บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษามิวเตชันที่เกิดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ต้นอ้อยพันธุ์ F156 เป็นสายพันธุ์ที่แนะนำโดยสำนักงานอ้อยและน้ำตาลทราย กระทรวงอุตสาหกรรม ซึ่งเป็นพันธุ์อ้อยที่มีลักษณะดีหลายประการ แต่มีข้อเสียคือไม่ต้านทานโรคแส้ดำ งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาถึงมิวเตชันหรือการแปรที่เกิดขึ้นโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยพันธุ์ F156 หลังจากที่ชักนำให้เกิดคัลลัสแล้วจึงชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยแช่ใน EMS 25 ppm. และ 50 ppm. เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ชักนำด้วยสาร EMS ซึ่งอาจเกิดมิวเตชันได้เองตามธรรมชาติเป็น spontaneous mutation

ขั้นตอนของงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการพัฒนาตั้งแต่ระยะคัลลัสจนเป็นต้นที่สมบูรณ์ พบว่าการชักนำให้เกิดคัลลัสในอ้อยพันธุ์ F156 สามารถเจริญได้จากเนื้อเยื่อเจริญของตายอด ข้อ และใบอ่อน ใบอ่อนให้คัลลัสดีที่สุดเมื่อเลี้ยงบนวุ้นอาหารสูตรดัดแปลงของ Murashige และ Skoog (1962) ตามวิธีของ Heinz และคณะ (1977) การชักนำให้คัลลัสเจริญไปเป็นต้นที่สมบูรณ์นั้นใช้สูตรของ Murashige และ Skoog (1962) โดยใช้น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร และวุ้น 9 กรัม ต่อลิตร ตามวิธีของ Nickell และคณะ (1973) และ Nadar และคณะ (1978) ซึ่งใช้ได้ผลดีกับอ้อยสายพันธุ์อื่น

ขั้นตอนการเจริญของคัลลัสอ้อยไปเป็นต้นที่สมบูรณ์นั้น เมื่อได้ศึกษาการเจริญและการเปลี่ยนแปลงนี้ในหลอดทดลองใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ พบว่าการเจริญจากคัลลัสและเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นอ้อยที่สมบูรณ์เป็นแบบ organogenesis คือคัลลัสจะเจริญให้ green nodule ก่อน แล้วจึงเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอดที่มีใบครบ จากนั้นจึงเกิดรากบริเวณโคนต้น ต้นอ่อนนี้มีลักษณะเหมือนต้นอ่อนที่เจริญมาจากเมล็ด ได้ผลตรงกับการเจริญของคัลลัสข้าวไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ซึ่งเป็นแบบ organogenesis เช่นกัน (Vajrabhaya และคณะ, 1984)

ผลการศึกษามิวเตชันที่เกิดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่ออ่อนนั้น ต้นกล้าอ่อนที่เจริญจากคัลลัสที่ชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วย EMS เปรียบเทียบกับต้นที่เจริญจากคัลลัสที่ไม่ได้ชักนำด้วย EMS แต่ปล่อยให้เกิดมิวเตชันแบบ spontaneous mutation แล้วศึกษาการแปรเมื่อต้นกล้ามีอายุโตพอสมควร (ระหว่าง 22 ถึง 43 วัน) โดยศึกษาถึงการแปรทางด้านการเจริญและลักษณวิทยาบางประการตลอดจนความทนต่อโรคแล้วดำ ซึ่งได้ผลดังนี้

ลักษณะการเจริญโดยศึกษาจากความสูงและเส้นผ่าศูนย์กลางรอบโคนต้นกล้าอ่อนเป็นเวลาติดต่อกัน 4 สัปดาห์ พบว่ากล้าอ่อนที่เจริญมาจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้มีการแปรด้านการเจริญต่าง ๆ กัน แต่ผลของ EMS และ spontaneous mutation ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ส่วนลักษณะอื่น เช่น ขนาดของใบนั้นมีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่สัดส่วนของขนาดใบ (ยาว : กว้าง) ไม่ทำให้รูปร่างของใบแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบการแปรที่เกิดขึ้นในด้านความหนาของใบที่เกิดจาก spontaneous mutation และชักนำด้วย EMS ก็ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการวิจัยนี้อาจสรุปได้ว่าในการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นสามารถคัดพันธุ์ที่แปรไปโดยการเกิด spontaneous mutation ก็เป็นการเพียงพอไม่จำเป็นต้องชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยสารเคมีหรือวิธีอื่น ซึ่งให้ผลตรงกับ Vajrabhaya และ Vajrabhaya (1974), Heinz และคณะ (1977), Nickell (1977) และ Krishnamurthi (1977, 1982)

