บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงอับเรณู และรังไข่ของข้าวมีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง ระยะการพัฒนาของละอองเรณู เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีส่วนสำคัญทำให้การเพาะเลี้ยงประสบความสำเร็จ ระยะที่เหมาะสม คือ ระยะการพัฒนาในช่วงกลางถึงช่วงท้ายของการเกิดนิวเคลียสเดียว ซึ่งการทดลองของ Chung (1992) และ Zhang (1992) พบว่าที่ระยะนี้การตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูดีที่สุด ทั้งในด้านการพัฒนาเป็นแคลลัสและพัฒนาเป็นยอดหรือต้น ถ้าหากละอองเรณูอยู่ในระยะที่นิวเคลียสมีการแบ่งเซลล์จนได้ 2 นิวเคลียส ละอองเรณูจะมีการสะสมแป้งมากขึ้น ความสมดุลของฮอร์โมนภายในเซลล์เปลี่ยนแปลงไป องค์ประกอบของเซลล์ที่จำเป็นต่อการพัฒนาถูกดึงไปใช้จนเกือบหมด ทำให้ยากต่อการชักนำให้เกิดกลไกการพัฒนาละอองเรณูไปเป็นต้น (Chen, 1983; Zapata *et al.,* 1983 และ Raina; 1989)

จากการทดสอบสูตรอาหารสำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสจากอับเรณู เมื่อนำอับเรณูที่เกิดแคลลัสมาตรวจดูด้วยกล้องสเตอริโอไมโครสโคป พบว่าภายในอับเรณูหนึ่ง ๆ อาจมีแคลลัสเกิดขึ้นได้หลายตำแหน่ง ซึ่งคาดว่าเกิดจากละอองเรณูต่างอันกันและในการทดลองนี้พบการเกิดแคลลัสจากทั้งอับเรณูที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือดำและจากอับเรณูที่ไม่เปลี่ยนสี แต่ส่วนใหญ่เกิดจากอับเรณูที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ซึ่งต่างจากทดลองของ รัตน์ดา (2538) ภัทรพร (2540) จันทร์วิภา (2547) และ Guzmam and Zapata-Arias (2000) ซึ่งไม่พบการเกิดแคลลัสในอับเรณูไม่เปลี่ยนสี จากนั้นแคลลัสเหล่านี้จะมีการแบ่งตัวขยายใหญ่ขึ้นและมักอยู่ชิดกันจนไม่สามารถแยกได้ชัดเจนว่าแคลลัสที่เกิดขึ้นนั้นเป็นแคลลัสที่เกิดจากจุดเริ่มต้นเดียวกันหรือไม่

จากทดลองเพาะเลี้ยงรังไข่ของข้าวบนอาหารสูตรต่างๆ พบว่าอาหารสูตรพื้นฐาน N6 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากรังไข่ของข้าว อาหารสูตรพื้นฐาน N6 ที่ดัดแปลงโดย Chu และคณะ (1975) เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์ของข้าวโดยอาศัยหลักการที่ว่าปริมาณของ NH_4^+ ในอาหารมีผลต่อการชักนำไมโครสปอร์ของข้าวให้เกิดการแบ่งตัวเป็นแคลลัส และการลดปริมาณ NH_4^+ ส่งผลต่อการเกิดแคลลัสในข้าวอินดิกาได้ดีมากขึ้นซึ่ง Zhou and Yang (1980, 1981)

และ Kuo (1981) ได้ประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากรังไข่ของข้าวอินดิก้าเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐาน N6

อาหารมีความสำคัญต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากรังไข่ของข้าว โดยเฉพาะการเลือกใช้ชนิดและความเข้มข้นของสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชอันเป็นส่วนประกอบของอาหารที่ต้องเหมาะสมทั้งต่อชนิดของพันธุ์ข้าวที่ใช้ทดลองและระยะของการพัฒนาของรังไข่ ในการทดลองนี้ประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากรังไข่ของข้าวบนอาหารสูตร N6 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Rongbai และคณะ (1998) ที่พบว่าการใช้ฮอร์โมน 2,4-D (0.2-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ NAA (2 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ kinetin (1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้ผลที่ดีและเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากรังไข่ของข้าว จากการทดลองชี้ให้เห็นว่าอาหารที่มีอัตราส่วนของออกซิน (auxins) สูงกว่าไซโคไคนิน (cytokinins) ให้ผลดีในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากรังไข่ กล่าวคือเมื่อลดความเข้มข้นของ kinetin จาก 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เหลือเพียง 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเพิ่มขึ้นจาก 6.23 เป็น 8.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเลือกใช้ BAP ร่วมกับ NAA หรือการใช้ 2,4-D เพียงชนิดเดียวบนอาหารสูตร N6 ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากรังไข่ของข้าวได้

การชักนำให้เกิดต้นสีเขียว จากแคลลัสของรังไข่ พบว่าความสมดุลของออกซินและไซโตไนนินมีความสำคัญต่อการยืดตัวและการพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากของแคลลัสเป็นอย่างมาก (Raina, 1989) ถ้าอัตราส่วนของไซโตไคนินสูงกว่าออกซินแคลลัสจะพัฒนาไปเป็นยอดมากกว่ารากแต่ถ้าอัตราส่วนของออกซินสูงกว่าไซโตไคนินแคลลัสจะมีการพัฒนาไปเป็นรากมากกว่ายอด (ไพบูลย์, 2524) ในการทดลองนี้ประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดต้นสีเขียวบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีอัตราส่วนอัตราส่วนของไซโตไคนินสูงกว่าออกซิน แต่เมื่อทดลองเปลี่ยนชนิดของไซโตไคนินจาก BAP มาเป็น kinetin ไม่พบการเกิดต้นจากแคลลัสของรังไข่แต่อย่างใด การชักนำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์พบว่า แคลลัสที่มีลักษณะเกาะตัวแน่นจะให้ผลดีกว่าแคลลัสที่มีลักษณะการเกาะตัวแบบหลวม ๆ ซึ่งตรงกับรายงานของ Toriyama (1986)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การนับจำนวนโครโมโซม และตรวจสอบเซลล์ชั้นผิวของใบข้าว พบว่าต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงรังไข่ทั้งหมดมีลักษณะเป็นต้นแฮพลอยด์ แสดงให้เห็นว่าแคลลัสที่ได้จากรังไข่นั้นเกิดจากการแบ่งตัวของ haploid cell ภายในรังไข่ของข้าว สอดคล้องกับรายงานของ Zhou and Yang (1981 a,b) ซึ่งกล่าวไว้ว่าการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย ภายในรังไข่ของข้าวขณะเพาะเลี้ยงเกิดขึ้นเมื่อรังไข่เข้าสู่ระยะแกมีโทไพต์อย่างสมบูรณ์พวกเขาพบการเกิด proembryos จากการแบ่งเซลล์ของไข่บริเวณส่วนปลายของไมโครไพล์โดยการตัดเนื้อเยื่อรังไข่ของข้าวด้วยการฝังเนื้อเยื่อใน paraffin ในขณะเพาะเลี้ยงมาศึกษา ซึ่งตรงกับรายงานของ Kuo (1981) และ ผลการทดลองได้ผลเช่นเดียวกับ Huang และคณะ (1982) ที่ศึกษาในข้าวบาร์เลย์

ในการทดลองเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยการแช่ลำต้นส่วนที่เป็นข้อพบว่า ลำต้นที่แช่ในสารละลายโคลชิชินที่ความเข้มข้นสูงมากว่า 0.3 เปอร์เซ็นต์ ลำต้นส่วนใหญ่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หลังจากนำมาวางบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนเป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้นบริเวณที่เป็นสีน้ำตาลเปลี่ยนเป็นสีดำ และขยายออกไปจนเป็นสีดำทั้งหน่อ ทั้งนี้การตายของเซลล์ในเนื้อเยื่อบริเวณลำต้นในส่วนที่สัมผัสกับสารละลายโคลชิชินโดยตรง เนื่องจากความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ ทำให้เซลล์ที่ตายขัดขวางการดูดซึมสารอาหารเข้าสู่ลำต้นส่งผลให้เนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าวได้รับสารอาหารน้อยลงจนเนื้อเยื่อตายไปในที่สุด ประกอบกับ Morris (1983) ได้ตั้งสมมุติฐานว่า สาเหตุที่ชิ้นส่วนของพืชตายภายหลังได้รับสารละลายโคลชิชิน อาจเป็นเพราะเซลล์ที่ได้รับสารละลายโคลชิชิน ความเข้มข้นสูงจะเกิดการเปลี่ยนแปลงความหนืดของไซโทพลาสซึม และกระบวนการเมทาบอลิซึมภายในเซลล์ ซึ่งมีผลทำให้เซลล์ตายไปในที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงอับเรณูและการเพาะเลี้ยงรังไข่ การเพาะเลี้ยงอับเรณูมีประสิทธิภาพในการสร้างแคลัสสูงกว่าการเพาะเลี้ยงไข่ เนื่องจากรังไข่นั้นมีเพียง 1 ถุงเอมบริโอ ต่อ 1 รังไข่ ขณะที่อับเรณูมีไมโครสปอร์จำนวนมากใน 1 อับเรณู (Gosal *et al,* 1997) ทำให้โอกาสที่จะพัฒนาเป็นแคลลัสขนาดเล็กมีได้มากกว่า แต่เมื่อนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้พัฒนาเป็นต้นกลับพบว่าอัตราการเกิดต้นสีเขียวจากแคลลัสที่ได้จากรังไข่สูงกว่าที่ได้แคลลัสจากอับเรณู ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Gosal และคณะ (1997) ที่พบว่าอัตราการเกิดต้นสีเขียวจากการเพาะเลี้ยงถุงเอมบริโอสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ส่วนใหญ่เป็นแคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะตัวกันแน่นมีความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นได้มากกว่าแคลลัสที่เกาะตัวกันอย่างหลวมๆ (Toriyama, 1986) โดยแคลลัสที่เกาะตัวกันอย่างหลวมๆ เป็นลักษณะที่พบได้มากในแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจากนี้การตอบสนองในการชักนำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ยังพบว่า ขึ้นกับลักษณะทางพันธุกรรมของข้าวที่ใช้ในการทดลอง โดยพบว่าข้าวที่ให้ผลดีในการเลี้ยงได้จากลูกผสมกลับระหว่าง Rathu Heenati/KDML 105//Chainat 1 ในขณะที่ข้าวลูกผสมกลับระหว่าง Rathu Heenati/KDML 105 ที่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ก่อนเกิดการเปลี่ยนสีของแคลลัส ทำให้ได้ต้นที่อ่อนแอมากจนไม่สามารถที่จะเจริญได้ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved