บทที่ 4

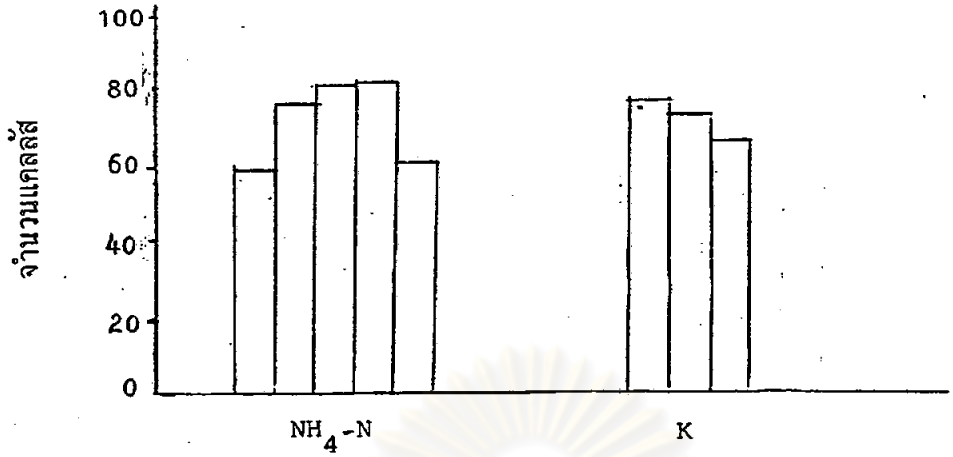
วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาผลของธาตุอาหารที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่จากแคลลัสของเอมบริโอข้าวนี้ใช้ข้าวพันธุ์ กข.23 ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์ดีที่นิยมปลูกกันแพร่หลายในประเทศไทย แคลลัสที่ใช้ในการทดลองนี้ได้จากการเลี้ยงเอมบริโอของเมล็ดแก่ในสูตรอาหารตาม Vajrabhaya et al. (1983) ซึ่งมีส่วนประกอบของธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรองและวิตามินตามสูตรของ Linsmaier และ Skoog (1965) ที่เติม kinetin 0.3 ppm 2,4-D 1 ppm ซูโครส และวุ้น 3 และ 0.8 เปอร์เซนต์ น้ำหนักต่อปริมาตรตามลำดับในการชักนำให้แคลลัสเจริญไปเป็นต้นใหม่ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวนับว่ายังมีปัญหามาก Vajrabhaya et al. (1984 a.) รายงานไว้ว่าการเจริญไปเป็นต้นใหม่จากแคลลัสของข้าวต้องการขั้นตอนสำคัญที่ต่อเนื่องกัน 2 ขั้นตอน คือ การที่แคลลัสเจริญไปเป็น greenspot ก่อน แล้วจึงเจริญต่อไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ อย่างไรก็ตามพบว่าในการชักนำให้แคลลัสเจริญไปเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์นั้น ยังมีปัญหาในข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ ของไทยหลายสายพันธุ์รวมทั้ง กข.23 ด้วย Vajrabhaya et al. (1984a.)พบว่าขั้นตอนแรกที่จะชักนำให้แคลลัสเปลี่ยนไปเป็นต้นนั้น สูตรอาหารที่ประกอบด้วยธาตุหลักของ White ซึ่งไม่เติมซูโครส และใช้น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซนต์ ให้ผลดีกว่าสูตรอาหารอื่น ๆ ที่มีธาตุอาหารหลักในปริมาณที่สูงกว่า การวิจัยนี้จึงอิงผลงานวิจัยในชั้นนี้ของ Vajrabhaya et al.(1984a) เพื่อที่จะศึกษาถึงผลของธาตุอาหารหลักต่าง ๆ อาทิ NO_3-N NH_4-N P K Ca และ Mg โดยเลือกใช้สูตรธาตุอาหารหลักตาม White (1963) ธาตุอาหารรองของ Murashige และ Skoog (1962) kinetin 3 มก./ล. IAA 1 มก./ล. และเพิ่มน้ำมะพร้าวซึ่งมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์หลายประเภทที่เสริมการเจริญและพัฒนาของแคลลัสเป็นสูตรเปรียบเทียบ แล้วเพิ่มหรือลดธาตุอาหารหลักเพื่อศึกษาอิทธิพลจากธาตุเหล่านั้น

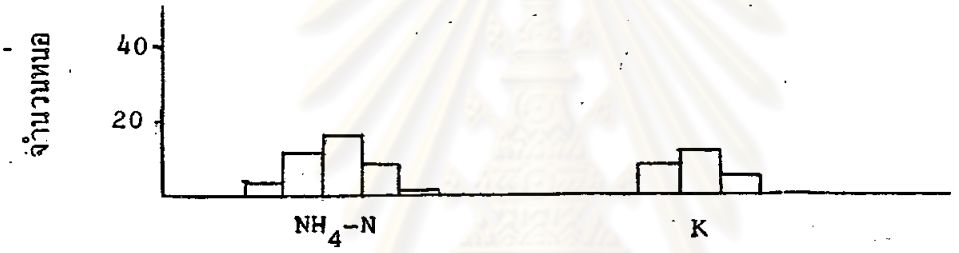
ในการวิจัยนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกเป็นการศึกษาผลของธาตุอาหาร 3 ธาตุ คือ N (ในรูปไนเตรตและแอมโมเนียม) P และ K ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่ และนำสูตรทดลองจากขั้นตอนแรกนี้ซึ่งให้ผลผลิตดี 10 อันดับแรก มาเลือกเพื่อเป็นสูตรทดลองในขั้นที่ 2 สำหรับศึกษาอิทธิพลของ Ca และ Mg ภายหลัง

จากผลการศึกษาอิทธิพลของ NO_3-N ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่ที่ความเข้มข้น 3.33, 9.51 และ 34.23 mM พบว่าความเข้มข้นระหว่าง 3.33 - 34.23 mM ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนแคลลัสที่มี greenspot และจำนวนหน่อไม่แตกต่างกันแต่ความเข้มข้น 3.33 mM มีผลต่อการเพิ่มจำนวนแคลลัสที่ให้รากอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งการที่ NO_3-N มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นในช่วงความเข้มข้น 3.33 - 34.23 mM ไม่แตกต่างกันนี้ Salisbury และ Ross (1977) กล่าวว่าเนื่องมาจาก NO_3-N นี้สามารถสะสมอยู่ภายในเซลล์พืชได้โดยไม่เป็นพิษ แต่ไม่เพิ่มการเจริญขึ้นตามความเข้มข้นของ NO_3-N ทั้งนี้อาจเนื่องจากการผลิต nitrate reductase ของเซลล์มีจำกัดหรือปัจจัยอื่นที่เกี่ยวกับเมตาบอลิซึมของไนเตรต Eeuwens (1976), Ohira และคณะ (1973), Yamaya และคณะ, (1978), Wetherell และ Dougall (1976) พบว่าแคลลัสมะพร้าว แคลลัสของข้าว และเอมบริโอจากแคลลัสของแคร์รอทป่า มีการเจริญเติบโตของแคลลัสและจำนวนของเอมบริโอเพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้นของ NO_3-N 20-40 mM

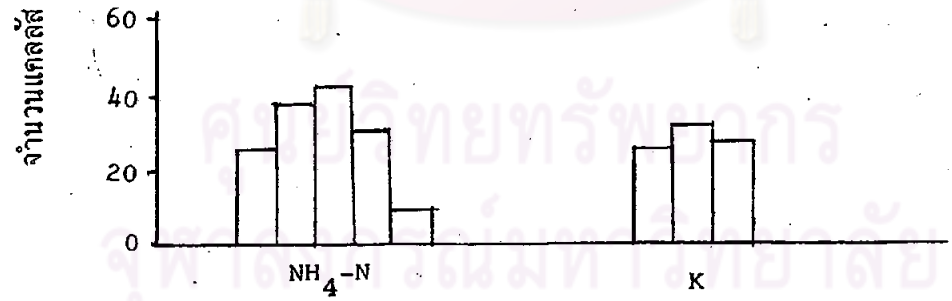
การศึกษาผลของ NH_4-N ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นที่ความเข้มข้น 0 0.8 3.2 12.8 และ 51.2 mM (กราฟที่ 1) พบว่า NH_4-N มีผลต่อการเพิ่มจำนวนแคลลัสที่ให้ greenspot ในช่วงความเข้มข้น 0.8 - 12.8 mM มีผลต่อากรเพิ่มจำนวนหน่อ ในช่วง 0.8 - 3.2 mM มีผลต่อการเพิ่มจำนวนแคลลัสที่ให้รากอยู่ในช่วง 0 - 12.8 mM การที่ NH_4-N มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นในช่วงกว้างคือ 0 ถึง 12.8 mM นั้นแสดงว่า NH_4-N เมื่อเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อจะช่วยส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่ของข้าวอย่างเห็นได้ชัด เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Ohira และคณะ (1973), Sargent และ King (1974), Wetherell และ Dougall (1976) ศึกษาในแคลลัสข้าวและแคร์รอทป่า อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้พบว่า NH_4-N ที่ความเข้มข้น 51.2 mM ให้ผลเลวลงในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากที่ระดับความเข้มข้นนี้เป็นระดับที่ทำให้ NH_4-N สะสมอยู่ในเซลล์ของข้าว Salisbury และ Ross (1977) กล่าวว่า NH_4-N จะไม่สะสมอยู่ในพืชเพราะมีพิษต่อพืชโดยไปยับยั้งการสร้าง ATP ในระบบการส่งผ่านอิเลคตรอนของไมโตคอนเดรียและการสังเคราะห์แสง (mitochondrial and photosynthesis electron transport system) ปกติพืชจะเก็บ NH_4-N ที่เข้าสู่เซลล์ในรูปกลูตามีน แล้วสะสมไว้ในรากหรือหัวของพืชเป็นส่วนใหญ่ และจากการศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ของ Vajrabhaya และ



ก. ผลของ NH_4-N และ K ต่อจำนวนแคลลัสที่มี greenspot (วัดผลในสัปดาห์ที่ 2)



ข. ผลของ NH_4-N และ K ต่อจำนวนหน่อ (วัดผลในสัปดาห์ที่ 6)



ค. ผลของ NH_4-N และ K ต่อจำนวนแคลลัสที่ให้ราก (วัดผลในสัปดาห์ที่ 6)

กราฟที่ 1 ผลของ NH_4-N และ K ที่มีต่อจำนวนแคลลัสที่มี greenspot จำนวนหน่อ และจำนวนแคลลัสที่ให้ราก
(เมื่อ NH_4-N มีความเข้มข้น 0, 0.8, 3.2, 12.8 และ 51.2 K มีความเข้มข้น 1.66, 6.64 และ 26.56 mM ตามลำดับ โดยเรียงจากซ้ายไปขวา และแสดงผลในรูปเปอร์เซ็นต์)

Vajrabhaya (1976) พบว่าการใส่ NH_4-N มากจะทำให้การเจริญเติบโตไม่ดี รายงานการทดลองของ Gamborg และคณะ (1968) ซึ่งศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อรากของถั่วพบว่า การเจริญเติบโตช้าลงเนื่องจาก NH_4^+ ไปมีผลต่อขบวนการ Kreb's cycle และ Staba (1980) ได้กล่าวถึงผลของ NH_4-N ที่ไปรบกวนการสร้างกลูตามีนทำให้ขบวนการนี้เปลี่ยนทิศทาง Ohira และคณะ (1973), Yamada และคณะ (1978), Wetherell และ Dougall (1976), Eeuwens (1976) ศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว แคร์รอทป่าและมะพร้าว พบว่า NH_4-N ส่งเสริมการเจริญเติบโตของแคลลัสในช่วง 5-10 mM

จากผลการทดลองสังเกตได้ว่าการใส่ไนโตรเจนทั้งสองรูปคือ ไนเตรตและแอมโมเนียมลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำให้ pH ของอาหารภายหลังการทดลองอยู่ในระหว่าง 5-7 ซึ่งไม่อยู่ในสภาพที่เป็นกรดหรือด่างมากเกินไป Ohira และคณะ (1973), Wetherell และ Dougall (1976) รายงานว่าช่วง pH ระหว่าง 4-7 เป็นช่วงที่เนื้อเยื่อสามารถเจริญเติบโตได้ ฉะนั้นการตอบสนองต่อ NO_3-N และ NH_4-N ที่ต่างกันจึงไม่น่าจะเกิดจากระดับความเป็นกรดและด่างในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ทำการทดลองนี้

ผลของ P ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นนั้นศึกษาที่ความเข้มข้น 0.12 0.48 และ 1.92 mM พบว่าที่ความเข้มข้นทั้ง 3 ระดับนี้มีผลต่อการเพิ่มจำนวนแคลลัสที่ให้ green-spot จำนวนหน่อและจำนวนแคลลัสที่เกิดรากไม่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงว่า P สามารถใช้ในความเข้มข้นช่วงกว้างโดยไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นของเนื้อเยื่อข้าวเพราะในการทดลองนี้ได้เพิ่ม P จากสูตร White (1963) ถึง 16 เท่า (1.92 mM) ก็ไม่ให้ผลต่างไปจากสูตรเดิม จากผลการทดลองของ Vajrabhaya และคณะ (1985) ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่ของข้าวพบว่า เมื่อเพิ่ม P จากสูตรของ White (1963) 10 เท่า โดยไม่ใส่ซูโครสให้ผลดี เมื่อเติมซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ลงไปจะทำให้ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่ และเป็นผลให้เซลล์ตายในที่สุด เมื่อเพิ่ม P เป็น 20 เท่า เซลล์ที่เลี้ยงจึงจะเจริญได้แต่ก็ไม่ดีเท่ากับเมื่อไม่ใส่ซูโครส จากการทดลองนี้แสดงว่า P ที่ความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นที่ใช้ในสูตร White (1963) คือ 0.12 mM เพียงพอต่อการเจริญแล้ว นอกจากนี้ในการทดลองนี้ยังใส่น้ำมะพร้าวซึ่งพบว่ามี P อยู่แล้ว และไม่ใส่น้ำตาล จึงเป็นที่น่าสังเกตว่า P อาจมีความสัมพันธ์กับน้ำตาลและปริมาณ P ที่มีอยู่ในสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อ

ผลของ K ต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้น ศึกษาที่ความเข้มข้น 1.66, 6.64 และ 26.56 mM (กราฟที่ 1) พบว่า K ที่ช่วงความเข้มข้น 1.66-6.64 mM มีผลต่อการเพิ่มจำนวนแคลลัสที่มี greenspot จำนวนหน่อและจำนวนแคลลัสที่ให้รากไม่แตกต่างกัน Ohira และคณะ (1973) พบว่า K ระหว่างช่วงความเข้มข้น 0-100 mM จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อข้าวที่เลี้ยงไม่มากนัก (30%) จากการทดลองสังเกตได้ว่านอกจาก N แล้วพบว่า K มีบทบาทส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นของข้าว Salisbury และ Ross (1977) Brown และคณะ (1976) กล่าวว่า K เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมากและมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์ นอกจากนี้ Staba (1980) รายงานว่า K^+ เป็นอิออนที่ช่วยรักษาความเป็นกลางของประจุไฟฟ้าในเซลล์

ผลของ Ca ต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นที่ความเข้มข้น 0.32, 1.27 และ 5.08 พบว่าช่วงความเข้มข้น 0.32-5.08 mM มีผลต่อการเพิ่มจำนวนแคลลัสที่ให้ greenspot จำนวนหน่อและจำนวนแคลลัสที่ให้รากไม่แตกต่างกัน Gamborg และคณะ (1968) ศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลืองพบว่า Ca ที่ความเข้มข้นระหว่าง 1.5 ถึง 6 mM แคลลัสเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน การศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวของ Ohiraและคณะ (1973) พบว่า Ca ความเข้มข้น 0.2-1 mM และความเข้มข้นสูงกว่านี้จะทำให้การเจริญเติบโตลดลง จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า Ca ที่ความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นในสูตร White (1963) คือ 1.27 mM นั้นเพียงพอแล้ว นอกจากนี้ Salisburyและ Ross (1977) พบว่าแม้พืชชั้นสูงจะต้องการ Ca ในปริมาณต่ำเพื่อรักษาโครงสร้างและคุณสมบัติในการยอมให้สารผ่านเข้าออกของเยื่อหุ้มเซลล์ แต่การขาด Ca ก็มีผลยับยั้งการพัฒนาของหน่อ และทำให้ปลายรากตาย

การศึกษาผลต่างของ Mg ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นที่ความเข้มข้น 0.73 และ 2.92 mM พบว่าที่ช่วงความเข้มข้น 0.73-2.92 mM มีผลต่อการเพิ่มจำนวนแคลลัสที่มี greenspot จำนวนหน่อและจำนวนแคลลัสที่เกิดรากไม่แตกต่างกัน Ohira และคณะ (1973) พบว่า Mg ความเข้มข้น 0.5 ถึง 5 mM ให้ผลดีต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อข้าว จากการทดลองนี้แสดงว่า ความเข้มข้นของ Mg เท่ากับสูตรของ White (1963) เพียงพอต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่ของข้าว

จากการสังเกตความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของ NH_4-N และ K ซึ่งมีผลต่อการเกิดหน่อ และขนาดแคลลัสพบว่า แคลลัสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม. ขึ้นไปในสัปดาห์ที่ 2 มีโอกาสให้จำนวนหน่อมากกว่าแคลลัสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-5 มม. เมื่อวัดผลในสัปดาห์ที่ 6 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแคลลัสที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม. ขึ้นไป ในสัปดาห์ที่ 2 เป็นแคลลัสที่มีการเจริญเติบโตดีกว่าแคลลัสขนาดอื่น ๆ และมีเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวมากกว่าแคลลัสอื่น ๆ ซึ่งเป็นผลให้สามารถพัฒนาไปเป็นหน่อได้มากกว่าแคลลัสขนาดอื่น ๆ Steward และ Krikorian (1971) การเจริญเติบโตของเซลล์จะต้องมีการเพิ่มจำนวนและการขยายขนาดของเซลล์ที่สมดุลย์กัน Dodds และ Roberts (1982) รายงานการศึกษาของ Torrey (1966) ว่าการเกิด organogenesisในแคลลัสนั้นเริ่มจากกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่าเมอริสเตมอยด์ (meristemoid) ซึ่งสามารถตอบสนองต่อปัจจัยต่าง ๆ ภายในเนื้อเยื่อในการสร้างตาหน่อ

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนหน่อและลักษณะต่าง ๆ ของแคลลัสคือ ขนาดสีพื้นที่ greenspot และพื้นที่รากบนพื้นที่ผิวของแคลลัส พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 จำนวนหน่อสัมพันธ์พื้นที่รากในทางบวก ในสัปดาห์ที่ 4 จำนวนหน่อสัมพันธ์กับพื้นที่รากและสีของแคลลัสในทางบวก ในสัปดาห์ที่ 6 จำนวนหน่อสัมพันธ์กับพื้นที่ราก สีของแคลลัส และพื้นที่ greenspot ในทางบวก และสัมพันธ์กับขนาดของแคลลัสในทางลบ ผลการศึกษาแสดงว่าเมื่อจำนวนหน่อเพิ่มขึ้น พื้นที่รากจะเพิ่มขึ้น ซึ่งการเกิดหน่ออาจทำให้ระดับฮอร์โมนภายในแคลลัสเหมาะสมต่อการเกิดรากและเมื่อเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลานาน 4 ถึง 6 สัปดาห์ พบว่ามีลักษณะอื่น ๆ มาเกี่ยวข้องด้วยคือ จะเพิ่มขึ้นเมื่อแคลลัสมีพื้นที่สีดำน้อย ซึ่งแสดงว่าแคลลัสยังมีการเจริญเติบโตดีมีพื้นที่ที่เซลล์ตายน้อยและมีพื้นที่ greenspot บนพื้นที่ผิวแคลลัสเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงแนวโน้มที่จะเจริญไปเป็นหน่อมากขึ้น แต่ขนาดของแคลลัสไม่เพิ่มซึ่งอาจเนื่องจากแคลลัสในสัปดาห์ที่ 6 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม. ขึ้นไปในการทดลองนี้วัดผลขนาดแคลลัสเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 2-6 มม. แคลลัสที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่กว่า 6 มม. จะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับแคลลัสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม. ขึ้นไป หรืออาจเนื่องจากแคลลัสมีการเจริญเติบโตช้าลงแต่มีการสะสมอาหารเพื่อส่งเสริมการเจริญของหน่อและราก Dodds และ Robert รายงานการศึกษาของ Gresshoff (1978) ว่าการเกิดรากมักพบภายหลังจากการเกิดหน่อในเนื้อเยื่อที่เลี้ยง และเชื่อว่าการพัฒนาของหน่อจะเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนภายในเนื้อเยื่อที่เลี้ยง และได้รายงานการศึกษา

การศึกษาของ Thorpe (1978) ว่าแคลลัสที่มีหน่อมีการสะสมอาหารพวกแป้งซึ่งคาดว่าจำเป็นต้องใช้ในระหว่างการเกิดหน่อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย