หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 4

## การอภิปรายผลการวิจัย

เมื่อตัดใบอ่อนที่หุ้มรอบตาแวนด้ามิสโจอะคิมซึ่งเลี้ยงบนวุ้นอาหารออกจนเหลือ2-3 ใบ แล้วย้ายลงในอาหารเหลวที่มีน้ำมะพร้าว 10% กับ naphthalene acetic acid 0.1 มก./ล. ในระยะเวลาประมาณ6-7 วันมีแคลลัสเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก การเกิดแคลลัสนี้อธิบายได้ว่าเกิดจากใบอ่อนได้รับบาดแผลเหมือนที่ Tse, Smith and Hackett (1971) เลี้ยงตาที่เป็นแผลของกล้วยไม้สกุล Phalaenopsis ได้แคลลัส ในขณะที่ตาปกติเจริญเป็นหน่อ Morel (1971) กล่าวว่าในการเลี้ยงตาพวก Vanda teres และลูกผสม สิ่งแรกในการตอบสนองต่อการเป็นแผลคือการสร้างแคลลัสตรงบริเวณรอยตัด จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าแคลลัสไม่ได้เกิดตรงรอยตัดเพียงแห่งเดียว แต่เกิดที่ใบอ่อนใกล้บริเวณรอยตัดหรือรอยชาดหรือเกิดทางด้าน abaxial และ adaxial ของใบอ่อนที่เหลืออยู่ Rao (1973) กล่าวว่าการที่ออกซินและไซโตไคนินอยู่ร่วมกันมีพลังเสริมกันที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานมากขึ้น Liu (1975 ) อ้างถึงงานของ Skoog and Miller (1957), Torrey (1966), Halperin (1969) และกล่าวเพิ่มเติมว่าสัดส่วนของออกซินและไซโตไคนินมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน การตัดใบอ่อนรอบตาก่อนย้ายลงไปเลี้ยงในอาหารเหลว ทำให้สมดุลย์ความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินเปลี่ยนไป เพราะถ้ามีใบเก่าอยู่มากจะไม่สร้างแคลลัส ทั้งนี้เพราะตาได้รับออกซินจากปลายใบ ทำให้สมดุลย์ระหว่างออกซินกับไซโตไคนินคล้ายกับอยู่ในต้นเดิมตามธรรมชาติซึ่งสร้างแต่ยอดและใบใหม่ (ถาวร กับ มนทกานติ, กำลังพิมพ์) การที่ตาแวนด้ามีการเจริญของแคลลัสไม่เท่ากัน การเกิด growing pointและการเกิดแคลลัสซ้อนแคลลัสนั้นก็อธิบายได้ด้วยสมดุลย์ของออกซินและไซโตไคนินเช่นกัน เมื่อใดที่สัดส่วนความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนิน ณ ระดับหนึ่งจะเกิด

organogenesis ขึ้น แต่ถ้าเปลี่ยนสัดส่วนไปอาจได้แต่แคลลัสเท่านั้น

จากการดูลักษณะภายนอกของแคลลัสขนาดใหญ่ พบว่าเหมือนที่ Knudson (1922) และ วีระวุฒิ (2516) ได้รายงานไว้ ส่วนลักษณะเซลภายในเหมือนของแคลลัสที่เกิดจากเมล็ดแวนด้าลูกผสมและแคลลัสที่ได้จากอ๋อย (Rao, 1963; Liu, 1974) แต่ต่างกันตรงที่ไม่พบว่าแคลลัสจากตาแวนด้ามิสโจะคิมมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น protoxylem cell, tracheid element และ phloem cell การที่ parenchymatous cell เปลี่ยนไปเป็นชั้นเซลคล้าย epidermis และสามารถเจริญเป็น meristemoid ได้นั้น อธิบายได้ว่าเซลเหล่านั้นสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงมาเป็น meristematic cell ได้อีก ส่วนแคลลัสที่มีอายุมากมีสีน้ำตาลเข้มและบางส่วนตายไป อาจเนื่องจากเมื่อเลี้ยงไปนานๆ มี suberin (Straus, 1954) มาเคลือบมากและเกิดสารพวกฟีนอล (Intuwong, 1974) มากด้วย suberin อาจปิดทางเข้าออกของน้ำและพวก metabolites ต่างๆ ทำให้ขาดน้ำและสะสมสารที่เป็นพิษขึ้นภายในเป็นเหตุให้เซลตายได้

การเกิด meristematic cell ที่ใบอ่อนหุ้มรอบตาแวนด้าที่เลี้ยงบนวุ้นอาหารยังไม่พบในรายงานมาก่อน ส่วนสาเหตุที่ตาแวนด้าบนวุ้นอาหารไม่สามารถสร้างแคลลัสจนกระทั่งย้ายลงในอาหารเหลวซึ่งเขย่าอยู่ตลอดเวลา meristematic cell นั้นจึงมีการแบ่งเซลหลายแบบจนมีการพองฟูของแคลลัสออกมาให้เห็น คงเกี่ยวกับสภาวะแวดล้อมและองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยง เพราะเมื่อเลี้ยงตาแวนด้าบนวุ้นอาหารมีเพียงด้านหนึ่งที่สัมผัสกับวุ้นอาหาร การดูดเอาเกลือธาตุต่างๆ ตลอดจนการถ่ายเทของเสียเป็นไปอย่างไม่สะดวก เนื่องจากเนื้อที่สัมผัสน้อย การเคลื่อนที่ของน้ำในวุ้นช้าและความชื้นรอบเนื้อเยื่อน้อย แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารเหลวตาแวนด้าซึ่งจมอยู่ในอาหารเหลวสามารถรับเอาเกลือธาตุต่างๆ ได้เร็วและถ่ายของเสียได้เร็วเช่นกัน ทำให้สามารถใช้ประโยชน์จากเกลือธาตุและน้ำได้เต็มที่ จึงมีการสร้าง-

แคลลัสอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ Scully ( 1967) ยังแสดงว่าการเลี้ยงเนื้อเยื่อในของเหลวแล้วเขย่าลดการแสดงออกของ polarity องค์ประกอบของอาหารที่เลี้ยงตาแวนด้าก็ต่างกัน กล่าวคือในอาหารเหลวไม่มีวุ้นและน้ำตาล จากผลการทดลองของ Kunisaki et al ( 1972) พบว่าเนื้อเยื่อที่พองฟูเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในอาหารเหลวที่ใช้สูตรพื้นฐานและน้ำมะพร้าวโดยไม่ใส่น้ำตาลซูโครส และเมื่อเติมน้ำตาลซูโครสไปทำให้เนื้อเยื่อเหลืองแล้วตายไปในที่สุด เมื่อสภาวะและองค์ประกอบของอาหารต่างกัน เมตาโบลิสมก็จะต่างกันด้วย ทำให้การเจริญของแคลลัสต่างกันด้วย

จากผลการวิจัยเกี่ยวกับจุดกำเนิดของแคลลัสจากตาแวนด้ามิสโจอะคิม พบว่าเจริญมาจากเซลหนึ่งเซลที่ผิวของใบ แม้ว่าการศึกษาทางด้านนี้มีน้อยแต่ก็มีหลายรายงานซึ่งสนับสนุนผลการวิจัยนี้ ที่ดีที่สุดได้แก่ผลงานของ Konar, Thomas and Street (1972) พบว่าเอมบริออยของต้น Ranunculus sceleratus L. ที่ได้จากการเลี้ยงแคลลัส มีจุดกำเนิดมาจาก epidermal cell ของลำต้นเพียงหนึ่งเซลที่มีไซโตปลาสมหนาแน่น เซลประเภทนี้มีนิวเคลียสใหญ่อยู่ตรงกลางล้อมรอบด้วยแวคคิวโอลเล็กๆ นอกจากนี้มีรายงานของ Vasil and Hildebrandt (1966) รวบรวมผลการเลี้ยงเนื้อเยื่อแครอทและ endive ได้ให้ข้อเสนอแนะว่าเนื้อเยื่อใหม่ที่เปลี่ยนไปเป็นต้นที่สมบูรณ์มาจากการแบ่งเซลที่เริ่มต้นจากเซลเดียว ในพวกกล้วยไม้ Morel (1971) ศึกษาการเจริญของโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุล Cymbidium และ Cattleya พบว่าเกิดจาก epidermis หรือ hypodermis ส่วนบริเวณอื่นของตาแวนด้ามิสโจอะคิม เช่น mesophyll ไม่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงในการที่จะสร้างแคลลัส ซึ่งต่างจากการทดลองของ ถาวร วัชราภัย (สอบถามส่วนตัว) พบว่าแคลลัสที่เกิดจากใบ Dendrobium เจริญมาจากเซลในชั้น mesophyll

เมื่อพิจารณาถึงจุดกำเนิดของแคลลัสแล้ว ทำให้ทราบว่าการเกิดแคลลัสจริงๆ นั้นควรเริ่มตั้งแต่เมื่อตาแวนด้ายังอยู่บนวุ้นอาหาร กล่าวคือเมื่อนำมาเลี้ยงใน

ระยะแรกในหลอดทดลองตาแวนด้าต้องปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมอันใหม่ หลังจากนั้นมีการเจริญอย่างรวดเร็วโดยเพิ่มขนาดใหญ่มีสีเขียว ทั้งนี้เพราะอาหารเกลือธาตุต่างๆ มีครบถ้วนในปริมาณที่เพียงพอกับความต้องการ เซลต่างๆ ของใบซึ่งมีการเจริญเต็มที่แล้วมีการเปลี่ยนแปลงสามารถที่จะแบ่งตัวต่อไปได้ใหม่ คือมี redifferentiation ตัวอย่างที่พบได้แก่เซลในชั้นนอกสุดของใบอ่อน โดยที่เซลในชั้นนอกสุดของใบอ่อนรอบนอกมีการเจริญของกลุ่มเซลสูงพ้นจากผิวใบ ส่วนเซลในชั้นนอกสุดของใบอ่อนที่อยู่ใกล้ยอดพบพวก meristematic cells ซึ่งพร้อมที่จะมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วอยู่แล้ว แต่เนื่องจากสภาพวุ้นอาหารทำให้เจริญได้ไม่เต็มที่ ต่อเมื่อตัดใบย้ายลงในอาหารเหลวสิ่งแวดล้อมทุกอย่างเหมาะแก่การเจริญ จึงมีการพองฟูของแคลลัสออกมาอย่างรวดเร็ว ถ้าไม่ตัดใบได้ยอดเก่าจะเจริญต่อไปโดยไม่สร้างแคลลัส ซึ่งกรณีนี้เกี่ยวข้องกับออกซินและไซโตไคนินที่มีอยู่ภายในตาแวนด้า เพราะฉะนั้นถ้าตัดใบอ่อนแล้วเลี้ยงตาแวนด้าบนวุ้นอาหารก็ควรได้แคลลัสเกิดขึ้น แต่ปริมาณที่ได้คงน้อยกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวตามเหตุผลที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

การที่เซลหนึ่งเซลที่ผิวของใบมีศักยภาพและความสามารถในการเจริญให้กลุ่มเซลของแคลลัสได้แสดงถึง totipotency ของเซล ซึ่งภายใต้สภาวะที่เหมาะสมแคลลัสที่ได้นี้เจริญและเปลี่ยนเป็นต้นใหม่ได้ มีรายงานที่แสดงถึง totipotency ของเซล เช่น Liu(1974)อ้างถึง Muir et al เลี้ยงเซลที่แยกออกมาเดี่ยวๆ ใน nurse culture คั่นด้วยกระดาษกรอง ซึ่งจากหนึ่งเซลนี้สามารถให้กลุ่มของแคลลัส ส่วน Vasil and Hildebrandt ได้แสดงว่าเซลยาสูบที่แยกเลี้ยงเดี่ยวอิสระสามารถเจริญใน microchamber เพื่อให้กลุ่มเล็กๆ ของเซลที่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นยาสูบที่สมบูรณ์ได้ การที่พวก meristematic cell ที่มีไซโตปลาสมหนาแน่นเหล่านั้นเมื่อแบ่งเซลได้ระยะ 2-4-cell เมื่อพิจารณาการแยกของผนังเซล เห็นว่านูนสูงขึ้นมากกว่าเซลข้างเคียงอาจบางทีเกิดขึ้นเพื่อตอบสนองต่อแรงดันจากการแบ่งเซลและการขยายตัวของเซลก็ได้ (Esau, 1965)

จากการศึกษาพบว่าเซลของแคลลัสสามารถเปลี่ยนแปลงเป็น growing point ซึ่งประกอบด้วยเซลแถวเดียวล้อมรอบ จุดกำเนิดของ growing point ควรมาจากเซลหนึ่งเซลในก้อนแคลลัส รายงานของ Kato and Takeuchi (1963) อ้างถึง Reinert (1958) พบว่าจากการเลี้ยงแคลลัสที่ได้จากรากของแครอท ได้ก้อนที่มีลักษณะคล้ายตาที่มีจุดกำเนิดมาจากเซลหนึ่งเซลในเนื้อเยื่อแคลลัส Torrey (1966) ให้คำแนะนำว่า organized structure ทั้งหมดในแคลลัสมีจุดกำเนิดร่วมจาก activated single cell

การวิจัยนี้ทำให้ได้ความรู้ขั้นมูลฐานทางกายวิภาคของการเกิดเนื้อเยื่อแคลลัสของพวกกล้วยไม้ ปัญหาที่พบคือการตายโดยไม่ทราบสาเหตุของตาแวนด้าที่เลี้ยงในหลอดทดลอง อันเป็นผลทำให้การเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลแวนด้าเพิ่งมาประสบผลสำเร็จในปี ค.ศ. 1972 นี้เอง มีข้อเสนอแนะบางประการสำหรับการศึกษาเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลแวนด้า เช่น

1. แคลลัสบางส่วนที่ตายไปนั้น อาจเนื่องจากมี suberin และสารฟีนอลเกิดขึ้น แต่ในเนื้อเยื่อแคลลัสของพวกแวนด้ามิสโจอะคิมจะมีสารพวกนี้หรือไม่ ศึกษาได้โดยอาศัยความรู้ทางชีวเคมีและการติดสีของเนื้อเยื่อ ซึ่งอาจจะนำไปสู่การแก้ปัญหาการตายของเนื้อเยื่อแคลลัสได้

2. เกี่ยวกับ meristematic cell ควรใช้เทคนิคของ electron microscope, scanning electron microscope และ histochemistry เข้าช่วย เพื่อศึกษารายละเอียดภายในเซลให้มากกว่านี้

3. ควรมีการศึกษาการเกิด growing point จากแคลลัสในกล้วยไม้สกุลนี้ด้วย เพื่อที่จะได้เปรียบเทียบว่าเหมือนที่พบในพืชอื่นๆ หรือไม่อย่างไร