บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การขยายพันธุ์พืชแบบ micropropagation นับเป็นธุรกิจใหญ่ที่เกี่ยวข้องกับเงินหลายพันล้านดอลล่าร์ ปัจจุบันการขยายพันธุ์พืชโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงมีบทบาทสำคัญมาก หลักการสำคัญในการขยายพันธุ์คือ ให้สามารถผลิตพืชในแต่ละครั้งให้ได้ปริมาณมากและรวดเร็ว ราคาต่อหน่วยต่ำ การขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดพืชเทียมนับเป็นเทคโนโลยีใหม่ซึ่งได้พัฒนามาประมาณ 15 ปี ซึ่งด้วยเทคโนโลยีนี้ช่วยให้ขยายพันธุ์พืชได้เร็ว ปริมาณมาก และราคาถูก ทั้งยังมีข้อได้เปรียบในการขนส่ง ลดปัญหาด้านการกักกันโรคพืช ทำให้การแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชเป็นไปได้โดยสะดวกขึ้น (Redenbaugh et al., 1986; Fujii et al., 1987)

หลักการของเมล็ดพืชเทียมคือใช้ hydrogel หุ้ม somatic embryo ที่พัฒนามาจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตัวอย่างเช่นการใช้ sodium alginate เติมลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อทำหน้าที่เป็นเอนโดสเปิร์มเทียม และอาศัยปฏิกิริยาระหว่าง sodium alginate กับ calcium nitrate ได้สารประกอบ calcium alginate ซึ่งมีลักษณะเป็นเจลค่อนข้างแข็ง มีคุณสมบัติยอมให้น้ำ ความชื้น และอากาศผ่านเข้าออกได้เป็นอย่างดี ทำหน้าที่เป็นเปลือกหุ้มเมล็ดพืชเทียม (Redenbaugh et al., 1987)

ปัจจัยสำคัญในการผลิตเมล็ดพืชเทียมคือต้องสามารถผลิต somatic embryo ที่แข็งแรงและมีขนาดสม่ำเสมอ เพื่อเพิ่มเปอร์เซนต์การงอกของเมล็ดพืชเทียมให้สูงที่สุด ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีของชัยวัฒน์ น่าชม (2531) ในการผลิต somatic embryo และผลิตเมล็ดพืชเทียม ซึ่งให้อัตราการงอกสูงถึง 98.7 เปอร์เซนต์ เมื่อทดสอบการงอกในสภาพปลอดเชื้อในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

แม้ว่า somatic embryo จะมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงในด้านสัณฐานวิทยาคล้ายกับของ zygotic embryo แต่จะมีข้อแตกต่างที่สำคัญคือ somatic embryo ไม่มีระยะพักตัว โดยพบว่ามีการงอกในระหว่างเก็บรักษา งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ในการศึกษาหาความรู้และเทคนิคพื้นฐานในการเก็บเมล็ดพืชเทียมให้ได้นานขึ้นโดยไม่มีการงอกระหว่างช่วงที่เก็บรักษา และมีเปอร์เซนต์การงอกสูงเมื่อนำมาเพาะใหม่ เพื่อสามารถนำเมล็ดพืชเทียมไปใช้ประโยชน์ได้อย่างแท้จริง

ปัจจัยหลายอย่างที่จะช่วยให้สามารถเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียมให้นานขึ้น เช่น สภาพของอุณหภูมิ แสง ความแห้งของเมล็ดพืชเทียม ตลอดจนการใช้ ABA treatment

ผลการศึกษาวิธีเก็บเมล็ดพืชเทียมที่อุณหภูมิ 4, 15 และ 25 องศาเซลเซียส ในที่มีแสงและที่มืด โดยพยายามเก็บให้นานเป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์นั้น พบว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสภาพมีแสงและที่มืด ไม่มีการงอกเกิดขึ้นตลอด 3 สัปดาห์ แต่เมื่อนำมาไว้ที่อุณหภูมิปกติ (25 ± 2 องศาเซลเซียส) แสง 1000 ลักซ์ พบว่าเมล็ดที่เก็บไว้นาน 1 สัปดาห์จะมีเปอร์เซนต์การงอกรวม (ระหว่างและหลังการเก็บรักษา) สูงกว่า 2 และ 3 สัปดาห์ (ตารางที่ 4) โดยที่เมื่อเก็บไว้นาน 3 สัปดาห์ เปอร์เซนต์การงอกรวมต่ำลงมากเหลือเพียง 60 เปอร์เซนต์เท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับงานของชัยวัฒน์ น่าชม (2531) ซึ่งเมื่อทำเป็นเมล็ดพืชเทียมแล้วปล่อยให้งอกทันที สามารถงอกได้สูงถึง 98.75 เปอร์เซนต์ แต่ผลงานนี้ได้ผลเช่นเดียวกับผลงานของ Bapat และ Rao (1988) ซึ่งได้ศึกษาการงอกหลังการเก็บรักษา somatic embryo ของ *Santalum album* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วัน โดยพบว่าเปอร์เซนต์การงอกต่ำมากคือเมื่อเก็บ somatic embryo ใน alginate 3 เปอร์เซนต์ อัตราการงอกหลังเก็บไว้ 45 วันมีเพียง 10 เปอร์เซนต์เท่านั้น เมื่อเก็บเมล็ดพืชเทียมของแครอทที่อุณหภูมิสูงขึ้นคือ 15 และ 25 องศาเซลเซียส ทั้งในสภาพที่มีแสงและที่มืด พบว่ามีเปอร์เซนต์การงอกระหว่างเก็บรักษาค่อนข้างสูง โดยเฉพาะที่ 25 องศาเซลเซียสซึ่งมีเปอร์เซนต์การงอกสูงมาก ไม่ควรใช้เป็นอุณหภูมิในการเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียม แต่ควรเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส มีแสงหรือไม่ก็ได้

คุณสมบัติของเมล็ดพืชโดยทั่วไปคือมีระยะพักตัวเมื่อเจริญเต็มวัย และเมล็ดจะงอกใหม่อีกครั้งเมื่อได้รับน้ำและอยู่ในสภาวะที่เหมาะต่อการเจริญ สำหรับ somatic embryo นั้นโดยปกติจะไม่มีระยะพักตัว เมื่อผ่านระยะต่างๆของ somatic embryogenesis ก็สามารถงอกได้เลย (Senaratna et al., 1992) somatic embryo อาจสูญเสียน้ำและเกิด desiccation tolerance ได้โดยการให้ ABA จากแหล่งภายนอก ซึ่ง Senaratna, Mckersie และ Bowley (1989) ได้ศึกษาใน alfalfa (*Medicago sativa* L.) โดยค่อยๆทำให้ somatic embryo แห้งจนเหลือความชื้น 10-15 เปอร์เซนต์ และเก็บไว้เป็นเวลาอย่างน้อย 3 สัปดาห์ แล้วทำให้ชื้นขึ้นมาใหม่ พบว่าประมาณ 65 เปอร์เซนต์ของ somatic embryo สามารถงอกใหม่ได้

การวิจัยนี้ได้ทดลองนำเมล็ดพืชเทียมมาทำให้แห้ง 2 วิธีคือ การทำแห้งอย่างช้าๆโดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดความชื้น เปรียบเทียบกับการทำแห้งอย่างรวดเร็วโดยใช้ลมเป่าใน laminar flow ซึ่งใช้เวลาเพียง 1 ใน 3 ของการทำแห้งโดยใช้ silica gel (ตารางที่ 5) เมื่อนำเมล็ดพืชเทียมที่ผ่านการทำให้แห้งทั้งสองวิธี โดยให้มีการสูญเสียน้ำ 20, 40, 60, 70 และ 80 เปอร์เซนต์ แล้วนำมาแช่น้ำใหม่ให้ชุ่มและปล่อยให้งอกต่อไป พบว่าเปอร์เซนต์การงอกใหม่ของเมล็ดพืชเทียมที่ผ่านการทำแห้งทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกันเมื่อการสูญเสียน้ำไม่เกิน 60 เปอร์เซนต์ แต่ถ้าปล่อยให้เมล็ดพืชเทียมเสียน้ำมากกว่า 60 เปอร์เซนต์ พบว่าการทำแห้งอย่างช้าๆโดยใช้ silica gel จะให้

เปอร์เซนต์การงอกใหม่สูงกว่า ซึ่งผลงานวิจัยนี้สอดคล้องกับ Senaratna และคณะ (1989) ซึ่งได้ศึกษาใน alfalfa เกี่ยวกับ desiccation tolerance ของ somatic embryo และ Senaratna และคณะ (1989) ได้อ้างถึงงานของ Krochko, Bowley และ Pacey (1978) ซึ่งพบว่าการทำแห้งอย่างช้าๆช่วยพัฒนาการเกิด desiccation tolerance ในมอสบางชนิด ดังนั้นเมื่อผนวกกับงานวิจัยครั้งนี้ จึงเลือกวิธีการทำเมล็ดพืชเทียมให้แห้งอย่างช้าๆด้วย silica gel

เมื่อนำเมล็ดพืชเทียมแครอทมาทำแห้งด้วย silica gel ให้เสียน้ำไปในอัตราต่างๆกัน และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 ±2 องศาเซลเซียสในที่มืด เป็นระยะเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ตามลำดับ เพื่อศึกษาอัตราการงอกของเมล็ดหลังจากนำมาแช่น้ำ พบว่าเมื่อทำให้เมล็ดพืชเทียมเสียน้ำไป 80 เปอร์เซนต์ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 สัปดาห์จะไม่มีการงอกเกิดขึ้นเลย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Liu และคณะ (1992) ซึ่งได้ศึกษาในเมล็ดพืชเทียมของแครอทเช่นกัน แต่ถ้าทำให้เมล็ดพืชเทียมเสียน้ำน้อยลงคือ 70 เปอร์เซนต์ พบว่ามีการงอกเกิดขึ้นบ้างในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 แต่ในอัตราที่ต่ำมากคือเพียง 6.7 เปอร์เซนต์เท่านั้น (ตารางที่ 6) อย่างไรก็ดีพบว่าถ้าในการทำแห้งนั้นยิ่งทำให้เมล็ดพืชเทียมเสียน้ำในปริมาณมาก การงอกรวม (ระหว่างและหลังการเก็บรักษา) หลัง rehydrate จะต่ำกว่าในกรณีที่เมล็ดเสียน้ำน้อยกว่า โดยในการทดลองนี้พบว่า ถ้าเมล็ดเสียน้ำไป 80 เปอร์เซนต์ เมื่อเก็บไว้ 3 สัปดาห์แล้วมา rehydrate ใหม่จะมีการงอกรวมเพียง 40 เปอร์เซนต์ และเมื่อทำให้เสียน้ำเพียง 70 เปอร์เซนต์ และเก็บไว้ 3 สัปดาห์ การงอกรวมสูงขึ้นถึง 60 เปอร์เซนต์หลังการ rehydrate (ตารางที่ 6) เมื่อพิจารณาการตายในระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส พบว่าถ้าทำให้เสียน้ำมากไป somatic embryo ในเมล็ดพืชเทียมมีโอกาสตายสูงกว่าเมื่อทำให้เสียน้ำน้อย โดยพบว่าเมล็ดพืชเทียมที่มีการเสียน้ำ 80 เปอร์เซนต์ มีการตายในระหว่างเก็บรักษาสูงถึง 37.3 เปอร์เซนต์

จากงานวิจัยนี้พบว่า เมล็ดพืชเทียมของแครอทที่มีการสูญเสียน้ำ 70 เปอร์เซนต์ มีการงอกในระหว่างเก็บรักษาเพียงเล็กน้อย และมีการงอกรวมหลังการ rehydrate สูงถึง 60 เปอร์เซนต์ในสัปดาห์ที่ 3 น่าจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ดี อย่างไรก็ตามเมล็ดพืชเทียมที่มีการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซนต์ ซึ่งไม่มีการงอกเลยในระหว่างการเก็บรักษาคล้ายกับเมล็ดพืชจริงที่มีระยะพักตัวและสามารถเก็บได้เป็นเวลานานโดยไม่มีการงอกน่าจะเป็นประโยชน์ในการผลิตเมล็ดพืชเทียมเช่นกัน แต่เปอร์เซนต์การงอกรวมหลังการ rehydrate ยังต่ำและมีเปอร์เซนต์การตายระหว่างการเก็บรักษาค่อนข้างสูง ซึ่งคาดว่าเกิดจากการขาด desiccation tolerance ของ somatic embryo

ในเมล็ดธรรมชาติพบว่ามี ABA peak ชั่วคราวในระยะท้ายของการเจริญ (Finkelstein et al., 1985) ซึ่งอาจทำให้เกิดการแสดงออกของ desiccation tolerance ในเมล็ด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า somatic embryoไม่มีเปลือกหุ้มเมล็ดและ endosperm ซึ่งเป็นส่วนที่คาดว่าทำให้เกิดการสังเคราะห์

ABA, การย้ายตำแหน่งหรือการควบคุมสัญญาณในการสังเคราะห์ ABA ภายในเอมบริโอ จากการศึกษาพบว่าการวาง seed coat - endosperm complex ของ alfalfa ให้อยู่ชิดกับ somatic embryo ที่กำลังเจริญ ช่วยชักนำให้เกิด desiccation tolerance ใน somatic embryo โดยปราศจาก treatment ใดๆ (Senaratna, 1992) นอกจากนี้ยังพบว่าการเติม ABA จากภายนอกสามารถชักนำให้เกิด desiccation tolerance ใน somatic embryo ของแครอท และ alfalfa ได้เช่นเดียวกัน (Kitto and Janick, 1985b; Senaratna et al., 1989; Senaratna et al., 1990) อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยเหล่านี้พบว่า somatic embryo ที่เลี้ยงในอาหารซึ่งเติม ABA จากแหล่งภายนอก ยังมีเปอร์เซนต์การงอกต่ำหลังการ rehydrate ซึ่งอาจเนื่องจาก somatic embryo มีระยะการเจริญที่ไม่เหมาะสมในการชักนำให้เกิด desiccation tolerance

ในงานวิจัยนี้จึงได้มีการศึกษาระยะที่เหมาะสมของ somatic embryo ในการชักนำให้เกิด desiccation tolerance โดยใช้ ABA (ตารางที่ 7) พบว่าเมล็ดพืชเทียมซึ่งผลิตจาก **somatic embryo ระยะ torpedo shape ที่มีอายุ 14 วัน ความยาว 2.6 มิลลิเมตร** เหมาะที่จะนำมาทำ ABA treatment โดยมีเปอร์เซนต์การงอกสูงสุดหลังการ rehydrate ในขณะที่ somatic embryo ระยะ globular shape และ heart shape ไม่สามารถงอกได้เลย แสดงให้เห็นว่า somatic embryo ทั้งสองระยะนี้ไม่สามารถตอบสนองต่อ ABA แต่ somatic embryo ระยะ torpedo shape สามารถตอบสนองต่อ ABA ได้ดี (ตารางที่ 7) ดังนั้นระยะการเจริญของ somatic embryo จะมีผลต่อการชักนำ desiccation tolerance ด้วย ABA ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Iida และคณะ (1992) ซึ่งพบว่าเอมบริโอระยะ torpedo shape ของแครอทที่มีอายุ 15 วัน สามารถชักนำให้เกิด desiccation tolerance โดย ABA ได้ดีที่สุด นอกจากนี้ Senaratna และคณะ (1990) ยังแสดงให้เห็นว่า somatic embryo ของ alfalfa ที่ระยะ torpedo shape ถึงระยะ cotyledonary เท่านั้นที่จะตอบสนองต่อ ABA และชักนำให้เกิด desiccation tolerance ในขณะที่ globular shape และ heart shape ไม่สามารถชักนำให้เกิด desiccation tolerance ซึ่งผลการทดลองนี้ตรงกับผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัย

จากการศึกษาผลความเข้มข้นของ ABA ที่มีต่อการงอกของเมล็ดพืชเทียมแครอทพบว่า **เมล็ดพืชเทียมที่ได้จาก somatic embryo ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่เติม ABA 0.1-0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซนต์การงอกหลังการ rehydrate สูงสุด** (ตารางที่ 8) และเมื่อเก็บเมล็ดพืชเทียมดังกล่าวไว้เป็นเวลา 3 สัปดาห์ การงอกยังสูงถึง 64 เปอร์เซนต์หลังการ rehydrate (ตารางที่ 9) แต่ถ้าไม่มี ABA treatment มาก่อน เมล็ดพืชเทียมงอกได้เพียง 40 เปอร์เซนต์เท่านั้น (ตารางที่ 6) ส่วน somatic embryo ที่เลี้ยงในอาหารซึ่งเติม ABA 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตรแม้ว่าสามารถงอกได้หลังการ rehydrate แต่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ แสดงให้เห็นว่า ABA ที่ความเข้มข้นสูงๆถึงแม้ว่าจะชักนำให้เกิด desiccation tolerance แต่จะยับยั้งการเจริญตามปกติของ somatic

embryo หลังการ rehydrate (Iida et al., 1992) ในขณะที่เมล็ดพืชเทียมซึ่ง somatic embryo เลี้ยงในอาหารซึ่งมี ABA ความเข้มข้นที่เหมาะสมจะชักนำให้เกิด desiccation tolerance โดย somatic embryo จะเจริญไปเป็นต้นที่มีลักษณะสมบูรณ์และแข็งแรง แต่ถ้าความเข้มข้นของ ABA ต่ำเกินไปจะไม่เพียงพอในการชักนำให้เกิด desiccation tolerance ที่สมบูรณ์ ซึ่งแสดงให้เห็นใน somatic embryo ของแครอท และ alfalfa เช่นกัน (Iida et al., 1992; Senaratna, Mckersie and Bowley., 1990a) งานวิจัยนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ Liu และคณะ (1992) ซึ่งพบว่าเปอร์เซนต์การงอกหลังการ rehydrate ของเมล็ดพืชเทียมแห้งที่มีการสูญเสียน้ำ 95 เปอร์เซนต์ จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเติม ABA ในอาหารเลี้ยง somatic embryo ก่อนทำเมล็ดพืชเทียม และเปอร์เซนต์การงอกจะสูงสุดเมื่อเติม ABA 0.13 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่เมื่อความเข้มข้นของ ABA สูงขึ้นทำให้เปอร์เซนต์การงอกลดลง

<u>สรุปผลการทดลอง</u>

ในการพัฒนาเทคนิคเพื่อผลิตเมล็ดพืชเทียมให้มีคุณสมบัติดีขึ้น โดยเฉพาะการพัฒนาให้มีช่วงพักตัวซึ่งจะมีประโยชน์ในการเก็บและการขนส่ง ตลอดจนสภาพแวดล้อมในการเก็บให้ได้นานโดยมีผลกระทบต่อการงอกน้อยที่สุดนั้น การทดลองนี้ได้ใช้ somatic ของแครอทเป็นพืชทดลอง ซึ่งได้ผลดังนี้

การทำเมล็ดพืชเทียมให้แห้งลงไปถึง 80 เปอร์เซนต์ และพบว่าวิธีการทำให้แห้งด้วย silica gel ดีกว่าวิธีใช้ลมเป่า

การให้ ABA treatment ที่เหมาะสมจะช่วยชักนำให้เมล็ดพืชเทียมเกิด desiccation tolerance มากขึ้น โดยควรทำ ABA treatment ด้วย ABA เข้มข้น 0.1-0.2 มิลลิกรัมติอลิตร เป็นเวลา 7 วันกับ somatic embryo ระยะ torpedo ที่มีอายุ 14 วันหรือมีขนาดประมาณ 2.6 มิลลิเมตร ก่อนที่จะนำมาทำเป็นเมล็ดพืชเทียม

การเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียมก่อนนำไปปลูก ควรเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในที่มืดหรือสว่างก็ได้