บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การหารูปแบบไอโซไซม์ที่เป็นเอกลักษณ์ของพืชทดลองทั้ง 10 ชนิด คือ ว่านนางคุ้ม ว่านมหาลาภ ว่านแสงอาทิตย์ ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมืองสีชมพู ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมืองสีแดง ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมืองสีส้ม บัวดินสีชมพูดอกใหญ่ บัวดินสีชมพูดอกเล็ก บัวดินสีเหลือง และบัวดินสีเหลืองอ่อน โดยใช้เอนไซม์ 6 ชนิด คือ ADH ALD DIA EST GOT และ MDH เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบรูปแบบแถบสีพบว่า แต่ละเอนไซม์ให้รูปแบบของแถบสีไอโซไซม์ไม่ซ้ำกันเลยในพืชแต่ละชนิด เอนไซม์ ADH แสดงรูปแบบไอโซไซม์เฉพาะจากว่านแสงอาทิตย์ ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมืองสีชมพู ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมืองสีส้ม และ บัวดินสีชมพูดอกเล็กเท่านั้นแต่ไม่ปรากฏแถบสีในพืชทดลองชนิดอื่น หากนำผลการวิเคราะห์ไปใช้ในการหาเอกลักษณ์ของพืชแต่ละชนิดควรเลือกใช้รูปแบบแถบสีที่มีจำนวนน้อย เห็นชัดเจน และมีค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) เฉพาะเจาะจงที่ไม่ซ้ำกับพืชอื่น แต่รูปแบบไอโซไซม์อาจมีโอกาสที่ตำแหน่งของแถบสีไปซ้ำกับรูปแบบไอโซไซม์จากพืชสกุลเดียวกันได้ (Apavatjrut *et al.* 1999) ดังนั้นเพื่อให้เกิดความแม่นยำควรทดสอบกับเอนไซม์มากกว่า 1 ชนิด เพื่อยืนยันความเป็นเอกลักษณ์ของรูปแบบแถบสีให้ชัดเจนยิ่งขึ้น การใช้รูปแบบแถบสีของไอโซไซม์มายืนยันการเป็นลูกผสม แถบสีไอโซไซม์ของลูกผสมอยู่ระหว่างแถบสีไอโซไซม์ของพ่อและแม่ซึ่งมีแถบสีบางแถบหายไป (ศิริลักษณ์ และ นิยะดา, 2540) ดังนั้นถ้าใช้ไอโซไซม์ที่แสดงแถบสีน้อยเกินไปแถบสีนั้นอาจมีโอกาสไม่ปรากฏในไอโซไซม์ของลูกผสมอาจทำให้การประเมินการเป็นลูกผสมผิดพลาดได้ ตัวอย่างการใช้ประโยชน์ในแง่นี้ได้แก่ รายงานการใช้รูปแบบไอโซไซม์ยืนยันการเป็นลูกผสมที่ได้จากการผสมระหว่าง Plum x Peach. (Parfitt and Arulsekar, 1985) Plum x Apricot (Byrne and Littleton, 1989) และพบว่ามีการใช้ในการยืนยันการเป็นลูกผสมของกุหลาบจากการผสมข้ามชนิด (interspecific) อีกด้วย (Kim and Byrne, 1996)

จากผลการทดลองนี้ ซึ่งพบว่า จำนวนรูปแบบแถบสีของไอโซไซม์ EST จากบัวดินสีชมพูดอกใหญ่มีจำนวนน้อยเพียง 2 แถบ ซึ่งโดยทั่วไป EST จะให้แถบสีจำนวนมาก อาจเป็นไปได้ว่าบัวดินสีชมพูดอกใหญ่อาจเกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งมีเอนไซม์ที่แสดง genetic marker ที่จำเพาะและแตกต่างกันหายไปบางส่วนแต่ลักษณะการหายไปของแถบสีไอโซไซม์ชนิดอื่นไม่เป็นไปในทำนองเดียวกัน

การศึกษาการผสมข้ามสกุล ระหว่างว่านนางคุ้ม กับ ว่านมหาลาภ ว่านแสงอาทิตย์ ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมืองสีชมพู ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมืองสีแดง ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมืองสีส้ม บัวดินสีชมพูดอกใหญ่ บัวดินสีชมพูดอกเล็ก บัวดินสีเหลือง และบัวดินสีเหลืองอ่อน แล้วนำไข่อ่อนจากรังไข่ที่ได้รับการผสมแล้วไปเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าเมื่อใช้ว่านนางคุ้มเป็นพ่อ แล้วนำไข่อ่อนหลังการผสมที่มีอายุ 3 และ 5 วันของต้นแม่มาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ไข่อ่อนไม่สามารถเจริญและพัฒนาได้ แต่เมื่อทิ้งรังไข่หลังการผสมเกสรไว้บนต้น รังไข่ฝ่อไปขึ้นอยู่กับชนิดพืช เช่น ประมาณ 3-5 วัน สำหรับบัวดินดอกเล็ก ประมาณ 5-7 วันสำหรับว่านแสงอาทิตย์ และประมาณ 7-10 สำหรับว่านสี่ทิศ การนำไข่อ่อนดังกล่าวมาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อไม่มีการเจริญเติบโตและพัฒนาต่อไป อาจเนื่องมาจากอาหารที่ใช้เลี้ยงไข่อ่อนไม่เหมาะสมกับคัพภะ (หากเกิดการผสมสำเร็จ) ของลูกผสมคู่นั้น ๆ เช่นอาจเกี่ยวกับแรงดันออสโมติก หรือสภาพความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารไม่เหมาะสม หรือ ไข่อ่อนที่นำมาเลี้ยงไม่ได้รับการผสมจากเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Thorpe, 1995)

ไข่อ่อนจากคู่ผสมที่ใช้ว่านนางคุ้มเป็นแม่เมื่อนำมาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าไข่อ่อนไม่สามารถงอกเป็นต้นได้ แต่เมื่อผ่าดูพบเพียงของเหลวใส ๆ เท่านั้น เมื่อนำไข่อ่อนที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อตั้งแต่สัปดาห์แรกมาศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่า ไม่มีการเจริญและพัฒนาของคัพภะและเอนโดสเปิร์ม ซึ่งสอดคล้องกับการผสมพันธุ์พืชในกลุ่มไม้หัวคู่ผสมอื่นในพืชวงศ์เดียวกันซึ่งรายงานโดยสุชาดา และ อรดี (2542) ซึ่งทำการผสมข้ามระหว่างว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมืองสีชมพู × รางนาค และคู่ผสมรางนาค × ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมืองสีชมพู เมล็ดไม่สามารถพัฒนาจนแก่ตามธรรมชาติได้ จึงนำเมล็ดที่ยังไม่แก่มาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ แต่เมล็ดเหล่านั้นไม่สามารถงอกเป็นต้นได้ เมื่อนำเมล็ดนั้นมาผ่าดูพบแต่เพียงของเหลวใส ๆ เท่านั้น ในการทดลองครั้งนี้เมื่อนำไข่อ่อนไปเลี้ยงพบการแบ่งเซลล์ซึ่งเป็นจุดกำเนิดของโครงสร้างคล้ายคัพภะเทียม (ภาพ 90) และสามารถพัฒนาต่อไป (ภาพ 91 และ ภาพ 92) เป็นเอมบริโอรูปกลม (globular shape) รูปหัวใจ (heart shape) และรูปรี (torpedo shape) ต้นพืชที่ได้มีการเจริญมาจากเนื้อเยื่อส่วนเซลล์ผิวชั้นในของช่องไข่อ่อน ซึ่ง Thrope (1995) กล่าวไว้ว่า เอมบริโอเจนิกแคลคัส สามารถเจริญมาจากเนื้อเยื่อส่วน integument ได้ ไม่ว่าไข่อ่อนได้รับการผสมหรือไม่ก็ตาม ส่วน Singh *et al.* (1992) ได้รายงานการทดลองนำไข่อ่อนที่ได้รับการผสมแล้วอายุ 10-40 วันหลังการผสมเกสรขององุ่นไร้เมล็ดมาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าภายในไข่ก็ไม่มีคัพภะและเอนโดสเปิร์ม นอกจากนั้นยังพบว่า เนื้อเยื่อส่วน outer integument มีสีเขียวและมีการสร้างแคลคัสขึ้นได้

โดยทั่วไปการใช้ casein hydrolysate ผสมในอาหารที่ใช้เลี้ยงไข่อ่อนในสภาพปลอดเชื้อช่วยให้คัพภะที่ได้จากการผสมของเซลล์สืบพันธุ์ที่อ่อนมากให้มีการแบ่งเซลล์และไข่อ่อนพัฒนาเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์ได้ ดังรายงานของ Cameron-Mills and Duffus (1980) ที่พบว่าผลของ casein

hydrolysate 0.1 เปอร์เซ็นต์ ช่วยให้คัพภะที่มีอายุน้อยของบาร์เลย์มีการแบ่งเซลล์และพัฒนาเร็วขึ้นกว่าการเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มี casein hydrolysate จากผลการทดลองที่ 2 พบว่ามีการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลคัสในอาหารทุกระดับของ casein hydrolysate ที่ใช้เลี้ยง แต่ให้ผลไม่แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าตัวเนื้อเยื่อว่านนางคุ้มเองมีความสามารถในการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเอมบริโอเจนิกแคลคัสที่สามารถพัฒนาต่อไปได้จนเป็นต้นพืชโดยไม่ต้องอาศัยแหล่ง organic nitrogen จาก casein hydrolysate

เป็นที่น่าสังเกตุว่าการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างจุดกำเนิดของเอมบริโอเจนิกแคลคัสสามารถเกิดขึ้นได้บนอาหารที่ปราศจากสารกระตุ้นการเจริญเติบโต แสดงว่าในเนื้อเยื่อไข่อ่อนหลังการผสมเกสรมีระดับของสารกระตุ้นการเจริญเติบโตอยู่แล้ว ดังเช่นงานทดลองของ Yeh and Chyuan (1992) พบว่า การเลี้ยงคัพภะที่ยังอ่อนอยู่ของถั่วเหลืองบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย casein hydrolysate 250 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ casein hydrolysate 250 มิลลิกรัมต่อลิตร + 2,4-D 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลไม่แตกต่างกันในการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลคัสที่เกิดจากเซลล์ร่างกาย

เมื่อนำต้นพืชที่ได้จากการพัฒนาของไข่อ่อนหลังการผสมเกสรในการศึกษาครั้งนี้มาตรวจสอบการเป็นลูกผสม โดยเปรียบเทียบรูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ EST และ GOT พบว่าใบอ่อนจากทุกต้นของทุกคู่ผสมปรากฏแถบสีเหมือนของแม่ทุกแถบสี แสดงว่าต้นพืชเหล่านั้นไม่ได้เจริญและพัฒนามาจากการผสมระหว่างนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์ต้นพ่อและนิวเคลียสของไข่จากต้นแม่ที่นำมาทดสอบ หากเป็นลูกผสมน่าจะต้องให้รูปแบบแถบสีไอโซไซม์อยู่ระหว่างแถบสีของพ่อและแม่ (ศิริลักษณ์ และ นิยะดา, 2540)

จากผลการทดลองการผสมระหว่างว่านนางคุ้ม กับ พืชทดลองทั้งหมดโดยสลับพ่อแม่ทุกคู่ผสมแต่ไม่ได้รับลูกผสมนั้น อาจเกิดจากสาเหตุ ดังนี้ (นิตย์ศรี , 2541)

1 คุณภาพของอับละอองเกสร ความมีชีวิตของละอองเกสร การงอกของละอองเกสร โครงสร้างของดอก และสภาพแวดล้อม

2 เกิดการไม่เข้ากัน (incompatability) ทำให้ไม่มีการผสมระหว่างสเปิร์มนิวเคลียสและนิวเคลียสของไข่

3 เอมบริโอที่ได้รับการผสมไม่สามารถเจริญและพัฒนาต่อไปในระยะ globular stage , heart stage และ torpedo stage มีสาเหตุจากการที่โครโมโซมไม่สามารถเข้าคู่กันได้ มีการไม่เสถียร (unstable) ของยีนในคัพภะ หรือคัพภะไม่สามารถใช้อาหารจากเนื้อเยื่อรอบ ๆ ถุงคัพภะ (embryo sac) หรืออาหารไม่สามารถลำเลียงไปสู่ suspensor ได้

เมื่อพิจารณาคุณภาพละอองเกสรของพืชทดลองพบว่าว่านสี่ทิศ (ประภัสสร, 2543) และว่านแสงอาทิตย์ (เอกรัตน์, 2543 ; พินิจดา, 2543) มีการสร้างละอองเกสรภายในอับละอองเกสรของ

พืชทั้งสามชนิดเป็นปกติแต่บางส่วนของละอองเกสรไม่สมบูรณ์มีลักษณะลีบและฝ่อ ซึ่งปริมาณของละอองเกสรที่มีน้อยนี้ อาจเป็นอุปสรรคต่อความสำเร็จในการผสมเกสร และพบว่าว่านแสงอาทิตย์เมื่อทำการผสมข้ามดอกในช่อเดียวกัน หรือผสมเกสรข้ามช่อสามารถติดเมล็ดได้ในสภาพธรรมชาติแต่มีเปอร์เซนต์การติดที่ต่ำมาก ส่วนว่านมหาลาภ (ศิริพร, 2541) และว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมืองสีแดงไม่มีการติดเมล็ดตามสภาพธรรมชาติ

ลักษณะทางสรีรวิทยาของพืชทดลอง คือ ว่านสี่ทิศ ว่านแสงอาทิตย์ ว่านมหาลาภ และพืชอื่นที่มีหัวแบบ tunicate bulb มีการสร้างและการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่ระยะที่ต้นแม่ยังมีการเจริญเติบโตทางใบเหนือดิน และขณะที่หัวอยู่ในช่วงพักตัวโดยในธรรมชาติแล้วหัวเหล่านี้จะอยู่ในดิน ในการทดลองครั้งนี้กับหัวของว่านนางคุ้ม ว่านแสงอาทิตย์ ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมือง และว่านมหาลาภ ที่นำมาปลูกเมื่อขุดขึ้นมาและเก็บรักษานั้น สภาพแวดล้อมในห้องเก็บรักษาหัวพันธุ์อาจมีผลกระทบต่อการพัฒนาและความสมบูรณ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ของพืชทดลองซึ่งมีผลทำให้เป็นอุปสรรคในการผสม (ประภัสสร, 2543 ; พินิจดา, 2543 ; ศิริพร, 2541; เอกรัตน์, 2543)

นอกจากสิ่งแวดล้อมดังกล่าวแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นที่มีอิทธิพลต่อการผสมติดได้เช่นกัน การทดลองครั้งนี้ได้ปลูกพืชทดลองในโรงเรือนพลาสติก ทำให้อุณหภูมิภายในโรงเรือนสูงกว่าภายนอกโรงเรือนมาก จึงอาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการผสมติด ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกของหลอดละอองเกสรจะแตกต่างกันออกไปในแต่ละพืช สอดคล้องกับงานทดลองของ Franken *et al.* (1998) ซึ่งพบว่าอุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ช่วยให้ละอองเกสรของ *Cucumis sativus* งอกได้เร็วขึ้นในก้านชูยอดเกสรตัวเมียของ *C. metiliferus* และยังช่วยลดปฏิกิริยาการยับยั้งการงอกของหลอดละอองเกสรบริเวณก้านชูยอดเกสรตัวเมีย ทำให้มีการผสมกันระหว่างสเปิร์มนิวเคลียสและนิวเคลียสของไข่ และอุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียสเหมาะสมที่สุดต่อการติดฝักและให้เมล็ดของลูกผสมจากการผสมข้ามชนิดของดอกทิวลิป (Kho and Baer, 1971)

การที่ไม่ได้เมล็ดจากการผสมพืชทดลองทั้งห้าสกุลอาจเป็นเพราะพืชทดลองทั้งห้าสกุลมีความห่างไกลทางพันธุกรรมซึ่งก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้พืชทั้งสองชนิดไม่สามารถผสมกันได้ (นิตย์ศรี,2541 ; Kho *et al*, 1980)

จากผลการทดลองการใช้เทคนิค fluorescence microscope มาตรวจสอบความสามารถในการงอกของหลอดละอองเกสรในยอดเกสรตัวเมียและก้านชูยอดเกสรตัวเมียของว่านนางคุ้ม × ว่านแสงอาทิตย์ × ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมืองสีชมพู สีแดง และสีส้ม พบว่าหลอดละอองเกสรของว่านแสงอาทิตย์สามารถงอกได้บริเวณปลายยอดเกสรตัวเมียเท่านั้น แต่ไม่สามารถงอกลงไปผสมกับไข่ได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเกิดปฏิกิริยาระหว่างละอองเกสรกับเกสรตัวเมีย ซึ่งปกติเซลล์ของเกสรตัวเมียมีการสร้างสารประกอบโปรตีนและขับออกมาไม่ว่าพืชชนิดนั้น ๆ มีลักษณะของปลายยอดเกสรตัว

เมียที่มีการขับของเหลวใส ๆ ออกมา (wet stigma) หรือไม่มีการขับของเหลวใส ๆ ออกมา (dry stigma) ก็ตาม พืชบางชนิดขับสารประกอบโปรตีนออกมาเมื่อดอกอยู่ในระยะที่พร้อมผสมเกสร แต่ในดอกบางชนิดอาจขับสารออกมาก่อนหน้านั้น ในส่วนของละอองเกสรสารประกอบโปรตีนที่สร้างขึ้นจะเคลือบอยู่บริเวณผิวด้านนอก เมื่อละอองเกสรมาตกบนยอดเกสรตัวเมียแล้ว เกิดปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบโปรตีนจากทั้งสองแหล่งซึ่งทำงานอย่างเฉพาะเจาะจงต่อกันและกัน ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้เป็นตัวกำหนดว่าละอองเกสรงอกแล้วแทงผ่านยอดเกสรตัวเมียลงไปในก้านชูเกสรตัวเมียและผสมกับไข่ได้หรือไม่ (Shivanna, 1989) จากการศึกษาของ Kroes, 1973 (อ้างจาก Shivanna, 1989) กล่าวไว้ว่าการสร้างสารประกอบโปรตีนเหล่านี้จะถูกควบคุมโดยยีน S (S-allele) ถ้ายีน S ของละอองเกสรเหมือนยีน S ของเกสรตัวเมียจะละอองเกสรจะไม่สามารถงอกหลอดละอองเกสรลงไปในเกสรตัวเมียได้ กระบวนการนี้เป็นการยับยั้งไม่ให้มีการผสมในพืชบางชนิดทั้งแบบผสมตัวเอง ผสมข้ามชนิด หรือผสมข้ามสกุล จึงแสดงออกโดยทำให้เกิดลักษณะการเข้ากันไม่ได้ (incompatibility) การผสมแบบต่าง ๆ ดังกล่าวมีกระบวนการในการยับยั้งที่เหมือนกัน

จากข้อมูลดังกล่าวอาจเป็นสาเหตุของการผสมไม่ติดดังนั้นจึงได้มีการคิดค้นวิธีการต่างๆ ที่จะเอาชนะปัญหาดังกล่าว เช่น การตัดก้านชูยอดเกสรตัวเมียให้สั้นลง เช่น การผสมข้ามระหว่างข้าวโพดกับ *Trypsacum* หลาย ๆ ชนิด (species) โดยให้สารเคมีบางชนิดแก่เกสรตัวเมียของต้นแม่ เช่น ในการผสมตัวเองของ *Brassica oleracea* ใช้สารละลาย saline หยดบริเวณปลายยอดเกสรตัวเมีย ทำให้ได้ลูกผสมจากต้นที่ไม่สามารถผสมตัวเองได้ (self-incompatibility) (Carafa and Carratu, 1997) นอกจากนี้ van Creij *et al.* (1997) ได้ทำการผสมข้ามชนิดของดอกทิวลิป 2 ชนิด ซึ่งในธรรมชาติเมื่อผสมกันแล้วรังไข่ฝ่อและแห้งไป ดังนั้นจึงใช้วิธี ตัดก้านชูยอดเกสรให้สั้นลง และทำการผสมเกสรในสภาพปลอดเชื้อ การใช้วิธีการดังกล่าวเป็นแนวทางที่อาจนำไปใช้วางแผนการปรับปรุงพันธุ์พืชทดลองเหล่านี้ต่อไป