ผลการศึกษาลักษณะที่แปรไปในด้านความต้านทานต่อโรคแล้วดำ ซึ่งเกิดจากเชื้อ Ustilago scitaminea Sydow ใช้กล้าอ่อนที่มีความสูง 10-20 ซม. (วัดจากโคนถึงคอใบที่หนึ่ง) จำนวนทั้งหมด 400 ต้น ซึ่งเป็นต้นที่ได้จากการเลี้ยงคัลลัสที่แช่ใน EMS 25 และ 50 ppm. เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง อย่างละ 80 ต้นและหน่ออ่อนซึ่งอาจเกิด spontaneous mutation (หน่อที่เจริญจากคัลลัสที่ไม่ได้แช่ EMS) อีก 80 ต้น ทดสอบความสามารถต้านทานโรคแล้วดำโดยการฉีด chlamydospore suspension ของเชื้อราที่บริเวณกาบใบเหนือตายอดของกล้าอ่อน สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ครั้งละ 2 มิลลิลิตรต่อต้น เป็นเวลา 5 สัปดาห์ติดต่อกัน ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพความต้านทานโรคแล้วดำโดยวิธีนี้ได้ต้นที่ต้านทานโรคแล้วดำ 2 ต้น จากจำนวน 400 ต้น ดังกล่าวข้างต้น ต้นที่ต้านทานโรค

แล้วนำทั้งสองต้นนี้ ต้นหนึ่งเจริญจากศัลลัสที่ ยักนำให้เกิดมิวเตชันด้วย EMS 25 ppm. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และอีกต้นหนึ่งเจริญจากศัลลัสที่ยักนำด้วย EMS 50 ppm. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

คณะผู้วิจัยได้ตั้งชื่อสายพันธุ์ใหม่ของอ้อยทั้งสองต้นที่เจริญมาจากพันธุ์เดิม คือ F156 ว่า

Saccharum officinarum cv.F156-CU1 คือ ต้นที่เจริญจากศัลลัสที่ยักนำด้วย EMS 25 ppm. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

และ Saccharum officinarum cv.F156-CU2 คือต้นที่เจริญจากศัลลัสที่ยักนำด้วย EMS 50 ppm. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ขณะนี้สายพันธุ์ใหม่ทั้งสองต้นได้ส่งให้สำนักงานอ้อยและน้ำตาลทราย กระทรวงอุตสาหกรรม และได้ส่งต่อไปปลูกที่สถานีอ้อยกาญจนบุรี เพื่อทดสอบคุณสมบัติอื่น ซึ่งจะได้ขยายท่อนพันธุ์ไว้ใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์อ้อยและแจกจ่ายพันธุ์ให้เกษตรกรต่อไป

ในเรื่องของการแปรหรือมิวเตชันที่เกิดจากการเลี้ยงเนื่อเยื่ออ้อยนั้น Vajrabhaya และ Vajrabhaya (1974) ได้อ้างถึงรายงานของ Hill และ Parker (1969) ซึ่งกล่าวว่ามิวเตชันที่เกิดขึ้นนี้สามารถถ่ายทอดลักษณะต่อไปยังลูกหลานได้ถึง 5 รุ่น หากผลของมิวเตชันนี้เกิดจากสภาพแวดล้อมในหลอดแก้ว (in vitro) ก็อาจเป็นได้ในแง่ที่ว่า การที่นำชิ้นส่วนของพืชมาเลี้ยงในหลอดทดลองซึ่งมีสภาพต่างจากขณะที่อยู่ภายในต้น (in vivo) มาก อาจมีผลทำให้การแบ่งเซลล์ผิดไปจากเดิม นอกจากนั้นในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เราจำเป็นต้องเติมสารเร่งการเจริญลงไป เช่น 2,4-D น้ำมะพร้าว ฯลฯ ซึ่งมีผลไปกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ อาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดมิวเตชันขึ้นได้เช่นกัน

การแปรของลักษณะต่าง ๆ อาจปรากฏออกให้เห็นในต้นที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากเนื้อเยื่อของพืชที่ถูกนำมาเลี้ยงในหลอดทดลองนั้น อาจเป็น heterogeneous อยู่ก่อนแล้ว แต่เนื้อเยื่อเหล่านี้ยังอยู่ภายในต้นไม่ได้มีการเจริญต่อไป จึงไม่สามารถแสดงลักษณะเหล่านั้นให้ปรากฏออกมาได้ เมื่อเนื้อเยื่อถูกนำมาเลี้ยงในหลอดทดลอง แต่ละเซลล์มีโอกาสเจริญไปเป็นต้นใหม่ได้ ดังนั้นลักษณะของ heterogeneous จึงสามารถแสดงออกให้ปรากฏได้ (Vajrabhaya, 1977)

ยิ่งกว่านั้นสภาพแวดล้อมในหลอดแก้วมีความแตกต่างจากสภาพแวดล้อมภายในต้นมาก ซึ่งสภาพแวดล้อมนี้อาจมีผลต่อการคัดเลือกแบบเซลล์ (cell type) ชนิดต่าง ๆ ได้ และในการเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นการเติมสารกระตุ้นการเจริญเช่น 2,4-D ก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ช่วยให้เซลล์ที่ถูกเลี้ยงในหลอดทดลองมีโอกาสเกิดมิวเตชันในธรรมชาติ (spontaneous mutation) โอกาสที่จะเห็น phenotype ของมิวเตชันในการเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นมีมากกว่า phenotype ที่จะปรากฏในต้นที่เจริญปกติมาก เพราะในการเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้ เซลล์ที่เกิดมิวเตชันมีโอกาสเจริญไปเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ จึงสามารถแสดง phenotype ปรากฏออกให้เห็น ส่วนมิวเตชันที่เกิดกับเซลล์ในต้นปกติ หากเซลล์นั้นมิได้อยู่ที่ growing bud มิวเตชันนั้น ก็ไม่สามารถแสดงออกมาให้เห็น (Vajrabhaya และ Vajrabhaya 1974, Vajrabhaya 1977, Nickell, 1977; Krishnamurthi 1977)

ในการเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจพบ spontaneous mutation ที่เกิดในธรรมชาติอยู่แล้ว และสามารถชักนำให้เกิดมากขึ้นได้โดยการใช้สารเคมี (chemical mutagen) รังสีหรือแฟคเตอร์ทางกายภาพ การใช้สาร ethyl methanesulphonate (EMS) ซึ่งเป็นสารเคมีที่กระตุ้นให้เกิดมิวเตชันได้ผลดีที่สุดชนิดหนึ่ง สารนี้ทำให้เกิดเปอร์เซ็นต์ของมิวเตชันโดยที่เกิดความเสียหายต่อโครโมโซมน้อยมาก สารกระตุ้นมิวเตชันนี้เชื่อว่ามีผลเฉพาะส่วนของโมเลกุลของ DNA เท่านั้น

อ้อยลายพันธุ์ F156 มีโครโมโซม 2n = ca.114 เป็นอ้อยชนิด chromosomal mosaic (Liu และ Chen, 1975, 1978) ซึ่งน่าจะมีโอกาสแปรมากกว่าอ้อยชนิดที่เป็น chromosomal stable (Heinz และคณะ 1971, 1972) โดยที่อ้อยเป็นพืชที่มีโครโมโซมเป็น polypoid สูง ดังนั้นการแปรที่พบในกล้าอ้อยในงานวิจัยนี้ จึงน่าจะเกิดจาก chromosomal mutation มากกว่า gene mutation เพราะพวกที่มี polyploid สูง ในระหว่างการแบ่งเซลล์แบบ mitotic cell division โอกาสที่จำนวนโครโมโซมแปรไปจึงมาก ทำให้ลักษณะทาง phenotype ที่แสดงออกมาแตกต่างกันได้มาก

Nickell เป็นผู้เริ่มทำงานวิจัยเกี่ยวกับการเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อของอ้อยซึ่งเริ่มมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1961 (Nickell, 1973) ปัจจุบันนี้ การเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยเป็นที่สนใจศึกษากันแพร่หลายทั่วโลก Taiwan Sugar Research Institute นับเป็นแห่งแรกที่นำ

เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยมาประยุกต์ใช้กับงานปรับปรุงพันธุ์ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1970 และที่ฟิลิปปินส์นับเป็นอีกแห่งหนึ่งที่ใช้เทคนิคนี้ปรับปรุงพันธุ์อ้อย เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถนำมาปรับปรุงและคัดพันธุ์อ้อยได้ผลดี เช่น การคัดพันธุ์อ้อยที่ให้ผลผลิตสูง พันธุ์อ้อยที่ทนโรค หรือพันธุ์อ้อยที่มีเปอร์เซ็นต์ความหวานสูง (Heinz และคณะ 1977; Krishnamurthi, 1982; Liu, 1981 และ Nickell, 1977)

สำหรับพันธุ์พืชอื่น ๆ อีกมากมายหลายชนิด ก็เป็นที่นิยมที่นำเทคนิคการเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เสริมกับโครงการผสมพันธุ์พืชซึ่งใช้เป็นวิธีมาตรฐานทั่วไป เทคนิคการเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชจึงนับเป็นวิธีที่ดีอีกวิธีหนึ่งในการสร้างสายพันธุ์ใหม่ ๆ เพื่อขยายพันธุ์ต่อไป เนื่องจากสามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่อไปนี้ คือ (1) การขยายพันธุ์ในหลอดแก้ว (2) การเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญเพื่อหนีไวรัส (3) การสังเคราะห์ secondary product (4) การผลิตพืช haploid โดยการเลี้ยงอับเรณู และ (5) การสร้างพันธุ์ใหม่ ข้อได้เปรียบของการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อเทียบกับวิธีผสมพันธุ์ คือ สามารถคัดพันธุ์ได้ในระดับเซลล์หรือเนื้อเยื่อ จึงมีโอกาสมากกว่า ใช้เนื้อที่น้อยกว่า และในเวลาสั้นกว่าวิธีผสมพันธุ์ธรรมดา วิธีนี้จึงประหยัดกว่ามาก

ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ผลงานวิจัยนี้คงจะมีประโยชน์โดยให้ข้อมูลมาตรฐานต่อผู้ที่สนใจใช้เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์อ้อยโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ยิ่งกว่านั้นจากผลงานวิจัยนี้ได้สายพันธุ์ใหม่ 2 ต้น ที่พิสูจน์แล้วว่าสามารถต้านทานโรคแส้ดำ จึงเชื่อแน่ว่าสายพันธุ์ใหม่ทั้งสองนี้จะสามารถนำมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์อ้อยเพื่อแก้ปัญหาโรคแส้ดำ ซึ่งเป็นปัญหาหลักของเกษตรกรผู้ปลูกอ้อยปัญหาหนึ่ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาจำนวนโครโมโซม (2n) ของอ้อยสายพันธุ์ใหม่ที่ได้นำจากคัลลัส เพื่อดูการแปรว่ามีความแตกต่างจากอ้อยพันธุ์เดิม (F156) หรือไม่

2. ทดสอบความต้านทานโรคแส้ดำของสายพันธุ์ใหม่อีกหลาย ๆ ครั้ง ในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย เพื่อยืนยันความสามารถต้านทานโรคอย่างถาวร

3. ทดลอบคุณสมบัติทางเกษตรของสายพันธุ์ใหม่เพื่อใช้เผยแพร่แก่เกษตรกรใช้เป็นพันธุ์ปลูกหรือใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

4. ในการชักนำให้เกิดการแปร สามารถชักนำโดย spontaneous mutation ไม่จำเป็นต้องใช้ EMS ซึ่งเป็นสารที่มีอันตรายมาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย