณะที่เป็นที่ต้องการทางเศรษฐกิจต่าง ๆ เช่น มีปริมาณน้ำมันสูง มีปริมาณสีย้อมสูง ทนทานต่อสภาพแวดล้อม ต้านทานโรค ต้านทานแมลงศัตรูพืช เป็นต้น แต่เดิมการปรับปรุงพันธุ์นิยมใช้การปลูกให้ผสมตัวเองในสภาพไร่และคัดเลือกอยู่นานหลายรุ่นจนได้สายพันธุ์แท้ที่มีลักษณะตามต้องการ ซึ่งวิธีการนี้มีข้อเสียที่ต้องใช้ระยะเวลานาน ในปัจจุบันมีแนวคิดที่จะใช้วิธีการอื่นมาทดแทน ได้แก่ การใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์และเทคโนโลยีชีวภาพในด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากเป็นวิธีที่มีศักยภาพสูงในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์และใช้เวลาดำเนินการรวดเร็วกว่าวิธีการดั้งเดิมหลายเท่า งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาเกี่ยวกับความแปรปรวนที่ได้จากการชักนำด้วยสาร EMS และความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคำฝอย โดยคาดหวังว่าอาจจะนำความแปรปรวนทางลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นคำฝอย และความแปรปรวนของการผลิตน้ำมันและกรดไขมันในแคลลัสคำฝอยมาใช้ประโยชน์เป็นแนวทางในการคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

1.11 ขั้นตอนการวิจัย

1.11.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการใช้สาร EMS เพื่อชักนำให้คำฝอยเกิดการกลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

1.11.2 ศึกษาความแปรปรวนของต้นคำฝอยที่ได้จากการชักนำด้วยสาร EMS ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.11.3 ศึกษาปัจจัยที่ทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นคำฝอยในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (somaclonal variation)

1.11.4 ตรวจสอบและวิเคราะห์ความแปรปรวนของการผลิตน้ำมันและกรดไขมันในแคลลัสคำฝอยที่ได้จากการใช้สาร EMS และแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามปกติ