บทที่ 4

อภิปรายผลการทดลอง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. การศึกษาการพัฒนาของเรณูข้าว

ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวระยะการพัฒนาของเรณู หรืออายุของเรณูเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่มีส่วนทำให้การเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวประสบความสำเร็จ Niizeki และ Oono (19), Guha-Mukherjee (9) สามารถสร้างแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวในระยะ uninucleate microspore เท่านั้น ต่อมา Chen (5) ได้ทำการศึกษาโดยเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวที่มีเรณูในระยะต่าง ๆ และสรุปว่า เรณูในระยะ mid uninucleate จะมีเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสสูงสุด แต่นักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลายท่าน เช่น Chang (4), Hu (13) และ Chu (7) ได้กล่าวว่าอับเรณูในระยะ late uninucleate เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงมากที่สุด จะเห็นว่าอายุของอับเรณูที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงอับเรณูเป็นช่วงสั้น ๆ ที่อยู่ในระยะ uninucleate เท่านั้น ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงใช้อับเรณูในระยะ mid uninucleate microspore และพบว่ามีเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสโดยเฉลี่ยใกล้เคียงกับการทดลองของ Chu (7)

2. การเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวให้เกิดแคลลัส

ในธรรมชาติเมื่อเรณูตกลงบนที่รับเรณูของเกสรตัวเมีย (stigma) จะงอก pollen tube ลงไปในก้านชูยอดเกสรตัวเมียเพื่อนำ gamete จากเรณูลงไปผสมกับไข่ และ polar nuclei ในรังไข่ nucleus ที่รวมตัวกับไข่จะเจริญเติบโตเป็น zygote และเจริญเป็นต้นอ่อน ส่วน nucleus ที่รวมกับ polar nuclei จะเจริญเติบโตเป็น endosperm (1) เมื่อนำอับเรณู

มาเพาะเลี้ยงแบบ <u>in</u> <u>vitro</u> การเจริญเติบโตของอับเรณูจะเปลี่ยนแปลงไปอย่างเห็นได้ชัดเจน และได้กลุ่มเซลที่เรียกว่าแคลลัส Sunderland (22) ได้กล่าวว่าการพัฒนาของเรณูของข้าวเป็นไปได้ 3 กรณี คือ

2.1 nucleus ของเรณูจะแบ่งตัวแบบ mitosis ได้ 2 nuclei มีขนาดไม่เท่ากัน คือ vegetative nucleus มีขนาดใหญ่ซึ่งจะเจริญเติบโตต่อไปจนกลายเป็นแคลลัส และ generative nucleus มีขนาดเล็กซึ่งจะสลายตัวไปในที่สุด

2.2 nucleus ของเรณูจะแบ่งตัวแบบ mitosis ได้ 2 nuclei มีขนาดเท่ากัน และจะเจริญเติบโตต่อไปจนกลายเป็นแคลลัส

2.3 nucleus ของเรณูจะแบ่งตัวแบบ mitosis ได้ vegetative nucleus และ generative nucleus ซึ่งจะเจริญเติบโตร่วมกันจนกลายเป็น embryoid โดยตรง

Chen (5) ได้ทำการศึกษาการพัฒนาของแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าว (<u>Oryza</u> <u>sativa</u> L. ssp. Japonica cv. Thinan 5) และรายงานว่าเรณูในระยะ mid uninucleate จะแบ่งตัวแบบกรณีที่ 2.1 หลังจากเพาะเลี้ยงอับเรณูได้ 2 วัน ต่อมา vegetative nucleus จะเริ่มแบ่งตัวอีกครั้งเมื่อเพาะเลี้ยงอับเรณูได้ประมาณ 5 วัน และเจริญเติบโตกลายเป็น multicellular pollen หลังจากนี้อีก 15 วัน ก็จะเจริญเติบโตกลายเป็นกลุ่มเซลที่เรียกว่าแคลลัส แต่ไม่พบการแบ่งตัวแบบกรณีที่ 2.2 ซึ่งเหมือนกับรายงานของ Iyer และ Raina (14) และ Clapham (8)

Chang (4) ได้ทำการศึกษาการพัฒนาของเรณูในระยะ late uninucleate ของข้าว ssp. keng และได้กล่าวว่า ไม่พบเรณูในระยะ late uninucleate ใด ๆ ที่มีการแบ่งตัวแบบกรณีที่ 2.1 และกรณีที่ 2.3 แต่จะพบว่ามีการแบ่งตัวแบบกรณีที่ 2.2 ถึง 82.6% และ daughter

cell ที่ได้ซึ่งมีขนาดเท่ากันจะแบ่งตัวซ้ำ ๆ กันอีกหลายครั้งจนกลายเป็น multi-cellular pollen grain ในที่สุดผนังของเรณูจะแตกออกและเห็นเป็นกลุ่มเซลตรงบริเวณรอยแตกซึ่งเรียกว่าแคลลัส ปกติแคลลัสจะเกิดเร็วที่สุดหลังจากเพาะเลี้ยงอับเรณูได้ประมาณ 17 วัน

จากการทดลองครั้งนี้พบว่าการพัฒนาของเรณูของข้าวอาจเกิดขึ้นได้ 2 กรณี คือ กรณีที่ 2.1 และที่ 2.2 โดยเกิดแคลลัสก่อนแล้วพัฒนาเป็นต้นข้าว แต่ไม่พบ embryoid แบบกรณีที่ 2.3 เลย ทั้งนี้อาจเนื่องจากความแตกต่างของพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง แต่ไม่ว่าจะเกิดขึ้นในแบบใดก็ตามแคลลัสที่เกิดขึ้นนั้นน่าจะมีจุดกำเนิดมาจากเรณูเพียงอย่างเดียวเท่านั้น และไม่มีแคลลัสที่เกิดจากส่วนอื่นของอับเรณู เช่น ก้านชูอับเรณู และผนังอับเรณู ซึ่งยืนยันโดย Chen, Guha-Mukherjee, Harn และ Niizeki and Oono (6, 9, 11 และ 19)

3. <u>การศึกษาอิทธิพลต่าง ๆ ที่มีต่อการเกิดแคลลัสจากอับเรณูของข้าว</u>

3.1 <u>อิทธิพลของน้ำตาลซูโครสต่อการเกิดแคลลัส</u>

ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวในอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสซึ่งมีปริมาณน้ำตาลซูโครสต่างกัน คือ 0%, 0.5%, 3% และ 6% พบว่าไม่มีการชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารที่ปราศจากน้ำตาลซูโครส (3) ส่วนการชักนำให้เกิดแคลลัสนั้นจะมีเปอร์เซนต์เพิ่มขึ้นตามปริมาณน้ำตาลซูโครส และจะเพิ่มมากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 3% แต่ในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสูงกว่านี้เปอร์เซนต์การชักนำให้เกิดแคลลัสจะลดลง แสดงว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสเป็นปัจจัยอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส (13) แต่ Chaleff (3) ได้รายงานว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสไม่ใช่ปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดแคลลัสซึ่งค้านกับผลการทดลองที่ได้รับและผลการทดลองของ Hu (13)

นอกจากนี้ Hu (13) ยังได้รายงานว่าผนังอับเรณูมีบทบาทสำคัญต่อ การเพาะเลี้ยงอับเรณูโดยผลิตปัจจัยบางอย่างที่เรียกว่า wall factor ซึ่งมีอิทธิพล

ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเรณู แต่อิทธิพลของ wall factor อาจถูกลบล้างได้ด้วย ปริมาณน้ำตาลซูโครสหรือปัจจัยอื่น ๆ

การชักนำให้เกิดแคลลัสนอกจากจะขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอกแล้ว ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยภายในด้วย จากผลการทดลองในตารางที่ 1 จะพบว่าอับเรณูจากข้าวพันธุ์ กข 5 ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจะมีเปอร์เซนต์การชักนำให้เกิดแคลลัสมากที่สุด รองลงมาได้แก่ อับเรณูจากข้าวพันธุ์ กข 3, กข 1, กข 11, กข 7 และ กข 9 ตามลำดับ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าปัจจัยภายในหรือพันธุกรรมก็เป็นปัจจัยอย่างหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส (28, 29)

3.2 <u>อิทธิพลของน้ำมะพร้าวต่อการเกิดแคลลัส</u>

Iyer และ Raina (14) ได้รายงานว่าน้ำมะพร้าวมีบทบาทสำคัญต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าว แต่จากการทดลองในตารางที่ 2 พบว่าเปอร์เซนต์การชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารที่มีน้ำมะพร้าว 15% เพียงอย่างเดียว หรือมีทั้งน้ำมะพร้าว 15% และ 2, 4-D 2 mg/1 จะน้อยกว่าเปอร์เซนต์การชักนำให้เกิดแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงอับเรณูในอาหารที่มี 2,4-D 2 mg/1 เพียงอย่างเดียว แสดงว่าน้ำมะพร้าวไม่มีผลต่อการเพิ่มเปอร์เซนต์การชักนำให้เกิดแคลลัสของการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ กข ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง ข้อขัดแย้งดังกล่าวนี้อาจเกิดขึ้นเนื่องจากความแตกต่างทางด้านพันธุกรรมของพืชที่ใช้ในการทดลอง

จากการทดลองในข้อ 3.1 และ 3.2 จะพบว่า นอกจากอิทธิพลจากองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงอับเรณูแล้ว physiological factor อื่น ๆ เช่น ความเข้มแสง, อุณหภูมิ และสารเคมีบางอย่าง ฯลฯ ก็อาจจะมีผลต่อการเพิ่มเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสได้ ดังนั้นถ้าเพาะเลี้ยงอับเรณูในสภาพแวดล้อมที่มี physiological factor เหมาะสม ก็อาจจะช่วยเพิ่มเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสได้

4. การศึกษาการเกิดต้นและรากจากแคลลัส

Chang (4) รายงานว่ารากมีจุดกำเนิดมาจากเซล parenchyma ที่อยู่รอบ ๆ tracheary element เปลี่ยนแปลงเป็นเนื้อเยื่อเจริญ และต่อมากลายเป็น root primordia ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ root primordia ของต้นกล้าที่เพาะจากเมล็ด ส่วนยอดอ่อนนั้นมีจุดกำเนิดมาจากเซล parenchyma ซึ่งล้อมรอบอยู่ที่ผิวของแคลลัสประมาณ 1 – 2 ชั้นเปลี่ยนแปลงเป็นเนื้อเยื่อเจริญต่อมากลายเป็น bud primordia ในที่สุดกลายเป็น shoot apex และมีleaf primordia เกิดขึ้นบริเวณด้านข้าง หลังจากนี้ leaf primordia จะถูกสร้างจาก shoot apex ปกติแล้วการเกิดรากและยอดอ่อนจะเกิดพร้อม ๆ กัน แต่รากจะสามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าก่อนยอดอ่อน เมื่อเกิดเป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์แล้วก็จะเจริญเติบโตต่อไป

จากการทดลองพบว่าต้นข้าวที่ได้มีทั้งต้นเผือกและต้นสีเขียว ซึ่งปกติแล้วเกิดจากอับเรณูแต่ละอัน แต่มีต้นเผือกและต้นสีเขียวที่เกิดขึ้นบนแคลลัสก้อนเดียวกัน แสดงว่ามีจุดกำเนิดมาจากเรณูต่างกัน ต้นเผือกที่เกิดขึ้นมี 2 ชนิด คือ ต้นเผือกที่มีสีขาวเพียงสีเดียว และต้นเผือกที่มีใบสีขาวแต่กาบใบมีสีม่วงแดง ลักษณะดังกล่าวที่เกิดขึ้นแสดงว่าต้นเผือกที่มีสีขาวจะไม่มีคลอโรฟิล ส่วนบริเวณที่มีสีม่วงแดงนั้นคงมีรงค์วัตถุชนิดอื่น คือ anthocyanin อยู่ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าเปอร์เซนต์ของต้นเผือกที่เกิดขึ้นค่อนข้างสูง ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากอับเรณูของข้าวพันธุ์ กข ที่ใช้ในการทดลองมีเปอร์เซนต์ homozygosity ค่อนข้างสูง จึงชักนำให้เกิดต้นเผือกได้ง่าย (27)

สาเหตุของการเกิดต้นเผือกในยาสูบและข้าวบาร์เลย์ พบว่าเกิดจากการใช้ปริมาณน้ำตาลซูโครสสูงในอาหารเพาะเลี้ยงอับเรณู (8, 21) แต่ Wang (27) รายงานว่าการเกิดต้นเผือกในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวไม่ได้มีสาเหตุมาจากปริมาณน้ำตาลซูโครส, ความแตกต่างของสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงอับเรณู และความแตกต่างของปริมาณเหล็กและแมงกานีสในสูตรอาหารต่าง ๆ และจากผลการทดลองที่ได้พบว่าแคลลัส

ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสูง (6%) เมื่อย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่ทำให้เกิดต้นและรากซึ่งมีปริมาณน้ำตาลซูโครส (3%) จะมีเปอร์เซนต์การเกิดต้นปกติสีเขียวสูงสุด นอกจากนี้ Wang (27) พบว่าต้นเผือกที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวไม่ได้มีผลจาก recessive albino gene แต่ไม่พบ RNA และเอ็นไซม์ที่จำเป็นสำหรับขบวนการสร้างคลอโรฟิล แสดงว่าการขาด RNA และเอ็นไซม์เหล่านั้นไม่ได้เกิดขึ้นเนื่องจากการขาด gene ในการสร้าง RNA และเอ็นไซม์ดังกล่าว แต่อาจเป็นเพราะว่า gene ในขบวนการสร้าง RNA บางส่วนไม่ทำงานหรือถูกยับยั้ง และมีผลทำให้ไม่สามารถสร้างเอ็นไซม์ด้วย

ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า physiological factor และ genetical factor มีความสัมพันธ์กับการเกิดต้นเผือก โดย physiological factor เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลทำให้ genetical factor ได้แก่ gene ทำงานแตกต่างกัน เช่น การเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำจะมีเปอร์เซนต์การเกิดต้นเผือกน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวในที่มีอุณหภูมิสูง (27) ในกรณีการเกิดต้นเผือกของข้าวอาจเป็นไปได้ว่า physiological factor มีผลทำให้ functional gene ซึ่งทำหน้าที่ในการเร่ง (regulate) ขบวนการสร้าง RNA ไม่ทำงาน จึงไม่สามารถสร้าง RNA และเอ็นไซม์ที่จำเป็นสำหรับขบวนการสร้างคลอโรฟิล ต้นข้าวที่เกิดขึ้นจึงกลายเป็นต้นเผือก

5. <u>การย้ายต้นอ่อนของข้าวไปปลูกในดิน</u>

ต้นอ่อนของข้าวที่เป็นต้นเผือกนั้นเมื่อย้ายมาปลูกในดินจะตาย เนื่องจากขาดคลอโรฟิลจึงไม่สามารถสังเคราะห์อาหารเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ส่วนต้นสีเขียวเมื่อย้ายมาปลูกในดินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว บางต้นอาจจะตายไปเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมอย่างกระทันหันทำให้ปรับตัวไม่ทัน เช่น เกิดการคายน้ำมากกว่าอัตราการดูดน้ำ บางคนจึงนิยมตัดใบข้าวแต่ละใบทิ้งเสียประมาณครึ่งหนึ่งเพื่อลดการคายน้ำ แต่ส่วนใหญ่หลังจากย้ายต้นอ่อนของข้าวมาปลูกในดินแล้วจะเจริญได้ตามปกติ

เมื่อต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูเจริญเติบโตเต็มที่จะพบว่ามีลักษณะแตกต่างจากต้นแม่เนื่องจากความแตกต่างทางด้านโครโมโซม ต้นข้าวที่เกิดขึ้นอาจจะมีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกันตั้งแต่ haploid, diploid จนถึง polyploid (4) การเกิด diploid หรือ polyploid นั้น เกิดจาก haploid cell ในระยะแรกของการเกิดแคลลัสเกิด endomitosis และเกิดการรวมตัวของนิวเคลียส ทำให้เซลที่เกิดขึ้นมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า กลายเป็น homozygous diploid cell และถ้า diploid cell เกิดเหตุการณ์ในทำนองเดียวกันอีกก็จะกลายเป็น polyploid cell (5) เมื่อย้ายแคลลัสเหล่านี้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่ทำให้เกิดรากและต้น ก็จะได้ต้นข้าวที่มีโครโมโซมแตกต่างกันดังกล่าว