บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

เมล็ดสังเคราะห์เป็นการขยายพันธุ์พืชแบบไม่อาศัยเพศ โดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่างกายผ่านขบวนการโซมาติกเอมบริโอเจเนซีสให้มีการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอมบริโอหรือเอมบริออยด์ ในการผลิตเมล็ดสังเคราะห์จะนำเอาโซมาติกเอมบริโอของพืชที่ผลิตได้ มาทำการเคลือบด้วยสารที่ทำให้เกิดเจล พวกอัลจิเนต หรือสารอื่นๆ เพื่อทำหน้าที่เป็นเปลือกหุ้มเมล็ดเทียม ป้องกันอันตรายให้แก่เอมบริโอเหมือนในเมล็ดจริง และยังเป็นแหล่งของของอาหารสะสมเทียม (Redenbaugh *et al.*, 1987; Gray and Purohit, 1992) นอกจากนี้แล้วยังหมายรวมถึงการนำเอาชิ้นส่วนอื่นๆ ที่ไม่ใช่โซมาติกเอมบริโอ แต่เป็นชิ้นส่วนของพืชที่สามารถเจริญเติบโตได้ใหม่ (regenerate) เป็นพืชต้นใหม่ได้ เช่น ปลายยอด ปลายราก ตาข้าง และแคลลัส มาเคลือบด้วยสารที่ทำให้เกิดเจลและมีลักษณะคล้ายเมล็ดจริง

ลักษณะที่สำคัญของโซมาติกเอมบริโอคือมีการเจริญและการพัฒนาไปเป็นต้นกล้าโดยไม่มีสภาวะเงียบหรือสภาวะพักตัวเหมือนในเมล็ดพวกออโธดอกซ์และมีความแข็งแรงน้อยกว่าไซโกติกเอมบริโอในเมล็ดธรรมชาติ (Gray, 1987) ทำให้ยากต่อการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน รวมทั้งสารที่นำมาเคลือบเมล็ดสังเคราะห์ไม่สามารถป้องกันลักษณะการงอกแบบ precocious germination ของโซมาติกเอมบริโอ ที่อยู่ภายในเมล็ดสังเคราะห์ก่อนที่จะนำไปปลูกได้ ซึ่งการเกิด precocious germination ในระหว่างระยะสุดท้ายของการพัฒนาของโซมาติกเอมบริโอ จะทำให้เกิดการตายของโซมาติกเอมบริโอขึ้นในระหว่างการระเหยน้ำออก (Redenbaugh, 1993)

การชักนำให้เมล็ดสังเคราะห์มีการพักตัวคล้ายเมล็ดจริงสามารถกระทำได้ โดยการระเหยน้ำออกจนมีระดับความชื้นในมล็ดสังเคราะห์ใกล้เคียงกับในเมล็ดจริง การชักนำให้เกิดการทนทานต่อการสูญเสียน้ำของโซมาติกเอมบริโอก่อนที่จะนำไปเคลือบเพื่อผลิตเป็นเมล็ดสังเคราะห์ และนำไปดึงน้ำออกเพื่อใช้ผลิตเป็นเมล็ดสังเคราะห์แบบแห้ง เป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับเทคโนโลยีเมล็ดสังเคราะห์ เนื่องจากว่าโซมาติกเอมบริโอจะอยู่ในสภาวะพักตัวคล้ายกับเมล็ดจริงพวก orthodox seed ซึ่งสามารถกระทำได้โดยการระเหยน้ำออกให้

มีความชื้นเหลือประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถยืดอายุการเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ให้ยาวนานออกไป (Senaratna *et al.*, 1989) และยังนำไปใช้ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชที่มีคุณค่าได้ (Gray and Purohit, 1992) ปัจจัยสำคัญที่จะทำการระเหยน้ำออกจากโซมาติกเอมบริโอประสบความสำเร็จ คือการชักนำให้โซมาติกเอมบริโอมีความทนทานต่อการสูญเสียน้ำ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาวิธีการในการชักนำให้โซมาติกเอมบริโอของอ้อยมีความทนทานต่อการสูญเสียน้ำ สำหรับใช้ในการผลิตเมล็ดสังเคราะห์แบบแห้ง ซึ่งจะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ให้ยาวนาน โดยที่ยังมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงและไม่มีการงอกในระหว่างการเก็บรักษาเกิดขึ้น

การศึกษาการผลิตและการเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์แบบแห้งของอ้อย สามารถวิจารณ์ตามหัวข้อการทดลองได้ดังนี้

1. การหาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ของอ้อย

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ของอ้อย โดยทำการเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ไว้ที่ระดับอุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 4±1, 15±2 และ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาพแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าระดับของอุณหภูมิในการเก็บรักษา มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดสังเคราะห์ระหว่างการเก็บรักษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดการงอกในระหว่างการเก็บรักษาสูงถึง 52 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเก็บรักษาในระดับอุณหภูมิ 15±2 องศาเซลเซียส จะยังคงมีการงอกในระหว่างการเก็บรักษาเกิดขึ้น 32 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งลดลงจากการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส อย่างเห็นได้ชัด การเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ไว้ที่อุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มีการงอกของเมล็ดสังเคราะห์เกิดขึ้นเลย

เมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์การตายของเมล็ดสังเคราะห์ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า ที่ระดับอุณหภูมิ 4±1 และ 15±2 องศาเซลเซียส ไม่มีการตายของเมล็ดสังเคราะห์เกิดขึ้นเลย การเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส มีการตายเกิดขึ้นเล็กน้อย คือ 6.67 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์

สำหรับเปอร์เซ็นต์ความงอกรวม (ระหว่างและภายหลังการเก็บรักษา) พบว่าระดับของอุณหภูมิในการเก็บรักษา 3 ระดับ คือ 4±1, 15±2 และ 25±2 องศาเซลเซียส มีผลต่อความงอกรวมของเมล็ดสังเคราะห์ของอ้อยอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง การเก็บรักษาไว้ที่ระดับอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำให้เมล็ดสังเคราะห์มีเปอร์เซ็นต์ความงอกรวมเกิดขึ้นสูงที่

สุด คือ 52 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาในระดับอุณหภูมิที่ต่ำลง พบว่าเมล็ดสังเคราะห์มีเปอร์เซ็นต์ความงอกรวมที่ลดลง พบว่าแม้จะเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ที่ระดับอุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส เมล็ดสังเคราะห์ของอ้อยก็ยังคงให้เปอร์เซ็นต์ความงอกรวมไม่แตกต่างจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15±2 องศาเซลเซียส

การงอกในระหว่างการเก็บรักษา เป็นสิ่งที่ไม่พึงปรารถนาในการเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ โดยที่ระดับอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เมล็ดสังเคราะห์จะงอกได้สูงถึง 52 เปอร์เซ็นต์ แต่หากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส เมล็ดสังเคราะห์จะไม่งอกในระหว่างการเก็บรักษาเลย ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส เป็นระดับอุณหภูมิที่ไม่ทำให้เกิดการงอกในระหว่างการเก็บรักษา แม้ว่าจะมีเปอร์เซ็นต์ความงอกรวมลดลงเมื่อทำการเก็บรักษานานขึ้น จึงเป็นระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ในระยะเวลาสั้นๆ คล้ายกับการทดลองของ Bapat และ Rao (1988) ที่ได้ทำการเก็บรักษาโซมาติกเอมบริโอของ *Santalum album* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 45 วัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำมาก หรือในการทดลองของ Kitto and Janick (1985) ในแครอท และ Anandarajah *et al.*, (1991) *ใน* rape seed (*Brassica napus*) พบว่าการใช้อุณหภูมิต่ำสามารถยืดอายุการเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ได้ เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำขบวนการชีวเคมีภายในโซมาติกเอมบริโอจะลดลง ทำให้โซมาติกเอมบริโอเข้าสู่ระยะพักตัวโดยพบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกในระหว่างการเก็บรักษาต่ำมาก เมื่อทำการเก็บโซมาติกเอมบริโอในอัลจิเนตความเข้มข้น3 เปอร์เซ็นต์

2. การหาผลของระดับการดึงน้ำออกโดยซิลิกาเจล ต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดสังเคราะห์แบบแห้งของอ้อย

โซมาติกเอมบริโอมีการเจริญและการพัฒนาไปเป็นต้นกล้าโดยไม่มีสภาวะเงียบหรือสภาวะพักตัวเหมือนในเมล็ดพวกออโธดอกซ์และมีความแข็งแรงน้อยกว่าไซโกติกเอมบริโอ ในเมล็ดธรรมชาติ (Gray, 1987) ทำให้ยากต่อการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน การชักนำให้เมล็ดสังเคราะห์มีการพักตัวคล้ายเมล็ดจริงสามารถกระทำได้ โดยการระเหยน้ำออกจนมีระดับความชื้นในมล็ดสังเคราะห์ใกล้เคียงกับในเมล็ดจริง

ในการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาถึงการระเหยน้ำออกจากเมล็ดสังเคราะห์ของอ้อยด้วยซิลิกาเจล ต่อผลของเปอร์เซ็นต์ความงอก เปอร์เซ็นต์การตายในระหว่างการเก็บรักษา และเปอร์เซ็นต์ความงอกรวมระหว่างและหลังจากการเก็บรักษา ระดับการสูญเสียน้ำที่ทำการ

ศึกษาคือ 0, 20, 40, 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และนำมาเพาะเพื่อทดสอบความงอกต่อไป

พบว่าระดับของการสูญเสียน้ำ มีผลต่อความงอกของเมล็ดสังเคราะห์ของอ้อยในระหว่างการเก็บรักษาอย่างมีนัยสำคัญ โดยเมล็ดสังเคราะห์ที่ไม่ได้ทำการระเหยน้ำออกจะมีเปอร์เซ็นต์การงอกในระหว่างเก็บรักษาสูงถึง 59 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อทำการเพิ่มระดับการสูญเสียน้ำของเมล็ดสังเคราะห์สูงขึ้น พบว่าเมล็ดสังเคราะห์จะมีเปอร์เซ็นต์การงอกในระหว่างการเก็บรักษาลดลง โดยที่ระดับการสูญเสียน้ำ60 เปอร์เซ็นต์ ความงอกในระหว่างการเก็บรักษา จะลดเหลือเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ และที่ระดับการสูญเสียน้ำ80 เปอร์เซ็นต์จะไม่มีการงอกของเมล็ดสังเคราะห์เกิดขึ้นเลย

เมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์การตายของเมล็ดสังเคราะห์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา พบว่าอัตราการสูญเสียน้ำที่แตกต่างกัน 5 ระดับ มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตายของเมล็ดสังเคราะห์ระหว่างการเก็บรักษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการไม่ระเหยน้ำออกจากเมล็ดสังเคราะห์ (0 เปอร์เซ็นต์) และระเหยน้ำออก 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดสังเคราะห์จะมีการตายในระหว่างการเก็บรักษาเกิดขึ้นน้อยมากเพียง 2, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น แต่เมื่อเพิ่มระดับการสูญเสียน้ำเป็น 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ จะพบว่าเมล็ดสังเคราะห์มีการตายเพิ่มมากขึ้น และเห็นได้อย่างชัดเจนเมื่อสูญเสียน้ำถึงระดับ 60 เปอร์เซ็นต์ โดยการตายของเมล็ดสังเคราะห์สูงที่สุดเมื่อทำการระเหยน้ำออกจากเมล็ดสังเคราะห์ที่ระดับ 80 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8)

เมื่อพิจารณาถึงความงอกรวม (ระหว่างและหลังเก็บรักษา) ของเมล็ดสังเคราะห์ของอ้อย พบว่าระดับของการสูญเสียน้ำที่ระดับต่างๆ มีผลต่อความงอกรวมของเมล็ดสังเคราะห์ของอ้อยอย่างมีนัยสำคัญ การไม่ระเหยน้ำออกจากเมล็ดสังเคราะห์พบว่าเมล็ดสังเคราะห์จะมีความงอกรวมสูงถึง 59 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มระดับการสูญเสียน้ำของเมล็ดสังเคราะห์จะทำให้เมล็ดสังเคราะห์มีเปอร์เซ็นต์ความงอกรวมลดลง โดยที่ระดับการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดสังเคราะห์จะงอกได้เพียง 27 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองเห็นได้ว่าระดับของการสูญเสียน้ำมีผลต่อการเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ การระเหยน้ำออกจากเมล็ดสังเคราะห์มากขึ้น จะทำให้เมล็ดสังเคราะห์มีความงอกในระหว่างการเก็บรักษาลดลง การระเหยน้ำออกจากเมล็ดสังเคราะห์จนถึงระดับ 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับระดับของความชื้นของเมล็ดจริงในธรรมชาติ โดยเมล็ดสังเคราะห์จะไม่มีการงอกเกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาเลย ซึ่งเกิดเนื่องจากโซมาติกเอมบริโอจะมีระยะพักตัวเกิดขึ้นทำให้ขบวนการทางชีวเคมีต่างๆ ในโซมาติกเอมบริโอ

หยุดลง เมื่อทำการให้ชื้นแก่เมล็ดอีกครั้ง ความชื้นจะไปกระตุ้นให้กระบวนการทางชีวเคมีในโซมาติกเอมบริโอเกิดขึ้นอีกครั้งหนึ่ง ทำให้เมล็ดสามารถงอกได้อีกครั้ง (Saranga *et al.*, 1992) แต่การเพิ่มระดับการสูญเสียน้ำให้สูงขึ้นมีผลทำให้เมล็ดสังเคราะห์มีการงอกลดลง และเกิดการตายในระหว่างการเก็บรักษาเพิ่มสูงขึ้นด้วย ดังนั้นจึงต้องหากรรมวิธีในการชักนำให้เมล็ดสังเคราะห์เกิดการทนทานต่อการสูญเสียน้ำ

3. การหาผลของ ABA (abscisic acid) ในการชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำ (desiccation tolerance) ของเมล็ดสังเคราะห์ของอ้อยที่ผ่านการดึงน้ำออก

ABA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชมีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิด precocious germination (Robichaud *et al.*, 1980; Crouch *et al.*, 1985 and Quatrano, 1986) และเพิ่มความทนทานต่อการสูญเสียน้ำของโซมาติกเอมบริโอ และกระตุ้นการพัฒนา และการแก่ของโซมาติกเอมบริโอ ในธรรมชาติพบว่าจะมีการเพิ่มขึ้นของระดับ ABA ขึ้นชั่วคราว ในระยะท้ายของการเจริญของเมล็ด (Finkelstein *et al.*, 1985) การได้รับ ABA ของโซมาติกเอมบริโอ ไม่ว่าจะได้รับโดยตรงหรือชักนำให้มีการสะสม ABA โดยการทำให้เกิดสภาพเครียดสามารถชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำของโซมาติกเอมบริโอได้ (Senaratna *et al.*, 1989) ซึ่งอาจเกิดจากการที่ ABA ชักนำให้ยีนแสดงออกลักษณะเฉพาะในการสร้างสารต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับการมีชีวิตของเอมบริโอก่อนที่จะสูญเสียน้ำ(Black, 1991) และควบคุมการสะสม proline และการสร้างอาหารสะสมในเอมบริโอซึ่งมีผลต่อการสูญเสียน้ำ (Nieves *et al.*, 2001) ABA ยังทำให้เกิดการเสื่อมสภาพ (degradation or degreening) ของคลอโรฟิลล์ ซึ่งจะลดกิจกรรมในการสร้างออกซิเจนของเนื้อเยื่อที่แห้งเมื่อได้รับแสง (Elstner, 1982)

3.1 หาระดับความเข้มข้นของ ABA ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำ

การวิจัยนี้มีการศึกษาถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ABA ในการชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำของโซมาติกเอมบริโอของอ้อย รวมทั้งผลของ ABA ในการรักษาความมีชีวิตของเมล็ดสังเคราะห์ในระหว่างการเก็บรักษา โดยทำการให้ ABA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, และ 0.8 มก/ล เป็นระยะเวลานาน 10 วัน ก่อนที่จะนำไปเคลือบด้วยสารอัลจิเนตและดึงน้ำออกจนมีระดับการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์

สำหรับผลิตเป็นเมล็ดสังเคราะห์แบบแห้ง พบว่าการใช้ความเข้มข้นของ ABA ที่ระดับ 0.1 มก/ล จะทำให้เมล็ดสังเคราะห์มีความงอกสูงที่สุดคือ 58.33 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับการไม่ใช้ ABA ที่เมล็ดสังเคราะห์จะงอกได้เพียง 33.33 เปอร์เซ็นต์ แต่ในรายงานการทดลองของ Nieves *et al.* (2000) รายงานว่าความมีชีวิตของโซมาติกเอมบริโอของอ้อยจะเพิ่มสูงเมื่อได้รับ ABA ความเข้มข้น 3.8 ไมโครโมล ก่อนนำไปเคลือบด้วยอัลจิเนตและทำการดึงน้ำออก ซึ่งจะให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดสังเคราะห์เท่ากับ 57 เปอร์เซ็นต์

3.2 การทดสอบความงอกภายหลังการเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ของอ้อยที่ผ่านการชักนำให้เกิดการทนทานต่อการสูญเสียน้ำด้วย ABA

การเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ที่ได้รับการชักนำให้เกิดการทนทานต่อการสูญเสียน้ำโดยการใช้ ABA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มก/ล เป็นระยะเวลานาน 1, 2, และ 3 สัปดาห์ พบว่า เมื่อทำการเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์นาน 1 สัปดาห์ จะยังคงสามารถงอกได้ ถึง 48 เปอร์เซ็นต์ และ 47 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 32 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาไว้นาน 3 สัปดาห์ ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าการให้ ABA แก่โซมาติกเอมบริโอสามารถชักนำให้โซมาติกเอมบริโอเกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำได้ เช่นเดียวกับในรายงานของ Takahata *et al.* (1993) ที่ใช้ ABA ในการชักนำให้เกิดการทนทานต่อสูญเสียน้ำของโซมาติกเอมบริโอที่ได้จากไมโครสปอร์ของบร๊อคโคลี โดยโซมาติกเอมบริโอในระยะที่มีใบเลี้ยง (cotyledonary stage) สามารถทนทานต่อการสูญเสียน้ำได้มากที่สุดเมื่อได้รับ ABA 100 ไมโครโมล ซึ่งเจริญเป็นต้นได้ 27-48 เปอร์เซ็นต์ และ Senaratna *et al.* ในปี 1989 และ 1990 ใน alfalfa (*Medicago sativa* L.) และ Timbert *et al.* (1996) โซมาติกเอมบริโอของแครอท สำหรับการชักนำให้เกิดการทนทานต่อการสูญสียน้ำชองโซมาติกเอมบริโอของอ้อยนั้น Nieves *et al.* (2000) รายงานว่า ABA จะชักนำให้มีการเพิ่มของระดับ protein, polyamine, free proline และ starch ในการตอบสนองต่อการทนทานต่อการสูญเสียน้ำ