บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาของอับละอองเกสร และละอองเกสรของผักกาดขาวปลี และผักกาดหัว โดยการนำอับละอองเกสรไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าอับละอองเกสรของผักกาดขาวปลีพันธุ์ #161 ค่อนข้างตอบสนองต่ออาหารได้ดีโดยอัตราของอับละอองเกสรที่พัฒนาเป็น callus มากว่าอับละอองเกสรของผักกาดขาวปลีพันธุ์ #23 และโดยเฉพาะผักกาดหัวพันธุ์ #9 กับ #100 ที่อับละอองเกสรไม่สามารถพัฒนาเป็น callus ได้บนอาหารที่ใช้ในการทดลองนี้เลย อย่างไรก็ตามพบอุปรรคที่สำคัญคือเมล็ดพันธุ์ของผักกาดขาวปลีพันธุ์ #161 เมื่อนำไปเพาะเพื่อกระตุ้นให้เมล็ดงอกก่อนการ vernalization พบว่า มีเชื้อราเข้าทำลาย แม้จะฟอกเมล็ดพันธุ์ในยากำจัดเชื้อรา หรือฟอกใน clorox 10 % ก่อนการเพาะเมล็ดแล้วก็ตาม ทำให้เปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำ ทั้งนี้เพราะว่าเมล็ดพันธุ์เก็บไว้นานเกินไป ประกอบกับไม่สามารถหาเมล็ดพันธุ์ที่เป็นพันธุ์เดียวกันกับพันธุ์ #161 ตามท้องตลาดได้ นอกจากนั้นยังพบว่าระยะเวลาการ vernalization มีผลต่อการเจริญเติบโตและการออกดอกของผักกาดขาวปลี (นิมิต, 2529) และผักกาดหัวหลังจากปลูก กล่าวคือ ถ้าใช้ระยะเวลา vernalization สั้นเกินไปทำให้ต้นกล้าที่ผ่านการ vernalization แล้ว มีความแข็งแรง อัตราการรอดตายหลังจากย้ายปลูกสูง แต่ใช้ระยะเวลาในการออกดอกนาน หรือไม่สามารถกระตุ้นให้ออกดอกได้ในสภาพควบคุม ถ้าใช้ระยะเวลา vernalization นานเกินไปจะได้ต้นกล้าที่ไม่แข็งแรง อัตราการรอดตายหลังย้ายปลูกต่ำ การออกดอกจะใช้ระยะเวลาสั้น การทดลองครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าระยะเวลา vernalization ที่เหมาะสมคือ 20 วัน ต้นกล้าหลังจาก vernalization มีความแข็งแรง สามารถกระตุ้นให้ผักกาดขาวปลี และผักกาดหัวออกดอกได้ภายใน 20 วันหลังจากย้ายปลูก ทำให้ช่อดอกมีความแข็งแรง ยกเว้นต้นกล้าของผักกาดขาวปลีพันธุ์ #161 หลังจากผ่านการ vernalization แล้วต้นกล้าที่ได้ไม่มีความแข็งแรง อัตราการรอดตายต่ำ จึงเป็นอีกปัญหาหนึ่ง ประกอบกับต้องปลูกในพื้นที่จำกัด และสภาพควบคุมทั้งอุณหภูมิและแสงเพื่อให้มีดอกสำหรับการทดลองตลอดปี ทำให้มีดอกสำหรับใช้ในการทดลองเป็นไปอย่างจำกัด การใช้ดอกจากต้นที่ปลูกในสภาพภายนอก พบว่าหลังจากเลี้ยงอับละอองเกสรแล้ว มีอัตรา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์สูงมาก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าสภาพภายนอกมีเชื้อจุลินทรีย์มาก และแทรกอยู่ภายในกลีบดอก ซึ่ง clorox ไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปได้

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดดอก และระยะการพัฒนาของละอองเกสร พบว่าขนาดดอกมีความสัมพันธ์โดยตรงกับระยะการพัฒนาของละอองเกสร กล่าวคือดอกที่มีขนาดเล็กจะมีระยะการพัฒนาของละอองเกสรอยู่ในระยะที่อ่อนกว่าดอกที่มีขนาดใหญ่กว่า และดอกที่มีขนาดเดียวกัน จะมีอัตราดอกที่ละอองเกสรอยู่ในระยะเดียวกันสูงมาก ซึ่งคล้ายกับงานทดลองที่พบในมะเขือ (อำพล, 2525) และพริก (จรรยา, 2528) โดยดอกผักกาดขาวปลีที่มีขนาด 1.6-2.5 มม. และดอกผักกาดหัวขนาด 1.6-3.5 มม. มีดอกที่ละอองเกสรอยู่ในระยะ uninucleate สูงถึงร้อยละ 100 ยกเว้นดอกของผักกาดหัวพันธุ์ #9 ที่มีขนาด 2.6-3.5 มม. มีอัตราดอกที่ละอองเกสรอยู่ในระยะ uninucleate สูงสุดร้อยละ 90 อย่างไรก็ตามยังถือว่าอยู่ในอัตราที่สูง ดังนั้นดอกที่มีขนาดนี้จึงเหมาะสมต่อการนำอับละอองเกสรไปเลี้ยงบนอาหาร เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างขนาดดอก และระยะการพัฒนาของละอองเกสรผักกาดขาวปลี และผักกาดหัว พบว่าดอกผักกาดขาวปลีที่มีระยะการพัฒนาของละอองเกสรอยู่ในระยะ uninucleate จะมีขนาดระหว่าง 1.6-2.5 มม. แต่ดอกผักกาดหัวอยู่ในช่วง 1.6-3.5 มม. แสดงให้เห็นว่าพืชที่ต่างกันมีความสัมพันธ์ระหว่างขนาดดอกและระยะการพัฒนาของละอองเกสรแตกต่างกัน (Dunwell et al., 1985; Keller, 1984; Thurling and Chay, 1984)การใช้สี quinacrine HCl ย้อมตรวจดูการพัฒนาของละอองเกสร สามารถย้อมติดนิวเคลียสได้อย่างชัดเจน โดยเฉพาะระยะ microspore tetrad และระยะ uninucleate ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับสี DAPI (Fan et al., 1988) และ mitramycin (Pescitelli and Petolino, 1988) แต่หลังจากระยะ uninucleate แล้ว ไม่สามารถแยกระยะ starch grain เป็นระยะ binucleate และ trinucleate ได้เป็นเพราะว่าในช่วงท้ายของระยะ uninucleate เริ่มมีการสร้างแป้ง ซึ่งต่างจากที่พบในข้าวโพด จะเกิดการสร้างแป้งในระยะ binucleate (Pescitelli and Petolino, 1988) ประกอบกับผนังของละอองเกสรอาจหนากว่าผนังของละอองเกสรข้าวโพด จึงทำให้ไม่สามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสได้

การศึกษาความมีชีวิตและความสามารถในการงอก pollen tube ของละอองเกสรที่ได้จากต้นที่ปลูกในสภาพควบคุม ให้แสงตลอดเวลาด้วยหลอดไฟ fluorescent ความเข้มแสง 9000 lux และอุณหภูมิ 22 ± 3 °ซ. พบว่าความมีชีวิตของละอองเกสรแต่ละพันธุ์มีความแตกต่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กัน อย่างไรก็ตามความมีชีวิตของละอองเกสรทุกพันธุ์มากกว่าร้อยละ 90 ละอองเกสรที่มีชีวิตเมื่อย้อมด้วยสี fluorescein diacetate จะเรืองแสง ส่วนไม่มีชีวิตจะไม่เรืองแสง ทั้งนี้เป็นเพราะว่าละอองเกสรที่มีชีวิตจะมี enzyme ชื่อesterase ซึ่งenzyme นี้จะย่อย fluorescein diacetate ได้ fluorescein มีคุณสมบัติในการเรืองแสงได้ ส่วนละอองเกสรที่ไม่มีชีวิตจะไม่มี enzyme นี้ (Jefferies, 1977) การศึกษาความสามารถในการงอก pollen tube พบว่าละอองเกสรของทุกพันธุ์มีความสามารถในการงอก pollen tube มากกว่าร้อยละ 90 และยังพบว่าปลาย pollen tube ของละอองเกสรผักกาดหัวพันธุ์ #100 หลังจากงอกได้ระยะหนึ่งจะแตกออก ซึ่งต่างจากปลาย tube ของผักกาดขาวปลีและผักกาดหัวพันธุ์ #9 ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะว่าละอองเกสรของผักกาดหัวพันธุ์ #100 ต้องการ osmotic pressure ของอาหารสูงกว่าซึ่งระดับน้ำตาลซูโครสร้อยละ 20 ที่มีในสูตรอาหารตาม Roberts et al.(1988) อาจมีความเข้มข้นต่ำเกินไป อย่างไรก็ตามจากการทดลองชี้ให้เห็นว่าละอองเกสรมีความสมบูรณ์อยู่ในอัตราที่สูง เมื่อปลูกในสภาพควบคุม

จากการทดลองเลี้ยงอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #23 กับ #161 และผักกาดหัวพันธุ์ #9 กับ #100 บนอาหารสูตรต่าง ๆ (การทดลองที่ 3) พบว่ามีเพียงอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #161 เท่านั้นที่สามารถพัฒนาเป็น callus ได้ บนอาหารตามสูตร Quazi (1978) และสูตรดัดแปลงตามประสาทพร โดยมีอัตราร้อยละ 44.32 และ 5.54 ตามลำดับ แต่ไม่สามารถชักนำให้อับละอองเกสรพัฒนาเป็น callus ได้บนอาหารสูตร Lichter (1981) และ Keller (1984) ได้ ส่วนอับละอองเกสรของผักกาดขาวปลีและผักกาดหัวไม่สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของอับละอองเกสรเป็น callus ได้บนอาหารสูตรใดเลย และเมื่อนำอับละอองเกสรไปเลี้ยงบนอาหารตามสูตร Keller (1984) แต่ดัดแปลงเติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 4 และ NAA ร่วมกับ 2,4,5-T ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน (การทดลองที่ 4) พบว่าอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #161สามารถพัฒนาเป็น callusได้สูงสุดร้อยละ 61.09 ส่วนอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #23 พัฒนาเป็น callusได้สูงสุดเพียงร้อยละ 36.10 เท่านั้น เมื่อเติม NAA ร่วมกับ BAP ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน (การทดลองที่ 5) พบว่าอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #161 พัฒนาเป็น callus ได้สูงสุดร้อยละ 77.75 ส่วนอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #23 พัฒนาเป็น callus ได้สูงสุดเพียงร้อยละ 24.99 เท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบการทดลองที่ 3 4 และ 5 จะพบว่าอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #161 มีการตอบสนองต่ออาหารที่ใช้ในการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ครั้งนี้ดีกว่าอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #23 และโดยเฉพาะผักกาดหัวพันธุ์ #9 กับ #100 ไม่สามารถพัฒนาเป็น callus ได้เลยไม่ว่าจะใช้สูตรอาหารที่ต่างกัน หรือแม้แต่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงในอาหารแล้วก็ตามทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าพันธุกรรมมีส่วนทำให้อับละอองเกสรพัฒนาเป็น callus โดยผักกาดขาวปลีพันธุ์ #161 อาจมีพันธุกรรมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งมีพันธุกรรมต่างจากผักกาดขาวปลีพันธุ์ #23 และผักกาดหัวทั้งสองพันธุ์ งานทดลองนี้คล้ายกับที่พบใน *B. napus* ssp. *oleifera* (Loh and Ingram, 1982) และ *B. oleracea* var. *gemmifera* (Ockendon, 1985) นอกจากนั้นยังพบว่าแม้แต่เป็นพันธุ์เดียวกัน การพัฒนาของอับละอองเกสรเป็น callus มีความแปรปรวนสูงดังเช่น อับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #23 เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี NAA เพียงอย่างเดียวในการทดลองที่ 4 และ 5 แต่ระยะเวลาทดลองต่างกันพบว่าการเติม NAA 1.0 มก./ล. และ 2.0 มก./ล. เพียงอย่างเดียวในการทดลองที่ 5 สามารถชักนำให้เกิด callus ได้ร้อยละ 5.55 และ 2.77 ตามลำดับ ส่วนการทดลองที่ 4 ไม่สามารถชักนำให้เกิด callus ได้ เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของ NAA ในระดับเดียวกัน ลักษณะเดียวกันนี้ยังพบในผักกาดขาวปลีพันธุ์ #161 เมื่อใช้ NAA 2.0 มก./ล. ในการทดลองที่ 4 สามารถชักนำให้เกิด callus ได้ร้อยละ 8.33 แต่การทดลองที่ 5 สามารถชักนำให้เกิดได้สูงสุดร้อยละ 38.87 นอกจากนั้นในการทดลองที่ 8 เมื่อเปรียบเทียบตำรับอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของ callus เป็นต้น พบว่า callus บางอันที่เลี้ยงบนอาหารตำรับที่มี GA_3 3.5 มก./ล. ร่วมกับ BAP 11.0 มก./ล. และน้ำมะพร้าวร้อยละ 10 สามารถชักนำให้เกิดต้น ในขณะเดียวกัน callus บางอันไม่สามารถพัฒนาเป็นต้น ซึ่ง callus ที่ใช้ในการทดลองได้จากแหล่งและเป็นพันธุ์เดียวกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าพันธุ์ผักกาดขาวปลีที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นพันธุ์ผสมเปิดทั้ง 2 พันธุ์ซึ่งมีฐานทางพันธุกรรมกว้าง ดังนั้นจึงเป็นเหตุหนึ่งที่ทำให้การทดลองมีความแปรปรวนสูง นอกจากพันธุกรรมแล้วส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมีบทบาทต่อการชักนำให้เกิดการพัฒนาของอับละอองเกสรเป็น callus ด้วย เมื่อพิจารณาความแตกต่างของส่วนประกอบอาหารที่มีอยู่ในสูตร Keller (1984) และประสาทพรแล้ว จะพบว่าแตกต่างเพียงปริมาณของน้ำตาลและสารควบคุมการเจริญเติบโตโดยสูตร Keller (1984) ใช้น้ำตาลซูโครสร้อยละ 10 และ 2,4-D 0.1 มก./ล. แต่สูตรประสาทพร ใช้น้ำตาลร้อยละ 4 และ 2,4,5-T 0.1 มก./ล. ความแตกต่างนี้ ทำให้จำนวนอับละอองเกสรพัฒนาเป็น callus มีความแตกต่างกัน จากสูตร Keller (1984) ไม่สามารถชักนำให้เกิด callus ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แต่สูตรประสาทพร สามารถชักนำให้เกิด callus ได้อัตราร้อยละ 5.55 แม้ว่าการวิเคราะห์ทางสถิติของจำนวนอับละอองเกสรพัฒนาเป็น callus ที่เกิดบนอาหารทั้งสองสูตร ไม่มีความแตกต่างกันก็ตามทั้งนี้อาจเป็นว่าปริมาณน้ำตาลมีผลต่อการพัฒนาของอับละอองเกสรเป็น callus และโดยเฉพาะชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาของอับละอองเกสร (Keller et al., 1975) แม้ว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองชนิดจะอยู่ในกลุ่ม auxin เหมือนกันและใช้ในปริมาณที่เท่ากันก็ตาม และจะพบผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการพัฒนาของอับละอองเกสรเป็น callus อย่างชัดเจนขึ้น เมื่อเติม NAA ร่วมกับ 2,4,5-T ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน (การทดลองที่ 4) อับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #23 สามารถพัฒนาเป็น callus ได้สูงสุดร้อยละ 36.10 บนอาหารที่มี NAA 0.5 มก./ล.ร่วมกับ 2,4,5-T 1.0 มก./ล. ส่วนอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #161 สามารถพัฒนาเป็น callus ได้สูงสุดร้อยละ 61.09 บนอาหารที่มี 2,4,5-T เพียงอย่างเดียว 2.0 มก./ล. ชี้ให้เห็นว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม auxin เพียงอย่างเดียว สามารถกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของอับละอองเกสรได้ (Keller, 1984) แต่การใช้ร่วมกันของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มเดียวกัน มีผลทำให้จำนวนอับละอองเกสรพัฒนาเป็น callus แตกต่างกันด้วย อาจเป็นเพราะว่าสารควบคุมการเจริญแต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน นอกจากนั้นอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #161 พัฒนาเป็น callus ได้ร้อยละสูงสุดบนอาหารที่มี 2,4,5-T 2.0 มก./ล. ซึ่งปริมาณ 2,4,5-T ระดับนี้เป็นระดับที่สูงสุดของการทดลองนี้ จึงมีแนวโน้มถ้าใช้ความเข้มข้นของ 2,4,5-T ในระดับที่สูงกว่านี้ อาจทำให้การพัฒนาของอับละอองเกสรเป็น callus เพิ่มขึ้น นอกจากการใช้ร่วมกันของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มเดียวกันทำให้อับละอองเกสรพัฒนาเป็น callus มีความแตกต่างกันแล้ว การใช้ร่วมกันของสารควบคุมการเจริญเติบโตระหว่างกลุ่ม auxin และ cytokinin มีผลทำให้การพัฒนาของอับละอองเกสรเป็น callus แตกต่างกัน โดยการเติม NAA ร่วมกับ BAP ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน (การทดลองที่ 5) พบว่าอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #23 สามารถพัฒนาเป็น callus ได้สูงสุดร้อยละ 24.99 บนอาหารที่มี NAA 2.0 มก./ล.ร่วมกับ BAP 1.0 มก./ล. ส่วนอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #161 สามารถพัฒนาเป็น callus ได้สูงสุดร้อยละ 77.75 บนอาหารที่มี NAA 1.0 มก./ล.ร่วมกับ BAP 0.5 มก./ล. อัตราการเกิด callus นี้สูงกว่าการใช้ NAA เพียงอย่างเดียวที่สามารถกระตุ้นให้เกิด callus จากอับละอองเกสรของผักกาดขาวปลีพันธุ์ #23 ได้สูงสุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพียงร้อยละ 5.55 และของผักกาดขาวปลีพันธุ์ #161 ได้สูงสุดเพียงร้อยละ 38.87 หรือสูงกว่าการใช้ BAP เพียงอย่างเดียวที่ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิด callus ได้ทุกระดับความเข้มข้น ชี้ให้เห็นผลร่วมกันระหว่างสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม auxin กับ cytokininที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาของอับละอองเกสร (Quazi,1978;Lichter,1981)แต่ผลร่วมกันระหว่าง auxin กับ cytokinin นี้ไม่ได้ทำให้เกิด callus ได้มากขึ้นเสมอไป โดยจะพบได้จากตำรับที่มี NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BAP 1.0 มก./ล.ไม่สามารถชักนำให้เกิด callus จากอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #23 หรือตำรับที่มี NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BAP 2.0 มก./ล. สามารถกระตุ้นให้เกิด callus จากอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #161 ได้เพียงร้อยละ 16.7 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าผลร่วมกันของ auxin กับ cytokinin ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการพัฒนาของอับละอองเกสรเป็น callus ได้มากขึ้นจะเกิดขึ้นในสัดส่วนระดับความเข้มข้นช่วงหนึ่งเท่านั้น ซึ่งเป็นระดับที่เกิดการสมดุลย์ของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารกับที่มีอยู่ในอับละอองเกสรจึงทำให้เกิดการพัฒนาของอับละอองเกสรเป็น callus ได้สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบการทดลองที่ 4 และ 5 จะพบว่ามีเพียงอับละอองเกสรของผักกาดขาวปลีเท่านั้นที่พัฒนาเป็น callus ส่วนอับละอองเกสรผักกาดหัวไม่สามารถพัฒนาเป็น callus ได้เลย แม้จะมีการเติม NAA ร่วมกับ 2,4,5-T หรือ NAA ร่วมกับ BAP ในระดับความเข้มข้นเช่นเดียวกับผักกาดขาวปลีแล้วก็ตาม ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าการพัฒนาของอับละอองเกสรผักกาดหัวต้องการชนิด สัดส่วนและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างจากผักกาดขาวปลี หรือแม้แต่ผักกาดขาวปลีทั้งสองพันธุ์ยังมีความแตกต่างของจำนวนอับละอองเกสรเป็น callus กล่าวคืออับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #23 สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็น callus สูงสุดร้อยละ 36.10 บนอาหารตำรับที่มี NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ 2,4,5-T 1.0 มก./ล. ส่วนการใช้ NAA ร่วมกับ BAP กลับทำให้เกิด callus ได้สูงสุดเพียงร้อยละ 24.99 บนอาหารที่มี NAA 2.0 มก./ล. ร่วมกับ BAP 1.0 มก./ล. ส่วนอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #161 นั้นการใช้ NAA ร่วมกับ 2,4,5-T สามารถชักนำให้เกิด callus ได้สูงสุดร้อยละ 61.09 บนอาหารที่มี 2,4,5-T 2.0 มก./ล.เพียงอย่างเดียวแต่เมื่อมีการใช้ NAA ร่วมกับ BAP สามารถชักนำให้เกิด callus ได้สูงสุดร้อยละ 77.75 นอกจากนั้น การใช้ร่วมกันของสารควบคุมการเจริญเติบโต ยังมีผลต่อคุณภาพของ callus และการพัฒนาของ callus เป็นต้นโดยเกิดขึ้นไม่เฉพาะการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม auxin ร่วมกับ cytokinin เท่านั้น จากการทดลองที่ 8 ชุดที่ 1 มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การใช้ร่วมกันของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่ม auxin cytokinin และ gibberellin พบว่า ตำรับแต่ละตำรับสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะ callus ที่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบตำรับที่มี NAA เพียงอย่างเดียวที่ระดับ 2.0 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดรากที่มีขนาดใหญ่กับตำรับที่มี NAA 2.0 มก./ล. ร่วมกับ GA_3 0.5 มก./ล. ที่มีรากขนาดเล็กกว่าแต่ได้จำนวนรากมากกว่า ชี้ให้เห็นว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม GA มีผลต่อการพัฒนาของ callus เป็นรากด้วย แต่ไม่มีผลโดยตรงต่อการเกิดราก เพราะว่าตำรับที่มี NAA 1.0 มก./ล.ร่วมกับ GA_3 0.5 มก./ล. ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ส่วนตำรับที่มี 2,4-D 0.44 มก./ล. ร่วมกับ BAP 0.45 มก./ล. ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ อาจเป็นเพราะว่า 2,4-D อาจมีความเข้มข้นมากจนกระทั่งมีผลยับยั้งการเกิดราก ส่วนตำรับที่มี NAA 1.0 มก./ล. และ NAA 1.0 มก./ล. ร่วมกับ GA_3 0.5 มก./ล. ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้นั้น อาจเป็นเพราะว่าระดับ auxin ยังไม่เพียงพอที่จะชักนำให้เกิดรากได้ ส่วนตำรับที่มี GA_3 4.0 มก./ล.ร่วมกับ BAP 5.0 มก./ล. ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้นั้น อาจเป็นเพราะว่าในตำรับไม่มี auxin อยู่เลยจึงทำให้ระดับ auxin ไม่สูงพอที่จะชักนำให้เกิดราก และในทำนองเดียวกันการใช้ cytokinin ระดับนี้ยังไม่สูงพอที่จะชักนำให้เกิดต้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ cytokinin สูงขึ้นระดับหนึ่งจึงทำให้การพัฒนาของ callus เป็นต้นได้ ซึ่งจะพบได้จากการทดลองที่ 8 ชุดที่ 2 บนตำรับที่มี GA_3 3.5 มก./ล.ร่วมกับ BAP 11.0 มก./ล. และน้ำมะพร้าวร้อยละ 10 สามารถชักนำให้เกิดต้นบน callus ได้ ซึ่งต่างจากตำรับอื่นที่ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ ในตำรับนี้ไม่มี auxin เป็นส่วนประกอบเลยแต่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ อาจเป็นเพราะว่าระดับ auxin ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อมีระดับที่เพียงพอสำหรับแสดงผลร่วมระหว่าง cytokinin และ GA ที่เติมลงในอาหารอยู่ในอัตราที่สมดุลย์จึงทำให้เกิดการพัฒนาของ callus เป็นต้นได้และในตำรับนี้มีระดับ cytokinin สูง เพราะมีทั้ง BAP และน้ำมะพร้าว การใช้ BAP ที่ระดับสูงเช่นนี้คล้ายกับรายงานของ Dunwell (1981) ที่พบว่าระดับของ BAP สูงถึง 10.0 มก./ล.จึงจะสามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของใบเลี้ยง *B. oleracea* เป็นต้นได้ แต่ต่างจากการทดลองของ Quazi (1978) ที่พบว่าการกระตุ้นให้ callus ที่ได้จากอับละอองเกสรของบร็อคโคลี่เป็นต้นได้โดยไม่ต้องเติม cytokinin เลย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า ความสมดุลย์ของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มต่าง ๆ โดยเฉพาะกลุ่ม auxin และ cytokinin ที่จะเป็นจุดวิกฤตให้เกิดการพัฒนาในพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับความสมดุลย์ของสารควบคุมการเจริญเติบโต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่มีในเนื้อเยื่อของพืชและที่เติมลงในอาหาร (ไพบูลย์, 2524)

จากการเปรียบเทียบระดับน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสม ต่อการพัฒนาของอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #161 (การทดลองที่ 7) พบว่าระดับน้ำตาลซูโครสร้อยละ 6 สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของอับละอองเกสรเป็น callus ได้อัตราสูงสุดร้อยละ 65.37 ซึ่งจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างจากการใช้ที่ระดับร้อยละ 4 และร้อยละ 2 โดยมีอัตราของการเกิด callus ร้อยละ 62.05 และ 58.17 ตามลำดับ แต่การใช้ระดับน้ำตาลซูโครสร้อยละ 2 4 และ 6 มีความแตกต่างจากการใช้ที่ระดับร้อยละ 8 และ ร้อยละ 10 ที่สามารถชักนำให้เกิด callus ได้ร้อยละ 19.49 และ 18.28 ตามลำดับ การเพิ่มระดับน้ำตาลจากร้อยละ 2 เป็นร้อยละ 6 ทำให้อัตราการเกิด callus สูงขึ้นจนกระทั่งเกิดในอัตราสูงสุดที่ระดับร้อยละ 6 แต่หลังจากนั้นอัตราลดต่ำลงซึ่งให้ผลต่างจากการทดลองของ อุดม และอรดี (2523) ที่พบว่าน้ำตาลซูโครสที่ระดับร้อยละ 6 จะลดอัตราการเกิด callus ของข้าว และการทดลองของ Keller (1984) ที่พบว่าการใช้ระดับน้ำตาลสูงถึงร้อยละ 10 จึงจะเหมาะสมต่อการพัฒนาของอับละอองเกสรของพืชสกุล *Brassica* อย่างไรก็ตามระดับน้ำตาลร้อยละ 6 เป็นระดับที่ทำให้อับละอองเกสรของผักกาดขาวปลีพัฒนาเป็น callus ได้สูงสุดนี้ อาจเป็นเพราะว่าอับละอองเกสรสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้สูงสุด แต่ถ้าระดับสูงขึ้นอาจมีผลยับยั้งการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนจึงทำให้ลดการเกิด callus

จากการทดลองนำดอกไปเก็บที่อุณหภูมิ 5 °ซ. เป็นระยะเวลา 2 4 6 วันและไม่ผ่านการเก็บดอกที่อุหภูมิต่ำ (การทดลองที่ 6) พบว่า การไม่เก็บดอกที่อุณหภูมิต่ำทำให้อับละอองเกสรพัฒนาเป็น callus ได้สูงสุดร้อยละ 70.36 ซึ่งตรงกับรายงานของ Keller (1984) ที่พบว่าการ pretreatment มีผลยับยั้งการพัฒนาของอับละอองเกสรของ *B. campestris* แต่ให้ผลต่างจากการทดลองของ George and Rao (1982) พบว่าการเก็บช่อดอกของ *B. juncea* ที่อุณหภูมิ 10 °ซ. เป็นเวลา 2-15 วัน ก่อนนำอับละอองเกสรไปเพาะเลี้ยงจะช่วยการพัฒนาของอับละอองเกสร จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการเก็บดอกที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 2 วัน ไม่มีความแตกต่างจากการไม่เก็บดอกที่อุณหภูมิต่ำจึงไม่จำเป็นต้องนำดอกไปเก็บที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งจะเป็นการสิ้นเปลืองเวลาและลดขั้นตอนลงได้

จากการทดลองเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดการพัฒนา ของอับละอองเกสรเป็น callus โดยเริ่มพัฒนาจากบริเวณขั้วของอับละอองเกสร ต่อจากนั้นต้องย้าย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

callus ลงเพาะในอาหารสูตรใหม่เพื่อชักนำให้เกิดต้นซึ่งคล้ายกับรายงานของ Quazi (1978) แต่ให้ผลต่างจาก Keller (1984) ที่เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรหรือละอองเกสร (microspore) แล้วได้คัพภะโดยตรง การพัฒนาของละอองเกสรเกิดการแบ่งตัวแบบ symmetrical nuclear division ได้นิวเคลียส ที่มีขนาดเท่ากัน บางละอองเกสรได้ 3 นิวเคลียส การเกิด mitosis ได้ 3 นิวเคลียสนี้อาจเกิดจากนิวเคลียสอันใดอันหนึ่งเกิดการแบ่งตัว ตรงกับรายงานของ Fan et al. (1988) ที่พบใน *B. napus* แต่ไม่พบเกิดการเชื่อมกันของนิวเคลียส เช่นในข้าวโพด (Pescitelli and Petolino, 1988) การเกิด mitosis นี้เกิดในอัตราต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนละอองเกสรที่มีอยู่ในอับละอองเกสร ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าละอองเกสรไม่สามารถสัมผัสกับอาหารได้โดยตรง เมื่อนำต้นที่ได้จากการเลี้ยงอับละอองเกสรไปเลี้ยงบนอาหารเพื่อชักนำให้เกิดราก มีบางต้นเกิดดอกในสภาพปลอดเชื้อ ดอกเป็นดอกสมบูรณ์ ไม่เป็นหมันอับละอองเกสรมีละอองเกสรบรรจุอยู่ภายใน เมื่อเปรียบเทียบจำนวน chloroplast ในคู่ของ guard cells ระหว่างต้น diploid ที่เจริญในสภาพปกติ และต้นที่ได้จากการเลี้ยงอับละอองเกสรที่เจริญในสภาพปลอดเชื้อ พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติโดยต้น diploid มี chloroplast เฉลี่ย 5.14 chloroplast ต่อคู่ของ guard cells ส่วนต้นที่ได้จากการเลี้ยงอับละอองเกสรทั้ง 4 ต้นมี chloroplast เฉลี่ย 14.00-20.20 chloroplast ต่อคู่ของ guard cells นอกจากนั้น ต้นที่ได้ยังมีจำนวน chloroplast แตกต่างกันทางสถิติด้วย แสดงให้เห็นว่าต้นที่ได้อาจไม่ใช่ต้น haploid หรือ diploid ซึ่งมีระดับ ploidy ที่สูงกว่านี้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าต้นที่ได้อาจเกิดจากละอองเกสร แต่ต่อมาเกิด endomitosis (Keller et al., 1975) เนื่องจากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตมากเกินไป (Reynolds, 1987) หรือต้นที่ได้อาจเกิดจากส่วนของผนังอับละอองเกสร ซึ่งพัฒนาได้ดีกว่าละอองเกสร แม้ว่าต้นที่ได้จะเกิดจากการพัฒนาของเนื้อเยื่ออับละอองเกสร วิธีการนี้ยังสามารถใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งเกิดการกลายพันธุ์จาก somaclonal variation (Jain et al., 1989) อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบจำนวน chloroplast เฉลี่ยต่อคู่ของ guard cells นั้น ได้เปรียบเทียบระหว่างต้น diploid ที่เจริญในสภาพปกติกับต้นที่เจริญในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งสภาพแวดล้อมอาจมีส่วนทำให้จำนวน chloroplast มีความแตกต่างกัน ดังนั้นงานทดลองนี้ควรใช้เป็นพื้นฐานสำหรับการทดลองเลี้ยงอับละอองเกสรและละอองเกสรของพืชชนิดนี้ หรือพืชชนิดอื่นเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สรุปและข้อเสนอแนะ

การเลี้ยงอับละอองเกสรของผักกาดขาวปลี และผักกาดหัวบนอาหารสังเคราะห์ สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีเท่านั้นส่วนอับละอองเกสรผักกาดหัวไม่สามารถชักนำให้เกิด callus ได้ซึ่งสามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้ (ตารางที่ 16)

1. ดอกผักกาดขาวปลีที่มีขนาด 1.6-2.5 มม. และดอกผักกาดหัวที่มีขนาด 1.6-3.5 มม. มีดอกที่ละอองเกสรอยู่ในระยะ uninucleate สูงสุด

2. ความมีชีวิตและความสามารถในการงอก pollen tube ของละอองเกสรผักกาดขาวปลี และผักกาดหัวมากกว่าร้อยละ 90 เมื่อปลูกผักกาดขาวปลี และผักกาดหัวในสภาพควบคุม

3. อับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #161 สามารถพัฒนาเป็น callus ได้ดีกว่าพันธุ์อื่น ๆ เมื่อเลี้ยงบนอาหารตามสูตร Quazi (1978) หรือสูตร Keller (1984) ที่ดัดแปลงเติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 4 และ 2,4,5-T 2.0 มก./ล. เพียงอย่างเดียว และตำรับที่มี NAA 1.0 มก./ล. ร่วมกับ BAP 0.5 มก./ล.

4. หลังจากเลี้ยงอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #161 บนอาหารตามสูตร Quazi (1978) เพื่อชักนำให้เกิด callus แล้ว ต้องย้ายไปเลี้ยงต่อ เพื่อชักนำให้เกิดต้นบนอาหารสูตรเดิมแต่ดัดแปลงเติม GA_3 3.5 มก./ล. BAP 11.0 มก./ล. และน้ำมะพร้าวร้อยละ 10

5. การพัฒนาของอับละอองเกสรเป็น callus และเป็นต้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางพันธุกรรมของพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหาร และปริมาณน้ำตาลซูโครส

6. งานทดลองต่อไปควรทดลองเลี้ยงอับละอองเกสรจากพันธุ์ลูกผสม F_1 และทดลองผสมพันธุ์ #161 กับพันธุ์อื่น ๆ ที่ไม่ตอบสนองซึ่งอาจทำให้พันธุ์อื่นตอบสนองต่ออาหารเพิ่มขึ้น

7. ควรทดลองใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่น เติมลงในอาหารสำหรับเลี้ยงอับละอองเกสรผักกาดหัว

8. ตำรับอาหารที่มี GA_3 3.5 มก./ล. ร่วมกับ BAP 11.0 มก./ล. และน้ำมะพร้าวร้อยละ 10 สามารถชักนำให้เกิดต้นจาก callus ได้เร็วที่สุดของการทดลองนี้ ดังนั้นควรใช้สูตรนี้เป็นพื้นฐานสำหรับทดลองชักนำ callus ให้พัฒนาเป็นต้นในอัตราที่สูงกว่านี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9. ควรแยกเอาเฉพาะละอองเกสรออกมาเลี้ยงเพื่อลดการแข่งขันระหว่างผนังอับละอองเกสร และละอองเกสรทำให้ละอองเกสรพัฒนาได้โดยตรง

ตารางที่ 16 แสดงส่วนประกอบของอาหารที่ชักนำให้เกิด callus และเกิดต้น

สูตรอาหาร	ผักกาดขาวปลี	
	พันธุ์ #23	พันธุ์ #161
การทดลองที่ 3		
สูตรดัดแปลงตาม Quazi (1978)	—	เกิด callus ได้สูงสุด ร้อยละ 44.32
การทดลองที่ 4		
สูตรดัดแปลงตาม Keller (1984) ซูโครส ร้อยละ 4 NAA 0.5 มก./ล. และ 2,4,5-T 1.0 มก./ล.	เกิด callus ได้สูงสุด ร้อยละ 36.10	—
สูตรดัดแปลงตาม Keller (1984) ซูโครส ร้อยละ 4 และ 2,4,5-T 2.0 มก./ล.	—	เกิด callus ได้สูงสุด ร้อยละ 61.09
การทดลองที่ 5		
สูตรดัดแปลงตาม Keller (1984) ซูโครส ร้อยละ 4 NAA 2.0 มก./ล. และ BAP 1.0 มก./ล.	เกิด callus ได้สูงสุด ร้อยละ 24.99	—

- มีต่อ -

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 16 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ผักกาดขาวปลี	
	พันธุ์ #23	พันธุ์ #161
สูตรดัดแปลงตาม Keller (1984) ซูโครส ร้อยละ 4 NAA 1.0 มก./ล. และ BAP 0.5 มก./ล.	—	เกิด callus ได้สูงสุด ร้อยละ 77.75
การทดลองที่ 7		
สูตรดัดแปลงตาม Quazi (1978) ซูโครส ร้อยละ 6	—	เกิด callus ได้สูงสุด ร้อยละ 65.37
การทดลองที่ 8		
สูตรดัดแปลงตาม Quazi (1978) GA_3 3.5 มก./ล. BAP 11.0 มก./ล. และ น้ำมะพร้าว ร้อยละ 10	—	ชักนำให้เกิดต้น ได้สูงสุด ร้อยละ 4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved