

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการผสมตัวเองโดยใช้ผึ้ง พบว่าแต่ละพันธุ์ให้เมล็ดจำนวนไม่เท่ากัน บางพันธุ์ติดเมล็ดมาก บางพันธุ์ติดเมล็ดน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาพอากาศในช่วงที่ทำการทดลองไม่เหมาะสม กล่าวคือหากความสม่ำเสมอของอากาศหนาวเย็นไม่ดีพอและอุณหภูมิไม่ต่ำพอ (สูงกว่า 10 องศาเซลเซียส) ตลอดฤดูกาล จะมีผลต่อการออกดอกของผักกาดหัวทำให้ไม่แทงช่อดอก การแตกแขนงน้อยมากจึงทำให้ติดเมล็ดน้อย และอากาศร้อนทำให้เกิดโรคเน่า (ดำรงณและคณะ, 2541) นอกจากนี้จำนวนประชากรของผึ้งในระยะที่ดอกบานมีผลต่อการติดเมล็ดและยังพบว่าผึ้งจะทำงานในช่วงบ่ายมากกว่าช่วงเช้า ซึ่งโดยปกติช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับผสมเกสรคือช่วงเวลาประมาณ 8.00-11.00 น. จึงอาจมีผลต่อการติดเมล็ด (กมล, 2536) ประกอบกับมีการให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในช่วงเช้าระหว่าง 6.00-8.00 น. ผลของคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีต่อกลไกการผสมตัวเองไม่ติดนั้น เชื่อว่ามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมในละอองเกสรตัวผู้ และ papilla cell ขณะที่มีการสัมผัสกัน ถึงแม้ว่าคาร์บอนไดออกไซด์จะสามารถลดการผสมตัวเองไม่ติดได้ แต่ถ้าไม่มีการผสมเกสรโดยผึ้งเกิดขึ้น การติดเมล็ดก็จะไม่เกิดขึ้น จึงมีผลทำให้อัตราการติดเมล็ดไม่แน่นอน (อรษา, 2528)

สำหรับปัจจัยสำคัญอื่นๆ ที่มีผลต่อการออกดอก การผสมเกสร การติดเมล็ด และการเจริญเติบโตของเมล็ด ได้แก่ อุณหภูมิ ธาตุอาหารในดิน ฝนและการให้น้ำ จากการศึกษาพบว่าผักในตระกูลกะหล่ำรวมทั้งผักกาดหัวต้องการอุณหภูมิต่ำในช่วง 0-15 องศาเซลเซียสช่วงระยะเวลาหนึ่งเพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างตาดอก โดยปกติเมื่อปลูกด้วยเมล็ดจะเจริญเติบโตไปเป็นหัวก่อนถึงจะออกดอกและเป็นเมล็ดอีกครั้งหนึ่ง ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า seed-to-root-to-seed การใช้อุณหภูมิต่ำในการกระตุ้นการออกดอก (vernalization) ช่วยประหยัดเวลาและลดค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษา ในเรื่องของฝนและการให้น้ำพบว่าผักทุกชนิดไม่ต้องการฝนมากในช่วงออกดอกเพราะจะมีปัญหาในการผสมเกสร แต่จะต้องการน้ำมากในช่วงติดเมล็ด และต้องการน้ำน้อยลงในช่วงเมล็ดแก่ (กมล, 2536)

การขยายพันธุ์โดยการผสมตัวเองด้วยวิธีผสมดอกอ่อนด้วยมือ เป็นวิธีการขยายพันธุ์ที่เหมาะสำหรับสร้างลูกผสม หลักสำคัญในการผสมดอกอ่อนคือ การเลือกอายุดอกให้เหมาะสม ควรเลือกดอกที่มีอายุก่อนที่จะบาน 2-3 วันจะทำให้ติดเมล็ดได้ดี ถ้าทำการผสมเกสรในระยะดอกไม่เหมาะสม

ผักที่ติดจะลีบไม่ติดเมล็ด จากการทดลองพันธุ์ที่ไม่ติดเมล็ดหรือติดเมล็ดน้อย อาจเนื่องมาจากการผสมเกสรในระยะดอกที่ไม่เหมาะสม หรือเกสรตัวผู้ที่นำมาผสมมีจำนวนน้อยเกินไป ทำให้กระบวนการงอกของละอองเกสรตัวผู้เป็นไปอย่างไม่สมบูรณ์ (กมล, 2536)

การขยายสายพันธุ์เพื่อรักษาสายพันธุ์ซึ่งมีลักษณะการผสมตัวเองไม่ติดนอกจากจะทำได้โดยการผสมดอกอ่อน และการเพิ่มปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์แล้วยังสามารถปฏิบัติได้ดังนี้ (จานุลักษณ์, 2535)

1. การขยายพันธุ์โดยใช้ส่วนเจริญเติบโต เลือกลส่วนของแขนงอ่อน หรือส่วนยอดที่กำลังเจริญเติบโตจากสายพันธุ์แล้วนำไปปักชำ สามารถขยายต้นอ่อนได้ผลดี แต่ได้ปริมาณจำกัด
2. การใช้พริกกันชนเหล็กป้ายละอองเกสรในขณะผสมเกสร ซึ่งจะทำลายผิวของยอดเกสรตัวเมีย ทำให้ยับยั้งการเกิดกลไกผสมตัวเองไม่ติด แต่วิธีการนี้เพิ่มปริมาณเมล็ดพันธุ์เล็กน้อย
3. การใช้ไฟฟ้ากระตุ้น ใช้ไฟฟ้ากระแสตรง ขนาด 90 โวลต์ นาน 1-2 วินาที กระตุ้นยอดเกสรตัวเมียในขณะผสมเกสร โดยยอดเกสรตัวเมียมีขั้วลบและละอองเกสรตัวผู้มีขั้วบวก เนื่องจากขั้วไฟฟ้าต่างกันทำให้ละอองเกสรตัวผู้และยอดเกสรตัวเมียดูดกันมากขึ้น permeability ของผนัง papilla cell เปลี่ยนไป และความร้อนจากกระแสไฟฟ้าทำลายโครงสร้างของ papilla cell
4. การใช้อุณหภูมิสูงเกินกว่า 25 องศาเซลเซียส สามารถทำลายกลไกการผสมตัวเองไม่ติดได้
5. การเพิ่มความชื้นในขณะผสมเกสร ความงอกของละอองเกสรตัวผู้ต้องการความชื้นไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ cutinase

ผักกาดหัวเป็นพืชผสมตัวเองไม่ติด เพราะดอกบานจะไม่ยอมให้ละอองเกสรตัวผู้งอกบนยอดเกสรตัวเมีย เนื่องจากมีการผลิตสารพิษออกมายับยั้งการงอกของละอองเกสรตัวผู้ แต่ก็ยังพบว่าตัวมันเองมีโอกาที่จะผสมตัวเองติดในขณะที่เป็นดอกตูมซึ่งยอดเกสรตัวเมียจะไม่ผลิตสารพิษออกมายับยั้งการงอกของละอองเกสรตัวผู้เหมือนในดอกบาน และพบว่าเนื้อเยื่อของหลอดเกสรตัวผู้ส่วนใหญ่จะมีสาร callose ซึ่งจะไม่พบในเนื้อเยื่อของก้านชูเกสรตัวเมียที่อยู่ล้อมรอบ และจะติดสีเฉพาะ anilin จึงต้องใช้ฟลูออเรสเซนซ์ที่ฉายแสงสีฟ้า หรือ ultra violet โดย callose จะแสดงแสงสีเหลืองเขียวที่สว่างตัดกับพื้นสีดำอย่างเห็นได้ชัด หลอดเกสรตัวผู้จะถูกกำหนดรูปร่างโดย callose และ callose plug ซึ่งจะถูกรีงเป็นระยะทางไม่สม่ำเสมอภายในก้านชูเกสรตัวเมีย (Kho and Baer, 1968) ในการทดลองเพื่อตรวจสอบลักษณะการผสมตัวเองไม่ติดโดยวิธีตรวจสอบหลอดเกสรตัวผู้ในก้านชูเกสรตัวเมีย พบว่า ดอกบานที่ไม่ได้รับการผสมบางพันธุ์มีละอองเกสรตัวผู้ติดบนยอดเกสรตัวเมีย และมีการงอกของ

หลอดเกสรตัวผู้ได้ ซึ่งแตกต่างจากดอกตูมที่ไม่ได้รับการผสมซึ่งไม่พบละอองเกสรตัวผู้บนยอดเกสรตัวเมีย เนื่องจากไม่ได้ทำการตอน (emasculation) ในบางกรณีของการผสมตัวเองไม่สามารถนับจำนวนหลอดเกสรตัวผู้ที่งอกได้ เพราะต้มใน NaOH นานเกินไป ทำให้ยอดเกสรตัวเมียเปื่อยยุ่ยและหลุดหายไป ดอกตูมที่ทำการผสมตัวเองบางพันธุ์ติดเมล็ดไม่ถึง 50% อาจเนื่องมาจากสภาพของดอกไม้พร้อมรับการผสม ความชื้นไม่พอ หรือดอกได้รับการผสมละอองเกสรตัวผู้้น้อยเกินไป ในการผสมข้ามนั้นโดยทั่วไปสามารถผสมได้ตามปกติทั้งดอกตูมและดอกบาน ในการตรวจสอบลักษณะการผสมตัวเองไม่ติดโดยวิธีผสมดอกตูมและดอกบานในข้อเดียวกันมักจะพบช่อดอกแห้งตายก่อนที่จะติดฝัก ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากการคลุมถุงไว้นานจะทำให้เกิดปัญหาแมลง เช่น เพลี้ยอ่อน และหนอนเข้าไปทำลายฝัก และบางครั้งการผสมอาจมีจำนวนละอองเกสรตัวผู้้น้อยเกินไปทำให้ผสมไม่ติด หรือระยะดอกที่ใช้ไม่เหมาะสม (กมล, 2536)

ในการทดสอบลักษณะการผสมตัวเองไม่ติดโดยวิธีผสมดอกตูมและดอกบานในข้อเดียวกันพบว่าทุกพันธุ์ที่ทดสอบมีลักษณะผสมตัวเองไม่ติด ยกเว้นพันธุ์ 56-1-1 ซึ่งผสมตัวเองไม่ติดในระดับปานกลาง และในการทดสอบลักษณะการผสมตัวเองไม่ติดโดยวิธีตรวจสอบหลอดเกสรตัวผู้ในก้านชูเกสรตัวเมีย พบว่าพันธุ์ 27-1-3 , 56-1-1 , 77-9-2 และ 84-1-1 ผสมตัวเองไม่ติดระดับปานกลาง ซึ่งจะเห็นว่าทั้งสองวิธีให้ผลไม่ตรงกันเสมอไป หากทำการเปรียบเทียบระหว่างวิธีการทั้งสองนี้จะเห็นว่าวิธีตรวจสอบหลอดเกสรตัวผู้ในก้านชูเกสรตัวเมียเป็นวิธีที่สะดวก ใช้เวลาไม่นาน (ประมาณ 2 วัน) ก็สามารถสรุปผลได้ และใช้แรงงานน้อยเพราะทำในห้องปฏิบัติการ สามารถทำคนเดียวได้ แต่วิธีผสมดอกตูมและดอกบานในข้อเดียวกันต้องใช้แรงงานมากกว่าเพราะต้องทำในแปลงปลูก และใช้เวลานานต้องรอจนกระทั่งติดฝักและเมล็ดจึงจะสามารถสรุปผลได้ แต่อย่างไรก็ตามในการทดสอบระดับการผสมตัวเองไม่ติดจะต้องนำผลของทั้งสองวิธีมาพิจารณาประกอบกัน (อัสนีย์, 2535) จากการทดลองพบว่าทุกสายพันธุ์สามารถนำไปขยายพันธุ์โดยการผสมตัวเองเพื่อใช้ในการผลิตลูกผสมได้ แต่เนื่องจากยีนที่ควบคุมการผสมตัวเองไม่ติดมีการกระจายตัว ดังนั้นจึงควรมีการทดสอบระดับการผสมตัวเองไม่ติดต่อไปจนกระทั่งแน่ใจได้ว่ายีนที่ควบคุมไม่มีการกระจายตัว แล้วจึงขยายสายพันธุ์ดังกล่าวเพื่อให้ได้เมล็ดพันธุ์จำนวนมาก

จากการผสมข้ามแบบพบกันหมดเพื่อคัดเลือกคู่ผสมที่ดีที่สุด พบว่าพันธุ์ 18 X 75 ให้ น้ำหนักเมล็ดสูงสุด และเมื่อพิจารณาลักษณะการผสมตัวเองไม่ติดพบว่าทั้งสายพันธุ์พ่อและสายพันธุ์แม่มีลักษณะการผสมตัวเองไม่ติดเมื่อทดสอบด้วยวิธีผสมดอกตูมและดอกบานในข้อเดียวกันและวิธี

ตรวจสอบหลอดเกษตรตัวผู้ในก้านชูเกสรตัวเมีย พันธุ์ที่ให้น้ำหนักเมล็ดรองลงมาคือ 75 x 18 , 27 x 18, 27 x 59 และ 56 x 18 ตามลำดับ จากการทดสอบพันธุ์ลูกผสมโดยบริษัทเอกชน พบว่าในเรื่องการเจริญเติบโตคุณสมบัติทั้งหมดมีการเจริญเติบโตดีเมื่อเทียบกับพันธุ์มาตรฐาน ยกเว้นพันธุ์ 27 x 18 มีการเจริญเติบโตดีมาก ความสม่ำเสมอของสายพันธุ์พบว่าพันธุ์ 27 x 18 , 62-8 x 18-5 , 62-8 x 18-6, 75-2 x 18-5 และ 75-2 x 18-6 มีความสม่ำเสมอดีกว่าพันธุ์มาตรฐานหมายเลข 12 และ 24 ลักษณะของใบมีทั้งพันธุ์ที่มีใบสีเขียวและพันธุ์ที่มีใบสีเขียวเข้ม รูปร่างของใบมีทั้ง lyrate และ entire พันธุ์ 27 x 18 , 62-2 x 18-5 , 62-8 x 18-5 และ 75-2 x 18-11 ใบไม่มีหนามหรือขน ส่วนพันธุ์อื่นๆ พบหนามหรือขนบางเล็กน้อย สำหรับลักษณะของหัวโดยส่วนใหญ่มีรูปร่างทรงกระบอก (cylindric) แต่พบบางพันธุ์มีหัวรูปร่างแบบ elliptic และ triangular พันธุ์ 59-10 x 18-5 , 62-2 x 18-5 , 62-2 x 18-6 และ 77-9 x 18-5 มีลักษณะหัวสั้น ใหญ่ พันธุ์ 75-2 x 18-6 และ 75-2 x 18-11 มีลักษณะหัวสั้นและใหญ่เขียว จากการประเมินลักษณะต่างๆ คุณสมบัติที่มีลักษณะที่ดีมีขนาดโตได้แก่ พันธุ์ 27-1-3 x 18-1 และ 27-1-3 x 18-6 เพราะมีการเจริญเติบโตดีมาก มีความสม่ำเสมอ หัวทรงกระบอก ผิวเรียบ เนื้อภายในแน่น ผลผลิตหัวผักกาดของลูกผสมเหล่านี้ได้เคยทดสอบแล้วว่าให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ตลาดหลายเท่าตัว (Nikornpun, 1988-92) โดยให้ผลผลิตสูงกว่าลูกผสมพันธุ์ Everest 1-3 เท่าตัว และให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ผสมเปิดเจียไต๋ 1 และ 2 ถึง 0.5-3 เท่าตัว (Nikornpun, 1995) ถึงแม้ว่าจะให้น้ำหนักเมล็ดมากเป็นอันดับที่สามารถรองจากพันธุ์ 18 X 75 และ 75 X 18 ก็ตาม ดังนั้นในการคัดเลือกคุณสมบัติจากการผสมข้ามแบบพบกันหมดจะพิจารณาจากจำนวนเมล็ดที่ผลิตได้และจากการทดสอบพันธุ์ พบว่า พันธุ์ 27 x 18 เป็นพันธุ์ที่มีลักษณะดี คือ มีความสม่ำเสมอของสายพันธุ์ ใบสีเขียวเข้มไม่มีหนาม หัวยาวทรงกระบอก ผิวเรียบ เนื้อภายในไม่พุ่ม น้ำหนักหัวประมาณ 360-400 กรัม ซึ่งเป็นที่ยอมรับของตลาด จึงควรนำเอาไปทดสอบในแปลงเกษตรกรต่อไป

เมื่อนำลูกผสมและสายพันธุ์พ่อ-แม่มาตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส เอนไซม์ที่ศึกษามี 3 ชนิด คือ peroxidase , acid phosphatase และ esterase พบว่า

การตรวจสอบเอนไซม์ PER สามารถมองเห็นแถบไอโซไซม์ได้ชัดเจน 3 แถบ ลูกผสมมีแถบไอโซไซม์ที่ถ่ายทอดจากสายพันธุ์พ่อ-แม่ ไม่พบว่าการตรวจสอบด้วยเอนไซม์ PER ทำให้เกิดแถบไอโซไซม์เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์พ่อ-แม่ แถบไอโซไซม์ที่ปรากฏไม่ค่อยชัดเจน อาจเป็นเพราะสภาพต่างๆ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิขณะปฏิบัติงานสูงขึ้น ทำให้โปรตีนและเอนไซม์สลายตัว(denature) คุณสมบัติของโปรตีนและเอนไซม์นั้นจะลดลงซึ่งเป็นผลให้การตรวจสอบ

ไม่ชัดเจน pH ของสารละลายบัฟเฟอร์มีผลต่อประจุไฟฟ้ารวมของอนุภาคของโปรตีนและเอนไซม์ และยังมีอิทธิพลต่อสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งส่งผลต่อทิศทางและอัตราการเคลื่อนที่ของอนุภาคประจุต่างๆ (ดวงพร, 2538)

การตรวจสอบเอนไซม์ ACP สามารถมองเห็นแถบไอโซไซม์ได้ชัดเจน แถบไอโซไซม์ที่ปรากฏในสายพันธุ์พ่อ-แม่และลูกผสมทุกพันธุ์คือ แถบที่ 2 และ 6 ลูกผสมส่วนใหญ่มีแถบไอโซไซม์ที่ถ่ายทอดจากสายพันธุ์พ่อ นอกจากนี้ยังพบว่า ลูกผสม 18-11 x 62-8-1 , 18-6-7 x 77-4 , 27-1-3 x 18-11 , 27-1-3 x 77-4 และ 56-1-1 x 77-4 มีแถบไอโซไซม์เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์พ่อ-แม่ แถบไอโซไซม์ที่เพิ่มขึ้นได้แก่ แถบที่ 2 , 3 , 9 และ 10 ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Kim และ Park (1984) ที่ว่าในการผสมผักกาดหัวพันธุ์พืชมียีน MM และมีแถบไอโซไซม์แถบที่ 1 กับพันธุ์แม่ที่มียีน NN และมีแถบไอโซไซม์แถบที่ 2 ได้ลูกผสมที่ยีนพันธุ์ทาง MN (heterozygous genes) และมีแถบไอโซไซม์แถบที่ 1 , 2 และ 3 จากการศึกษาของ Popova (1963) เชื่อว่าแถบที่เพิ่มขึ้นมานั้นมีสาเหตุเนื่องมาจากลูกผสมเกิด heterosis ซึ่งทำให้ลูกผสมแสดงลักษณะได้ลักษณะหนึ่งเหนือพ่อแม่ (hybrid vigor)

การตรวจสอบเอนไซม์ EST สามารถมองเห็นแถบไอโซไซม์ได้ชัดเจน แต่สายพันธุ์ 56-1-1 ไม่เกิดแถบไอโซไซม์ และสายพันธุ์ 18-6-7 , 18-11 x 62-8-1 และ 27-1-3 x 56-1-1 แถบไอโซไซม์ที่ปรากฏไม่ชัดเจน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในพันธุ์เหล่านี้มีเอนไซม์ EST อยู่่น้อย หรือเอนไซม์สลายตัวไปเนื่องจากอุณหภูมิสูง เป็นผลให้ผลการตรวจไม่ชัดเจน

จากการทดลองในครั้งนี้อาจใช้ลักษณะแบบแผนการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ได้จากขบวนการอิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นเกณฑ์ในการจำแนกความแตกต่างของผักกาดหัวสายพันธุ์พ่อ สายพันธุ์แม่ และลูกผสมได้ กล่าวคือ มีความแตกต่างกันในเรื่องของจำนวนและหมายเลขแถบไอโซไซม์ที่ปรากฏตัวอย่างเช่น ในตรวจสอบเอนไซม์ PER ของผักกาดหัวพันธุ์ 56-1-1 มีแถบไอโซไซม์เกิดขึ้น 1 แถบคือ แถบที่ 3 พันธุ์ 77-4 มีแถบไอโซไซม์เกิดขึ้น 1 แถบคือแถบที่ 2 ในลูกผสม 56-1-1 x 77-4 มีแถบไอโซไซม์ปรากฏ 2 แถบคือแถบที่ 2 และ 3 ในตรวจสอบเอนไซม์ ACP ของผักกาดหัวพันธุ์ 18-11 มีแถบไอโซไซม์เกิดขึ้น 5 แถบคือแถบที่ 2 , 5 , 6 , 7 และ 10 พันธุ์ 62-8-1 มีแถบไอโซไซม์เกิดขึ้น 5 แถบเช่นกันคือแถบที่ 2 , 3 , 5 , 6 และ 9 ในลูกผสม 18-11 x 62-8-1 มีแถบไอโซไซม์เกิดขึ้นเพียง 4 แถบคือแถบที่ 2 , 4 , 6 และ 10

สรุป

1. การขยายพันธุ์โดยการผสมตัวเองสามารถทำได้โดยใช้ฝักและการผสมดอกก่อนด้วยมือ
2. ทุกพันธุ์มีลักษณะการผสมตัวเองไม่ติดในระดับต่างกัน และสามารถนำไปขยายพันธุ์โดยการผสมตัวเองเพื่อใช้ในการผลิตลูกผสมต่อไปได้
3. คู่ผสม 27 x 18 ให้เมล็ดพันธุ์จำนวน 0.68 กรัม/ฝัก และเป็นพันธุ์ที่มีลักษณะดีทางพืชสวน ซึ่งเป็นที่ยอมรับของตลาด จึงควรนำเอาไปทดสอบในแปลงเกษตรกรต่อไป
4. การใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส เอนไซม์ที่เหมาะสมในการตรวจสอบคือ acid phosphatase เพราะแสดงแถบไอโซไซม์ที่ชัดเจน แต่ควรใช้ร่วมกับเอนไซม์ peroxidase และ esterase
5. ลูกผสมมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์พ่อแม่ โดยลูกผสมแสดงแถบไอโซไซม์ผสมกันระหว่างพ่อและแม่
6. ลูกผสมพันธุ์ 18-11 x 62-8-1 , 18-6-7 x 77-4 , 27-1-3x77-4 และ 56-1-1 x 77-4 เมื่อตรวจสอบด้วยเอนไซม์ acid phosphatase พบว่ามีแถบโปรตีนเพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์พ่อและแม่ เนื่องจากลูกผสมเกิด heterosis