บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้จะแบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหวนกลับเป็นต้นของแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะของข้าวโพดและการสร้างสายพันธุ์ของข้าวโพดที่มีพันธุกรรมในการผลิตเมทไธโอนีนในระดับสูงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์

ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเพื่อให้ผลิตเมทไธโอนีนสูงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์นั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องพัฒนาเทคนิคในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อที่จะสามารถควบคุมการหวนกลับเป็นต้นจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงให้มีประสิทธิภาพดีเสียก่อน การชักนำให้เกิดต้นจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของข้าวโพดประสบความสำเร็จครั้งแรก โดย Green และ Phillips ในปี 1975 แต่ประสิทธิภาพในการเกิดต้นยังคงต่ำอยู่ หลังจากนั้นได้มีการศึกษาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการหวนกลับเป็นต้นอีกมากมาย (Lu et al., 1983 ; Duncan et al, 1985 ; Hodges et al,1991) ซึ่งสามารถพัฒนาวิธีการจนเป็นที่น่าพอใจได้ อย่างไรก็ดีการศึกษาดังกล่าวนั้น พันธุ์ข้าวโพดที่ใช้เป็นพันธุ์ต่างประเทศซึ่งไม่ได้ใช้เป็นปกติในประเทศไทย วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้มุ่งที่จะปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวโพดของไทย โดยคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถเพิ่มระดับการผลิตกรดอะมิโนได้สูงโดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์ ดังนั้นขั้นตอนที่สำคัญที่สุดคือการมีเทคนิคที่แน่นอนและเชื่อถือได้ในการพัฒนาให้เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงหวนกลับเป็นต้น โดยมุ่งเน้นที่ข้าวโพดสายพันธุ์ไทย ซึ่งสามารถปลูกและเจริญได้ดีในสภาวะภูมิอากาศของไทยเอง สำหรับการวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวโพดไทยเท่าที่ติดตามเอกสารมีน้อยมาก

สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ พันธุ์สุวรรณ 3 ซึ่งเป็นพันธุ์ผสมเปิด, KTX 3101 เป็นพันธุ์ลูกผสมสามทาง, KSX 2301 เป็นพันธุ์ลูกผสมสองทาง และ Ki7 เป็นพันธุ์ผสมตัวเอง พันธุ์ผสมเปิดจะมีการกระจายตัวของพันธุกรรมสูง พันธุ์ลูกผสมจะมีพันธุกรรมที่เป็น heterozygous และพันธุ์ผสมตัวเองมีพันธุกรรมแบบ homozygous สายพันธุ์ที่เลือกใช้เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีผสมเกสรและคัดเลือกพันธุ์ จากศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ ซึ่งมีลักษณะดีที่เหมาะสมต่อการปลูกในประเทศไทย คือ มีผลผลิตสูง ต้านทานต่อโรคราสนิม และราน้ำค้างได้ดี การใช้สายพันธุ์ที่มีพันธุกรรมต่างกันทั้ง 3 แบบในงานวิจัยนี้ เพื่อให้มีความหลากหลายของพันธุกรรม ทำให้โอกาสที่จะพบสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นมากขึ้น

ทั้งนี้เนื่องจากปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการพัฒนาไปเป็นต้นของข้าวโพดคือ พันธุกรรม (Green และ Phillips, 1975) นอกเหนือจากปัจจัยภายในอื่น ๆ ของพืช เช่น อิทธิพลของอายุสรีรวิทยาของเนื้อเยื่อ (Green, 1977) ชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (Rhodes et al., 1986) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยภายนอก เช่น ชนิดของอาหารและสารควบคุมการเจริญ (fahey et al.,1986; Duncan et al,1989) เหล่านี้เป็นต้น

ลักษณะของการพัฒนาไปเป็นต้นจากแคลลัสของข้าวโพดอาจเป็นแบบออกาโนเจเนซีส (Lowe et al.,1985) หรือเอมบริโอเจเนซีส โดยผ่าน somatic embryo (Kamo et al, 1985) เนื่องจากโดยทั่วไปแล้วพัฒนาการแบบเอมบริโอเจเนซีสจะมีศักยภาพในการเกิดต้นสูงกว่าและการเกิดต้นจะมีการเชื่อมต่อของระบบรากและลำต้นสมบูรณ์ ดังนั้นงานวิจัยจึงมุ่งเน้นที่จะหาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อที่จะชักนำให้ได้เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงที่มีความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นโดยผ่านพัฒนาการแบบเอมบริโอเจเนซีส

ชนิดของเนื้อเยื่อข้าวโพดที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงและประสบความสำเร็จในการหวนกลับเป็นต้นมีหลายชนิด อาทิเช่น ช่อดอกอ่อน (Reddy และ Petolino, 1990), ช่อดอกตัวผู้ (Rhodes et al.,1986), เมล็ด (Duncan et al., 1989), คัพภะแก่ (Wang, 1987), คัพภะอ่อน (Green และ Phillips,1975) อย่างไรก็ตามจากรายงานการศึกษาต่าง ๆ พบว่าคัพภะอ่อนจะมีประสิทธิภาพในการหวนกลับเป็นต้นสูงสุด (Kamo et al.,1985; Ducan et al., 1985)

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้คัพภะอ่อนและคัพภะแก่ เป็นแหล่งของเนื้อเยื่อเพื่อการเพาะเลี้ยง การเลือกใช้คัพภะอ่อน เนื่องจากมีศักยภาพในการหวนกลับเป็นต้นสูงตามที่ได้กล่าวไปแล้ว ส่วนการใช้คัพภะแก่เนื่องจากสามารถเตรียมได้จากเมล็ดพันธุ์โดยตรงไม่ต้องเสียเวลาในการปลูกต้นใหม่ และมีรายงานถึงความสำเร็จอยู่บ้าง (Wang, 1987)

4.1 การศึกษาอิทธิพลของลักษณะทิศทางการวางของคัพภะอ่อนต่อการเกิดเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

เนื่องจากสองด้านของคัพภะอ่อนประกอบด้วยเนื้อเยื่อต่างชนิดกัน คือ ด้านหนึ่งเป็นส่วนของ scutellum ส่วนอีกด้านหนึ่งเป็น embryonic axis ที่ประกอบด้วย plumule และ radical ดังนั้นทิศทางการวางของคัพภะอาจจะมีผลต่อการเกิดแคลลัสได้ จากการศึกษาอิทธิพลของการวางชิ้นส่วนของคัพภะข้าวโพดในสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารเพาะเลี้ยง ผลการศึกษา

พบว่า เมื่อวางด้าน embryonic axis สัมผัสกับอาหารจะเกิดแคลลัสขึ้นจาก scutellum มากถึง 84 เปอร์เซนต์ แต่เมื่อกลับเอาด้าน scutellum สัมผัสกับอาหารลง จะเกิดแคลลัสจากด้าน embryonic axis เพียง 12 เปอร์เซนต์ เท่านั้น ดังนั้นในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะอ่อนของข้าวโพดในการทดลองนี้จึงวางด้าน embryonic axis สัมผัสกับอาหารทุกครั้ง

มีรายงานการศึกษาพบว่า เซลล์แคลลัสข้าวโพดจะเกิดจาก scutellum ได้ดีเมื่อวางด้าน embryonic axis สัมผัสกับอาหาร และเมื่อวางด้าน scutellum สัมผัสกับอาหาร จะเกิดแคลลัสขึ้นจากด้าน embryonic axis เพียงเล็กน้อยเช่นเดียวกัน

4.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้น

4.2.1 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะแก่

ในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะแก่จะนำคัพภะของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 และ KTX 3101 มาแบ่งครึ่งเป็น 2 ส่วนตามความยาวตามวิธีของ Wang (1987) ทั้งนี้เนื่องจากคัพภะแก่จะมีขนาดใหญ่ การแบ่งออกเป็น 2 ส่วน จะช่วยให้การซึมผ่านของอาหารไปสู่เนื้อเยื่อเป็นไปอย่างทั่วถึง ลักษณะแคลลัสที่ได้ของทั้ง 2 สายพันธุ์ จะมีสีขาวออกน้ำตาลเกาะตัวกันหลวม ๆ ชุ่มน้ำ คล้ายคลึงกัน สายพันธุ์สุวรรณ 3 จะมีศักยภาพในการเกิดแคลลัสสูงกว่าสายพันธุ์ KTX 3101 ในทุกสูตรอาหาร การที่สายพันธุ์ KTX 3101 เกิดแคลลัสต่ำกว่าอาจเนื่องมาจากปัจจัยทางด้านพันธุกรรมของพืชเอง หรือความไม่สมบูรณ์ของเมล็ดพันธุ์ก็เป็นได้

ในการศึกษานี้ใช้ฮอร์โมนกลุ่มออกซิน (auxin) คือ 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเท่านั้น เนื่องจากมีรายงานว่า 2,4-D จะให้ผลในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะแก่ของข้าวโพดดีกว่า NAA และ IAA แต่ความสามารถในการเกิดแคลลัสจะขึ้นอยู่กับปัจจัยทางพันธุกรรมอีกด้วย (Wang, 1987) จากผลการศึกษาพบว่าอาหารทั้ง 4 สูตร ที่ใช้มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะแก่ได้ดี 2,4-D ความเข้มข้น 1 และ 2 มก./ล. ให้เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสใกล้เคียงกัน แต่อาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงสุดในทั้ง 2 สายพันธุ์

4.2.2 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะอ่อน

คัพภะอ่อนเป็นเนื้อเยื่อของข้าวโพดที่พบว่ามีศักยภาพสูงในการที่จะชักนำให้เกิดแคลลัสที่สามารถหวนกลับเป็นต้นได้ อาหารสูตรพื้นฐานที่นิยมใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะอ่อน ได้แก่ สูตร N_6 และ MS จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ฮอร์โมนพืชที่มีความสำคัญต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะอ่อนของข้าวโพดได้แก่ 2,4-D ซึ่งเป็นฮอร์โมนในกลุ่มออกซินเท่านั้น โดยที่ไม่ต้องการฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนินเลย (Linsmaier-Bednar และ Bednar, 1972) การเสริมด้วยฮอร์โมนไซโตไคนินบางชนิด เช่น ABA ร่วมกับ 2,4-D กลับพบว่ามีการพัฒนาของ somatic embryo ลดลงเทียบกับเมื่อใช้ 2,4-D เพียงอย่างเดียว (Kamo et al., 1985)

ในงานวิจัยนี้อาหารที่ใช้ในการทดลองเป็นสูตร N_6 และ MS ดัดแปลงที่เสริมด้วย 2,4-D 1 และ 2 มก./ล. การเกิดแคลลัสของสายพันธุ์ KSX 2301, KTX 3101, Ki7 และสุวรรณ 3 มีลักษณะเหมือนกัน คือ จะเกิดจากส่วน scutellum แคลลัสที่เกิดขึ้นจำแนกได้เป็น 2 ชนิด ที่แตกต่างกัน คือ ชนิด compact และชนิด friable สายพันธุ์ KTX 3101, KSX 2301 จะให้แคลลัสชนิด friable เพียงอย่างเดียว ในขณะที่สายพันธุ์สุวรรณ 3 และ Ki7 จะเกิดแคลลัสทั้ง 2 ชนิด มีรายงานว่าธัญญพืชโดยส่วนใหญ่แล้วลักษณะของเอมบริโอเจนิกแคลลัสมักจะเป็นชนิด compact ซึ่งสามารถหวนกลับเป็นต้นได้ ขณะที่แคลลัสชนิด friable จะเป็นนอนเอมบริโอเจนิกแคลลัส ซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็นรากได้เท่านั้น (Freeling et al,1976 ; King et al, 1978 ; Mott และ Cure, 1978 ; Ozias-Akins และ Vasil, 1982) สำหรับเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพด พบทั้งที่เป็น compact (Green และ Phillips , 1975 ; Lu et al, 1982) และชนิด friable (Green และ Rhodes, 1982 ; Kamo et al., 1985) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของข้าวโพด และชนิดของอาหารเพาะเลี้ยง เหตุผลที่คัพภะอ่อนของสายพันธุ์เดียวกันสามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสที่มีลักษณะภายนอกที่แตกต่างกัน 2 ชนิด ภายใต้สภาวะเพาะเลี้ยงเดียวกันยังไม่สามารถอธิบายได้ แต่คาดว่าเนื่องมาจากความเหมาะสมระหว่างปัจจัยของอาหารและสารควบคุมการเจริญ กับปัจจัยทางสรีระวิทยาของแหล่งเนื้อเยื่อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (Reddy et al.,1990) อย่างไรก็ดีแคลลัสชนิด compact ของสายพันธุ์สุวรรณ 3 และ Ki7 จะมีการเจริญสูงกว่าแคลลัสชนิด friable ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Rao และคณะ (1990) ที่รายงานว่าแคลลัสชนิด compact จะมีการเจริญรวดเร็วกว่าชนิด friable เช่นกัน

จากการศึกษาประสิทธิภาพของการเกิดแคลลัสของข้าวโพดพบว่าพันธุ์ลูกผสมคือสายพันธุ์ KTX 3101 และ KSX 2301 จะมีเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสต่ำที่สุด ในขณะที่สายพันธุ์ผสมตัวเอง คือ สายพันธุ์ Ki7 มีเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Vasil และคณะ (1984), Kamo และคณะ (1986) ที่สรุปว่าโดยทั่วไปข้าวโพดสายพันธุ์ลูกผสมจะเกิดแคลลัสได้ยาก ในขณะที่พันธุ์ผสมตัวเองจะเกิดแคลลัสได้ดี ข้อมูลในการทดลองยังแสดงให้เห็นด้วยว่า 2,4-D ความเข้มข้น 1 และ 2 มก./ล. ให้ผลในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ใกล้เคียงกันในทั้ง 2 สูตรอาหารและทุกสายพันธุ์

จากการเปรียบเทียบความสามารถในการเกิดแคลลัสระหว่างคัพภะแก่และคัพภะอ่อน พบว่าแหล่งของเนื้อเยื่อที่ใช้มีผลต่อการพัฒนาไปเป็นแคลลัสขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ สายพันธุ์ KTX 3101 คัพภะอ่อนจะมีการเจริญไปเป็นแคลลัสได้ดีกว่าคัพภะแก่ แต่สายพันธุ์สุวรรณ 3 คัพภะทั้ง 2 ชนิด จะให้แคลลัสใกล้เคียงกัน ลักษณะเช่นเดียวกันนี้สามารถพบได้จากรายงานการศึกษาในข้าวโพดบางสายพันธุ์ เช่น สายพันธุ์ B73 คัพภะทั้ง 2 ชนิดจะให้เอมบริโอเจนิกแคลลัสใกล้เคียงกัน ขณะที่บางสายพันธุ์เช่น Mo17 คัพภะอ่อนจะให้เอมบริโอเจนิกแคลลัสสูงกว่า (Wang , 1987 ; Fahey et al.,1986)

4.2.3 การหวนกลับเป็นต้นจากแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะแก่และคัพภะอ่อน

โดยทั่วไปการชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสที่ชักนำจากส่วนต่างๆของข้าวโพดทำได้โดยการย้ายชิ้นแคลลัสลงบนอาหารที่ไม่เสริมฮอร์โมน หรือ อาจเติมฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนิน เช่น BAP ลงไป แต่ที่สำคัญคือต้องไม่มีฮอร์โมนกลุ่มออกซินอยู่ในอาหารชักนำให้เกิดต้น ออกซินสามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของแคลลัสจากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของพืชได้ ขณะเดียวกันก็ยับยั้งการพัฒนาของยอดจากแคลลัสได้เช่นเดียวกัน (Dixon,1987) เมื่อย้ายแคลลัสลงบนอาหารชักนำให้เกิดต้นร่วมกับการให้แสงที่พอเหมาะ จะมีการพัฒนาของเอมบริโอเจนิกแคลลัสไปเป็นต้น โดยผ่านพัฒนาการแบบเอมบริโอเจเนซีส หรือ ออกาโนเจเนซีส การเติมไซโตไคนินบางชนิดลงไปก็เพื่อช่วยให้มีการพัฒนาของยอดได้ดีขึ้น (Reddy et al., 1990)

ข้อมูลจากการทดลองพบว่าแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะแก่ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้เลยในทุกสายพันธุ์ ในขณะที่แคลลัสที่ชักนำจากคัพภะอ่อนของสายพันธุ์ Ki7 และ สุวรรณ 3 สามารถหวนกลับเป็นต้นได้ เมื่อพิจารณาในสายพันธุ์สุวรรณ 3 แคลลัสจากคัพภะอ่อนสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ โดยที่แคลลัสจากคัพภะแก่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความ

แตกต่างของอายุและสรีรสภาพของคัพภะ คัพภะอ่อนเป็นระยะเริ่มต้นของการพัฒนาของกลุ่มเซลล์ ดังนั้นเซลล์ของเนื้อเยื่อเจริญจึงเจริญได้ดี และสามารถควบคุมทิศทางการเปลี่ยนแปลงให้เปลี่ยนเป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นได้ง่าย ขณะที่คัพภะแก่เป็นระยะแก่ทางสรีรวิทยา เซลล์ต่าง ๆ อาจมีการเปลี่ยนรูปข้ามไปเป็นเซลล์ขั้นตอนอื่น ๆ ซึ่งเปลี่ยนแปลงกลับไปเป็นต้นได้ยาก การควบคุมให้เซลล์ขั้นนี้เปลี่ยนกลับไปเป็นต้นได้จะต้องหาชนิดและอัตราส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมใหม่ ลักษณะเช่นเดียวกันนี้สามารถพบได้ในพืชชนิดอื่น ๆ เช่น ถั่วเหลือง (Li et al., 1985 ; พงศ์ยุทธ, 2535)

จากการศึกษาพบว่าแคลลัสชนิด compact เท่านั้นที่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ ขณะที่แคลลัสชนิด friable จะพัฒนาไปเป็นรากเท่านั้น จากผลการวิจัยโดย Armstrong และ Phillips (1985) พบว่า อาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย L-proline อาจจะช่วยชักนำให้เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสชนิด friable จากคัพภะได้ดี แต่ข้อมูลจากผลการทดลองในงานวิจัยนี้พบว่าแคลลัสชนิด friable ที่พบทั้งหมด เป็นนอนเอมบริโอเจนิกแคลลัสที่ไม่สามารถหวนกลับเป็นต้นได้เลย กล่าวได้ว่าเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์ Ki7 และ สุวรรณ 3 ที่ชักนำจากอาหารทั้ง 4 สูตร เป็นแคลลัสชนิด compact เท่านั้น ดังนั้นศักยภาพในการชักนำให้เกิดต้นจึงไม่ได้ขึ้นอยู่กับเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส แต่ขึ้นอยู่กับว่าจะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสชนิด compact ได้มากน้อยเพียงใด

ในการศึกษาและวิจัยที่ใช้แหล่งเซลล์ข้าวโพดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยทั่วไปกระทำโดยใช้สายพันธุ์ที่เป็นพันธุ์ผสมตัวเองซึ่งมีลักษณะทางพันธุกรรมคงที่มีการกระจายตัวน้อย เนื่องจากมีรายงานว่าสายพันธุ์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการหวนกลับเป็นต้นสูง (Lu et al.,1983; Fahey et al.,1986; Duncan et al.,1989) การหวนกลับเป็นต้นของสายพันธุ์ลูกผสมขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของพ่อและแม่เป็นอย่างมาก ลูกผสมที่ได้จากพ่อและแม่ที่มีความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นสูง ก็จะมีประสิทธิภาพในการหวนกลับดังกล่าวได้สูงขึ้นด้วย (Kamo et al.,1986) สำหรับข้าวโพดพันธ์ผสมเปิดยังไม่พบว่ามีรายงานการศึกษาเทคนิคและสภาวะที่เหมาะสมในการหวนกลับไปเป็นต้นของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงมาก่อนเลย ข้อมูลจากผลการทดลองนี้ยืนยันถึงความยุ่งยากในการหวนกลับเป็นต้นของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงข้าวโพดลูกผสม ดังจะเห็นได้จากแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะอ่อนของสายพันธุ์ KSX 2301 และ KTX 3101 ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ ในขณะที่สายพันธุ์ผสมตัวเอง (Ki7) และพันธุ์ผสมเปิด (สุวรรณ 3) สามารถหวนกลับเป็นต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สายพันธุ์ Ki7 ให้เอมบริโอเจนิกแคลลัสเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. เท่านั้น ส่วนสายพันธุ์สุวรรณ 3 ให้เอมบริโอเจนิกแคลลัสในอาหารทุกสูตร แต่ในสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. จะให้ผลดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ Ki7 และ สุวรรณ 3 พบว่าสายพันธุ์สุวรรณ 3 จะให้เปอร์เซนต์เอมบริโอเจนิกแคลลัสสูงกว่า ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงได้เลือกใช้สายพันธุ์สุวรรณ 3 เป็นแม่แบบในการทดลอง

4.2.4 การจำแนกชนิดของแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะอ่อน

จากการศึกษาแคลลัสทั้งชนิด compact และ friable ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. ซึ่งได้ทำการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องนานถึง 6 เดือน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแคลลัสชนิด compact เท่านั้นที่ยังคงความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นใหม่ จึงเป็นเครื่องยืนยันว่าแคลลัสที่มีลักษณะ compact ของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ควรเป็นเอมบริโอเจนิกแคลลัส มีรายงานว่าเอมบริโอเจนิกแคลลัสอาจเปลี่ยนแปลงไปเป็นนอนเอมบริโอเจนิกแคลลัสได้เมื่อเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลานาน แต่จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงของนอนเอมบริโอเจนิกแคลลัสกลับมาเป็นเอมบริโอเจนิกแคลลัสเลย (Duncan et al., 1985 ; Wang และ Nguyen, 1990)

เอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 สามารถหวนกลับเป็นต้นคิดเป็น % plant regeneration ประมาณ 90 เปอร์เซนต์ เท่ากันทั้งสูตรอาหารพื้นฐาน N_6 และ MS ซึ่งมีค่าค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับเอมบริโอเจนิกแคลลัสที่ได้จากส่วนอื่นของข้าวโพด เช่น ช่อดอกอ่อน ซึ่งมี % plant regeneration เพียง 50 เปอร์เซนต์ (Reddy et al.,1990) การที่อาหารสูตรพื้นฐานทั้ง 2 ชนิด ให้ % plant regeneration ใกล้เคียงกัน ชี้ให้เห็นว่าชนิดของสูตรอาหารพื้นฐานทั้ง 2 ชนิด ไม่น่ามีผลต่อการชักนำให้เกิดต้นจากเอมบริโอเจนิกแคลลัส ปัจจัยที่ควรมีผลกระทบต่อการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสน่าจะได้แก่ ฮอร์โมนและการให้แสง (Dixon , 1987) นอกจากนี้ยังช่วยยืนยันว่าความแตกต่างของ % plant regeneration ของอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ (การทดลองที่ 3.3.3) น่าจะเป็นผลมาจากอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสเท่านั้น ไม่ได้เกิดจากความแตกต่างของชนิดของสูตรอาหารพื้นฐานในอาหารชักนำให้เกิดต้น

4.3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3

4.3.1 การศึกษาขนาดของคัพภะที่เหมาะสมในการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส

เนื่องจากในการเก็บตัวอย่างไม่สามารถกำหนดอายุของฝักข้าวโพดที่เก็บจากแปลงได้แน่นอนโดยจะมีความผันแปรอยู่ในช่วง 1-3 วัน นอกจากนี้ในข้าวโพดฝักเดียวกันคัพภะก็ยังได้รับการผสมไม่พร้อมกันจึงมีขนาดที่แตกต่างกัน ดังนั้นในการศึกษาถึงอิทธิพลของคัพภะจะใช้ขนาดคัพภะแทนอายุของฝัก เพราะสามารถกำหนดและจำแนกได้ชัดเจนแน่นอนกว่า

คัพภะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงส่วนใหญ่จะมีขนาดประมาณ 1.5-3.0 มม. ขนาดของคัพภะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสจะแปรผันไปตามชนิดของอาหาร , สารควบคุมการเจริญ และสภาวะในการเพาะเลี้ยง Green และ Phillips (1975) พบว่าคัพภะขนาด 3 มม. จะเหมาะสมที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ล. และให้แสง 16 ชม./วัน Kamo และคณะ (1985) พบว่าคัพภะขนาด 1.7 มม. จะเหมาะสมที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 0.5-2 มก./ล. เมื่อเพาะเลี้ยงในที่มืด

จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในสายพันธุ์สุวรรณ 3 พบว่าขนาดของคัพภะที่เหมาะสมที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. คือขนาด 1.5 มม. ซึ่งจะให้เอมบริโอเจนิกแคลลัสสูงกว่าขนาด 2 มม. ประมาณ 2 เท่า โดยที่คัพภะขนาด 3 มม. ขึ้นไปจะไม่เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสเลย ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญในการเลือกอายุฝักข้าวโพดที่ใช้เป็นแหล่งของคัพภะ คัพภะขนาด 1.5 มม. จะได้จากฝักอ่อนอายุประมาณ 13 วันหลังผสม และเมื่อใช้คัพภะขนาดใหญ่กว่า 3 มม. คือ มีอายุมากกว่า 17 วันหลังผสม จะไม่สามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสได้

อิทธิพลของความแตกต่างของขนาดคัพภะต่อความสามารถในการชักนำให้เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส อาจเนื่องมาจากระดับของการพัฒนาที่แตกต่างกันของคัพภะ Green (1977) รายงานว่า คัพภะขนาดใหญ่กว่า 3 มม. จะมีพัฒนาการที่เสร็จสิ้นสมบูรณ์ซึ่งไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่หวนกลับเป็นต้นได้ สำหรับคัพภะที่มีขนาดเล็ก เนื้อเยื่อเจริญยังมีการพัฒนาที่ยังไม่ถึงจุดสมบูรณ์จึงสามารถควบคุมและกระตุ้นให้พัฒนาไปเป็นเอมบริโอเจนิกแคลลัสได้ง่าย นอกจากนี้ ยังพบว่าปัจจัยความสมดุลของฮอร์โมนกับเนื้อเยื่อพืชก็มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการหวนกลับเป็นต้น ความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เหมาะสมจะเปลี่ยนไปเมื่อขนาดของคัพภะต่างกัน ซึ่งหมายถึง

อายุของคัพภะต่างกัน

4.3.2 การศึกษาชนิดของอาหารและสารควบคุมการเจริญที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส

อาหารสูตรพื้นฐานที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวโพด ได้แก่ สูตร N_6 และ MS จากข้อมูลการศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้พบว่าอาหารสูตรพื้นฐาน MS จะให้เปอร์เซนต์การเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสสูงกว่าสูตร N_6 ซึ่งให้ผลตรงข้ามกับงานวิจัยของ Duncan และคณะ (1985) และ Hodges และคณะ (1991) ที่พบว่าอาหารสูตร N_6 จะเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสชนิด friable จากคัพภะอ่อนมากกว่าสูตร MS ขณะเดียวกันผลการศึกษากลับสอดคล้องกับการศึกษาจากส่วนของช่อดอกตัวผู้ (Rhodes et al.,1986), ช่อดอกอ่อน (Reddy et al.,1990) ซึ่งเอมบริโอเจนิกแคลลัสเป็นชนิด compact จากผลการศึกษานี้ร่วมกับการศึกษาอื่น ๆ ที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า อาหารสูตร MS จะชักนำให้เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสชนิด compact ได้ดี สำหรับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมกับอาหารสูตร N_6 เท่ากับ 2 มก./ล. และในสูตร MS เท่ากับ 1 มก./ล. ความแตกต่างของความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมต่ออาหารสูตรพื้นฐานต่างชนิดกัน แสดงให้เห็นความจำเป็นที่จะต้องมีการทำงานหรือมีความสัมพันธ์ร่วมระหว่างชนิดของอาหารกับสารควบคุมการเจริญ

ข้อมูลจากการวิจัยนี้ยังยืนยันถึงความสำคัญของ L-proline ต่อการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส โดยพบว่าอาหารสูตร N_6 ที่เติม L-proline 2,3 ก./ล. จะทำให้การเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสสูงกว่าเมื่อไม่เติมถึง 100 เปอร์เซนต์ ขณะที่ในอาหารสูตร MS มีการเพิ่มเปอร์เซนต์เอมบริโอเจนิกแคลลัสขึ้นเพียง 15 เปอร์เซนต์ มีรายงานว่า L-proline สามารถเพิ่มเปอร์เซนต์การเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส โดยจะมีอิทธิพลสูงในอาหารสูตร N_6 แต่จะมีผลน้อยในอาหารสูตร MS เช่นเดียวกัน (Armstrong และ Green, 1985)

จากการศึกษาการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสเมื่อแปรผันความเข้มข้นของซูโครส พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสขึ้น 3 เท่า (จาก 2 เป็น 6 เปอร์เซนต์)จะทำให้เอมบริโอเจนิกแคลลัสชนิด compact ลดลง 2 เท่า ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานวิจัยซึ่งศึกษาถึงอิทธิพลของความเข้มข้นของซูโครสต่อการเกิดแคลลัส (Lu et al., 1983; Vasil et al ., 1984 ; Vasil et al.,1985 ; Tomes, 1985) ที่สรุปว่า ถ้าความเข้มข้นของซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยงต่ำ (2%) จะเกิดแคลลัสชนิด friable ได้ดี และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นซูโครส

ให้สูงขึ้น (6%) จะเกิดแคลลัสชนิด compact ได้ดี

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสให้ผลที่พอสรุปได้ในที่นี้ว่า อาหารที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสจากคัพภะอ่อนของสายพันธุ์สุวรรณ 3 คือ อาหารสูตรพื้นฐาน MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. L-proline 2.3 ก./ล., Casein hydrolysate 200 มก./ล. และ ซูโครส 2 เปอร์เซนต์ ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสสูงถึง 44.3 เปอร์เซนต์

4.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3

4.4.1 การศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการเจริญเอมบริโอเจนิกแคลลัส

ในการวิจัยพบว่าเอมบริโอเจนิกแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในที่มืดมีการเจริญสูงกว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง มีผู้รายงานถึงอิทธิพลของแสงต่อการเจริญว่า แสงสีขาวที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแคลลัสได้ ทั้งนี้เนื่องจากแสงที่มีความยาวคลื่นต่ำกว่า 450 นาโนเมตร จะมีผลกระทบต่อปฏิกริยาของระบบตอบสนองต่อแสง (photosensory system) ของเนื้อเยื่อพืช (Ninnemann และ Epel, 1973 ; Seibert et al.,1975) หรืออาจเป็นไปได้ว่าแสงสามารถเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีในอาหารเพาะเลี้ยงบางอย่าง มีผลทำให้อาหารไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเนื้อเยื่อพืชก็อาจเป็นได้ Hangarter และ Stasinopoulos (1991) รายงานว่าธาตุเหล็กในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถกระตุ้นให้เกิด photooxidation ของ EDTA ไปเป็น formaldehyde ซึ่งเป็นพิษต่อพืช อย่างไรก็ตามหากมีแต่ธาตุเหล็กแล้วขาด EDTA ธาตุเหล็กจะอยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ได้ เป็นผลให้เนื้อเยื่อพืชขาดธาตุเหล็ก นอกจากนี้ฮอร์โมนในกลุ่มออกซินบางชนิด เช่น IAA, 2,4-D สามารถสลายตัวได้ง่ายเมื่อถูกแสง ซึ่งอาจมีผลทำให้ความเข้มข้นของฮอร์โมนลดลงจนไม่เหมาะสมต่อการเจริญของพืช

เนื่องจากฮอร์โมนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 คือ 2,4-D ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการที่แคลลัสสามารถเจริญในที่มืดได้ดีกว่าเมื่อให้แสงอาจเนื่องมาจากการสลายตัวของ 2,4-D ในอาหารเพาะเลี้ยงเมื่อถูกแสง หรือจากสาเหตุอื่น ๆ ดังที่กล่าวไปแล้ว การพบจุดเขียว และรงควัตถุสีม่วงซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นแอนโธไซยานินในสภาวะ

ที่มีแสงในช่วงท้าย ๆ ของการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์ที่ 3) น่าจะเกิดขึ้นเนื่องจากการที่ 2,4-D ในอาหารลดลงเพราะถูกใช้ หรือสลายตัวไปเป็นผลิตภัณฑ์อย่างอื่นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง จึงมีผลให้แคลลัสของข้าวโพดมีการสร้างคลอโรพิล และแอนโธไซยานินขึ้นได้ (Mizukami et al., 1988)

4.4.2 การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ

มีรายงานถึงการศึกษาการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดโดย Kamo และคณะ (1986) พบว่าความเหมาะสมของอาหารสูตรพื้นฐานและความเข้มข้นของ 2,4-D ขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์ของข้าวโพด ผลจากการศึกษาชี้ให้เห็นว่า เอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 เจริญในอาหารสูตร N_6 ได้ดีกว่าสูตร MS ซึ่งตรงข้ามกับการชักนำให้เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสจากคัพภะ ความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมคือ 1 มก./ล. เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D ขึ้นเป็น 2 มก./ล. อัตราการเจริญลดลงถึง 40 เปอร์เซนต์ L-proline มีผลต่อการเจริญของแคลลัส โดยเฉพาะในอาหารสูตรพื้นฐาน N_6 อัตราการเจริญเพิ่มขึ้นถึง 40 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับไม่เติม แต่จะมีผลน้อยในอาหารสูตร MS L-proline มีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อของข้าวโพด ทั้งในการชักนำให้เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสและการเจริญ จากผลที่ได้นี้ ในการศึกษาต่อไปจะใช้แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล. และ casein hydrolysate 200 มก./ล.

4.5 การศึกษารูปแบบการเจริญและการพัฒนาไปเป็นต้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3

จากการศึกษารูปแบบการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 หลังจากย้ายแคลลัสลงบนอาหารใหม่ พบว่า จะใช้เวลาในการปรับตัวโดยมีการเจริญช้าลงเป็นช่วงระยะเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นแล้วจะเพิ่มอัตราการเจริญเร็วขึ้นในช่วงสัปดาห์ที่ 2 แต่เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 5 อาหารและสารควบคุมการเจริญเริ่มหมด แคลลัสจะมีอัตราการเจริญช้าลง และเกือบคงที่ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 เป็นต้นไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Dixon (1987) รายงานว่าเอมบริโอเจนิกแคลลัสที่มีการพัฒนาหวนกลับเป็นต้นโดยวิธีการแบบ somatic embryogenesis เมื่อย้ายแคลลัสลงบนอาหารที่ไม่มีฮอร์โมนและให้แสงพอเหมาะ somatic embryo จะสามารถพัฒนาไปเป็นต้นพืชในลักษณะของ bipolar คือมีการพัฒนาของยอดและรากพร้อมกัน และยอดกับรากจะเชื่อมต่อกันอย่างสมบูรณ์ เมื่อศึกษาลักษณะการพัฒนาไปเป็นต้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6 ที่ไม่เสริมฮอร์โมนและให้แสง 4,000 ลักซ์ พบว่ามีการพัฒนาของ somatic embryo ไปเป็นยอดและรากโดยที่ไม่ต้องเปลี่ยนชนิดของอาหาร ลำต้นและรากจะมีการเชื่อมต่อกันอย่างสมบูรณ์ อันเป็นลักษณะของพัฒนาการแบบ somatic embryogenesis เช่นเดียวกัน ลักษณะพัฒนาการแบบนี้จะมีประสิทธิภาพสูง ดังจะเห็นได้จากการทดลองที่พบว่าแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 มีความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นสูงถึง 90 เปอร์เซนต์ การเกิดต้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัสไม่ต้องการฮอร์โมนจากภายนอกแต่อย่างใด

4.6 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการหวนกลับเป็นต้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3

4.6.1 การศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการชักนำให้เกิดต้น

มีรายงานถึงอิทธิพลของแสงต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวโพดว่า แสงไม่มีความจำเป็นในการชักนำให้เกิดแคลลัส แต่มีความสำคัญต่อการชักนำให้เกิดต้น (Pareddy , 1985 ; Suprasanna , 1986) แต่ไม่ได้รายงานถึงอิทธิพลของความเข้มแสงต่อ % plant regeneration ในการศึกษานี้ได้แปรผันความเข้มแสงจนสูงสุดเท่ากับ 4,000 ลักซ์ เนื่องจากว่า ถ้าใช้ความเข้มสูงกว่านี้อุณหภูมิจะสูงขึ้นมากจนเป็นอันตรายต่อพืชได้ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ความเข้มแสงมีอิทธิพลต่อการหวนกลับเป็นต้นอย่างยิ่ง แสงที่มีความเข้มสูงจะให้ % plant regeneration สูงขึ้นและมีการพัฒนาจากแคลลัสไปเป็นต้นได้เร็วขึ้นอีกด้วย แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในที่มืดจะมีการพัฒนาของใบและยอดเล็ก ๆ เท่านั้น แต่จะไม่มีการพัฒนาไปเป็นต้นเลย การที่แคลลัสในที่มืดสามารถพัฒนาไปเป็นอวัยวะได้ แสดงให้เห็นถึงบทบาทและความสัมพันธ์ระหว่างแสง กับ 2,4-D ในการชักนำให้เกิดต้น กล่าวคือโดยปกติ 2,4-D สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ขณะเดียวกันก็ยับยั้งการพัฒนาของแคลลัสไปเป็นต้น เมื่อย้ายแคลลัสลงบนอาหารชักนำให้เกิดต้นซึ่งไม่มี 2,4-D somatic embryo จึงสามารถพัฒนาต่อไปเป็นอวัยวะต่าง ๆ เช่น ใบ

หรือยอดได้ แต่ขณะเดียวกันการพัฒนาต่อไปจนสมบูรณ์ของใบและยอดต้องได้รับการกระตุ้นจากแสงที่มีความเข้มเพียงพอ (Dixon,1987) ดังนั้นในที่มืด ถึงแม้จะมีการพัฒนาของใบหรือยอดเล็ก ๆ แต่จะไม่สามารถเจริญต่อไปได้ เพราะแสงมีความสำคัญในการกระตุ้นการเจริญโดยกระบวนการสังเคราะห์แสง และสังเคราะห์คลอโรฟิล เหมือนกับการเจริญของ zygotic embryo ทั่ว ๆ ไปนั่นเอง

4.6.2 การศึกษาอิทธิพลของขนาดและน้ำหนักของแคลลัสต่อการชักนำให้เกิดต้นและจำนวนยอด

การศึกษาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดต้นของแคลลัสส่วนใหญ่มักนิยมใช้ฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนินในการกระตุ้นเพื่อให้เกิดยอดได้มากขึ้น (Reddy และ Petotino , 1991; Duncan et al.,1989) แต่ในการศึกษานี้จะเน้นถึงการใช้ขนาดของแคลลัสที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้นเพื่อที่จะใช้แคลลัสได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุด ในการศึกษาโดยใช้แคลลัสที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางต่างกัน 3 ขนาด คือ 0.25, 0.5 และ 1.0 ซ.ม. พบว่าขนาดของแคลลัสมีผลต่อ % plant regeneration อย่างชัดเจน เมื่อใช้แคลลัสขนาดเล็ก (~0.25 ซม.) แต่เมื่อเพิ่มขนาดของแคลลัสให้มีขนาดใหญ่ขึ้นถึงขนาดหนึ่ง (~0.5 ซม.) ขนาดของแคลลัสจะไม่มีผลต่อ % plant regeneration อีกต่อไป เป็นผลให้ % plant regeneration คงที่ การที่แคลลัสขนาดเล็กมีความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นได้ต่ำอาจเป็นผลเนื่องมาจากชิ้นแคลลัสขนาดเล็ก จึงมีการเจริญของ somatic embryo ช้ากว่าแคลลัสขนาดใหญ่ (ตารางที่ 13) หรือเป็นเพราะขนาดของแคลลัสที่เล็กมากอาจมีบริเวณที่จะเจริญไปเป็น somatic embryo ได้น้อย

จำนวนยอดต่อแคลลัสจะแปรผันตามขนาดของแคลลัส แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นจะมีจำนวนยอดต่อแคลลัสมากขึ้น เนื่องจากมีจำนวน somatic embryo มากขึ้น และแคลลัสเองมีขนาดใหญ่พอที่จะรองรับการเจริญของยอดนั้นได้ แต่เมื่อคิดเป็นจำนวนยอดต่อกรัมน้ำหนักสดของแคลลัสแล้ว แคลลัสที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. จะให้จำนวนยอดต่อกรัมน้ำหนักสดสูงสุด ดังนั้นการชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. จะมีประสิทธิภาพสูงที่สุด

4.7 การศึกษาความเสถียรของประสิทธิภาพการเจริญและการหวนกลับเป็นต้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3

4.7.1 การศึกษาอิทธิพลของอายุของเอมบริโอเจนิกแคลลัสต่อการหวนกลับเป็นต้นและการเจริญ

ปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งในการควบคุมการหวนกลับเป็นต้นใหม่ของพืชคือลักษณะความเสถียรของประสิทธิภาพในการหวนกลับเป็นต้น มีรายงานถึงพืชหลายชนิดที่พบว่าประสิทธิภาพความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นจะลดลง หรือสูญเสียไปเมื่อเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลานาน เช่น เซลล์แขวนลอยของข้าวสาลี เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2.5 ปี พบว่ามีเพียง 3 พันธุ์ เท่านั้นจาก 12 พันธุ์ ที่ยังสามารถพัฒนาให้เกิดยอดได้ และความสามารถในการเกิดยอดลดลงเหลือเพียง 0.25-1 เปอร์เซนต์เท่านั้น (Wang และ Nguyen , 1990) Vasil และคณะ (1984) รายงานว่าเอมบริโอเจนิกแคลลัสชนิด compact ของข้าวโพดสายพันธุ์ DeKalb XL 82 ไม่สามารถที่จะเลี้ยงต่อเนื่องนานกว่า 10 สัปดาห์ได้ เนื่องจาก somatic embryo จะเจริญไปเป็นต้นอย่างรวดเร็ว สำหรับเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ในงานวิจัยนี้พบว่า มีลักษณะและความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นคงที่ สามารถเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลายาวนานกว่า 18 เดือน โดยยังมีความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นได้ไม่น้อยกว่า 85 เปอร์เซนต์

เมื่อศึกษาการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 ที่มีอายุในการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ กัน พบว่าในช่วงแรกตั้งแต่อายุ 6-12 เดือน อัตราการเจริญจะลดลงอย่างรวดเร็ว (20 เปอร์เซนต์) แต่หลังจากแคลลัสมีอายุ 12 เดือนขึ้นไป อัตราการเจริญค่อนข้างจะคงที่ โดยลดลงเล็กน้อย (9 เปอร์เซนต์) เมื่อแคลลัสมีอายุ 16 เดือน ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 มีความคงที่ของประสิทธิภาพความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นและการเจริญที่ดี ซึ่งเป็นลักษณะที่พึงประสงค์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สายพันธุ์ที่มีความคงที่ของลักษณะนี้จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้สร้างเมทไธโอนีนสูงได้ต่อไป

จากการนำเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 มาเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลาประมาณ 1 ปี ในสภาวะที่ได้กำหนดแล้ว พบว่าบนชิ้นแคลลัสมีส่วนของเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ เนื้อเยื่อชนิด compact ซึ่งเกาะตัวกันแน่น สีเหลืองหรือขาว และเนื้อเยื่อชนิด friable ซึ่งมีเนื้อหลวม ชุ่มน้ำ สีขาวหรือเทา เมื่อแยกเอาแคลลัสทั้ง 2 ชนิด

ออกจากกันแล้วนำไปเพาะเลี้ยงและทดสอบคุณสมบัติในการหวนกลับเป็นต้น พบว่าเนื้อเยื่อชนิด compact เท่านั้น ที่สามารถหวนกลับเป็นต้นได้ ส่วนเนื้อเยื่อชนิด friable ที่เกิดขึ้นจากแคลลัสชนิด compact ตั้งเดิมจะไม่สามารถหวนกลับเป็นต้นได้เลย ดังนั้นเนื้อเยื่อชนิด friable ที่เกิดขึ้น จึงเป็นเนื้อเยื่อชนิดนอนเอมบริโอเจนิกแคลลัส

ในการทดลองเมื่อทำการการย้ายแคลลัสลงบนอาหารใหม่ ถึงแม้จะพยายามแยกเอาแคลลัสชนิด friable ออกให้หมด แล้วทำการย้ายเฉพาะแคลลัสชนิด compact เท่านั้นลงบนอาหารใหม่ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปก็จะยังคงพบเนื้อเยื่อชนิด friable เกิดแทรกขึ้นมาอยู่เสมอ โดยที่บางครั้งอาจพบในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อชนิด compact เอง จากการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นคาดว่าการเกิดขึ้นของเนื้อเยื่อชนิด friable อาจเป็นผลเนื่องมาจากในขั้นตอนการแยกเนื้อเยื่อทั้ง 2 ชนิด ทำได้ไม่สมบูรณ์ จึงมีเนื้อเยื่อชนิด friable ติดไปด้วยทุกครั้ง แล้วจึงเจริญต่อไป แต่เมื่อศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเนื้อเยื่อทั้ง 2 ชนิด พบว่าชนิด friable มีอัตราการเจริญต่ำกว่าชนิด compact ถึง 2.7 เท่า และไม่สามารถเพาะเลี้ยงต่อเนื่องได้ ดังนั้นจึงไม่น่าจะเป็นไปได้ที่เนื้อเยื่อชนิด friable ที่พบ จะเจริญเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงนานกว่า 1 ปี ดังนั้นข้อสรุปจึงควรเป็นได้ว่า เนื้อเยื่อชนิด compact สามารถเจริญไปเป็นเซลล์ที่มีสัณฐานวิทยาต่างกัน 2 ชนิด

มีรายงานถึงลักษณะของเอมบริโอเจนิกแคลลัสชนิด compact ของข้าวโพดสายพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งจะประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อ 2 ชนิดคือ เนื้อเยื่อชนิด compact ซึ่งมีลักษณะเนื้อแน่น สีขาวเหลือง มีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นได้ กับเนื้อเยื่อชนิด friable ซึ่งมีลักษณะเนื้อหลวม ชุ่มน้ำ สีขาว ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ (Duncan และ Widholm, 1989; Rao et al.,1990) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อชนิด compact ไปเป็นชนิด friable ซึ่งมีการเจริญที่รวดเร็ว และสามารถที่จะพัฒนาไปเป็นต้นได้ หลังจากเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลา 1 ปี (Barkowiak, 1989 ; Vasil et al., 1984) สาเหตุของการพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่แตกต่างกันยังไม่เป็นที่เข้าใจมากนัก แต่คาดว่าเกิดจากความแตกต่างของระดับในการแสดงออกของพันธุกรรมที่ตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง (Chen และ Luthe , 1987) ปัจจุบันได้มีการหาวิธีบ่งชี้เพื่อแยกเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันนี้ออกจากกันโดยอาศัยวิธีการทางเคมี (Duncan และ Widholm ,1989) และทางชีวเคมี (Rao et al., 1990) เพื่อสามารถกำจัดเนื้อเยื่อส่วนที่ไม่สามารถหวนกลับเป็นต้นออกไปจากระบบการเพาะเลี้ยงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากผลการศึกษาดังกล่าวนี้สามารถอธิบายถึงผลที่เกิดขึ้นในการทดลองที่ 3.8.1 และ 3.8.2 ได้ว่า การที่ความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นและอัตราการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสลดลงตลอดเวลา หลังจากที่เพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลานานเกิน 1 ปี เนื่องมาจากมีการพัฒนาของเนื้อเยื่อที่เป็น friable ซึ่งเป็นแคลลัสชนิดที่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นเกิดขึ้น แคลลัสชนิดนี้มีอัตราการเจริญต่ำและไม่สามารถเพาะเลี้ยงต่อเนื่องได้ จึงมีผลทำให้ประสิทธิภาพของการหวนคืนกลับเป็นต้นและอัตราการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสลดลงตลอดเวลา

4.8 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย

4.8.1 การศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย

การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอยทำได้โดยใช้แหล่งของเซลล์จากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง เช่น การเพาะเลี้ยง mesophyll ของยาสูบ (Callow และ Dow, 1980) หรือจากแคลลัส เช่น ถั่วเหลือง (Gamborg et al., 1983) การใช้แคลลัสเป็นแหล่งของเซลล์แขวนลอยจะมีข้อดีกว่า เนื่องจากเป็นเซลล์ที่คุ้นเคยกับสภาวะที่เพาะเลี้ยงใน in vitro อยู่แล้ว จึงสามารถปรับตัวได้ง่าย ชนิดของแคลลัสที่ใช้เป็นแหล่งของเซลล์แขวนลอยมีผลอย่างมากต่อลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่ได้ เซลล์แขวนลอยที่เริ่มต้นจากแคลลัสชนิด compact จะมีขนาดของกลุ่มเซลล์ใหญ่ ประมาณ 1-10 มม. (Sheridan, 1975) ส่วนเซลล์แขวนลอยที่เริ่มต้นจากแคลลัสชนิด friable จะมีการกระจายตัวดี กลุ่มของเซลล์มีขนาดเล็ก ประมาณ 0.25-1.0 มม. (Kamo et al., 1986) ซึ่งเป็นลักษณะที่พึงประสงค์ของเซลล์แขวนลอย

ในงานวิจัยนี้ตั้งเป้าไว้ที่จะได้เซลล์แขวนลอยที่มีการกระจายตัวดี และสามารถหวนกลับคืนเป็นต้นได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งใหม่ ดังนั้นแคลลัสที่เหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งของเซลล์แขวนลอย จึงน่าจะเป็นแคลลัสชนิด friable ที่มีความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นได้ แต่เนื่องจากเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 เป็นชนิด compact และไม่สามารถทำให้เซลล์ friable ของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 หวนกลับเป็นต้นได้ ทำให้ลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ลักษณะ compact มีขนาดค่อนข้างใหญ่ ประมาณ 1-5 มม. เมื่อศึกษาอัตราการเจริญของเซลล์แขวนลอย พบว่า มีลักษณะคล้ายคลึงกับเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารแข็ง คือ จะมีการเจริญในอาหารสูตร N_6 ได้ดีกว่าในสูตร MS

และความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสม เท่ากับ 1 มก./ล. การที่เซลล์แขวนลอยมีการเจริญในอาหารสูตร N_6 ดีกว่าสูตร MS อาจเนื่องมาจากการที่แคลลัสเริ่มต้นเพาะเลี้ยงอยู่ในอาหารสูตร N_6 อยู่แล้ว ทำให้เซลล์มีความเคยชินและใช้ประโยชน์ของคุณค่าอาหารจากอาหารสูตร N_6 ได้ดีกว่า เมื่อแยกเอากลุ่มเซลล์ที่มีขนาดเล็กกว่า 500 ไมโครเมตร มาเลี้ยง กลุ่มเซลล์นี้จะไม่เจริญและไม่สามารถเลี้ยงต่อไปได้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากกลุ่มเซลล์มีขนาดเล็กเกินไปขาดการพึ่งพาระหว่างเซลล์ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยจะต้องมีขนาด และความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสม ซึ่งถ้าต่ำกว่านั้นจะไม่สามารถเจริญและขยายขนาดได้ (Dixon,1987) นอกจากนี้จากที่กล่าวแล้วว่าเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 มีการเปลี่ยนลักษณะของแคลลัสจาก compact ไปเป็นเนื้อเยื่อชนิด friable ซึ่งไม่สามารถเพาะเลี้ยงต่อเนื่องได้ และไม่สามารถหวนกลับเป็นต้นได้อีกด้วย ดังนั้นคาดว่ากลุ่มเซลล์ที่มีขนาดเล็ก (เล็กกว่า 500 ไมโครเมตร) และแขวนลอยอยู่ในอาหารอาจจะเกิดมาจากเนื้อเยื่อชนิด friable นี้ เพราะมีลักษณะของเซลล์หลวมสามารถหลุดออกมาได้ง่าย ขณะที่กลุ่มเซลล์ชนิด compact มีการเจริญและยังคงเกาะแน่นอยู่กับกลุ่มเซลล์เดิม

ลักษณะอีกอย่างหนึ่งที่สังเกตพบ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของสายพันธุ์สุวรรณ 3 คือ จะมีการปลดปล่อยสารที่มีความหนืดสูงออกมาจากเซลล์ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นสารโพลีแซคคาไรด์จำพวกกลูแคน (glucan) ที่ปลดปล่อยออกมาจากผนังเซลล์ของพืช มีรายงานถึงการปลดปล่อยสารที่มีความหนืดสูงเช่นเดียวกันจากงานวิจัยของ Kamo และคณะ (1986) แต่ไม่ได้รายงานถึงชนิดของสารและกลไกของการปลดปล่อยสารดังกล่าว เซลล์แขวนลอยของสายพันธุ์สุวรรณ 3 นี้ สามารถเพาะเลี้ยงต่อเนื่องได้ไม่ต่ำกว่า 5 เดือน

4.8.2 การศึกษาลักษณะและรูปแบบการเจริญของเซลล์แขวนลอย

เนื่องจากลักษณะเซลล์แขวนลอยของสายพันธุ์สุวรรณ 3 มีขนาดของกลุ่มเซลล์ใหญ่ และมีขนาดแตกต่างกันมาก ดังนั้นในการทดลองจึงพยายามทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงในตัวอย่างเดียวกันมีขนาดของเซลล์สม่ำเสมอ โดยการกรองผ่านตะแกรงไนลอนขนาด 500 ไมโครเมตร หลังจากกรองเซลล์แล้วจึงทำการตัดแบ่งกลุ่มเซลล์ให้มีขนาดใกล้เคียงกัน ชั่งน้ำหนักสดของเซลล์ที่จะทำการศึกษาโดยตรง เซลล์แขวนลอยจะเข้าสู่ช่วง log phase โดยใช้เวลาไม่ถึง 1 สัปดาห์ เนื่องจากปริมาณของเซลล์เริ่มต้นค่อนข้างสูง (0.05 กรัมน้ำหนักแห้ง) เซลล์แขวนลอยบนอาหารสูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. มีลักษณะการเจริญที่ดีกว่า และเข้าสู่ stationary

phase เร็วกว่าเมื่อเสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ล. หลังจากสัปดาห์ที่ 3 สารอาหาร และฮอร์โมนเริ่มหมดลง การเจริญจึงเข้าสู่ระยะ decline phase เซลล์จะหยุดเจริญและเริ่มตายในที่สุด

4.8.3 การชักนำให้เซลล์แขวนลอยเกิดต้น

จากรายงานการเพาะเลี้ยงเซลล์ข้าวโพดแบบแขวนลอย โดย Sheridan (1975) ยังไม่สามารถที่จะชักนำให้เซลล์แขวนลอยหวนกลับเป็นต้นได้ เนื่องจากแหล่งของเซลล์ที่ใช้เป็นนอนเอมบริโอเจนิกแคลลัส Kamo และคณะ (1986) สามารถชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยที่ใช้แหล่งของเซลล์เป็นเอมบริโอเจนิกแคลลัสชนิด friable โดยนำเซลล์แขวนลอยไปเจริญบนอาหารกึ่งแข็ง แล้วจึงย้ายลงสู่อาหารชักนำให้เกิดต้น

เซลล์แขวนลอยที่ได้จากเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ส่วนที่กรองผ่านตะแกรงไนลอน ขนาด 500 ไมโครเมตร ไม่สามารถเจริญบนอาหารกึ่งแข็งได้ เนื่องจากกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กซึ่งกระจายตัวได้ดีเหล่านี้น่าจะเกิดจากเนื้อเยื่อชนิด friable ซึ่งไม่สามารถเพาะเลี้ยง และไม่มีความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นอีกด้วย หรือ อาจเนื่องมาจากปัจจัยในแง่ของขนาดของกลุ่มเซลล์และความหนาแน่นของเซลล์ที่ใช้ไม่เพียงพอ สำหรับเซลล์แขวนลอยที่มีขนาดใหญ่ เมื่อเจริญเซลล์บนอาหารกึ่งแข็ง จะมีลักษณะคล้ายคลึงกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งตามปกติ หลังจากเลี้ยงกลุ่มเซลล์จนมีขนาดใหญ่พอ คือ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 0.25 ซม. ขึ้นไป (การทดลอง 2.12.2) จึงค่อยย้ายลงบนอาหารชักนำให้เกิดต้น พบว่า แคลลัสขนาด 0.25 ซม. สามารถที่จะชักนำให้เกิดต้นได้ กลุ่มเซลล์บนอาหารชักนำให้เกิดต้นสามารถพัฒนาไปเป็นยอดและรากได้โดยพัฒนาการแบบเอมบริโอเจเนซีส (ผลการทดลองข้อ 3.9.3) ตามปกติ

4.9 การวิเคราะห์ปริมาณเมทไธโอนีนอิสระ

จากการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณเมทไธโอนีนอิสระด้วยวิธี HPLC และวิธีทางชีวภาพ พบว่า วิธีการวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธี สามารถใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระของสารสกัดจากตัวอย่างได้ แต่ความไวของการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC จะสูงกว่าวิธีวิเคราะห์ทางชีวภาพ โดยที่สามารถวัดปริมาณเมทไธโอนีนได้ต่ำสุดถึง 10 pmole ขณะที่วิธีทางชีวภาพวัดได้

ต่ำสุดประมาณ 70 pmole

ในการทดลองนี้จะเลือกใช้วิธี HPLC ในการวิเคราะห์ปริมาณเมทไธโอนีนอิสระจากสารตัวอย่างเนื่องจากมีความไวสูงกว่า ซึ่งจะมีประโยชน์ในกรณีที่ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์มีปริมาณน้อย วิธี HPLC จะใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นกว่า และมีความแม่นยำสูงกว่าเนื่องจากมีค่าสหสัมพันธ์สูงถึง 99.97 เปอร์เซนต์ ขณะที่วิธีทางชีวภาพเท่ากับ 92.85 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ยังสามารถแยกกรดอะมิโนอิสระอื่น ๆ ที่เป็นองค์ประกอบออกจากกันได้ (ภาคผนวกที่ 18, 19) อันจะเป็นประโยชน์ในการวัดกรดอะมิโนอิสระตัวอื่น ๆ นอกจากเมทไธโอนีน ซึ่งจะไม่สามารถทำได้ด้วยวิธีทางชีวภาพ

4.10 การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดที่ผลิตเมทไธโอนีนสูง

ในงานวิจัยส่วนที่ 2 นี้ เป็นการสร้างสายพันธุ์ของข้าวโพดแล้วคัดเลือกพันธุ์ที่ผลิตกรดอะมิโนเมทไธโอนีนสูง ซึ่งกระทำได้หลังจากที่ได้เอมบริโอเจนิกแคลลัสที่มีความคงที่ในการหวนกลับเป็นต้น แล้วจึงนำมาคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีนต่อไป

การสร้างสายพันธุ์ที่มีพันธุกรรมในการสร้างเมทไธโอนีนสูง ต้องทำให้ระบบการยับยั้งแบบป้อนกลับของเอนไซม์ที่อยู่ในกระบวนการสังเคราะห์เสียไป โดยคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อเมทไธโอนีน หรืออะนาล็อกของเมทไธโอนีนเอง การเติมเมทไธโอนีน หรืออะนาล็อกความเข้มข้นที่เหมาะสมลงในอาหารจะทำให้การสังเคราะห์เมทไธโอนีนถูกยับยั้ง เซลล์ปกติที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงจะไม่สามารถเจริญและตาย เซลล์ที่จะเจริญได้ต้องมีการเปลี่ยนแปลงกลไกของเมตาบอลิสม บางอย่าง เพื่อที่จะไม่ให้ถูกยับยั้งโดยเมทไธโอนีน หรืออะนาล็อก ซึ่งกลไกแบบหนึ่งอาจรวมไปถึงการที่เซลล์สามารถสร้างเมทไธโอนีนในปริมาณที่สูงกว่าปกติ เพื่อสามารถจะแข่งขันกับอะนาล็อก ในการที่จะสอดแทรกเข้าสู่สายของโพลีเปปไตด์ เพื่อความปกติในการสังเคราะห์โปรตีนต่อไป

4.10.1 การศึกษาผลกระทบของเอทไธโอนีนต่อการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพด

เอทไธโอนีนเป็นอะนาล็อกของเมทไธโอนีนซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับเมทไธโอนีนมาก ต่างจากเมทไธโอนีนเฉพาะตรงที่มีหมู่เมทธิล มากกว่า 1 หมู่ ผลจากการศึกษา

พบว่า เอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ถูกยับยั้งการเจริญได้ด้วยเอทไธโอนีน โดยช่วงความเข้มข้นที่มีผลต่อการยับยั้งประมาณ 0.1 ถึง 1.0 มิลลิโมลาร์ และค่า ID_{50} ที่คำนวณได้จากกราฟมีค่า เท่ากับ 0.05 มิลลิโมลาร์ อนึ่ง เนื่องจากโครงสร้างของเอทไธโอนีนคล้ายคลึงกับเมทไธโอนีนมากนี้เอง กลไกของการยับยั้งการเจริญจึงคาดว่าเกิดขึ้นจากการที่เอทไธโอนีนสามารถไปขัดขวางหน้าที่สำคัญต่าง ๆ ของเมทไธโอนีน แบบ competitive inhibition ทำให้มีผลกระทบต่อกระบวนการต่าง ๆ เช่น การสังเคราะห์โปรตีน, RNA, DNA และกระบวนการ methylation ภายในเซลล์ อย่างไรก็ตามอิทธิพลของเอทไธโอนีนจะถูกลบล้างลงได้เมื่อเติมเมทไธโอนีนลงไปให้มากขึ้น อันเป็นลักษณะพิเศษของเอทไธโอนีนที่แตกต่างจากสารก่อมะเร็งชนิดอื่น ๆ (Alix, 1982)

เมื่อความเข้มข้นของเอทไธโอนีนที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ไม่เกิน 0.01 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นของเมทไธโอนีนในเซลล์ยังมีมากพอที่จะแข่งขันกับเอทไธโอนีนในการที่จะไม่ให้ถูกยับยั้ง การเจริญจึงลดลงเพียง 20 เปอร์เซนต์ แต่เมื่อความเข้มข้นของเอทไธโอนีนในอาหารเพาะเลี้ยงสูงเกิน 0.05 มิลลิโมลาร์ขึ้นไป ปริมาณเมทไธโอนีนที่มีอยู่ไม่สามารถแข่งขันกับเอทไธโอนีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ เอทไธโอนีนที่เติมลงไปยังสามารถยับยั้งการสังเคราะห์เมทไธโอนีนตามปกติของเซลล์โดยกระบวนการยับยั้งป้อนกลับ เป็นผลให้มีการเจริญลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซนต์ จนถึงสามารถถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์

4.10.2 การคัดเลือกแคลลัสที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน และการศึกษาผลกระทบของเอทไธโอนีนต่อการเจริญของแคลลัสที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน

ตามที่กล่าวไปแล้วว่าเมทไธโอนีนสามารถยับยั้งอิทธิพลของเอทไธโอนีนที่มีต่อเซลล์ลงได้ จากหลักการนี้จึงเป็นที่คาดว่าสายพันธุ์ที่สามารถต้านทานต่อเอทไธโอนีน จะมีคุณสมบัติในการสังเคราะห์เมทไธโอนีนได้สูงกว่าปกติเพื่อแข่งขันกับเอทไธโอนีนได้ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่า กลไกในการต้านทานต่ออะนาล็อกของกรดอะมิโนในพืชอาจเกิดได้หลายแบบ อาทิเช่น เกิดการเปลี่ยนแปลงในระบบการยับยั้งของเอนไซม์เป็นผลให้มีการสร้างกรดอะมิโนสูงขึ้น, ยับยั้งการนำอะนาล็อกเข้าสู่เซลล์โดยเปลี่ยนแปลงระบบการนำเข้า (permeability) ของเยื่อเซลล์, การย่อยสลายอะนาล็อกให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีประสิทธิภาพในการเป็นพิษ หรือการใช้อะนาล็อกเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ secondary metabolite (Flick,1983) เหล่านี้เป็นต้น

ในการคัดเลือกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารที่มีเอทไธโอนีน ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นเท่ากับ ID_{50} ของสายพันธุ์ปกติ และ 0.1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งสูงกว่า ID_{50} ประมาณ 2 เท่า พบว่า มี 11 สายพันธุ์ ที่สามารถเจริญได้บนความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ และ 2 สายพันธุ์บนความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ โดยดูจากลักษณะที่ยังคงเจริญบนอาหารที่มีเอทไธโอนีนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 6 เดือน แคลลัสที่เจริญในอาหารที่มีเอทไธโอนีน 0.1 มิลลิโมลาร์ จะมีการเจริญที่ต่ำกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่เซลล์ไม่สามารถที่จะสร้างเมทไธโอนีนได้มากพอที่จะลดอิทธิพลของเอทไธโอนีนลง เอทไธโอนีนจึงสามารถที่จะสอดแทรกเข้าสู่สายของโพลีเปบไตด์ และไปมีผลต่อวิถีการสังเคราะห์และกระบวนการต่าง ๆ ในเซลล์

ลักษณะของการสร้างสารที่มีความหนืดสูงคล้ายเมือกที่ผิวสัมผัสระหว่างชิ้นแคลลัสกับอาหาร คาดว่าเป็นกลไกหนึ่งของการป้องกันเอทไธโอนีนเข้าสู่เซลล์ในระดับของการนำเข้า แคลลัสที่เจริญบนอาหารที่มีเอทไธโอนีน 0.05 มิลลิโมลาร์ (สายพันธุ์ NS8) จะไม่พบลักษณะการสร้างสารที่มีความหนืดนี้ และสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเอทไธโอนีนสูงกว่าสายพันธุ์ปกติ ค่า ID_{50} ของสายพันธุ์ NS8 เท่ากับ 0.095 มิลลิโมลาร์ ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ปกติ 2 เท่า สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีเอทไธโอนีน 0.05 มิลลิโมลาร์ อย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานกว่า 6 เดือน โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะ และอัตราการเจริญก็ไม่แตกต่างจากแคลลัสปกติมากนัก จึงจัดว่าเป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน เหมาะสมที่จะนำไปศึกษาคุณสมบัติต่อไป

4.10.3 การวิเคราะห์ปริมาณเมทไธโอนีนอิสระของแคลลัสที่ต้านทานและไม่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน

มีรายงานถึงการสร้างสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีนของยาสูบ โดย Gonzales และคณะ (1984) พบว่า กลไกของการต้านทานเกิดจากการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ aspartokinase เป็นผลให้มีการสร้างกรดอะมิโนในวิถีการสังเคราะห์ aspartate family สูงขึ้น ส่วนการศึกษาในถั่วเหลือง โดย Madison และ Thompson (1988) พบแคลลัสที่ต้านต้านต่อเอทไธโอนีน ซึ่งมีกลไกแตกต่างกัน 2 ชนิด ชนิดแรกเป็นการยับยั้งการนำเอทไธโอนีนเข้าสู่เซลล์ ซึ่งจะไม่มีการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนในวิถี และชนิดที่ 2 เป็นการเปลี่ยนแปลงในระบบของเอนไซม์ในวิถี เป็นผลให้มีปริมาณเมทไธโอนีนสูงขึ้น

จากการวัดปริมาณของเมทไธโอนีนอิสระของสายพันธุ์ NS8 พบว่า มีระดับของเมทไธโอนีนสูงกว่าสายพันธุ์ที่ไม่ต้านทานต่อเอทไธโอนีนประมาณ 3 เท่า ดังนั้นกลไกในการต้านทานต่อเอทไธโอนีนของสายพันธุ์ NS8 แบบหนึ่ง น่าจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ในวิถีของการสังเคราะห์เมทไธโอนีน การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์ของเมทไธโอนีนซึ่งเป็นผลให้มีการสร้างเมทไธโอนีนสูงขึ้นในสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน อาจเกิดจากการลดลงของการทำงานของเอนไซม์ methionine adenosyltransferase เช่นในยีสต์ (Saccharomyces cereviciae) ทำให้มีการสะสมของเมทไธโอนีน แต่จะไม่มีการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนตัวอื่น ๆ ที่อยู่ในวิถี (Mertz และ Spence, 1972) หรือเกิดจากการเพิ่มขึ้นของการทำงานของเอนไซม์ aspartokinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีการสังเคราะห์เมทไธโอนีน, ทรีโอนีน, ซีสเตอีน และ อื่น ๆ เป็นผลให้มีการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนใน aspartate family สูงขึ้นมากกว่า 1 ตัว (Gonzales et al., 1984) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ที่อยู่ในส่วนท้ายของวิถีเช่น cystathionine synthase หรือ cystathionine - B lyase ซึ่งเป็นผลให้มีการเพิ่มเฉพาะเมทไธโอนีน เช่นเดียวกัน (Madison และ Thompson, 1988)

สำหรับแคลลัสสายพันธุ์ NS8 ที่ได้จากการคัดเลือกในงานวิจัยนี้ ยังไม่สามารถกำหนดตำแหน่งของเอนไซม์ที่มีการเปลี่ยนแปลงได้ เนื่องจากไม่ทราบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตัวอื่น ๆ ที่อยู่ในวิถีเลย

4.10.4 การหวนกลับเป็นต้นของแคลลัสที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน

แคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 ซึ่งต้านทานต่อเอทไธโอนีน (ID_{50} เท่ากับ 0.095) คือสายพันธุ์ NS8 เมื่อย้ายลงบนอาหารชักนำให้เกิดต้น ยังคงมีความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นได้ถึง 50 เปอร์เซนต์ หรือสูงกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องจากสายพันธุ์ NS8 คัดเลือกมาจากเอมบริโอเจนิกแคลลัสที่มีความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นสูง และความเข้มข้นของเอทไธโอนีนที่ใช้ในการคัดเลือกไม่สูงมากจนเกินไป Boyes และ Vasil (1987) รายงานว่าเมื่อความเข้มข้นของอะนาล็อกที่ใช้ในการคัดเลือกสูงขึ้น ความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นจะลดลง และพบลักษณะที่ผิดปกติมากขึ้น

ต้นข้าวโพดที่ชักนำจากสายพันธุ์ NS8 พบลักษณะที่ผิดปกติถึง 75 เปอร์เซนต์ โดย 50 เปอร์เซนต์ เป็นต้นที่มีสีม่วงซึ่งจะตายในที่สุด และ 25 เปอร์เซนต์ เป็นต้น dwarf

มีลักษณะแคระแกรน สาเหตุของความผิดปกติยังไม่สามารถอธิบายได้ แต่คาดว่าเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของระดับในการแสดงออกของพันธุกรรม เช่น ลักษณะของการสร้างแอนโธไซยานินในเซลล์เพาะเลี้ยงปกติพันธุกรรมส่วนนี้จะไม่ค่อยแสดงออก แต่ในสายพันธุ์ NS8 จะพบลักษณะของการสร้างแอนโธไซยานินได้ในทุกแคลลัสที่ชักนำให้เกิดต้น

สิ่งที่สำคัญที่สุดในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้องการ คือ ความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะไปสู่รุ่นลูกได้ ซึ่งหมายถึงต้องเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจนถึงระดับพันธุกรรม การเกิดลักษณะที่เป็น epigenetic trait ย่อมเป็นสิ่งที่ไม่ต้องการในการคัดเลือก เนื่องจากเป็นลักษณะที่ไม่สามารถถ่ายทอดได้ เช่น ลักษณะการต้านทานต่อ S-AEC ของข้าว (Oryza sativa) (Scheaffer และ Sharpe, 1983) ดังนั้นการวิเคราะห์พันธุกรรมของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย