บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลของความเข้มข้นของ sodium alginate และ calcium chloride ต่อการงอกของเมล็ดสังเคราะห์พริกหวาน ความแข็งแรง และความอยู่ตัวของเจลที่ใช้เคลือบเมล็ดสังเคราะห์พริกหวานหลังจากนำเมล็ดสังเคราะห์ไประเหยน้ำออกด้วยซิลิกาเจล จนมีระดับการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์

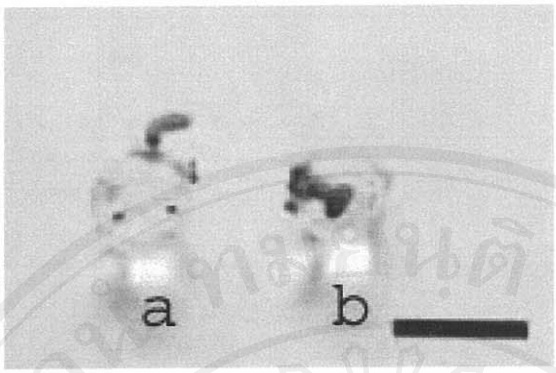
การนำโซมาติกเอมบริโอของพริกหวาน มาทำการเคลือบเมล็ดโดยอาศัยการทำปฏิริยาระหว่างสารละลาย sodium alginate และสารละลาย calcium chloride ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน แล้วนำมาระเหยน้ำออกด้วยซิลิกาเจล จนมีระดับการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความงอก และระยะเวลาที่ใช้ในการงอก รวมถึงลักษณะของเจลที่เคลือบโซมาติกเอมบริโอด้วย เมื่อพิจารณาปัจจัยทั้ง 2 ปัจจัยแยกกัน พบว่า การเคลือบเมล็ดโดยใช้ความเข้มข้นของ sodium alginate 2, 3 และ4 %w/v จะได้เมล็ดสังเคราะห์ที่มีรูปร่างคงตัว ค่อนข้างแข็งเล็กน้อย แต่หลังจากทำการระเหยน้ำออกด้วยซิลิกาเจล จนมีระดับการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นของ sodium alginate 2 %w/v จะเหี่ยวลงไม่อยู่ตัว มีเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำเพียง 33-60 เปอร์เซ็นต์ อาจเนื่องมาจากโซมาติกเอมบริโอได้รับความเสียหายขณะที่เมล็ดสังเคราะห์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เวลาที่ใช้ในการงอกค่อนมากประมาณ 5 วัน เพราะต้องทำการดูดซึมอาหารจากอาหารMS ที่อยู่ภายนอกเมล็ดสังเคราะห์มาทดแทนอาหารที่รั่วไหลออกไปจากภายในเมล็ด เมื่อเมล็ดเหี่ยวสอดคล้องกับผลการทดลองของ Gray (1987) ซึ่งกล่าวว่าในระหว่างการทำแห้ง somatic embryo จะลดขนาดลง มีสีค่อนข้างเหลือง ขาดง่าย และเซลล์ผนังชั้นนอกจะยุบลง ซึ่งคาดว่าเอมบริโอที่ถูกทำให้แห้งอาจอยู่ในระยะพักตัว อย่างไรก็ตามอัตราการรอดชีวิตของ somatic embryo ที่ทำให้แห้งยังต่ำมาก ซึ่งการเคลือบเมล็ดด้วยความเข้มข้นของ sodium alginate 3 และ 4 %w/v จะยังคงรูปร่างเดิมอยู่หลังจากทำการระเหยน้ำออกด้วยซิลิกาเจล จนมีระดับการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์ความงอกค่อนข้างสูง ใช้เวลาในการงอกเพียง 2-3 วัน อาจเนื่องมาจากเจลที่เคลือบเมล็ดค่อนข้างบาง และอ่อนนุ่มทำให้ต้นอ่อนสามารถงอกออกมาได้ง่าย ส่วนการเคลือบเมล็ดโดยใช้ความเข้มข้นของ sodium alginate 5 และ 6 %w/v เมล็ดสังเคราะห์ที่ได้จะมีลักษณะที่แข็ง และหนามาก มีความอยู่ตัวสูง เมื่อพิจารณาจากแรงต้านทานของเจลต่อแรงกดทับพบว่า ที่ความเข้มข้นของ sodium alginate 5-6 %w/v มีค่าสูงถึง 18 และ 24 นิวตันแสดงให้เห็นถึงความแข็งของเจลที่เคลือบเมล็ดสังเคราะห์ที่มีค่าสูงมาก มีความยืดหยุ่นต่ำ จึงส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ความงอกค่อยๆลดลง และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เวลาที่ใช้ในการงอกจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นที่ใช้สูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องมาจากเจลที่ใช้เคลือบเมล็ดมีความแข็ง และหนา ทำให้โซมาติกเอมบริโอเจริญผ่านออกจากเจลได้ยาก ซึ่งได้ผลใกล้เคียงกับผลการทดลองของ Fourre และ คณะ (1991) ซึ่งพบว่า sodium alginate 4 %w/v จะยับยั้งการงอกของ somatic embryo ในขณะที่การใช้ alginate ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 %w/v ทำให้อัตราการงอกของ somatic embryo สูงมาก อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของ sodium alginate 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรจะสร้างแคปซูลที่อ่อนเกินไป

อีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดสังเคราะห์พริกหวาน คือ ความเข้มข้นของ calcium chloride จากการใช้ calcium chloride ที่ความเข้มข้น 25, 50, 75 และ100 mM พบว่ามีผลต่อความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาในการสร้างเจลเคลือบเมล็ดสังเคราะห์ โดยที่ความเข้มข้น 25 และ 50 mM ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 20-30 นาที ส่วนที่ความเข้มข้น 75 และ100 mM ใช้เวลาเพียง 10-15 นาทีเท่านั้น ซึ่งความเร็วในการเกิดปฏิกิริยานี้มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดสังเคราะห์ด้วย กล่าวคือ การที่ใช้เวลาในการเคลือบเมล็ดน้อยลงจะทำให้โซมาติกเอมบริโอได้รับความเสียหายลดลงจากการปั่นด้วย magnetic stirrer และอาหารที่ติดอยู่กับโซมาติกเอมบริโอมีปริมาณเพียงพอต่อการเจริญของเมล็ดสังเคราะห์ เนื่องจากการทำปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วทำให้ไม่มีการสูญเสียอาหารเพาะเลี้ยงต้นอ่อนไปกับสารละลาย calcium chloride ที่สามารถจับกับอาหารที่หลุดออกมาจากเอมบริโอได้ จากการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของ sodium alginate และ calcium chloride มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความงอก ระยะเวลาที่ใช้ในการงอกของเมล็ดสังเคราะห์พริกหวาน ความแข็งแรงและความอยู่ตัวของเจลที่ใช้เคลือบเมล็ดสังเคราะห์พริกหวานช่วยทำให้เมล็ดสังเคราะห์มีรูปร่างคงตัวอยู่ได้ และช่วยลดความเสียหายที่เกิดขึ้นจากการสูญเสียน้ำได้ ซึ่งมีความสอดคล้องกับรายงานของ Buyukalaka(1993) ที่ได้เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดสังเคราะห์พริกหวานแบบชื้นสูงถึง 97 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ความเข้มข้นของ sodium alginate 3%w/v และความเข้มข้นของ calcium chloride 75 mM ในการเคลือบโซมาติกเอมบริโอโดยไม่ได้ทำการระเหยน้ำออกจากเมล็ดสังเคราะห์หลังทำการเคลือบเมล็ด

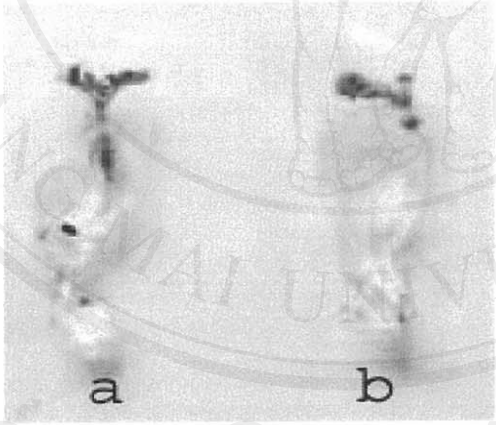
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 6 ลักษณะเมล็ดสังเคราะห์ หลังจากผ่านการเคลือบเมล็ด

a. เมล็ดสังเคราะห์ที่ใช้ความเข้มข้นของ sodium alginate 2 %w/v และความเข้มข้นของ calcium chloride 75 mM

b. เมล็ดสังเคราะห์ที่ใช้ความเข้มข้นของ sodium alginate 3 %w/v และความเข้มข้นของ calcium chloride 75 mM



ภาพที่ 7 ลักษณะการงอกของเมล็ดสังเคราะห์พริกหวานหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารMS 4 วัน

a. เมล็ดสังเคราะห์ที่ใช้ความเข้มข้นของ sodium alginate 3 %w/v และความเข้มข้นของ calcium chloride 75 mM

b. เมล็ดสังเคราะห์ที่ใช้ความเข้มข้นของ sodium alginate 4 %w/v และความเข้มข้นของ calcium chloride 75 mM

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ระยะการเจริญที่เหมาะสมของโซมาติกเอมบริโอของพริกหวานในการชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำ โดยใช้ ABA หลังจากนำเมล็ดสังเคราะห์ไประเหยน้ำออกด้วยซิลิกาเจลจนมีระดับการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์

หลังจากทำการย้ายโซมาติกเอมบริโอในระยะ late torpedo มาเลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรพัฒนาเอมบริโอให้แก่ ที่เติม ABA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 และ 25 วัน บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25±2°C ในที่มืดแล้วนำมาผลิตเมล็ดสังเคราะห์ และทำการระเหยน้ำออกด้วยซิลิกาเจลจนสูญเสียความชื้น 80เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ระยะ 3–12 วัน มีเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำมากอาจเป็นผลมาจากเอมบริโอยังอยู่ในช่วงพัฒนาส่วนต่างๆ และเวลาในการสะสมอาหารสำหรับการงอกยังไม่สมบูรณ์ การชักนำให้ทนทานต่อการสูญเสียน้ำอาจยังมีน้อยอยู่เนื่องจากเอมบริโอยังได้รับการชักนำจาก ABA ไม่เพียงพอ หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเอมบริโอที่มีอายุ 12 และ15 วัน พบว่ามีการงอกที่มีลักษณะผิดปกติเกิดขึ้นในอัตราที่สูงมากถึง 16 และ17 เปอร์เซ็นต์ของเมล็ดที่งอกทั้งหมด อาจเนื่องมาจากเป็นช่วงที่เมล็ดกำลังปรับตัวให้มีความทนทานต่อการสูญเสียน้ำมากขึ้น เมื่อเทียบกับ ระยะการเจริญในช่วง 18-25 วัน เอมบริโอมีความสมบูรณ์มากขึ้นเนื่องจากมีการสะสมอาหารนานกว่า และ มีการชักนำให้มีความทนทานต่อการสูญเสียน้ำด้วย ABA อย่างเหมาะสม ทำให้มีความสามารถในการงอกสูงกว่ามาก โดยในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอที่มีอายุการเจริญ 21 วัน พบว่า ให้เปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ยที่สูงที่สุดถึง 93 เปอร์เซ็นต์ และมีต้นอ่อนที่มีลักษณะผิดปกติเพียง 4 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังใช้ระยะเวลาในการงอกเพียง 3 วันเท่านั้น หลังจากที่เอมบริโอมีอายุมากกว่า 21 วันขึ้นไป เปอร์เซ็นต์ความงอกจะลดลงอาจเนื่องมาจากการสะสมของ ABA เป็นระยะเวลานานอาจจะไปกระตุ้นโซมาติกเอมบริโอให้เข้าสู่ระยะพักตัว

3. วิเคราะห์ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ABA ในการชักนำให้โซมาติกเอมบริโอเกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำ (desiccation tolerance) ก่อนนำมาผลิตเมล็ดสังเคราะห์ และนำไประเหยน้ำออกด้วยซิลิกาเจลจนมีระดับการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์

ABA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชโดยจะมีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิด precocious germination (Robichaud *et al.*, 1980; Crouch *et al.*, 1985 and Quatrano, 1986) และเพิ่มความทนทานต่อการสูญเสียน้ำของโซมาติกเอมบริโอ อีกทั้งยังกระตุ้นการพัฒนาและการแก่ของโซมาติกเอมบริโอ ในธรรมชาติพบว่าจะมีการเพิ่มขึ้นของระดับ ABA ขึ้นชั่วคราว ในระยะท้าย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของการเจริญของเมล็ด (Finkelstein *et al.*, 1985) การได้รับ ABA ของโซมาติกเอมบริโอ ไม่ว่าจะได้รับโดยตรงหรือชักนำให้มีการสะสม ABA โดยการทำให้เกิดสภาพเครียดสามารถชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำของโซมาติกเอมบริโอได้ (Senaratna *et al.*, 1989) ซึ่งอาจเกิดจากการที่ ABA ชักนำให้ยีนแสดงออกลักษณะเฉพาะในการสร้างสารต่างๆที่จำเป็นสำหรับความมีชีวิตของเอมบริโอก่อนที่จะสูญเสียน้ำ (Black, 1991) และควบคุมการสะสม proline และการสร้างอาหารสะสมในเอมบริโอซึ่งมีผลต่อการสูญเสียน้ำ (Nieves *et al.*, 2001) ABA ยังทำให้เกิดการเสื่อมสภาพ (degradation or degreening) ของ คลอโรฟิลล์ ซึ่งจะลดกิจกรรมในการสร้างออกซิเจนของเนื้อเยื่อที่แห้งเมื่อได้รับแสง (Elstner, 1982)

การทดลองนี้มีการศึกษาถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ABA ในการชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำของโซมาติกเอมบริโอพริกหวาน รวมทั้งผลของ ABA ในการรักษาความมีชีวิตของเมล็ดสังเคราะห์ในระหว่างการเก็บรักษา โดยนำโซมาติกเอมบริโอมาเลี้ยงในอาหาร MS สูตรพัฒนาเอมบริโอให้สุกแก่ที่เติม ABA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 1.0 มก./ล. เป็นระยะเวลา 1 เดือน ในที่มืด บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25±2°C ก่อนที่จะนำไปเคลือบด้วยสารอัลจิเนต และระเหยน้ำออกจนมีระดับการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการผลิตเป็นเมล็ดสังเคราะห์แบบแห้ง พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ ABA ขึ้นเรื่อยๆทีละน้อยจะทำให้เปอร์เซ็นต์ความงอกค่อยๆเพิ่มขึ้นด้วย แต่ลักษณะต้นอ่อนที่ได้จะมีความแปรปรวนไม่คงที่อาจเนื่องมาจากผลของ ABA ที่มีต่อการทำงานของเอมไซน์ในพืชบางชนิด โดยการใช้ความเข้มข้นของ ABA ที่ระดับ 0.5 มก./ล. จะทำให้เมล็ดสังเคราะห์มีความงอกสูงที่สุดคือ 83 เปอร์เซ็นต์ และให้ต้นอ่อนที่มีลักษณะผิดปกติเพียง 4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับการไม่ใช้ ABA เมล็ดสังเคราะห์จะงอกได้เพียง 33 เปอร์เซ็นต์ และให้ต้นอ่อนที่มีลักษณะผิดปกติสูงถึง 13 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อความเข้มข้นของ ABA มากกว่า 0.5 มก./ล เปอร์เซ็นต์ความงอกจะเริ่มลดลงอีกครั้ง เนื่องจากความเข้มข้นของ ABA ที่สูงมากๆจะก่อให้เกิดการพักตัวในพืชมากกว่าการชักนำให้ทนทานต่อการสูญเสียน้ำ

4. การทดสอบความงอกภายหลังการเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์พริกหวานที่ผ่านการชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำด้วย ABA หลังจากนำเมล็ดสังเคราะห์ไประเหยน้ำออกด้วยซิลิกาเจลจนมีระดับการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์

หลังจากนำโซมาติกเอมบริโอที่อยู่ในระยะ late torpedo มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS half-strength ที่เติม 0.5 มก./ล. ABA เป็นเวลา 21 วัน มาผลิตเมล็ดสังเคราะห์ และระเหย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำออก 80 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 6 และ 8 สัปดาห์พบว่า เปอร์เซ็นต์ความงอกจะลดลงในทุกๆสัปดาห์ และเวลาที่ใช้ในการงอกก็จะเพิ่มขึ้นด้วย แต่เปอร์เซ็นต์ความงอกจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดในสัปดาห์ที่ 8 ของการเก็บรักษา โดยเปอร์เซ็นต์ความงอกจะเหลือเพียง 43 เปอร์เซ็นต์ และต้นอ่อนที่มีลักษณะผิดปกติ 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาตามความเป็นไปได้ การเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์เป็นเวลา 6 สัปดาห์จะเหมาะสมที่สุด เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ย 63 เปอร์เซ็นต์ และมีต้นอ่อนลักษณะผิดปกติเพียง 7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่ายังเป็นเปอร์เซ็นต์ที่น่าพอใจอยู่ แต่ในรายงานการทดลองของ Nieves *et al.*, 2000 รายงานว่าความมีชีวิตจะเพิ่มสูงเมื่อได้รับ ABA ความเข้มข้น 3.8 μM ก่อนนำไปเคลือบด้วยอัลจิเนตและทำการดึงน้ำออก ซึ่งจะให้เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดสังเคราะห์เท่ากับ 57 เปอร์เซ็นต์ การเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ที่ได้รับการชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำโดยการใช้ ABA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มก./ล. เป็นระยะเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ พบว่าเมื่อทำการเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์นาน 1 สัปดาห์ จะยังคงสามารถงอกได้ถึง 48 เปอร์เซ็นต์ และ 47 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 32 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาไว้นาน 3 สัปดาห์ ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าการให้ ABA แก่โซมาติกเอมบริโอสามารถชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำได้ เช่นเดียวกับในรายงานของ Takahata *et al.*, 1993 ที่ใช้ ABA ในการชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำได้มากที่สุดเมื่อได้รับ ABA 100 μM ซึ่งเจริญเป็นต้นได้ 27-48 เปอร์เซ็นต์ และ Senaratna *et al.*, 1989 และ 1990 ใน alfalfa (*Medicago sativa* L.) และ Timbert *et al.*, 1996 โซมาติกเอมบริโอของแครอท เมื่อนำผลการทดลองทั้งหมดมาพิจารณาร่วมกันแล้ว พบว่าการให้ ABA จากภายนอก เพื่อจะยับยั้งการงอกของเมล็ดได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงนั้นต้องรู้ว่า ABA ทำงานอย่างไรในพืช โดยทั่วไปแล้วผลของABAจะทำให้การยืดยาวของ radicle ช้าลง จึงเป็นการชะลอการงอกโดยที่ไม่ใช่การทำให้เมล็ดไม่งอก นอกจากนี้ในพืชบางชนิดปรากฏว่าระดับ ABA ในเมล็ดจะลดลงเมื่อการพักตัวถูกทำลายลงโดยการให้แสง หรือการผ่านอุณหภูมิต่ำๆได้ ในพืชบางชนิดจะไม่ปรากฏการลดลงของระดับ ABA เช่นนี้ข้อสรุปจากผลการทดลองเหล่านี้คือ อาจจะเป็นไปได้ว่า ABA เป็นสาเหตุของการพักตัวในเมล็ดสำหรับพืชบางชนิดเท่านั้น และในพืชอีกหลายชนิด ABA ไม่ใช่สาเหตุสำคัญเนื่องจากยังมีสารประกอบอีกหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการพักตัวของเมล็ดนอกเหนือจาก ABA (นพดล, 2537)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved