การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาและความสมบูรณ์พันธุ์ของปทุมมาลูกผสม (*Curcuma alismatifolia* x *C. rhabdota*) ดิพลอยด์และเททระพลอยด์

มะลิวรรณ จุรุทา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
พ.ศ. 2551

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

COMPARISONS OF MORPHOLOGICAL CHARACTERS AND FERTILITY BETWEEN DIPLOID AND TETRAPLOID *CURCUMA* HYBRIDS

MALIWAN JURUTA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

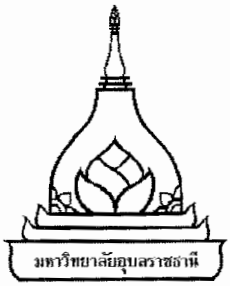
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

MAJOR IN AGRICULTURE FACULTY OF AGRICULTURE

UBON RAJATHANEE UNIVERSITY

YEAR 2008

COPYRIGHT OF UBON RAJATHANEE UNIVERSITY



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์

เรื่อง การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาและความสมบูรณ์พันธุ์ของปทุมมาลูกผสม (*Curcuma alismatifolia* x *C. rhabdota*) ดิพลอยด์และเททระพลอยด์

ผู้วิจัย นางสาวมะลิวรรณ จุรุทา

ได้รับพิจารณาเห็นชอบโดย

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล สุริยภัทร)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุมนทิพย์ บุนนาค)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ถาวร สุภาพรม)

..... กรรมการ
(ดร.บุบผา ใจเที่ยง)

..... คณบดี
(รองศาสตราจารย์ ดร.วัชรพงษ์ วัฒนกูล)

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี รับรองแล้ว

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุทิศ อินทร์ประสิทธิ์)
รองอธิการบดี ฝ่ายวิชาการ
ปฏิบัติราชการแทนอธิการบดี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปีการศึกษา 2551

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล สุริยภัทร ซึ่งเป็นทั้งอาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์ประจำวิชา ที่กรุณาให้ความรู้ทางวิชาการ วิธีการดำเนินการวิจัย และให้คำปรึกษาในการทำวิทยานิพนธ์ จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ถาวร สุภาพรม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ประจำศูนย์วิเคราะห์โครโมโซม ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ความรู้เรื่องการศึกษาโครโมโซม ตลอดจนให้คำชี้แนะในการทำวิจัยและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณ ดร.บุบผา ใจเที่ยง กรรมการที่ปรึกษาและกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้ความรู้ด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุมนทิพย์ บุนนาค กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้คำชี้แนะในการทำวิจัยและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้

ขอกราบขอบพระคุณพี่ ๆ บุคลากรคณะเกษตรศาสตร์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือวิทยาศาสตร์ และให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยด้วยดีเสมอมา ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และพี่น้องชาวพืชสวน ที่คอยเป็นกำลังใจในการทำงานด้วยดีตลอดมา และขอขอบพระคุณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทดลอง

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยเลี้ยงดูและสนับสนุนเป็นอย่างดี ขอขอบคุณญาติพี่น้อง และสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่คอยให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยดีมาตลอด

(นางสาว มะลิวรรณ จุรุทา)
ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง : การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาและความสมบูรณ์พันธุ์ของปทุมมาลูกผสม(*Curcuma alismatifolia* x *C. rhabdota*) ดิพลอยด์และเททระพลอยด์

โดย : มะลิวรรณ จุรุทา

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา : เกษตรศาสตร์

ประธานกรรมการที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล สุริยภัทร

ศัพท์สำคัญ : ปทุมมาลูกผสม ลักษณะสัณฐานวิทยา ละอองเรณู ไมโอซิส

การศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาและความสมบูรณ์พันธุ์ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ และศึกษาความผิดปกติของการแบ่งไมโอซิสของเซลล์ต้นกำเนิดละอองเรณู (pollen mother cells: PMC) เพื่อหาสาเหตุความเป็นหมันในต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ ผลการศึกษาพบว่า ในการปลูกทดสอบเป็นเวลา 2 ฤดูปลูก ต้นเททระพลอยด์มีลักษณะสัณฐานวิทยาต่างจากต้นดิพลอยด์ โดยมีความสูงของต้นใกล้เคียงกัน แต่ต้นเททระพลอยด์มีความกว้างทรงพุ่มมากกว่าต้นดิพลอยด์อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากต้นเททระพลอยด์มีขนาดใบและพื้นที่ใบมากกว่าต้นดิพลอยด์ ส่วนความยาวช่อดอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางก้านช่อดอก และขนาดดอกของต้นเททระพลอยด์มีค่ามากกว่าต้นดิพลอยด์อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ดอกของต้นเททระพลอยด์ใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ 16 % และมีกลีบดอกหนามากกว่า ทำให้ระยะเวลาการบานของดอกนานกว่าต้นดิพลอยด์เป็นเวลา 6 – 7 วัน ต้นเททระพลอยด์มีอับเรณูขนาดใหญ่มากกว่า และมีละอองเรณูใหญ่กว่าดิพลอยด์ 22% นอกจากนี้ ขนาดหัวพันธุ์ของต้นเททระพลอยด์มีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางหัวพันธุ์ และจำนวนรากสะสมอาหารมากกว่าต้นดิพลอยด์อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนผลการศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ พบว่าละอองเรณูเกือบทั้งหมด (99 %) ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ไม่มีชีวิตโดยย้อมไม่ติดสีอะซีโตออซีน ในขณะที่ละอองเรณูของต้น ปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์มีชีวิตร้อยละ 18 และสามารถงอกในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลซูโครส 10 % โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกร้อยละ 28 เมื่อนำละอองเรณูของต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ไปทำการผสมตรง และผสมสลับกับปทุมมา (*Curcuma alismatifolia*) พบว่าต้นเททระพลอยด์ที่ผสมตัวเอง และใช้ปทุมมาเป็นแม่มีการผสมติดเป็นร้อยละ 16 และ 13 ตามลำดับ ทั้งนี้เมล็ดที่เกิดจากการผสมนี้ไม่สามารถงอกได้ในอาหารสังเคราะห์ และผล

การศึกษาความผิดปกติของการแบ่งไมโอซิสของ PMC เพื่อหาสาเหตุความเป็นหมันของละอองเรณูของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ พบว่า มีความผิดปกติในการแยกออกจากกันของโครโมโซมในระยะ แอนาเฟส I แบบ chromosome bridge และ chromosome lagging รวมเป็นร้อยละ 46 แต่ไม่พบความผิดปกติของการเข้าคู่กันของโครโมโซมที่ระยะไดอะไคเนซิส อาจสรุปได้ว่าสาเหตุการเป็นหมันของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์เกิดจากความผิดปกติทางด้านโครงสร้างของโครโมโซมลูกผสม (chromosome structural hybridity) โดยกระบวนการอินเวอร์ชัน (inversion) และการเพิ่มชุดโครโมโซมได้เป็นต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ ช่วยให้ PMC มีการแยกออกจากกันของโครโมโซมในระยะแอนาเฟส I เป็นปกติสูงถึงร้อยละ 90 ส่งผลให้ละอองเรณูมีชีวิตเพิ่มขึ้นร้อยละ 18

ABSTRACT

TITLE : COMPARISONS OF MORPHOLOGICAL CHARACTERS AND FERTILITY BETWEEN DIPLOID AND TETRAPLOID *CURCUMA* HYBRIDS

BY : MALIWAN JURUTA

DEGREE : MASTER OF SCIENCE (AGRICULTURE)

MAJOR : AGRICULTURE

CHAIR : ASSOC.PROF. PONPIMON SURIYAPAT, Ph.D.

KEYWORDS : *CURCUMA* HYBRIDS / MORPHOLOGICAL CHARACTERS / MEIOSIS / POLLEN

This study aimed to compare morphological characters and fertility between diploid and tetraploid *Curcuma* hybrids (*Curcuma alismatifolia* x. C. *rhabdota*). In addition, the meiotic behavior causing pollen sterility in the diploid hybrid was also studied. After two-year-growth cycles, the morphological characters of these plants were investigated. The results showed that the plant heights of the tetraploids and diploids were the same, but the widths of the leaf portions of the plants in the tetraploids were 11 % wider than those in the diploids. These differences resulted in larger leaf areas in the tetraploids than in the diploids. Inflorescence lengths were the same in both hybrids, but the width of inflorescences and the diameter of peduncles in the tetraploid plants were significantly wider than those in the diploids ($P \leq 0.05$). The flowers of the tetraploids were 16 % larger, with thicker petals than the diploids, resulting in a longer flowering period (6-7 days). The tetraploids had larger anthers which contained 22 % larger size pollens. In addition, the rhizome size of the tetraploids had a larger diameter and had more root numbers than those in the diploids. The fertility studies in these hybrids revealed that the diploids had most of the nonviable pollens (99%) detected by aceto-orcein staining. While the tetraploids pollens had 18% viability and 28% germination percentage in medium containing 10% sucrose. Pollination by the tetraploid themselves and with *Curcuma alismatifolia* caused fruit set to be 16% and 13%, respectively. However, the seeds from these crosses were not germinated. The meiotic behavior in pollen mother cells (PMC) and its implication on the pollen viability in *Curcuma*

hybrids were studied. The results showed that PMC of the diploid hybrid in anaphase I displayed 54% with a normal anaphase. Irregular anaphases showed 24% of cells with chromosome bridges and 22% of cells with chromosome lagging. Even though the chromosome numbers from each progenitor were unequal, abnormality in bivalent pairing was not detected. These results suggested that the sterility of pollen in the diploids may be caused by chromosome structural hybridity due to chromosome inversion. The tetraploid PMC displayed 90% with a normal anaphase I, consequently, its pollen viability increased to 18 %.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญภาพ	ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฒ
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 วัตถุประสงค์	2
1.2 สมมติฐานการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตการศึกษา	2
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
2 การตรวจเอกสาร	
2.1 การตรวจสอบความเป็นเททระพลอยด์ในพืช	3
2.1.1 ต้นเททระพลอยด์	3
2.1.2 วิธีการตรวจสอบต้นเททระพลอยด์	4
2.1.2.1 การตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก	5
2.1.2.2 การวัดขนาดเซลล์คุมปากใบ	8
2.1.2.3 การวัดขนาดละอองเกสรเพศผู้	9
2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นพืชเททระพลอยด์	10
2.2.1 ระดับพลอยดีกับการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยา	10
2.2.2 ความสมบูรณ์พันธุ์ของพืชที่เป็นเททระพลอยด์	13
2.2.2.1 การย้อมติดสีของละอองเรณู	13
2.2.2.2 การงอกของละอองเกสรเพศผู้	14
2.2.2.3 ความสามารถในการผสมติดเมล็ด	16
2.3 พัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้	18

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4 สาเหตุของความเป็นหมันในละอองเกสรเพศผู้ของลูกผสมข้ามชนิด 20

2.4.1 การเป็นหมันเนื่องจากการเข้าคู่และการแยกออกจากกันของโครโมโซมผิดปกติ 20

2.4.2 ความผิดปกติของกระบวนการแบ่งไซโทพลาสซึม 24

3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ลักษณะพฤกษศาสตร์ของปทุมมาลูกผสม 26

3.2 การเตรียมหัวพันธุ์ปทุมมาลูกผสม การบ่มหัวพันธุ์และการย้ายปลูก 26

3.2.1 การเตรียมหัวพันธุ์ 26

3.2.2 การบ่มหัวพันธุ์ 26

3.2.3 การเตรียมวัสดุย้ายปลูก 27

3.2.4 การย้ายปลูก 27

3.2.5 การดูแลรักษา 27

3.3 วิธีการศึกษา แผนการทดลอง และการบันทึกผล 27

3.3.1 การตรวจสอบต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ 27

3.3.1.1 การศึกษาขนาดและจำนวนเซลล์คุมปากใบต่อพื้นที่ 27

3.3.1.2 การศึกษาการวัดขนาดละอองเรณู 28

3.3.1.3 การศึกษาจำนวนโครโมโซมเซลล์ปลายราก 28

3.3.2 การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ 29

3.3.3.1 การวัดอัตราสังเคราะห์แสงของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ 30

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.2.2 การวัดพื้นที่ใบของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ 30

3.3.3 การศึกษาเปรียบเทียบความสมบูรณ์พันธุ์ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ 31

3.3.3.1 การศึกษาความมีชีวิตของละอองเรณู 31

3.3.3.2 การงอกของละอองเรณูในอาหารสังเคราะห์ 32

3.3.3.3 การศึกษาเปอร์เซ็นต์การผสมติดของปทุมมาลูกผสมในคู่ผสมต่างๆ 32

3.3.3.4 การศึกษาการพัฒนาของฝักที่เกิดจากการผสมเกสร 33

3.3.3.5 การศึกษาการงอกของเมล็ดปทุมมาลูกผสมในหลอดแก้ว 33

3.3.4 การศึกษาสาเหตุความเป็นหมันจากความผิดปกติของไมโอซิสในPMC 33

3.3.4.1 ระยะพัฒนาการของดอกอ่อนกับระยะการแบ่งแบบไมโอซิส 33

3.3.4.2 การศึกษาความยาวนานในการหยุดวงชีพจักรเซลล์ 34

3.3.4.3 การศึกษาชนิดสีและระยะเวลาในการย้อมสีโครโมโซม 34

3.3.4.4 การศึกษาความผิดปกติของการแบ่งแบบไมโอซิส 35

3.4 ระยะเวลาทำการวิจัย 35

3.5 สถานที่ทำการวิจัย 35

4 ผลการทดลอง

4.1 การตรวจสอบยืนยันความเป็นผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ในปทุมมาลูกผสม 36

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.1.1 ขนาดและจำนวนเซลล์คุมปากใบ 36

4.1.2 จำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก 38

4.1.3 ขนาดละอองเรณู 38

4.2 การศึกษาการเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และ เททระพลอยด์ 39

4.2.1 ลักษณะต้น 39

4.2.2 ลักษณะช่อดอกและดอก 42

4.2.3 ลักษณะหัวพันธุ์ 46

4.3 การศึกษาเปรียบเทียบความสมบูรณ์พันธุ์ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ 48

4.3.1 การศึกษาความมีชีวิตของละอองเรณู 48

4.3.2 การงอกของละอองเรณู 50

4.3.3 การศึกษาเปอร์เซ็นต์ผสมติดของปทุมมาลูกผสม 53

4.3.4 การเจริญของผล 54

4.3.5 การงอกของเมล็ดปทุมมาลูกผสมในหลอดแก้ว 59

4.4 การศึกษาสาเหตุความเป็นหมันจากความผิดปกติของการแบ่งไมโอซิสของเซลล์ต้นกำเนิดละอองเรณู 59

4.4.1 การศึกษาระยะพัฒนาการของดอกอ่อนกับระยะการแบ่งไมโอซิสของ PMC 59

4.4.2 การศึกษาเทคนิคการย้อมสีโครโมโซมในดอกอ่อน 66

4.4.2.1 การศึกษาความยาวในการหยุดวงชีพจักรเซลล์ 66

4.4.2.2 การศึกษาชนิดสีและระยะเวลาในการย้อมสีโครโมโซม 67

4.4.3 การศึกษาความผิดปกติของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส 68

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5 อภิปรายผลการทดลอง

5.1 การตรวจสอบยืนยันความเป็นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ในปทุมมาลูกผสม 71

5.1.1 ปากใบ 71

5.1.2 จำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก 72

5.1.3 ขนาดละอองเรณู 72

5.2 การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ 72

5.2.1 ลักษณะต้น 73

5.2.2 ลักษณะช่อดอกและดอก 73

5.2.3 ขนาดของหัวพันธุ์ 74

5.3 การเปรียบเทียบความสมบูรณ์พันธุ์ของต้นปทุมมาดิพลอยด์และเททระพลอยด์ 74

5.4 การศึกษาความผิดปกติของการแบ่งไมโอซิสของเซลล์ต้นกำเนิดละอองเรณู 75

5.4.1 การศึกษาระยะพัฒนาการของดอกอ่อนกับระยะการแบ่งไมโอซิสของ PMC 75

5.4.2 การศึกษาความผิดปกติของการแบ่งไมโอซิสของ PMC 76

6 สรุป **78**

เอกสารอ้างอิง **80**

ภาคผนวก

ก การคำนวณจำนวนปากใบต่อพื้นที่ 93

ข การเตรียมอาหาร และสารเคมี 95

ค การศึกษาโครโมโซมด้วยเทคนิค squash method 99

ประวัติผู้วิจัย **104**

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ค่าเฉลี่ยความยาวเซลล์คุมปากใบและจำนวนปากใบต่อพื้นที่ของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ อายุ 2 ปี	36
2	ค่าเฉลี่ยความยาวเซลล์คุมปากใบและจำนวนปากใบต่อพื้นที่ของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ อายุ 3 ปี	37
3	ขนาดละอองเรณูของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ อายุ 2 และ 3 ปี	38
4	การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์	40
5	การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์	40
6	การเปรียบเทียบอัตราการสังเคราะห์แสง และขนาดพื้นที่ใบทั้งหมดของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์	41
7	การเปรียบเทียบลักษณะช่อดอกของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์	43
8	การเปรียบเทียบลักษณะดอกของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์	43
9	การเปรียบเทียบลักษณะดอกของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์	44
10	การเปรียบเทียบลักษณะดอกของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์	44
11	ลักษณะหัวพันธุ์ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์จากต้นอายุ 2 ปี	47
12	ลักษณะหัวพันธุ์ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์จากต้นอายุ 3 ปี	47

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	เปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสรปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ในอาหารสูตร Taylor's ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0, 10, 20, 30 และ 40 % นานเป็นระยะเวลา 1, 3 และ 5 ชั่วโมง	50
15	ความยาวของหลอดละอองเรณูปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ในอาหารสูตร Taylor's ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0, 10, 20, 30,และ 40 % นานเป็นระยะเวลา 1, 3 และ 5 ชั่วโมง	51
16	การติดฝักของปทุมมาลูกผสมในคู่ผสมต่าง ๆ	54
17	การเปรียบเทียบลักษณะของผลปทุมมาลูกผสมที่ได้จากคู่ผสมต่าง ๆ	55
18	การเปลี่ยนแปลงขนาดของผล น้ำหนัก และจำนวนเมล็ดที่เกิดจากการผสมระหว่างต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์กับเททระพลอยด์	56
19	การเปลี่ยนแปลงขนาดของของผล น้ำหนัก และจำนวนเมล็ดที่เกิดจากการผสมระหว่างต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ผสมกับปทุมมา	57
20	การเปลี่ยนแปลงขนาดของของฝัก น้ำหนักและจำนวนเมล็ดที่เกิดจากการผสมระหว่างต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ผสมกับปทุมมา	60
21	เปอร์เซ็นต์ความถี่ของเซลล์ในระยะต่าง ๆ ของการแบ่งไมโอซิสของ PMC ที่มาจากดอกระยะต่าง ๆ ในต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์	63
22	เปอร์เซ็นต์ความถี่ของเซลล์ในระยะต่าง ๆ ของการแบ่งไมโอซิสของ PMC ที่มาจากดอกระยะต่าง ๆ ในต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์	64
23	เปอร์เซ็นต์ความถี่ของการพบ chromosome bridge และ chromosome lagging ในระยะแอนาเฟส I ของการแบ่งไมโอซิสของ pollen mother cells จากเซลล์ดอกอ่อนของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์	69
24	เปอร์เซ็นต์ความถี่ของการพบ chromosome bridge และ chromosome lagging ในระยะแอนาเฟส I ของการแบ่งไมโอซิสของ pollen mother cells จากเซลล์ดอกอ่อนของต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์	69
ข.1	สูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962)	98

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดประกอบด้วยชั้น tunica (L1, L2) และ ชั้น corpus (L3)	4
2	การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้	19
3	ขนาดเซลล์คุมปากใบของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์	37
4	จำนวนปากใบต่อพื้นที่ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์	37
5	โครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์	38
6	ละอองเกสรเพศผู้ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ อายุ 3 ปี	39
7	ลักษณะต้นปทุมมูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ ที่มีอายุ 2 ปี และ 3 ปี	41
8	ลักษณะช่อดอกของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์	45
9	เปรียบเทียบดอกจริงของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์และส่วนประกอบของดอกของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์	45
10	ลักษณะอับเรณูของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์	46
11	ลักษณะหัวพันธุ์ปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์	48
12	ละอองเกสรเพศผู้ของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์	49
13	ละอองเกสรเพศผู้ของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ที่ผิดปกติ ย้อมไม่ติดสีอะซีโตออซีน มีผนังเซลล์หนาและมีหลายขนาดปะปนกัน	49
14	เปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเรณูในปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ในอาหารสูตร Taylor's ที่เติมน้ำตาลความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในระยะเวลาต่างๆกัน	51
15	ความยาวของหลอดละอองเกสรปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ในอาหารสูตรTaylor's ที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, และ 40 % นานเป็นระยะเวลาต่าง ๆ	52
16	การงอกของละอองเรณูปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ในอาหารสังเคราะห์สูตร Taylor's ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 10 % นานเป็นระยะเวลา 0, 1, 3 และ 5 ชั่วโมง	52
17	ละอองเรณูปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร Taylor's	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	ความสัมพันธ์ระหว่างอายุ และน้ำหนักผลของปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ที่ผสมตัวเอง	56
19	ความสัมพันธ์ระหว่างอายุ และน้ำหนักผลของปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ผสมปทุมมา	57
20	ลักษณะผล และเมล็ดอายุ 30 วัน ที่เกิดจากการผสมตัวเองของปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์	58
21	ลักษณะผล และเมล็ดอายุ 30 วัน ที่เกิดจากการผสมปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์กับปทุมมา	58
22	ขนาดดอกอ่อนและอับเรณูของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์	61
23	การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส I และไมโอซิส II ของ PMC ในเซลล์ดอกอ่อนของปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์	65
24	โครโมโซมจากเซลล์ดอกอ่อนของต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ที่ได้รับการหยุดวงชีพจักรเซลล์เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง	66
25	โครโมโซมจากเซลล์ดอกอ่อนของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ที่ย้อมด้วยสี aceto-orcein และสี lacto-propionic orcein	67
26	โครโมโซมจากเซลล์ดอกอ่อนของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ที่ย้อมด้วยสี aceto-orceinและสี lacto-propionic orcein 10, 15 และ 20 นาที	68
27	ความผิดปกติในการแบ่งไมโอซิสในระยะแอนาเฟส Iของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์แบบ chromosome bridge และ chromosome lagging	70
28	ความผิดปกติในการแบ่งไมโอซิสในระยะแอนาเฟส I ของปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์แบบ chromosome bridge และ chromosome lagging	70

คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ

สัญลักษณ์และอักษรย่อ	คำอธิบาย
ก.	กรัม
ชม.	ชั่วโมง
ซม.	เซนติเมตร
ซม.^{2}	ตารางเซนติเมตร
มก.	มิลลิกรัม
มก./ล.	มิลลิกรัมต่อลิตร
มม.	มิลลิเมตร
ล.	ลิตร
BAP	6-benzylamino purine
$\mu molm^{-2}s^{-1}$	ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที
MS	Murashige and Skoog
PDB	2,4-paradichlorobenzene

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญภาพ	ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฒ
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 วัตถุประสงค์	2
1.2 สมมติฐานการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตการศึกษา	2
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
2 การตรวจเอกสาร	
2.1 การตรวจสอบความเป็นเททระพลอยด์ในพืช	3
2.1.1 ต้นเททระพลอยด์	3
2.1.2 วิธีการตรวจสอบต้นเททระพลอยด์	4
2.1.2.1 การตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก	5
2.1.2.2 การวัดขนาดเซลล์คุมปากใบ	8
2.1.2.3 การวัดขนาดละอองเกสรเพศผู้	9
2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นพืชเททระพลอยด์	10
2.2.1 ระดับพลอยดีกับการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยา	10
2.2.2 ความสมบูรณ์พันธุ์ของพืชที่เป็นเททระพลอยด์	13
2.2.2.1 การย้อมติดสีของละอองเรณู	13
2.2.2.2 การงอกของละอองเกสรเพศผู้	14
2.2.2.3 ความสามารถในการผสมติดเมล็ด	16
2.3 พัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้	18

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4 สาเหตุของความเป็นหมันในละอองเกสรเพศผู้ของลูกผสมข้ามชนิด 20

2.4.1 การเป็นหมันเนื่องจากการเข้าคู่และการแยกออกจากกันของโครโมโซมผิดปกติ 20

2.4.2 ความผิดปกติของกระบวนการแบ่งไซโทพลาสซึม 24

3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ลักษณะพฤกษศาสตร์ของปทุมมาลูกผสม 26

3.2 การเตรียมหัวพันธุ์ปทุมมาลูกผสม การบ่มหัวพันธุ์และการย้ายปลูก 26

3.2.1 การเตรียมหัวพันธุ์ 26

3.2.2 การบ่มหัวพันธุ์ 26

3.2.3 การเตรียมวัสดุย้ายปลูก 27

3.2.4 การย้ายปลูก 27

3.2.5 การดูแลรักษา 27

3.3 วิธีการศึกษา แผนการทดลอง และการบันทึกผล 27

3.3.1 การตรวจสอบต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ 27

3.3.1.1 การศึกษาขนาดและจำนวนเซลล์คุมปากใบต่อพื้นที่ 27

3.3.1.2 การศึกษาการวัดขนาดละอองเรณู 28

3.3.1.3 การศึกษาจำนวนโครโมโซมเซลล์ปลายราก 28

3.3.2 การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ 29

3.3.3.1 การวัดอัตราสังเคราะห์แสงของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ 30

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.2.2 การวัดพื้นที่ใบของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ 30

3.3.3 การศึกษาเปรียบเทียบความสมบูรณ์พันธุ์ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ 31

3.3.3.1 การศึกษาความมีชีวิตของละอองเรณู 31

3.3.3.2 การงอกของละอองเรณูในอาหารสังเคราะห์ 32

3.3.3.3 การศึกษาเปอร์เซ็นต์การผสมติดของปทุมมาลูกผสมในคู่ผสมต่างๆ 32

3.3.3.4 การศึกษาการพัฒนาของฝักที่เกิดจากการผสมเกสร 33

3.3.3.5 การศึกษาการงอกของเมล็ดปทุมมาลูกผสมในหลอดแก้ว 33

3.3.4 การศึกษาสาเหตุความเป็นหมันจากความผิดปกติของไมโอซิสในPMC 33

3.3.4.1 ระยะพัฒนาการของดอกอ่อนกับระยะการแบ่งแบบไมโอซิส 33

3.3.4.2 การศึกษาความยาวนานในการหยุดวงชีพจักรเซลล์ 34

3.3.4.3 การศึกษาชนิดสีและระยะเวลาในการย้อมสีโครโมโซม 34

3.3.4.4 การศึกษาความผิดปกติของการแบ่งแบบไมโอซิส 35

3.4 ระยะเวลาทำการวิจัย 35

3.5 สถานที่ทำการวิจัย 35

4 ผลการทดลอง

4.1 การตรวจสอบยืนยันความเป็นผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ในปทุมมาลูกผสม 36

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.1.1 ขนาดและจำนวนเซลล์คุมปากใบ 36

4.1.2 จำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก 38

4.1.3 ขนาดละอองเรณู 38

4.2 การศึกษาการเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และ เททระพลอยด์ 39

4.2.1 ลักษณะต้น 39

4.2.2 ลักษณะช่อดอกและดอก 42

4.2.3 ลักษณะหัวพันธุ์ 46

4.3 การศึกษาเปรียบเทียบความสมบูรณ์พันธุ์ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ 48

4.3.1 การศึกษาความมีชีวิตของละอองเรณู 48

4.3.2 การงอกของละอองเรณู 50

4.3.3 การศึกษาเปอร์เซ็นต์ผสมติดของปทุมมาลูกผสม 53

4.3.4 การเจริญของผล 54

4.3.5 การงอกของเมล็ดปทุมมาลูกผสมในหลอดแก้ว 59

4.4 การศึกษาสาเหตุความเป็นหมันจากความผิดปกติของการแบ่งไมโอซิสของเซลล์ต้นกำเนิดละอองเรณู 59

4.4.1 การศึกษาระยะพัฒนาการของดอกอ่อนกับระยะการแบ่งไมโอซิสของ PMC 59

4.4.2 การศึกษาเทคนิคการย้อมสีโครโมโซมในดอกอ่อน 66

4.4.2.1 การศึกษาความยาวในการหยุดวงชีพจักรเซลล์ 66

4.4.2.2 การศึกษาชนิดสีและระยะเวลาในการย้อมสีโครโมโซม 67

4.4.3 การศึกษาความผิดปกติของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส 68

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5 อภิปรายผลการทดลอง

5.1 การตรวจสอบยืนยันความเป็นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ในปทุมมาลูกผสม 71

5.1.1 ปากใบ 71

5.1.2 จำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก 72

5.1.3 ขนาดละอองเรณู 72

5.2 การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ 72

5.2.1 ลักษณะต้น 73

5.2.2 ลักษณะช่อดอกและดอก 73

5.2.3 ขนาดของหัวพันธุ์ 74

5.3 การเปรียบเทียบความสมบูรณ์พันธุ์ของต้นปทุมมาดิพลอยด์และเททระพลอยด์ 74

5.4 การศึกษาความผิดปกติของการแบ่งไมโอซิสของเซลล์ต้นกำเนิดละอองเรณู 75

5.4.1 การศึกษาระยะพัฒนาการของดอกอ่อนกับระยะการแบ่งไมโอซิสของ PMC 75

5.4.2 การศึกษาความผิดปกติของการแบ่งไมโอซิสของ PMC 76

6 สรุป **78**

เอกสารอ้างอิง **80**

ภาคผนวก

ก การคำนวณจำนวนปากใบต่อพื้นที่ 93

ข การเตรียมอาหาร และสารเคมี 95

ค การศึกษาโครโมโซมด้วยเทคนิค squash method 99

ประวัติผู้วิจัย **104**

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ค่าเฉลี่ยความยาวเซลล์คุมปากใบและจำนวนปากใบต่อพื้นที่ของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ อายุ 2 ปี	36
2	ค่าเฉลี่ยความยาวเซลล์คุมปากใบและจำนวนปากใบต่อพื้นที่ของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ อายุ 3 ปี	37
3	ขนาดละอองเรณูของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ อายุ 2 และ 3 ปี	38
4	การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์	40
5	การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์	40
6	การเปรียบเทียบอัตราการสังเคราะห์แสง และขนาดพื้นที่ใบทั้งหมดของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์	41
7	การเปรียบเทียบลักษณะช่อดอกของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์	43
8	การเปรียบเทียบลักษณะดอกของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์	43
9	การเปรียบเทียบลักษณะดอกของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์	44
10	การเปรียบเทียบลักษณะดอกของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์	44
11	ลักษณะหัวพันธุ์ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์จากต้นอายุ 2 ปี	47
12	ลักษณะหัวพันธุ์ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์จากต้นอายุ 3 ปี	47

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	เปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสรปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ในอาหารสูตร Taylor's ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0, 10, 20, 30 และ 40 % นานเป็นระยะเวลา 1, 3 และ 5 ชั่วโมง	50
15	ความยาวของหลอดละอองเรณูปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ในอาหารสูตร Taylor's ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0, 10, 20, 30,และ 40 % นานเป็นระยะเวลา 1, 3 และ 5 ชั่วโมง	51
16	การติดฝักของปทุมมาลูกผสมในคู่ผสมต่าง ๆ	54
17	การเปรียบเทียบลักษณะของผลปทุมมาลูกผสมที่ได้จากคู่ผสมต่าง ๆ	55
18	การเปลี่ยนแปลงขนาดของผล น้ำหนัก และจำนวนเมล็ดที่เกิดจากการผสมระหว่างต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์กับเททระพลอยด์	56
19	การเปลี่ยนแปลงขนาดของของผล น้ำหนัก และจำนวนเมล็ดที่เกิดจากการผสมระหว่างต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ผสมกับปทุมมา	57
20	การเปลี่ยนแปลงขนาดของของฝัก น้ำหนักและจำนวนเมล็ดที่เกิดจากการผสมระหว่างต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ผสมกับปทุมมา	60
21	เปอร์เซ็นต์ความถี่ของเซลล์ในระยะต่าง ๆ ของการแบ่งไมโอซิสของ PMC ที่มาจากดอกระยะต่าง ๆ ในต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์	63
22	เปอร์เซ็นต์ความถี่ของเซลล์ในระยะต่าง ๆ ของการแบ่งไมโอซิสของ PMC ที่มาจากดอกระยะต่าง ๆ ในต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์	64
23	เปอร์เซ็นต์ความถี่ของการพบ chromosome bridge และ chromosome lagging ในระยะแอนาเฟส I ของการแบ่งไมโอซิสของ pollen mother cells จากเซลล์ดอกอ่อนของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์	69
24	เปอร์เซ็นต์ความถี่ของการพบ chromosome bridge และ chromosome lagging ในระยะแอนาเฟส I ของการแบ่งไมโอซิสของ pollen mother cells จากเซลล์ดอกอ่อนของต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์	69
ข.1	สูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962)	98

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดประกอบด้วยชั้น tunica (L1, L2) และ ชั้น corpus (L3)	4
2	การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้	19
3	ขนาดเซลล์คุมปากใบของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์	37
4	จำนวนปากใบต่อพื้นที่ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์	37
5	โครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์	38
6	ละอองเกสรเพศผู้ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ อายุ 3 ปี	39
7	ลักษณะต้นปทุมมูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ ที่มีอายุ 2 ปี และ 3 ปี	41
8	ลักษณะช่อดอกของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์	45
9	เปรียบเทียบดอกจริงของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์และส่วนประกอบของดอกของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์	45
10	ลักษณะอับเรณูของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์	46
11	ลักษณะหัวพันธุ์ปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์	48
12	ละอองเกสรเพศผู้ของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์	49
13	ละอองเกสรเพศผู้ของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ที่ผิดปกติ ย้อมไม่ติดสีอะซีโตออซีน มีผนังเซลล์หนาและมีหลายขนาดปะปนกัน	49
14	เปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเรณูในปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ในอาหารสูตร Taylor's ที่เติมน้ำตาลความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในระยะเวลาต่างๆกัน	51
15	ความยาวของหลอดละอองเกสรปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ในอาหารสูตรTaylor's ที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, และ 40 % นานเป็นระยะเวลาต่าง ๆ	52
16	การงอกของละอองเรณูปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ในอาหารสังเคราะห์สูตร Taylor's ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 10 % นานเป็นระยะเวลา 0, 1, 3 และ 5 ชั่วโมง	52
17	ละอองเรณูปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร Taylor's	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	ความสัมพันธ์ระหว่างอายุ และน้ำหนักผลของปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ที่ผสมตัวเอง	56
19	ความสัมพันธ์ระหว่างอายุ และน้ำหนักผลของปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ผสมปทุมมา	57
20	ลักษณะผล และเมล็ดอายุ 30 วัน ที่เกิดจากการผสมตัวเองของปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์	58
21	ลักษณะผล และเมล็ดอายุ 30 วัน ที่เกิดจากการผสมปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์กับปทุมมา	58
22	ขนาดดอกอ่อนและอับเรณูของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์	61
23	การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส I และไมโอซิส II ของ PMC ในเซลล์ดอกอ่อนของปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์	65
24	โครโมโซมจากเซลล์ดอกอ่อนของต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ที่ได้รับการหยุดวงชีพจักรเซลล์เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง	66
25	โครโมโซมจากเซลล์ดอกอ่อนของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ที่ย้อมด้วยสี aceto-orcein และสี lacto-propionic orcein	67
26	โครโมโซมจากเซลล์ดอกอ่อนของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ที่ย้อมด้วยสี aceto-orceinและสี lacto-propionic orcein 10, 15 และ 20 นาที	68
27	ความผิดปกติในการแบ่งไมโอซิสในระยะแอนาเฟส Iของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์แบบ chromosome bridge และ chromosome lagging	70
28	ความผิดปกติในการแบ่งไมโอซิสในระยะแอนาเฟส I ของปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์แบบ chromosome bridge และ chromosome lagging	70

คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ

สัญลักษณ์และอักษรย่อ	คำอธิบาย
ก.	กรัม
ชม.	ชั่วโมง
ซม.	เซนติเมตร
ซม.^{2}	ตารางเซนติเมตร
มก.	มิลลิกรัม
มก./ล.	มิลลิกรัมต่อลิตร
มม.	มิลลิเมตร
ล.	ลิตร
BAP	6-benzylamino purine
$\mu molm^{-2}s^{-1}$	ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที
MS	Murashige and Skoog
PDB	2,4-paradichlorobenzene

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญในการวิจัย

ปทุมมา (*Curcuma alismatifolia*) จัดเป็นพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) อยู่ในสกุล *Curcuma* ซึ่งเป็นสกุลเดียวกับกระเจียวและขมิ้น (สุรวิช วรรณไกรโรจน์, 2539) ปทุมมาเป็นไม้ดอกที่มีลักษณะเด่น คือ ดอกมีสีสันสวยงาม แปลกตา มีอายุการใช้งานนาน จึงได้รับความนิยมและเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ (กรมวิชาการเกษตร, 2544) การพัฒนาพันธุ์ปทุมมาเพื่อให้มีความหลากหลาย และตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภคจึงมีความจำเป็น การปรับปรุงพันธุ์สามารถทำได้โดยการผสมข้ามสายพันธุ์ หรือผสมข้ามชนิดในกลุ่ม *Curcuma* แต่ลูกผสมที่ได้มักเป็นหมัน ทำให้ไม่สามารถนำไปปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้ ดังตัวอย่างเช่น ลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างปทุมมากับบัวโกเมน (*Curcuma alismatifolia* x *C. rhabdota*) (วิภาดา ทองทักษิณ, 2543) ปทุมมากับบัวโกเมนนี้มีจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างกัน อาจทำให้โครโมโซมไม่สามารถจับคู่กันได้ในระหว่างการแบ่งแบบไมโอซิสของเซลล์สืบพันธุ์ จึงอาจส่งผลให้ลูกผสมเป็นหมัน วิธีการแก้ไขปัญหานี้ทำได้โดยการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมแก่ลูกผสมให้เป็น 2 เท่า ก็อาจช่วยทำให้โครโมโซมคู่เหมือนสามารถเข้าคู่กันได้ และช่วยฟื้นฟูความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ของลูกผสมให้สูงขึ้นได้หากความเป็นหมันนี้มิได้เกิดจากความผิดปกติของลักษณะทางพันธุกรรมอื่นๆ

พรพิมล สุริยจันทราทอง และอรัญญา พิมพ์มงคล (2548) ได้ทำการศึกษาการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมปทุมมาลูกผสมที่เกิดจากปทุมมากับบัวโกเมน (*Curcuma alismatifolia* x *C. rhabdota*) โดยสารโคลชิซินในสภาพหลอดแก้วทำให้ได้ต้นเททระพลอยด์ (tetraploid) ดังนั้นผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาเพื่อทดสอบสมมติฐานของการวิจัยว่าต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์จะมีความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ที่เพิ่มขึ้นจากต้นดิพลอยด์ และสามารถผสมติดเมล็ดได้ ดังตัวอย่างในขมิ้นชัน ลิลี่ ขิง และ *Alstroemeria* (Lu and Bridgen, 1997; วัชรินทร์ รัตนพันธ์ และอรดี สหวัชรินทร์, 2543; Adaniya and Shirai, 2001; Rhee et al., 2005) ที่ประสบความสำเร็จมาแล้วในการฟื้นฟูความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสม โดยการชักนำให้ลูกผสมเป็นเททระพลอยด์

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการชักนำให้พืชเป็นเททระพลอยด์นั้นส่งผลให้ต้นพืชมีลักษณะบางประการที่ดีเด่นกว่าเดิม เช่น การชักนำกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมดิพลอยด์ให้เป็นเททระพลอยด์

จะทำให้ดอกมีขนาดใหญ่ขึ้น กลีบดอกหนาขึ้น ก้านดอกตั้งตรงและมีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ และ มีอายุการบานของดอกนานขึ้น (สาริณี ไชยเจริญ, 2538) ส่วนการชักนำให้เกิดออโตเททระพลอยด์ในพืชสมุนไพร ช่วยทำให้ต้นและเหง้ามีขนาดใหญ่ขึ้น จึงทำให้ผลผลิตมีปริมาณสารสำคัญมากขึ้นกว่าเดิม ดังในขิง (Smith et al., 2004) และใน *Salvia miltiorrihiza* Bge. (Gao et al., 1996)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยา ร่วมกับการศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ระหว่างต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์กับต้นเททระพลอยด์ เพื่อช่วยให้สามารถคัดเลือกเป็นปทุมมาพันธุ์ใหม่ และนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อสร้างลูกผสมสามทางได้

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์

1.2.2 เพื่อศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์

1.3 สมมติฐานการวิจัย

1.3.1 ต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์จะมีความสมบูรณ์พันธุ์เพิ่มขึ้นกว่าต้นดิพลอยด์

1.3.2 ต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์จะมีลักษณะพันธุกรรมบางประการดีกว่าต้นดิพลอยด์

1.4 ขอบเขตการวิจัย

ทำการศึกษาในปทุมมาลูกผสม(*Curcuma alismatifolia* x *C. rhabdota*) ดิพลอยด์ และเททระพลอยด์

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 สามารถอธิบายลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ที่แตกต่างจากต้นดิพลอยด์ได้

1.5.2 สามารถอธิบายสาเหตุบางประการที่ทำให้เกิดความเป็นหมันของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ได้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

2.1 การตรวจสอบความเป็นเททระพลอยด์ในพืช

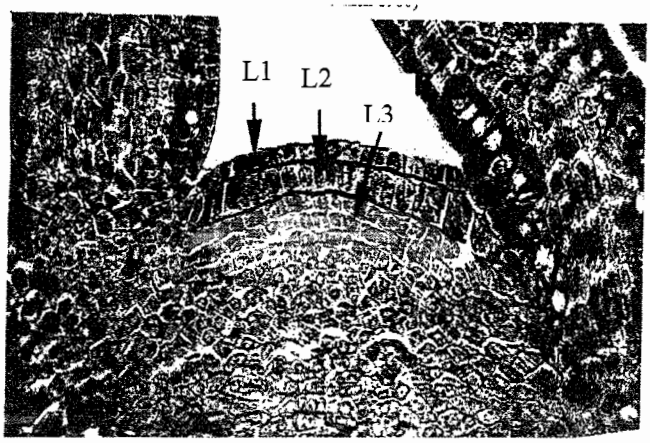
2.1.1 พืชเททระพลอยด์

พืชที่เป็นเททระพลอยด์สามารถแบ่งตามลักษณะทางพันธุกรรมได้เป็น 2 แบบ คือ อัลโลเททระพลอยด์ (allotetraploid) คือ พืชที่มีโครโมโซม 4 ชุด ซึ่งเกิดจากการผสมข้ามระหว่างพืชที่เป็นดิพลอยด์ 2 ชนิด ที่มีจีโนมแตกต่างกัน ดังนั้นลูกผสมที่ได้มักเป็นหมัน เนื่องจากโครโมโซมไม่สามารถจับคู่กันได้ในระหว่างที่มีการแบ่งไมโอซิส ทำให้การแยกตัวออกจากกันของโครโมโซมเป็นไปอย่างสุ่ม และเกิดความไม่สมดุลของโครโมโซมในเซลล์สืบพันธุ์ แต่เมื่อมีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมให้เป็น 2 เท่า ทำให้มีโอกาสที่โครโมโซมคู่เหมือนจะสามารถเข้าคู่กันได้อย่างปกติ และสามารถฟื้นฟูความสมบูรณ์พันธุ์ให้กับลูกผสมที่เป็นหมันได้ นอกจากนี้การสร้างพืชให้เป็นอัลโลเททระพลอยด์มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะรวมลักษณะที่ดีของฝ่ายพ่อแม่เข้าด้วยกัน หรือถ่ายทอดลักษณะที่ดีของพ่อแม่ให้กับลูก (ประดิษฐ์ พงษ์ทองคำ, 2543 ; Ranney, 2004) ดังนั้นลูกผสมที่เป็นอัลโลเททระพลอยด์อาจมีลักษณะบางประการที่ดีเด่นกว่าในพ่อแม่ เช่น ส่วนประกอบต่างๆของต้นพืชมีขนาดใหญ่ขึ้น สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้มากขึ้น

ออโตเททระพลอยด์ (autotetraploid) คือ พืชที่มีโครโมโซมเหมือนกันทั้งหมด 4 ชุด แต่ละชุดโครโมโซมมีลักษณะเหมือนกันทุกประการ พืชที่เป็นออโตเททระพลอยด์มักมีส่วนต่างๆที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เช่น ใบ ราก ดอก ผล และเมล็ด จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการเพิ่มขนาดให้กับไม้ดอกไม้ประดับ ทำให้ดอกมีขนาดใหญ่และเพิ่มอายุการใช้งานของดอกนานขึ้น นอกจากนี้ยังใช้ในการเพิ่มขนาดให้กับไม้ผล และพืชสมุนไพรต่างๆ ที่ไม่ได้ขยายพันธุ์โดยการใช้เมล็ด เนื่องจากต้นที่เป็นออโตเททระพลอยด์มักเป็นหมัน ผลิตละอองเกสรได้น้อย ทำให้เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดต่ำ ซึ่งเกิดจากการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมอาจทำให้มีโครโมโซมคู่เหมือนได้มากกว่า 1 คู่ ส่งผลให้การเข้าคู่กันของโครโมโซมคู่เหมือนเกิดความผิดปกติได้ (ประดิษฐ์ พงษ์ทองคำ, 2543 ; นิตย์ศรี แสงเดือน, 2551)

ต้นเททระพลอยด์เกิดจากการเพิ่มชุดโครโมโซมแก่เซลล์ร่างกายของพืชโดยเฉพาะที่บริเวณปลายยอดด้วยสารเคมีโคลชิซินหรือสารเคมีอื่น ๆ ที่มีผลยับยั้งการสร้างเส้นใย

สปินเดิลทำให้โครโมโซมไม่ถูกแยกไปยังแต่ละขั้วของเซลล์ และไม่เกิดการสร้างเซลล์เพลท (cell plate) เซลล์จึงมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าของเซลล์เดิม โดย Marcotrigiano (1990) ได้อธิบาย ว่าเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของพืชใบเลี้ยงคู่ส่วนใหญ่นั้น ประกอบไปด้วย 2 ชั้นเซลล์ คือ ชั้น tunica ประกอบด้วยเซลล์ 2 ชั้น คือ L1 และ L2 ส่วนชั้น corpus ประกอบด้วยชั้นเซลล์ L3 ซึ่งการเจริญและพัฒนาของแต่ละชั้นเซลล์ไปเป็นอวัยวะต่าง ๆ ได้แตกต่างกัน เช่น ชั้นเซลล์ L1 พัฒนาต่อไปเป็นเนื้อเยื่อผิวหรือชั้นอิพิเดอมิสของต้นพืช ส่วนชั้นเซลล์ L2 เจริญและพัฒนาไปเป็นพาเรงไคมาและส่วนประกอบของเซลล์สืบพันธุ์ และชั้นเซลล์ L3 จะพัฒนาไปเป็นส่วนของท่อลำเลียงและราก (ภาพที่ 1) จะเห็นได้ว่าบริเวณเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ประกอบด้วยเซลล์หลายชั้นที่มีการแบ่งออกได้หลายระนาบ และเซลล์ทั้งหมดมีการแบ่งตัวได้ไม่พร้อมกัน ดังนั้นเมื่อเนื้อเยื่อพืชบริเวณปลายยอดได้รับโคลชิซินก็อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติไปได้ อาจมีผลให้ต้นพืชไม่เป็นเททระพลอยด์ทั้งหมด แต่อาจทำให้เกิดลักษณะไคเมอร่า(chimera) ที่มีระดับโพลีพลอยด์ได้แตกต่างกัน จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการคัดเลือกเพื่อให้ได้ต้นเททระพลอยด์ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้



ภาพที่ 1 เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดประกอบด้วยชั้น tunica (L1, L2) และ ชั้น corpus (L3) (Mochizuki and Satoshi, 2004)

2.1.2 วิธีการตรวจสอบต้นเททระพลอยด์

วิธีการตรวจสอบต้นเททระพลอยด์ทำได้โดยการตรวจนับจำนวนโครโมโซมในเซลล์ปลายรากของต้นพืชตั้งแต่อยู่ในหลอดแก้ว และตรวจสอบยืนยันอีกครั้งภายหลังจากที่ย้ายปลูกในสภาพแปลง (Cohen and Yao, 1996) อย่างไรก็ตามการตรวจสอบจากจำนวนโครโมโซมนั้นเป็นวิธีการที่ต้องใช้เวลานาน ถ้าหากมีต้นที่ต้องการตรวจสอบจำนวนมากอาจทำให้เสียเวลา จึงได้ใช้

วิธีการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง flow cytometry (Song et al., 1997; Smith et al., 2004) ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและกระทำได้รวดเร็วกว่าการตรวจนับจำนวนโครโมโซม แต่ข้อเสียของวิธีการนี้ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง ดังนั้น ดัชนีที่ใช้ในการคัดเลือกต้นเททระพลอยด์เบื้องต้นเพื่อช่วยให้ลดระยะเวลาในการตรวจสอบต้นเททระพลอยด์ เช่น การใช้ขนาดของเซลล์คุมปากใบ หรือการนับจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมปากใบที่เพิ่มขึ้นจากเดิม ซึ่งเป็นการศึกษาความเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในชั้นเนื้อเยื่อผิว จึงเป็นวิธีการที่นิยมใช้กันทั่วไป (McCuistion and Gary, 1993; Lu and Bridgen, 1997; Song et al., 1997; Thao et al., 2003; De Oliveira et al., 2004; Nassar et al., 2004; Smith et al., 2004) นอกจากนี้การตรวจสอบจากการวัดขนาดของละอองเรณูเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถยืนยันความเป็นเททระพลอยด์เช่นเดียวกันโดยขนาดละอองเรณูจะเพิ่มขึ้นตามระดับพลอยดีที่มากขึ้น แต่วิธีการวัดขนาดละอองเรณูนี้จะสามารถกระทำได้เมื่อต้นพืชเจริญพัฒนาจนกระทั่งถึงระยะที่มีดอกบานแล้วเท่านั้น (Tan and Dunn, 1973; Maecellan and Camadro, 1996; De Oliveira et al., 2004; Ghaffari, 2006) อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบต้นเททระพลอยด์ที่แท้จริงควรยืนยันทั้งการเพิ่มขนาดเซลล์คุมปากใบ การเพิ่มขนาดละอองเรณู และการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของเซลล์ร่างกายเป็นสองเท่า จึงเป็นการยืนยันการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นทั้งหมดในเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชั้น

2.1.2.1 การตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก

การศึกษาจำนวนและรูปร่างโครโมโซมทำได้จากการศึกษาระยะต่างๆของการแบ่งเซลล์ ซึ่งระยะการแบ่งเซลล์ที่เหมาะสมต่อการศึกษารูปร่างและจำนวนของโครโมโซมมากที่สุด คือ ระยะเมตาเฟส (metaphase) ของการแบ่งแบบไมโทซิสหรือไมโอซิส เนื่องจากในระยะนี้โครโมโซมมีการหดตัวสั้นที่สุดทำให้มองเห็นรูปร่างโครโมโซมได้อย่างชัดเจน (วิสุทธิ์ ใบไม้, 2538 ; อมรา คัมภิรานนท์, 2540 ; นิตย์ศรี แสงเดือน, 2551) สำหรับวิธีการที่นิยมใช้ในการศึกษาโครโมโซมทั่วไป คือ squash method หรือ Feulgen squash method โดยทั้งสองวิธีนี้จะแตกต่างกันที่ชนิดของสีที่ใช้ในการย้อมโครโมโซมเท่านั้น ส่วนวิธีที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับศึกษาโครโมโซมนั้น ประกอบ ด้วย 1) การหยุดวงชีพจักรเซลล์ (pretreatment) เป็นวิธีการที่ทำให้โครโมโซมรวมตัวกันอยู่บริเวณกลางเซลล์ เนื่องจากสายใยสปินเดิลถูกทำลาย โครโมโซมที่ประกอบด้วยสองโครมาทิดจึงไม่ถูกดึงไปยังแต่ละขั้วของเซลล์ สารเคมีที่ใช้ได้แก่ โคลชิซินความเข้มข้น 0.001 – 1.0 % นานเป็นระยะเวลา 30 นาที – 2 ชั่วโมง (Song et al., 1997; Gao et al., 2002 ; พนิต รพิพันธุ์, 2544) หรือ สาร 8-hydroxyquinoline ในรูปของสารละลายที่มีความเข้มข้น 0.002 M นานเป็นเวลา 2 – 8 ชั่วโมง (นิตย์ศรี แสงเดือน, 2541 ; Rose et al., 2000) หรือสารละลายของ p-paradichlorobenzene หรือ PDB ที่อิ่มตัวในน้ำ นาน 2 – 6 ชั่วโมง (พิมพ์ใจ อาภาวัชรุตน์ และคณะ, 2539 ; Eksomtramage et al., 2002 ; ดวงทิพย์ วิทยศักดิ์ และคณะ, 2545 ; De Oliveira et al., 2004;

ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2551) 2) การคงสภาพของเนื้อเยื่อ (fixation) เป็นวิธีที่ทำให้เนื้อเยื่อตายอย่างรวดเร็ว จนสามารถหยุดกิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์อย่างทันทีทันใด ในขณะที่โครงสร้างและองค์ประกอบของเซลล์ยังคงมีลักษณะ เหมือนเดิมอยู่ สารเคมีที่ใช้ในการคงสภาพเซลล์ มีหลายชนิดที่สามารถเลือกใช้ให้เหมาะสมตามชนิดพืชที่ต้องการศึกษา เช่น สารละลายที่มีส่วนผสมของ glacial acetic acid 1 ส่วน กับ absolute alcohol 3 ส่วน เป็นเวลา 4 – 24 ชั่วโมง (อมรา คัมภิรานนท์, 2540 ; นิตย์ศรี แสงเดือน, 2541 ; Rose et al., 2000) หรือ Carnoy's fluid ซึ่งมีส่วนผสมของคลอโรฟอร์มนานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Song et al., 1997; Eksomtramage et al., 2002; Gao et al., 2002; De Oliveira et al., 2004) และ 3) การย้อมสี (staining) การย้อมสีโครโมโซมทำให้สามารถตรวจสอบจำนวน หรือจำแนกลักษณะโครงสร้างของโครโม โซมในพืชแต่ละชนิดได้ ตัวอย่างสีที่ใช้ย้อมโครโมโซม เช่น 1% acetocarmine (Ishikawa et al., 1999; นิตย์ศรี แสงเดือน, 2541) propionic carmine (Schinfino and Fernandes, 1987) aceto-orcein (อมรา คัมภิรานนท์, 2540 ; ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2551) lacto-propionic orcein (Barry and David, 1995; ดวงทิพย์ วิทยศักดิ์ และคณะ, 2545 ; Speranza et al., 2003) carbol fuchsin (Song et al., 1997; Gao et al., 2000) หรือ Feulgen stain (Anderson et al., 1991; Rose et al., 2000) โดยระยะเวลาที่ใช้ในการย้อมสีแต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไปตามชนิดของพืช หากตัวอย่างรากพืชมีขนาดเล็กอาจใช้เวลาย้อมสีเพียง 5 – 10 นาที แต่ถ้าตัวอย่างที่ต้องการศึกษามีรากขนาดใหญ่ และมีโครงสร้างแข็งอาจจำเป็นต้องใช้เวลาในการย้อมสีนานถึง 24 ชั่วโมง สำหรับวิธีการศึกษาโครโมโซมในตัวอย่างพืชชนิดต่าง ๆ มีดังนี้

อย่างไรก็ดีวิธีการตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากหรือเซลล์ดอกอ่อนนี้ เป็นวิธีการที่ต้องใช้เวลานานในการเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบ และเสียเวลาในการตรวจนับจำนวนโครโมโซม ถ้าหากมีต้นที่ต้องการพิสูจน์ความเป็นโพลีพลอยด์ (polyploid) จำนวนมากอาจไม่สามารถทำได้ในระยะเวลาที่กำหนด ถึงแม้ว่าวิธีการนี้เป็นวิธีการที่ช่วยยืนยันความเป็นโพลีพลอยด์ของพืชได้ ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีสำหรับใช้ในการจำแนกต้นโพลีพลอยด์ออกจากต้นปกติได้อย่างรวดเร็ว โดยการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่อยู่ในเซลล์พืชแต่ละพลอยดีด้วยเครื่อง flow cytometry หลักการทำงาน คือ ตรวจวัดขนาดของเซลล์พืชที่กำลังไหลผ่านลำแสงเป็นแถวเรียงเดี่ยว แต่ข้อจำกัดของเซลล์ที่วัดต้องอยู่ในสภาพแขวนลอย และถูกทำให้แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวๆก่อน (Kadota and Niimi, 2002) นอกจากนี้เครื่อง flow cytometry มีราคาแพง การนำมาใช้งานจึงยังจำกัดในบางหน่วยงานเท่านั้น

สาริณี ไชยเจริญ (2538) ได้ศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของกล้วยไม้หวาย (*Dendrobium superbiens*) ที่เป็นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ โดยเก็บรากกล้วยไม้

ยาวประมาณ 1 ซม แช่ในสารละลาย 1-bromonapthalene นานเป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส จากนั้นคงสภาพเซลล์ด้วย acetic acid 90% นาน 20 นาที ล้างตัวอย่างรากใน แอลกอฮอล์ 70% 3 ครั้ง แล้วนำมาย้อมด้วยสี aceto orcein และศึกษาจำนวนโครโมโซมโดยใช้ เทคนิค squash method

วิธีการศึกษาจำนวนโครโมโซมของ *Scutellaria baicalensis* ซึ่งเป็นพืช สมุนไพรในตำรายาจีนชนิดหนึ่ง โดยการเก็บตัวอย่างรากยาว 0.5 ซม หยุดวงชีพจักรเซลล์ด้วย โคลชิซิน 0.1% นาน 30 นาที และแช่ปลายรากใน Carnoy's fluid นาน 2 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างรากไว้ ในเอทานอล 70% ก่อนที่จะนำมาย่อยด้วย 1M HCl นาน 5 นาที ก่อนที่จะย้อมสีโครโมโซมด้วย สี carbol fuchsin ก่อนที่จะศึกษาจำนวนโครโมโซมโดยใช้เทคนิค squash method (Gao et al., 2002)

ดวงทิพย์ วิทยศักดิ์ และคณะ (2545) ได้ทำการศึกษาจำนวนโครโมโซมจาก เซลล์ปลายรากของว่านสี่ทิศ พบว่า ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างราก คือ 09.30 น. เป็น ช่วงเวลาที่พบเซลล์อยู่ในระยะเมตาเฟสมากที่สุด การหยุดวงชีพจักรเซลล์ด้วยสารละลาย PDB นานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และคงสภาพเซลล์ด้วยสารละลาย Carnoy's fluid นาน 10 นาที จากนั้น ย้อมโครโมโซมด้วยสี cabol fuchsin นานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะทำให้โครโมโซมติดสีได้ชัดเจน กว่าการย้อมด้วยสี lacto-propionic orcein และศึกษาจำนวนโครโมโซมโดยใช้วิธี Feulgen squash

พิมพ์ใจ อาภาวัชรุตน์ และคณะ (2539) ได้ทำการศึกษาจำนวนโครโมโซม ดิพลอยด์ (2n) จากเซลล์ปลายราก โดยเก็บตัวอย่างปลายรากยาวประมาณ 1 ซม แช่ในสารละลาย อิ่มตัวของ paradichlorobenzene นาน 4-6 ชั่วโมง ตรึงเซลล์ในสารละลาย ethanol absolute: glacial acetic acid (3:1) จากนั้นนำปลายรากไปสลายผนังเซลล์ด้วย 1 N HCl ที่ 60 C นาน 4 นาที และ นำไปแช่ในสี carbol fuchsin นาน 1 คืน เตรียมสไลด์โดยวิธี squash method แล้วตรวจนับจำนวน โครโมโซมในระยะเมตาเฟสด้วยกล้องจุลทรรศน์ และวิธีการสำหรับศึกษาจำนวนโครโมโซมจาก เซลล์ในอับละอองเรณู โดยใช้อับละอองเรณูขนาด 3-4 ซม วางบนกระจกสไลด์ ขยี้ผนังอับละออง เกสรบนสี aceto orcein แล้วนำไปนับจำนวนโครโมโซมในระยะเมตาเฟส I และเมตาเฟส II

Eksomtramage et al., (2002) ได้ศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืชวงศ์ขิง ในประเทศไทยจำนวน 22 ชนิด โดยเก็บตัวอย่างรากยาว 1-2 ซม หยุดวงชีพจักรเซลล์ด้วย PDB นาน 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส แช่ปลายรากใน Carnoy's fluid นาน 24 ชั่วโมง แล้ว ล้างและเก็บรักษาตัวอย่างรากไว้ใน เอทานอล 70% ก่อนที่จะนำมาศึกษาจำนวนโครโมโซม โดย ใช้วิธี Feulgen squash method

วิธีการศึกษาจำนวนโครโมโซมของ *Scutellaria baicalensis* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรในตำรายาจีนชนิดหนึ่ง โดยการเก็บตัวอย่างรากยาว 0.5 ซม หยุดวงชีพจักรเซลล์ด้วยโคลชิซิน 0.1% นาน 30 นาที และแช่ปลายรากใน Carnoy's fluid นาน 2 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างรากไว้ในเอทานอล 70% ก่อนที่จะนำมาย่อยด้วย 1M HCl นาน 5 นาที ก่อนที่จะย้อมสีโครโมโซมด้วยสี carbol fuchsin พบว่าต้นที่เป็นดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 2n=2x=18 แท่ง และเททระพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเท่า 2n=4x=36 แท่ง (Gao et al., 2002)

2.1.2.2 การวัดขนาดเซลล์คุมปากใบ

การศึกษาขนาดความยาวเซลล์คุมปากใบจะกระทำได้เมื่อต้นพืชมีการเจริญเติบโตมีใบที่แผ่ขยายเต็มที่แล้วจึงเก็บตัวอย่างใบมาวัดขนาดปากใบและจำนวนต่อพื้นที่อย่างน้อยที่สุด 20 เซลล์ต่อต้น โดยลอกเนื้อเยื่อผิวด้านล่างใบจากต้นพืชที่ต้องการทดสอบ นำชิ้นส่วนมาวางบนสไลด์ที่มีน้ำสะอาด 1 หยด แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ศึกษาขนาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วัดขนาดความยาวเซลล์คุมปากใบโดยไมโครมิเตอร์ ทำการสุ่มตัวอย่างต้นละ 2 ใบ แต่ละใบทำการวัด 5 ตำแหน่ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยโดยสุ่มวัดขนาดความยาวจากเซลล์ปากใบที่ปิดเท่านั้น (นิตย์ศรี แสงเดือน, 2541 ; Krishnaswami and Andal, 1978; McCuistion and Gary, 1993; Wan et al., 2006) วิธีการดังกล่าวอาจทำให้เนื้อเยื่อใบของพืชเกิดความเสียหาย และมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตได้ ซึ่งอาจใช้วิธีการตรวจวัดขนาดเซลล์คุมปากใบโดยใช้แผ่นฟิล์มบางๆ หรือกระดาษกาวชนิดใสกดทับบริเวณด้านล่างใบแล้วลอกแผ่นฟิล์มออก จะทำให้ปรากฏร่องรอยของปากใบติดอยู่ที่แผ่นฟิล์ม แล้วจึงนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งทำการสุ่มวัดปากใบทั้งหมด 10 ตำแหน่งๆ ละ 10 เซลล์ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย และนับจำนวนเซลล์คุมปากใบต่อพื้นที่ (De Oliveira et al., 2004) ข้อจำกัดของวิธีการนี้ คือ การวัดขนาดเซลล์คุมปากใบจากแผ่นฟิล์มอาจเกิดความผิดพลาดได้ง่าย เพราะรูปร่างของปากใบอาจเปลี่ยนแปลงจากเดิมทำให้เกิดความแปรปรวนของข้อมูลสูงกว่าวิธีการแรก อย่างไรก็ตามการวัดขนาดความยาวเซลล์คุมปากใบสามารถใช้เป็นดัชนีเบื้องต้นสำหรับตรวจสอบต้นเททระพลอยด์ได้ เนื่องจากขนาดความยาวของเซลล์คุมปากใบของต้นพืชที่มีระดับพลอยดีเดียวกันจะมีค่าใกล้เคียงกัน

Tan and Dunn (1973) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความยาวเซลล์คุมปากใบ และจำนวนเซลล์คุมปากใบ เพื่อจำแนกต้น *Bromus inermis* Leyss ที่เป็นเททระพลอยด์ เฮกซะพลอยด์ และออกทะพลอยด์ ผลการศึกษาพบว่า ขนาดความยาวของเซลล์คุมปากใบจะมีความสัมพันธ์กับระดับพลอยดี และจำนวนเซลล์คุมปากใบจะแปรผกผันกัน โดยต้นออกทะพลอยด์จะมีขนาดความยาวเซลล์คุมปากใบมากที่สุดถึง 66 ไมครอน รองลงมาคือ เฮกซะพลอยด์

53 ไมครอน และเททระพลอยด์ 42 ไมครอน ตามลำดับ ในขณะเดียวกันพบว่าจำนวนเซลล์คุมปากใบต่อพื้นที่ของต้นเททระพลอยด์จะมากกว่าต้นเฮกซะพลอยด์ และออกทะพลอยด์

McCuistion and Gary (1993) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมปากใบของแตงโม (*Citrullus lanatus*) ที่มีระดับพลอยดีต่างๆกัน พบว่า ต้นแตงโมที่มีระดับพลอยดีเพิ่มขึ้นจะมีขนาดเซลล์คุมปากใบใหญ่ขึ้น ทำให้ปริมาณคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมเพิ่มมากขึ้นด้วย โดยแตงโมต้นดิพลอยด์ ทริพลอยด์ และเททระพลอยด์ มีจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบเฉลี่ยเป็น 11, 14 และ 20 เซลล์ ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาเปรียบเทียบจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมปากใบของ *Musa* spp. ที่เป็นดิพลอยด์ ทริพลอยด์ และเททระพลอยด์ พบว่า ต้นที่เป็นเททระพลอยด์จะมีจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมมากกว่าพลอยดีอื่น ทั้งนี้เนื่องมาจากว่าต้นเททระพลอยด์มีขนาดเซลล์คุมปากใบที่มีขนาดใหญ่กว่าเดิม (Oselebe et al., 2006)

Beck et al. (2003) และ Beck et al. (2005) ทำการคัดเลือกต้น *Acacia mearnsii* ที่มีระดับพลอยดีต่างกัน โดยใช้ขนาดความยาวเซลล์คุมปากใบและนับจำนวนเซลล์คุมปากใบ พบว่าต้นที่เป็นเททระพลอยด์ (2n=4x=52) มีขนาดความยาวเซลล์คุมปากใบเฉลี่ย 40.24 ไมครอน ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์คุมปากใบของต้นดิพลอยด์ (2n=2x=26) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเป็น 27.17 ไมครอน แต่จำนวนเซลล์คุมปากใบต่อพื้นที่ของต้นเททระพลอยด์มีเพียง 10.26 เซลล์ ซึ่งมีจำนวนน้อยกว่าต้นดิพลอยด์ (22.11) ที่มีค่ามากกว่าต้นเททระพลอยด์เกือบสองเท่า

2.1.2.3 การวัดขนาดละอองเกสรเรณู

การนำละอองเกสรเรณูจากดอกบานของต้นดิพลอยด์และโพลีพลอยด์มาย้อมด้วยสี acetocarmine แล้วนำไปวัดขนาดด้วยไมโครมิเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อเปรียบเทียบขนาดละอองเกสรเรณู อย่างน้อย 3 ดอกต่อต้น หรือวัดอย่างน้อย 100 เซลล์ โดยขนาดละอองเกสรเรณูของต้นที่เป็นโพลีพลอยด์จะมีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์มากกว่าต้นที่เป็นดิพลอยด์หรือแฮพลอยด์ ขนาดละอองเกสรเรณูที่เปลี่ยนแปลงไปนี้จะช่วยยืนยันความเป็นโพลีพลอยด์ให้กับลูกผสมได้ เนื่องจากว่าละอองเกสรเรณูพัฒนามาจากชั้นเซลล์ L2 ของเนื้อเยื่อเจริญบริเวณเซลล์ปลายยอด แต่การพัฒนาของเนื้อเยื่อชั้น L2 เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์นี้จะพบได้ในระยะที่ต้นพืชมีการเจริญเติบโตในระยะหลังสุด ดังนั้นการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อชั้นนี้จึงทำได้ช้ากว่าการตรวจสอบจากเนื้อเยื่อชั้นอื่นๆ

การวัดขนาดละอองเกสรเรณูของลูกผสมระหว่าง *Saccharum spontaneum* x *Erianthus arundinaceus* ที่ย้อมติดสี 1% acetocarmine โดยใช้ไมโครมิเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

พบว่า ละอองเกสรเรณูของลูกผสมที่เป็นโพลีพลอยด์มีขนาดตั้งแต่ 29 – 50 ไมครอน (Lalitha and Premachandran, 2007)

การใช้ขนาดของละอองเรณูตรวจสอบความเป็นโพลีพลอยด์จากละอองเรณูในต้น *Mimulus guttatus* พบว่าละอองเรณูที่มีชีวิตจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 40 ไมครอน ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าละอองเรณูที่ไม่มีชีวิตถึง 13 ไมครอน โดยละอองเรณูที่ไม่มีชีวิตมีขนาดเพียง 27 ไมครอน ดังนั้นจึงอาจใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของละอองเรณูตรวจสอบระดับโพลีลอยด์ของพืชได้ (Kelley et al., 2002)

Ghaffari (2006) จำแนกระดับพลอยดีของ *Sorghum bicolor* ที่ถูกชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์โดยโคลชิซิน โดยวิธีการนับจำนวนโครโมโซมร่วมกับการวัดขนาดละอองเรณู พบว่า ขนาดของละอองเกสรเรณูจะมีขนาดเพิ่มขึ้นตามระดับพลอยดี จึงทำให้สามารถจำแนกระดับพลอยดีของ *Sorghum bicolor* ได้เป็น 5 กลุ่มตามขนาดของละอองเรณู คือ แฮพลอยด์ ดิพลอยด์ ทริพลอยด์ เททระพลอยด์ และเพนทะพลอยด์ มีค่าเป็น 32.66, 40.11, 42.66, 46.63 และ 50.12 ไมครอน ตามลำดับ

2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นพืชเททระพลอยด์

2.2.1 ระดับพลอยดีกับการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยา

โดยทั่วไปพืชที่มีโครโมโซมเป็นโพลีพลอยด์จะมีส่วนประกอบต่าง ๆ ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เช่น ราก ลำต้น กิ่ง ใบ ดอก และผล เนื่องจากว่าเซลล์จะมีขนาดใหญ่กว่าเดิม ดังนั้นเมื่อสังเกตใบของต้นที่เป็นเททระพลอยด์จะพบว่าใบมีความหนามากขึ้น และสีของใบเขียวเข้มขึ้นกว่าดิพลอยด์ เซลล์คุมปากใบมีขนาดใหญ่ขึ้น แต่มีจำนวนเซลล์คุมปากใบต่อพื้นที่ลดลง และละอองเกสรเพศผู้มีขนาดใหญ่ขึ้น (Tan and Dunn, 1973; Krishnaswami and Andal, 1978; Ramachandran, 1982; McCuistion and Gary, 1993; สาริณี ไชยเจริญ, 2538 ; Song et al., 1997; Mishra, 1997; นิตย์ศรี แสงเดือน, 2541 ; Kadota and Niimi, 2002; De Oliveira et al., 2004; Smith et al., 2004; Beck *et* al., 2005; Wongpiyasatid et al., 2005; Wan et al., 2006) อย่างไรก็ตามพืชที่เป็นโพลีพลอยด์ส่วนใหญ่มักมีอัตราการเจริญเติบโตช้า เนื่องจากมีอัตราการแบ่งเซลล์ช้ากว่าปกติ เช่น พืชที่เป็นออโตเททระพลอยด์จะมีอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าดิพลอยด์ ส่งผลให้ต้นเททระพลอยด์ออกดอกได้ช้ากว่า แต่ดอกมีขนาดใหญ่ขึ้น หรือทำให้เกิดการร่วงของดอกช้ากว่าดิพลอยด์ ดังที่มีรายงานใน กล้วยไม้สกุลหวาย (สาริณี ไชยเจริญ, 2538) เยอบีรา (ดิเรก ตนพะยอม และคณะ, 2538) เจอราเนียม (Cramer, 1991 อ้างโดย Cramer, 1999) *Spathoglottis* (Zong et al., 2007) และ *Scoparia montevidiensis* (Escandon et al., 2005) ดังนั้น การชักนำต้นพืชให้เกิดเป็นโพลี

พลอยด์อาจส่งผลทำให้ลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นพืชเปลี่ยนแปลงไป ทั้งความสูงของต้น ขนาดใบ ขนาดดอก และความสมบูรณ์พันธุ์ ซึ่งจะกล่าวถึงต่อไป

การเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาของขิงที่ถูกชักนำให้เป็นเททระพลอยด์โดยโคลชิซิน พบว่า ขนาดเซลล์คุมปากใบและขนาดละอองเรณูของต้นเททระพลอยด์มีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ ใบมีสีเขียวเข้ม ความกว้างและความหนาของใบมากขึ้น ส่งผลให้ต้นเททระพลอยด์มีพื้นที่เพิ่มขึ้น ส่วนของเหง้ามีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ นอกจากนี้ส่วนประกอบต่าง ๆ ของดอกยังมีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ ซึ่งเป็นผลมาจากการที่เซลล์ของต้นเททระพลอยด์มีขนาดใหญ่ขึ้น ส่งผลให้ส่วนประกอบต่างๆของต้นมีการขยายขนาดใหญ่มากขึ้น (Ramachandran, 1982; Smith et al., 2004)

ลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium superbiens*) ซึ่งเกิดจากการผสมข้ามชนิดระหว่าง *D. phalaenopsis* และ *D. undulatum* ที่เป็นดิพลอยด์และถูกชักนำให้เป็นอัลโลเททระพลอยด์โดยใช้โคลชิซิน พบว่า ต้นดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 38 แท่ง ส่วนต้นที่เป็นอัลโลเททระพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 76 แท่ง ซึ่งต้นกล้วยไม้หวายที่เป็นอัลโลเททระพลอยด์จะมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างไปจากต้นดิพลอยด์ คือ มีขนาดของดอก และก้านช่อดอกที่ใหญ่กว่า รวมทั้งมีส่วนของกลีบดอกและความหนาของกลีบมากกว่าดิพลอยด์ ลักษณะดังกล่าวนี้ส่งผลให้ดอกของต้นอัลโลเททระพลอยด์มีระยะเวลาการบานของดอกได้นานกว่าต้นดิพลอยด์ถึง 8 วัน (สาริณี ไชยเจริญ, 2538) เช่นเดียวกันกับที่พบในกล้วยไม้สกุล *Spathoglottis* ที่เป็นเททระพลอยด์ (55.3 มม.) จะมีขนาดดอกใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ (49 มม.) ถึง 12.9 % และส่วนประกอบต่างๆของดอกทั้งกลีบเลี้ยง กลีบดอก กลีบปาก และก้านช่อดอกมีขนาดเพิ่มขึ้น ส่วนของใบและกลีบดอกหนามากขึ้น มีขนาดเซลล์คุมปากใบใหญ่ขึ้น แต่จำนวนปากใบต่อหน่วยพื้นที่ลดลง นอกจากนี้ ต้นเททระพลอยด์ยังมีการสะสมน้ำหนักแห้งได้มากกว่าต้นดิพลอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Zong et al., 2007)

ลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นเยอบีร่าที่เกิดจากการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมจากดิพลอยด์เป็นออโตเททระพลอยด์จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์เทอร์รานีวาลีส เทอร์รามอนซา และเทอร์ราพาเรด พบว่า ต้นเยอบีร่ามีลักษณะสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไป คือ มีขนาดความยาวของเซลล์คุมปากใบ ความหนาใบ ความกว้างและความยาวกลีบดอก ความหนากลีบดอก และเส้นผ่าศูนย์กลางของดอกมีขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนของก้านช่อดอกสั้นแต่มีขนาดใหญ่ขึ้น การแตกกอ และจำนวนดอกของต้นเททระพลอยด์น้อยกว่าต้นดิพลอยด์ (ดิเรก ตนพะยอม และคณะ, 2538) เช่น เดียวกันกับที่พบในต้นเจอราเนียม (*Pelargonium x ortorum* Bailey) ที่ถูกชักนำให้เป็นเททระพลอยด์ จะมีขนาดดอกที่ใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ (Cramer, 1991 อ้างโดย Cramer, 1999)

การเพิ่มจำนวนโครโมโซมให้กับพืชสกุล *Zantedeschia* จำนวน 9 สายพันธุ์ พบว่า ต้นที่เป็นโพลีพลอยด์จะมีขนาดความยาวเซลล์คุมปากใบที่ใหญ่กว่าดิพลอยด์ (Cohen and Yao, 1996) เช่นเดียวกันกับลักษณะสัณฐานวิทยาของต้น *Stevia rebaudiana* ที่ถูกชักนำให้เป็นโพลีพลอยด์จะมีความกว้างและความยาวใบ ขนาดความกว้างและความยาวของเซลล์คุมปากใบ และขนาดละอองเกสรเพศผู้ใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ แต่ต้นโพลีพลอยด์จะมีจำนวนเซลล์คุมปากใบต่อพื้นที่น้อยกว่าต้นดิพลอยด์ (De Oliveira et al., 2004)

การเพิ่มจำนวนโครโมโซมให้กับลูกผสม *Alstroemeria* ที่เป็นดิพลอยด์ (2n=2x=16) ให้เป็นเททระพลอยด์ (2n=4x=32) โดยโคลชิซินส่งผลให้ลักษณะสัณฐานวิทยาในระยะออกดอกเปลี่ยนแปลงไป คือ ต้นเททระพลอยด์มีจำนวนปากใบต่อพื้นที่ลดลง แต่มีขนาดความยาวของเซลล์คุมปากใบใหญ่ขึ้น นอกจากนี้ต้นเททระพลอยด์ยังมีความสูงของต้น ขนาดของใบ และน้ำหนักแห้งใบต่อพื้นที่มากกว่าต้นดิพลอยด์ (Lu and Bridgen, 1997)

การชักนำให้ต้น *Salvia miltiorrihiza* Bge. ที่เป็นดิพลอยด์ให้เป็นเททระพลอยด์ส่งผลทำให้มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม คือ ต้นที่เป็นดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 2n=2x=18 แท่ง และเททระพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเท่า 2n=4x=36 แท่ง โดยจำนวนโครโมโซมที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมนี้ส่งผลให้ต้นเททระพลอยด์มีลักษณะที่แตกต่างไปจากต้นดิพลอยด์ เช่น มีขนาดความยาวของเซลล์คุมปากใบ ความหนาของใบ ความสงของต้น จำนวนรากต่อต้น และความยาวรากมากกว่าต้นดิพลอยด์ ทำให้ต้นเททระพลอยด์มีน้ำหนักสดของรากมากกว่าต้นดิพลอยด์ประมาณ 3 เท่า เมื่อทำการตรวจวัดปริมาณสาระสำคัญจากรากของต้นที่เป็นเททระพลอยด์พบว่ามีเปอร์เซ็นต์สารสำคัญที่สูงกว่าต้นดิพลอยด์ (Gao et al., 1996)

การเปรียบเทียบลักษณะของแตงโมพันธุ์ Sugar Baby และ พันธุ์ Halep Karasai ที่เป็นแฮพลอยด์และดิพลอยด์ โดยใช้ flow cytometer ขนาดเซลล์คุมปากใบ จำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม และลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่า ต้นแตงโมที่เป็นดิพลอยด์จะปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียสเพิ่มขึ้นจากต้นแฮพลอยด์ ขนาดความกว้างและความเซลล์คุมปากใบใหญ่ขึ้น และมีจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมปากใบมากกว่าแตงโมที่เป็นแฮพลอยด์ (Sari et al., 1999)

นอกจากนี้ พิมพ์ใจ อาภาวัชรุตน์ และคณะ (2539) ได้ทำการศึกษาจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (2n) จากเซลล์ปลายรากและเซลล์ดอกอ่อนของปทุมมาพันธุ์คัดเลือก (*C. alismatifolia* Gagnep.) พบว่า จำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากและเซลล์ในอับละอองเรณูของปทุมมาพันธุ์คัดเลือกเท่ากับ 2n = 32 และ n = 16 ตามลำดับ ส่วนบัวโกเมน (*Curcuma* sp.) มีจำนวนโครโมโซมปลายรากและเซลล์ดอกอ่อนเท่ากับ 2n = 24 และ n = 12 ตามลำดับ เช่นเดียวกับ

การรายงานจำนวนโครโมโซมของ *Curcuma rhabdota* Sirirugsa & M.F. Newman ว่ามีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 2n=2x=24 แท่ง (Eksomtramage et al., 2002)

สุรวิช วรรณไกรโรจน์ (2539) ได้รวบรวมพรรณไม้สกุล *Curcuma* และนับจำนวนโครโมโซมของ *C. alismatifolia* พบว่า มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 2n=32 แท่ง

Saensouk et al. (1998) ศึกษาจำนวนโครโมโซมของพรรณไม้วงศ์ขิงในอุทยานแห่งชาติภูพานจำนวน 11 ชนิด และรายงานจำนวนโครโมโซมของ *C. alismatifolia* ว่ามีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 2n=32 แท่ง

2.2.2 ความสมบูรณ์พันธุ์ของพืชที่เป็นเททระพลอยด์

การปรับปรุงพันธุกรรมพืชจำเป็นต้องอาศัยละอองเรณูที่เจริญเต็มที่ และมีชีวิตเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการผสมเกสร วิธีการเก็บจากต้นแม่พันธุ์เพื่อนำไปผสมควรเก็บก่อนที่อับละอองเรณูจะแตก ก่อนการผสมเกสรจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทดสอบคุณภาพของละอองเรณูที่จะใช้ในการผสม เพื่อให้มั่นใจว่าละอองเรณูนั้นมีคุณภาพดี วิธีการทดสอบความมีชีวิตของละอองเรณูสามารถทำได้อย่างน้อย 3 วิธี คือ การย้อมติดสี (สาริณี ไชยเจริญ, 2538 ; Ishikawa et al., 1999; Shivanna, 2003; Cardoso et al., 2004; De Oliveira et al., 2004) การงอกหลอดละอองเรณูในอาหารสังเคราะห์หรืองอกบนยอดเกสรเพศเมีย (สาริณี ไชยเจริญ, 2538 ; Cavalcante et al., 2000; Adaniya, 2001; Shivanna, 2003;) และการผสมติดเมล็ด (สาริณี ไชยเจริญ, 2538) ซึ่งรายละเอียดจะกล่าวถึงในหัวข้อถัดไป

2.2.2.1 การย้อมติดสีของละอองเรณู

การย้อมสีละอองเรณูเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการประเมินความสมบูรณ์พันธุ์ของต้นโพลีพลอยด์ และตรวจสอบความสมบูรณ์แข็งแรง และความสม่ำเสมอของขนาดละอองเรณูก่อนที่จะนำไปใช้ในการผสมเกสรและปรับปรุงพันธุ์ การทดสอบด้วยวิธีนี้จะใช้ละอองเรณูที่แก่ โดยทำการเก็บละอองเรณูเขี่ยลงบนสไลด์ แล้วย้อมด้วยสี acetocarmine หรือ aceto-orcein จึงนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการวัดขนาดละอองเรณูที่ติดสีย้อมสม่ำเสมอด้วยไมโครมิเตอร์ และบันทึกจำนวนละอองเรณูที่ไม่ติดสีย้อม ผนังเซลล์หนา และมีรูปร่างผิดปกติอย่างน้อย 100 – 1,000 เซลล์ต่อดอก (สาริณี ไชยเจริญ, 2538 ; Ishikawa et al., 1999; หยกทิพย์ สุดารีย์ และเฉลิมศรี นนทสวัสดิ์, 2549 ; Lalitha and Premachandran, 2007; Ryan et al., 2007)

การตรวจสอบความมีชีวิตของละอองเรณูของพืชสกุล *Curcuma* จำนวน 16 ชนิด ด้วยการย้อมสี acetocarmine 1% พบว่า อัตราการย้อมติดสีของละอองเรณูสดอยู่ในช่วง 32.50 – 75.00 % และเมื่อทำการเก็บรักษาละอองเรณูไว้ที่อุณหภูมิ 9 – 12 องศาเซลเซียส

เป็นเวลานาน 90 วัน ละอองเรณูมีอัตราการย้อมติดสีลดลงเหลือเพียง 9 – 72 % เท่านั้น (สุรวิช วรรณไกรโรจน์, 2535)

การย้อมสีละอองเรณูเพื่อทดสอบความมีชีวิตโดยใช้สี acetocarmine ในพืชสกุลขมิ้นจำนวน 8 สายพันธุ์ พบว่า ปทุมมากลีบแหลม มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของละอองเรณูสูงที่สุด คือ 97.76 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ ว่านนางคำ ขาวสโนว์ เชียงใหม่เรด บัวชั้น ว่านงูเห่า และว่านมหาจักรพรรดิ มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต เท่ากับ 97.61, 91.14, 79.43, 49.81, 42.33 และ 42.18 ส่วนช่อมรกตเป็นสายพันธุ์ที่ละอองเรณูมีชีวิตต่ำที่สุดคือ 16.51 เปอร์เซ็นต์ (หยกทิพย์ สุดารีย์ และเฉลิมศรี นนทสวัสดิ์, 2549)

การตรวจสอบความมีชีวิตของละอองเรณูของ *Rhododendron* โดยการย้อมสีละอองเรณูโดยใช้สีย้อม 1% acetocarmine พบว่า ละอองเรณูของต้นที่เป็นดิพลอยด์ย้อมติดสีเพียงร้อยละ 4 ในขณะที่ละอองเรณูของต้นเททระพลอยด์ย้อมติดสีเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 68 (Ryan et al., 2007)

การทดสอบความมีชีวิตของละอองเรณูของข้าว 3 สายพันธุ์ คือ *Oryza rufipogon, O. sativa* และ พันธุ์ลูกผสม โดยวิธีการย้อมละอองเรณูด้วยสี โพแทสเซียมไอโอไดด์ 1% (I_2-KI) พบว่า ข้าวพันธุ์ *O. rufipogon* มีเปอร์เซ็นต์การย้อมติดสีสูงที่สุดคิดเป็นร้อยละ 98 รองลงมา *O. sativa* และ พันธุ์ลูกผสม มีเปอร์เซ็นต์การย้อมติดสีคิดเป็นร้อยละ 94 และ 66 ตามลำดับ (Song, 2001)

2.2.2.2 การงอกของละอองเรณู

การทดสอบคุณภาพของละอองเรณูที่จะใช้ในการผสมเกสรเพื่อให้มั่นใจว่าละอองเกสรนั้นมีคุณภาพดี สามารถทำได้โดยการเพาะเลี้ยงละอองเรณูในสารละลาย ซึ่งนิยมใช้น้ำกลั่นและน้ำตาลซึ่งมีผลต่อการงอกของละอองเรณูเนื่องจากที่บริเวณผนังของละอองเรณูประกอบด้วยสารเซลลูโลส และเพคติน จึงทำให้เกิดการดูดโมเลกุลน้ำตาลที่อยู่บริเวณรอบ ๆ ผิวของละอองเรณูเข้าไป จากนั้นละอองเรณูจะสร้างเอนไซม์ออกมาใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ โดยมีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญ และทำให้เกิด sucrose metabolizing activity จนละอองเรณูเกิดอาการบวมและงอกหลอดเรณู (pollen tube) ออกมา ซึ่งหลอดเรณูที่งอกออกมานี้จะมีความไวต่อแรงดันออสโมติกของน้ำตาลที่อยู่ภายนอกเซลล์ (Steffen, 1963) นอกจากนี้ยังมีกรดบอริคที่เป็นสารสำคัญต่อการงอกของหลอดละอองเรณู เนื่องจากโบรอนเป็นธาตุที่มีส่วนช่วยในการสร้างสารเพคติน ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของผนังเซลล์ (Stanley and Loewus, 1963) ดังนั้นการศึกษาเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกหลอละอองเรณูของพืชชนิดต่าง ๆ จึงมีความจำเป็นเนื่องจากช่วยทำให้ทราบความสมบูรณ์ของละอองเรณูก่อนที่จะนำไปใช้ในการผสมเกสรต่อไป โดยสูตร

ข้อมูลท้องถิ่น

อาหารที่ใช้เลี้ยงละอองเรณูของพืชแต่ละชนิด มีความต้องการสารอาหารที่จำเป็นในการงอกที่แตกต่างกันไป

การศึกษาการงอกของละอองเรณูของพืชสกุล *Curcuma* จำนวน 16 ชนิด ในอาหารสังเคราะห์สูตร Brewbake and Kwack (1963) ที่เติมน้ำตาลทรายความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 % พบว่า ละอองเรณูสดของพืชสกุล Curcuma จำนวน 7 ชนิด สามารถงอกได้ดีที่สุดบนอาหารสังเคราะห์ที่เติมน้ำตาลทรายความเข้มข้น 5 % (สุรวิช วรรณไกรโรจน์, 2535) เช่นเดียวกันกับที่มีการศึกษาการงอกของละอองเรณูในปทุมมากลีบแหลม, เชียงใหม่เรด, ขาวสโนว์, ช่อมรกต, ว่านงูเห่า, บัวชั้น, ว่านนางคำ และมหาจักรพรรดิ บนอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย $(CaNO_2)_3$, $MgSO_4$ และ H_3BO_3 ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างกัน 4 ระดับ คือ 10, 20, 30 และ 40% นานเป็นระยะเวลา 1, 3 และ 5 ชั่วโมง เพื่อดูความสามารถในการงอก และความยาวของหลอดเรณู ผลการศึกษาพบว่า ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการงอกของละอองเรณูคือ 10 % นานเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง ยกเว้น พันธุ์ช่อมรกตที่ไม่สามารถงอกหลอดละอองเรณูได้เลยในทุกความเข้มข้นของซูโครส (หยกทิพย์ สุดารีย์ และเฉลิมศรี นนทสวัสดิ์, 2549)

การศึกษาการงอกของละอองเรณูกล้วยไม้หวายซาบิน โดยใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครส กรดบอริค และแคลเซียมไนเตรต เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมแก่การงอกของหลอดละอองเรณู พบว่า การใช้สารละลายกลูโคส 30 กรัม/ลิตร ร่วมกับการใช้กรดบอริค 50 มก./ลิตร และแคลเซียมไนเตรต 200 มก./ลิตร ทำให้ละอองเรณูของกล้วยไม้หวายซาบินมีอัตราการงอกสูงที่สุด (สุทธิชาติ อารีวิลาศ, 2537)

การศึกษาการงอกของละอองเรณูข้าวโพดในอาหารสังเคราะห์ที่มีกรดบอริค 10% ซึ่งเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 90, 100 และ 110% นานเป็นเวลา 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเรณูข้าวโพดอยู่ในช่วง 22– 65 % โดยละอองเรณูที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 100% นานเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีความยาวของหลอดละอองเรณูมากที่สุด คือ 239.63 ไมครอน (Geetha et al., 2004)

Baloch et al. (2001) ได้ศึกษาการงอกของละอองเรณูของ *Hibiscus esculentus* โดยใช้อาหารสังเคราะห์สูตร Taylor's ที่ประกอบด้วยแคลเซียมไนเตรต 300 มก./ลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 140 มก./ลิตร และกรดบอริค 50 มก./ลิตร ร่วมกับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่างกัน 4 ระดับ คือ 10, 20, 30 และ 40 % เพื่อหาระดับน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการงอกของละอองเรณู พบว่า การใช้อาหารสังเคราะห์สูตร Taylor's ร่วมกับน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 20% นานเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง ทำให้ละอองเรณูของ *H. esculentus* งอกหลอดละอองเรณูได้ยาวที่สุด

ในเวลา 3 ชั่วโมง (3000 – 4000 ไมครอน) สำหรับการวัดขนาดความยาวของหลอดละอองเรณู เลือกวัดเฉพาะเซลล์ที่มีการงอกของหลอดละอองเรณูได้มากกว่าสองเท่าของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแต่ละเซลล์

Sato et al. (1998) พบว่าวิธีการที่เหมาะสมต่อการงอกของละอองเรณูของ *Brassica rapa* คือ เก็บละอองเรณูไว้ในที่มีความชื้น 52 – 66% อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นานเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร Kwack's ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 20% ปรับค่าความเป็นกรด- ด่าง อยู่ในช่วง 8 ทำให้ละอองเรณูของ *B. rapa* มีเปอร์เซ็นต์การงอกได้สูงถึง 90%

Song (2001) ได้ทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของละอองเรณูของข้าวจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *O. rufipogon, O sativa* และ พันธุ์ลูกผสม พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของละอองเรณูของข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ สูตรอาหารที่ประกอบด้วย borax 0.1 กรัม glutin 25 กรัม และน้ำตาลซูโครส 12 กรัม ทำให้ละอองเรณูของข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุดคิดเป็นร้อยละ 58, 85 และ 34 ตามลำดับ

Ercisli (2007) ได้ทำการศึกษาการงอกหลอดละอองเรณูของ *Rosa dumalis* และ *R. villosa* จำนวน 4 สายพันธุ์ ในอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างกัน 8 ระดับ ร่วมกับกรดบอริค 0.1 % แล้วนับจำนวนละอองเรณูอย่างน้อย 50 เซลล์ เพื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของละอองเรณู ผลการศึกษา พบว่าละอองเรณูของ *Rosa dumalis* (genotype 1, 2) สามารถงอกหลอดละอองเรณูได้ดีที่สุดในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 35 % คิดเป็นร้อยละ 36 และ 32 ตามลำดับ ส่วนละอองเรณูของ *R. villosa* (genotype 3,4) สามารถงอกได้ดีในอาหารที่มีซูโครส 30% มีเปอร์เซ็นต์ความงอกเป็น 19 % และ 14 % ตามลำดับ

การศึกษาการงอกของละอองเรณูของลูกผสม *Rhododendron* ที่เป็นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ ในอาหารสังเคราะห์สูตร Brewbaker and Kwack (1963) ที่เติมซูโครส 5% นานเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง พบว่า ละอองเรณูของต้นดิพลอยด์ไม่สามารถงอกหลอดละอองเรณูได้เลย แต่ละอองเรณูของต้นเททระพลอยด์สามารถงอกหลอดละอองเรณูในอาหารสังเคราะห์ได้ดีกว่าต้นดิพลอยด์คิดเป็นร้อยละ 45 (Contreras et al., 2007)

2.2.2.3 ความสามารถในการผสมติดเมล็ด

ความสมบูรณ์พันธุ์ของละอองเรณูในลูกผสมข้ามชนิดมักจะต่ำหรือเป็นหมัน ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดลดลงหรือไม่สามารถติดเมล็ดได้เลย ทั้งนี้เนื่องจากว่าโครโมโซมของลูกผสมมีการเข้าคู่กันและแยกตัวออกจากกันอย่างผิดปกติในระหว่างการแบ่งแบบไมโอซิส การเพิ่มจำนวนโครโมโซมให้เป็นโพลีพลอยด์อาจช่วยทำให้โครโมโซมสามารถเข้าคู่กัน

ได้อย่างปกติ และฟื้นฟูความเป็นหมันให้กับลูกผสมได้ ดังนั้นการทดสอบความสมบูรณ์พันธุ์จากการผสมติดเมล็ดอาจเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้พิสูจน์ความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะสำคัญบางประการจากต้นพ่อพันธุ์ไปยังรุ่นลูกได้

การศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของกล้วยไม้หวาย *Dendrobium superbiens* ที่เป็นดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ พบว่า ต้นกล้วยไม้ที่เป็นเททระพลอยด์มีเปอร์เซ็นต์การติดฝักเพิ่มสูงขึ้น และการผสมเกสรที่ใช้ละอองเรณูจากต้นเททระพลอยด์จะทำให้มีการติดฝักเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 62 % ในขณะเดียวกันหากใช้ละอองเรณูจากต้นดิพลอยด์มาผสมเกสรจะมีการติดฝักได้เพียงร้อยละ 16 เท่านั้น (สาริณี ไชยเจริญ, 2538)

การศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสม *Alstroemeria* ที่เป็นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ พบว่า ต้นลูกผสมดิพลอยด์ไม่สามารถติดเมล็ดได้ จากการศึกษาพันธุศาสตร์ของเซลล์ในระยะไมโอซิสของ PMC พบว่า ในต้นลูกผสมดิพลอยด์มีพฤติกรรมการแบ่งไมโอซิสที่ผิดปกติไป คือ โครโมโซมคู่เหมือนไม่สามารถเข้าคู่กันได้อย่างปกติในระยะไดอะไคเนซิส และเกิดความผิดปกติของการแยกออกจากกันของโครโมโซมในระยะแอนาเฟส I แบบ chromosome bridge และ chromosome lagging ในขณะที่โครโมโซมของต้นเททระพลอยด์สามารถเข้าคู่กันได้อย่างปกติ และส่งผลให้พบเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติในการแยกออกจากกันของโครโมโซมแบบ chromosome bridge ลดลง ส่งผลให้ละอองเรณูของต้นเททระพลอยด์มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 12 แต่การผสมตัวเองของต้นเททระพลอยด์ก็ยังไม่สามารถติดเมล็ดได้ ดังนั้นสาเหตุความเป็นหมันของลูกผสม *Alstroemeria* อาจเกิดจากเนื่องมาจากสาเหตุอื่น (Lu and Bridgen, 1996)

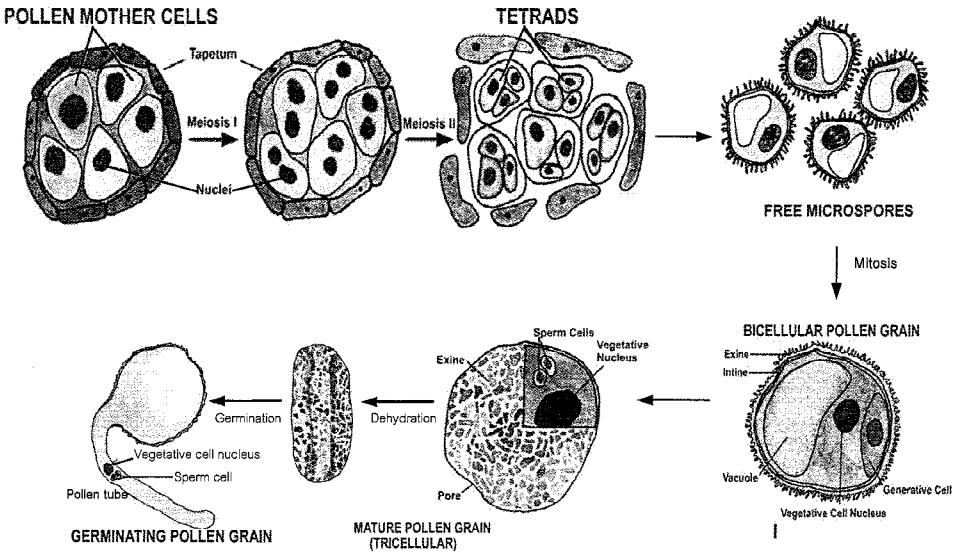
การผสมข้ามชนิดระหว่างข้าวพันธุ์ กข7 (*Oryza sativa*) กับข้าวพันธุ์ป่า (*O. minuta*) เพื่อถ่ายทอดลักษณะต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลให้กับข้าวพันธุ์ กข 7 ทำให้ได้ข้าวลูกผสมที่เป็นหมัน การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมให้เป็นเททระพลอยด์แก่ลูกผสมช่วยทำให้สามารถฟื้นฟูความเป็นหมันได้ โดยทำให้ลูกผสมที่เป็นเททระพลอยด์มีอัตราการติดเมล็ดสูง และสามารถต้านทานต่อการเข้าทำลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ (สุพรรณญิกา เนตรทัศน์, 2539)

Lavania and Srivastava (1991) ได้ศึกษาเปรียบเทียบความสมบูรณ์พันธุ์ใน *Hyoscyamus niger* L. ที่เป็นดิพลอยด์และถูกชักนำให้เป็นออโตเททระพลอยด์ จำนวน 2 ฤดูปลูก พบว่า การผสมติดเมล็ดของต้นออโตเททระพลอยด์ในฤดูปลูกที่ 2 มีอัตราการผสมติดเมล็ดเฉลี่ย 92 % ซึ่งเพิ่มขึ้นจากฤดูแรกที่มีอัตราการผสมติดเพียงร้อยละ 75 % และอัตราการติดเมล็ดของต้นออโตเททระพลอยด์มีค่าใกล้เคียงกับต้นดิพลอยด์ คือ 98 %

2.3 พัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้

สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดล้วนมีกำเนิดมาจากการรวมกันระหว่างเซลล์สืบพันธ์ของพ่อและแม่ ซึ่งสิ่งมีชีวิตเหล่านี้มีกลุ่มเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์โดยกระบวนการแบ่งนิวเคลียสที่เรียกว่า ไมโอซิส (meiosis) ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้เซลล์สืบพันธุ์มีจำนวนโครโมโซมลดลงเป็นครึ่งหนึ่งของเซลล์เดิมเรียกแฮพลอยด์ (haploid) ด้วยสาเหตุนี้จึงทำให้สิ่งมีชีวิตที่เป็นดิพลอยด์ (diploid) สามารถรักษาจำนวนโครโมโซมให้คงที่ในทุกๆชั่ว ภายหลังการผสมพันธุ์ที่มีการรวมกันของเซลล์สืบพันธุ์จากฝ่ายพ่อและฝ่ายแม่ซึ่งเป็นแฮพลอยด์ กระบวนการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิสแบ่งออกได้เป็น 2 ขั้นตอนที่ต่อเนื่องกัน คือ ไมโอซิส I และไมโอซิส II

เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของพืชถูกสร้างขึ้นในอับเรณูภายในดอกอ่อน โดยมีแหล่งกำเนิดจากเซลล์ต้นกำเนิดละอองเรณู (pollen mother cells: PMC) ซึ่งแต่ละเซลล์มีโครโมโซม 2 ชุด (2n) ในอับเรณูที่กำลังพัฒนานั้นจะพบว่า PMC มีการแบ่งตัวแบบไมโอซิส เมื่อมีการแบ่งไมโอซิสครั้งแรกได้เซลล์ใหม่ 2 เซลล์ติดกัน เรียกว่า dyad และการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ครั้งที่ 2 ได้ 4 เซลล์ติดกัน เรียกว่า tetrad โดยแต่ละเซลล์มีโครโมโซมลดลงเป็นครึ่งหนึ่ง (n) จากนั้นเซลล์ทั้ง 4 เซลล์แยกออกจากกัน ทำให้ได้ ไมโครสปอร์ซึ่งจะพัฒนาไปเป็นละอองเรณู (pollen) โดยภายในเซลล์ของไมโครสปอร์จะมีการแบ่งแบบไมโทซิสของนิวเคลียส ทำให้แต่ละไมโครสปอร์มี 2 นิวเคลียส คือ vegetative nucleus และ generative nucleus ซึ่งส่วนของ generative nucleus นั้นจะมีการแบ่งแบบไมโทซิสอีกครั้งหนึ่งเพื่อสร้างเสปิร์มเซลล์ (sperm cells) 2 เซลล์ และเรณูมีการสร้างผนังเซลล์หนาหลายชั้น (Goldberg et al., 1993; Furness and Rudall, 1999; Scott et al., 2004; Fuzinatto et al., 2008) ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (McCormick, 2004)

การศึกษาถึงระยะพัฒนาการของดอกกับระยะการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของ PMC ทำให้สามารถระบุขนาดอกที่เหมาะสมกับระยะการแบ่งไมโอซิสของ PMC และนำดอกอ่อนไปใช้ประโยชน์สำหรับการศึกษาพฤติกรรมของการแบ่งไมโอซิสของ PMC ได้รวดเร็วขึ้น จากการศึกษาของ Smyth et al. (1990) ที่ได้รายงาน ความสัมพันธ์ระหว่างระยะพัฒนาการของดอกอ่อน *Arabidopsis* จำนวน 12 ระยะ กับระยะการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสจากเซลล์ดอกแต่ละระยะ พบว่าขนาดของดอกอ่อนมีความสัมพันธ์กับระยะการแบ่งเซลล์ โดยดอกอ่อนที่มีขนาดความยาว 0.3 – 0.5 มม. เป็นระยะที่มีการแบ่งไมโอซิสของ PMC มากที่สุด นอกจากขนาดความยาวของดอกจะมีผลต่อระยะการแบ่งเซลล์แล้ว ลักษณะโครงสร้าง และส่วนประกอบต่าง ๆ ของดอกในแต่ละระยะก็สามารถใช้เป็นดัชนีในการคัดเลือกดอกเบื้องต้นได้ สอดคล้องกับการศึกษาขนาดดอกกับระยะการแบ่งไมโอซิสในกล้วยไม้สกุล *Renanthera* Singapore Botanic Gardent, *Mokara* Singa Gold และ *Arachnoglottis* พบว่า ขนาดดอกกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิดมีความสัมพันธ์กับระยะการแบ่งไมโอซิส คือ ดอกที่มีขนาดน้อยกว่า 4.0 - 4.5 มม. PMC จะยังไม่มีการแบ่งเซลล์ ส่วนดอกที่มีขนาด 4.0 – 6.5 มม. เซลล์ PMC มีการแบ่งเซลล์ในระยะไมโอซิส I และดอกที่มีขนาดยาวมากกว่า 6.5 มม. ขึ้นไปจะพบการแบ่งเซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในระยะ sporad เกือบทั้งหมด ดังนั้นการศึกษาพฤติกรรมการแบ่งไมโอซิสของ PMC จากเซลล์ดอกอ่อนกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด ควรเลือกใช้ดอกที่มีขนาดความยาวเฉลี่ย 4.5 – 6.0 มม. (Winston et al., 2002)

2.4 สาเหตุของความเป็นหมันในละอองเกสรเพศผู้ของลูกผสมข้ามชนิด

การเป็นหมันของละอองเรณู (male sterile) หมายถึง การที่พืชไม่สามารถผลิตละอองเรณูได้ หรือผลิตละอองเรณูที่ผิดปกติไม่สามารถผสมกับเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียจนเกิดเป็นเมล็ดหรือผลได้ การเป็นหมันของละอองเรณูเป็นลักษณะทางพันธุกรรมที่ถูกควบคุมโดยยีนในนิวเคลียสหรือยีนในไซโทพลาสซึม สามารถเกิดขึ้นเองในสภาพธรรมชาติ หรือเกิดจากการชักนำด้วยสารเคมี การเป็นหมันของละอองเรณูมีประโยชน์อย่างยิ่งในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมในพืชผสมตัวเองหรือพืชผสมข้าม ทั้งนี้การเป็นหมันช่วยลดขั้นตอนในการทำลายเกสรเรณูของต้นแม่พันธุ์ในการผสมข้ามกับต้นพ่อพันธุ์ปกติเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม ทำให้ต้นทุนการผลิตลดลง

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีการผสมข้ามชนิดเป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยเพิ่มความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรมของพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผสมข้ามชนิดในกลุ่มไม้ดอกไม้ประดับนั้นสามารถสร้างความหลากหลายของพันธุ์ เพื่อตอบสนองกับความต้องการของผู้บริโภค แต่ลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามชนิดส่วนใหญ่มักมีละอองเรณูเป็นหมัน ทำให้ไม่สามารถที่จะนำลูกผสมไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้ สาเหตุความเป็นหมันของลูกผสมนั้นอาจเกิดมาจากการเลือกคู่ผสมที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันมาก ซึ่งโครโมโซมจากฝ่ายพ่อและฝ่ายแม่มีรูปร่างและจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างกัน ทำให้โครโมโซมไม่สามารถเข้าคู่กันได้ในขณะที่มีการแบ่งแบบไมโอซิสของเซลล์ต้นกำเนิดละอองเรณู ส่งผลทำให้กระบวนการสร้างไมโครสปอร์หยุดชะงักหรือผิดปกติไปจนไม่สามารถสร้างละอองเรณูได้ (ลิลลี่ กาวีตั๊ะ, 2546 ; Armstrong and Jone, 2003) นอกจากนี้สาเหตุการเป็นหมันอาจเกิดจากองค์ประกอบของยีนลูกผสมเอง และยังมีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมในแปลงปลูก เช่น อุณหภูมิ ความยาวของวันและความชื้น เป็นต้น ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะสาเหตุความเป็นหมันที่เกิดจากการที่โครโมโซมจากพ่อและแม่แตกต่างกัน โดยเน้นระยะเวลาที่ละอองเรณูฝ่อ ซึ่งแบ่งออกได้เป็นในช่วงของไมโอซิสและช่วงปลายไมโอซิสเท่านั้น

2.4.1 การเป็นหมันเนื่องจากการเข้าคู่และการแยกออกจากกันของโครโมโซมผิดปกติ

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการผสมข้ามระหว่างชนิดหรือสกุลเพื่อถ่ายทอดลักษณะที่ดีบางอย่างจากพืชชนิดหนึ่งไปยังอีกชนิดหนึ่งนั้น จะประสบผลสำเร็จมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความแตกต่างของจีโนมจากพืชทั้งสองชนิด ซึ่งจะมีผลต่อการเข้าคู่กันของโครโมโซมในระหว่างการแบ่งไมโอซิสและการรวมตัวกันของยีน ในบางครั้งหากจีโนมของพืชทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันมาก จนโครโมโซมไม่สามารถเข้าคู่กันได้การรวมตัวกันใหม่ของยีนจึงไม่เกิดขึ้น การถ่ายทอดยีนไปสู่พืชอาจไม่ประสบผลสำเร็จก็ได้ การเพิ่มจำนวนโครโมโซมให้แก่ลูกผสมข้ามจึง อาจฟื้นฟูความสมบูรณ์พันธุ์ให้กับลูกผสมที่เป็นหมันได้ เนื่องจากว่าโครโมโซมสามารถเข้าคู่กัน

ได้ แต่การเข้าคู่กันไม่ได้เกิดจากการจับคู่กันระหว่างโครโมโซมจากฝ่ายพ่อหรือแม่ แต่เป็นการเข้าคู่กันของโครโมโซมที่เหมือนกัน ดังนั้นพฤติกรรมของโครโมโซมในระหว่างการแบ่งไมโอซิสจึงมีความคล้ายคลึงต้นที่เป็นดิพลอยด์ ที่โครโมโซมส่วนใหญ่มักจะจับคู่กันเป็นไบวาเลนต์ และแยกตัวออกจากกันอย่างปกติ แต่อย่างไรก็ดีการเพิ่มจำนวนให้แก่ลูกผสมที่เป็นหมันอาจไม่ประสบผลสำเร็จและแก้ไขความเป็นหมันของลูกผสมได้เสมอไป (Lu and Bridgen, 1997; Kharabian and Darabi, 2005)

การแบ่งแบบไมโอซิสซึ่งเป็นการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์ ประกอบด้วยไมโอซิส I และไมโอซิส II ซึ่งเป็นการแบ่งนิวเคลียสสองครั้งที่ต่อเนื่องกันเกิดขึ้นภายหลังจากที่มีการเพิ่มปริมาณโครโมโซมแล้ว โดยในระยะไมโอซิส I จะมีการเข้าคู่แนบชิดกันของโครโมโซมคู่เหมือนและเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนระหว่างโครมาทิดของโครโมโซมคู่เหมือน รวมทั้งมีการแยกตัวของโครโมโซมคู่เหมือนออกจากกันออกจากกันอย่างอิสระ ผลที่ได้จากการแบ่งไมโอซิส I ทำให้ได้เซลล์ใหม่ 2 เซลล์ ส่วนในไมโอซิส II เป็นการแยกออกจากกันของโครมาทิดที่เหมือนกันให้เคลื่อนที่ไปยังแต่ละขั้วของเซลล์ในระยะแอนาเฟส II และมีการแบ่งไซโทพลาสซึมในเทโลเฟส II ทำให้ได้เซลล์ใหม่จำนวน 4 เซลล์ แต่ละเซลล์จะได้ยีนที่แสดงลักษณะแตกต่างไปจากฝ่ายพ่อและฝ่ายแม่ อันเป็นผลเนื่องมาจากการรวมตัวกันใหม่ของยีนหรือเกิดยีนรีคอมบิเนชัน (gene recombination) ในขณะที่เกิด ครอสซิงโอเวอร์ (crossing over) ดังนั้นยีนในโครโมโซมที่ปรากฏอยู่ในรุ่นลูกจึงไม่จำเป็นต้องเหมือนกับยีนในโครโมโซมของพ่อและแม่ก็ได้ (วิสุทธิ์ ใบไม้, 2538 ; ลิลลี่ กาวีตัะ, 2546 ; นิตย์ศรี แสงเดือน, 2551)

สาเหตุความเป็นหมันของลูกผสมอาจเกิดขึ้นในระหว่างขั้นตอนที่ PMC พัฒนาไปเป็นไมโครสปอร์นั้นมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสผิดปกติตั้งแต่ระยะโปรเฟส I ทำให้ละอองเกสรเพศผู้ฝ่อได้ กล่าวคือ หากมีการผสมข้ามชนิดในพืชที่มีความห่างไกลกันมาก โครโมโซมไม่สามารถมาจับคู่กันได้ในขณะที่มีการแบ่งไมโอซิส เมื่อสิ้นสุดกระบวนการแบ่งนิวเคลียส และเซลล์มีการแบ่งไซโทพลาสซึมจะได้ unbalanced chromosome gamete ส่งผลให้เซลล์สืบพันธุ์มีจำนวนโครโมโซมที่ไม่แน่นอน และไม่สามารถทำหน้าที่ได้เหมือนเซลล์ปกติ (Dobzhansky, 1953 อ้างโดย ศิริพร เชื้อจีน, 2546)

Lu and Bridgen (1997) ได้อธิบายถึงสาเหตุความเป็นหมันของลูกผสม *Alstroemeria* ว่าอาจเกิดจากการที่โครโมโซมเข้าคู่กันไม่ได้ในระยะโปรเฟส I เนื่องจากโครโมโซมมีรูปร่างที่แตกต่างกัน จึงทำให้การแบ่งไมโอซิสไม่สามารถแบ่งเซลล์ต่อไปจนสิ้นสุดกระบวนการได้ นอกจากนี้ Khrustaleva and Kik (1998) ได้รายงานความผิดปกติของการแบ่งไมโอซิสใน *Allium ampeloprasum* spp. *Porrum* พบความผิดปกติในการเข้าคู่กันของโครโมโซมคู่เหมือนใน

ระยะโปรเฟส I เป็นแบบ univalent bivalent และ quadrivalent อยู่ปะปนกันเป็นจำนวนมาก แทนที่จะมีการเข้าคู่กันเป็น bivalent ทั้งหมด ลักษณะดังกล่าวนี้มีผลทำให้กระบวนการแยกออกจากกันของโครโมโซมคู่เหมือนในระยะแอนาเฟส I ผิดปกติ และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการแบ่งไมโอซิสของ PMC พบไมโครสปอร์ที่เป็น dyad รวมกับไมโครสปอร์ที่เป็นเทแทรด และเป็นสาเหตุที่ทำให้ความสมบูรณ์พันธุ์ของกระเทียมลดลง เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Khazanehdari et al. (1996) ที่ศึกษาความผิดปกติของการแบ่งไมโอซิสในกระเทียม (*Allium ampeloprasum* spp. *porrum*) พบความผิดปกติของการเข้าคู่กันของโครโมโซมคู่เหมือนในระยะ โปรเฟส I และเมตาเฟส I เป็นแบบ univalent bivalent และ quadrivalent อยู่ปะปนเป็นจำนวนมากภายในเซลล์ ลักษณะดังกล่าวนี้มีผลทำให้เกิดความผิดปกติในการแยกออกจากกันของโครโมโซม คู่เหมือนระยะแอนาเฟส I และแอนาเฟส II เมื่อสิ้นสุดกระบวนการแบ่งเซลล์จึงได้ไมโครสปอร์ที่เป็น dyads และ tetrads รวมทั้งพบ micronuclei อยู่ในไมโครสปอร์ที่ผิดปกติเป็นจำนวนมาก สอดคล้องกับการศึกษาของ XueLin et al. (2007) ในข้าว ซึ่งพบว่า สาเหตุที่ทำกระบวนการสร้างละอองเรณูปกตินั้น เกิดจากการแบ่ง ไมโอซิสของ PMC ผิดปกติ โดยการเข้าคู่กันของโครโมโซมในระยะไดอะไคเนซิสเป็นแบบ univalent bivalent และ multivalent ในทำนองเดียวกันพบความผิดปกติของการแบ่งไมโอซิสของ PMC ในระยะโปรเฟส I ที่เกิดเนื่องจากการเข้าคู่กันไม่ได้ของโครโมโซมคู่เหมือนจะส่งผลให้การแบ่งเซลล์ในระยะแอนาเฟส I ซึ่งเป็นระยะที่มีการแยกออกจากกันของโครโมโซมคู่เหมือนผิดปกติไปด้วย

นอกจากการเข้าคู่กันของโครโมโซมในระยะโปรเฟสผิดปกติแล้ว การแยกออกจากกันของโครโมโซมในระยะแอนาเฟส I และ II ที่ผิดปกติเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการเป็นหมันในลูกผสมได้เช่นเดียวกัน โดยลักษณะความผิดปกติที่พบในระหว่างที่โครโมโซมมีการแยกออกจากกันได้แก่ แบบ chromosome bridge คือ โครโมโซมในระยะแอนาเฟส I ถูกดึงให้แยกออกจากกันไปยังแต่ละขั้วของเซลล์ แต่มีโครโมโซมคู่เหมือนหรือโครมาทิดของทั้งสองโครโมโซมไม่แยกออกจากกันหรือแยกออกจากกันไม่สมบูรณ์ในระหว่างการแบ่งไมโอซิส ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างที่มีรูปร่างคล้ายสะพาน ทำให้แต่ละขั้วของเซลล์มีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน ทำให้เซลล์สืบพันธุ์มีจำนวนโครโมโซมที่ผิดปกติไป ส่วนความผิดปกติแบบ chromosome lagging เป็นลักษณะที่โครโมโซมบางแท่งหรือบางโครมาทิดเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าแท่งอื่นๆ ในระยะเมตาเฟสหรือระยะแอนาเฟสของการแบ่งไมโอซิส โดยโครโมโซมหรือโครมาทิดอาจไม่สามารถเคลื่อนที่ไปยังขั้วเซลล์ เพื่อรวมกับโครโมโซมคู่อื่นๆได้ ดังนั้นโครโมโซมหรือโครมาทิดนี้จึงถูกทิ้งไว้ให้อยู่ในเซลล์ซึ่งต่อมาอาจหายไป หรือเมื่อเข้าสู่ระยะเทโลเฟสซึ่งเป็นระยะที่มีการแบ่งไซโทพลาสซึมและ

สร้างผนังเซลล์ ชิ้นส่วนโครโมโซมเหล่านี้อาจจะมีการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ล้อมรอบเกิดเป็นนิวเคลียสขนาดเล็ก ที่เรียกว่า ไมโครนิวคลีไอน์(micronuclei)

Lu and Bridgen (1997) พบความผิดปกติทั้งแบบ chromosome bridge และ chromosome lagging ใน PMC ที่ระยะแอนาเฟส I และ II ของลูกผสม *Alstroemeria aurea* Graham x *A. caryophyllaea* Jacq ความผิดปกติทั้งสองชนิดนี้เป็นสาเหตุที่ทำให้โครโมโซมคู่เหมือนที่ประกอบกันเป็นไบวาเลนต์ไม่ถูกแยกออกจากกันไปยังแต่ละขั้วของเซลล์ ลักษณะดังกล่าวนี้มีผลให้การแบ่งเซลล์หยุดชะงัก และส่งผลต่อการแบ่งเซลล์ระยะอื่น ๆ ผิดปกติไปจนไม่สามารถสร้างละอองเรณูที่เป็นปกติได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Song et al. (1997) ในลูกผสมของ *Allium fistulosum* x *A. cepa* พบความผิดปกติของโครโมโซมทั้งแบบ chromosome bridge และ chromosome lagging เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความเป็นหมันในลูกผสมหอมหัวใหญ่ได้ ในทำนองเดียวกันจากการศึกษาของ Adaniya and Shoda (1998) ที่ได้วิเคราะห์การแบ่งไมโอซิสของ PMC ในขิงพันธุ์ Sanchu และพันธุ์ Philippine พบว่าความถี่ของการเกิดความผิดปกติแบบ chromosome bridges และ chromosome lagging ในระยะแอนาเฟส I สูงถึงร้อยละ 25 และยังพบความผิดปกติแบบ chromosome bridges ในระยะแอนาเฟส II มากกว่าร้อยละ 15 ในขิงทั้งสองพันธุ์ ซึ่งเป็นผลทำให้ความสมบูรณ์พันธุ์ของละอองเรณูในขิงพันธุ์ Philippine และ พันธุ์ Sanchu มีเพียงร้อยละ 21 และ 2 ตามลำดับ นอกจากนี้การศึกษาของ Sastrapradja and Aminah (1970) ได้รายงานถึงความผิดปกติของโครโมโซมแบบ chromosome bridges และ chromosome lagging ที่เกิดขึ้นในระยะแอนาเฟส I เป็นสาเหตุที่ทำให้ละอองเรณูของ *Curcuma lorzengii* เป็นหมันได้

ในข้าวลูกผสมพบว่ามีความผิดปกติของการแยกออกจากกันของโครโมโซมในระยะแอนาเฟส I ทั้งแบบ chromosome bridges และ chromosome lagging เป็นร้อยละ 13 และ 52 ตามลำดับ ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้กระบวนการสร้างละอองเกสรเพศผู้ผิดปกติได้ (XueLin et al., 2007) ในทำนองเดียวกันกับ *Agave tequilana* Weber var. azul ที่พบความผิดปกติแบบ chromosome bridges และ chromosome lagging ในระยะแอนาเฟส I ร้อยละ 15 และ 3 ตามลำดับ นั้น ส่งผลละอองเรณูเป็นหมันสูงถึงร้อยละ 42 (Ruvalcaba-Ruiz and Rodriguez-Garay, 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าหากเกิดโครโมโซมแบบ chromosome bridges หรือ chromosome lagging เพียงความผิดปกติแบบใดแบบหนึ่งก็ส่งผลให้กระบวนการสร้างละอองเรณูผิดปกติได้ ตัวอย่างเช่นใน *Alstroemeria andina* var. *venustula* มี chromosome bridge สูงถึงร้อยละ 78 (Lu and Bridgen, 1997; Sanso and Juan, 1998; Sanso et al., 2007) และใน *Brachiaria ruziziensis* x *B. brizantha* เกิด chromosome lagging ทั้งในระยะแอนาเฟส I และ II ได้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ (Mendes-

Bonato et al., 2004; Risso-Pascotto, 2005; Mendes-Bonato et al., 2007) ซึ่งความผิดปกติเหล่านี้ส่งผลทำให้ละอองเรณูเป็นหมัน

2.4.2 ความผิดปกติของกระบวนการแบ่งไซโทพลาสซึม

นอกจากความผิดปกติของการเข้าคู่กันของโครโมโซมและความผิดปกติของการแยกออกจากกันของโครโมโซม จะมีผลทำให้กระบวนการแบ่งไมโอซิสหยุดชะงักจนไม่สามารถแบ่งเซลล์ต่อไปได้แล้ว ยังมีผลตามมาที่ทำให้เกิดความผิดปกติของการแบ่งไซโทพลาสซึม (cytokinesis) ซึ่งเป็นการแยกเซลล์เดิมของการแบ่งไมโอซิสออกโดยผนังเซลล์ หรือเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายหลังจากที่มีการแบ่งนิวเคลียสเสร็จเรียบร้อยแล้ว

Boldrini et al. (2006) ได้ทำการศึกษาความผิดปกติของการแบ่งไซโทพลาสซึมใน *Brachiaria humidicola* พันธุ์ H003 พบว่าการแบ่งไซโทพลาสซึมที่ผิดปกติสังเกตพบได้ตั้งแต่ระยะเทโลเฟส I และในการแบ่งไมโอซิส II พบว่ามีการแบ่งไซโทพลาสซึมได้ตั้งแต่ระยะโปรเฟส II ถึงระยะเทโลเฟส II โดยความผิดปกติที่พบส่วนใหญ่เป็นแบบที่ไม่มีการแบ่งไซโทพลาสซึม เมื่อสิ้นสุดกระบวนการแบ่งไมโอซิสจึงทำให้ได้ไมโครสปอร์เซลล์เดียวที่มีสองนิวเคลียส (monads) แต่บางเซลล์อาจมีการแบ่งไซโทพลาสซึมเพียงครั้งเดียว จึงทำให้ได้ไมโครสปอร์เพียงสองเซลล์ (dyads) หรือในบางเซลล์อาจมีการแบ่งไซโทพลาสซึมครั้งที่สองได้เพียงเซลล์เดียวอีกเซลล์หนึ่ง ไม่มีการแบ่งไซโทพลาสซึมจึงทำให้เกิดความผิดปกติได้เซลล์ 3 เซลล์ ที่เรียกว่า triads

นอกจากนี้ Adamowski et al. (2007) ได้ทำการศึกษาความผิดปกติของการแบ่งไซโทพลาสซึมในกระบวนการสร้างละอองเรณูของ *B. humidicola* พันธุ์ H121 พบว่าสามารถสังเกตพบความผิดปกติของการแบ่งไซโทพลาสซึมตั้งแต่ระยะแรกของการแบ่งไมโอซิส I สูง ถึงร้อยละ 10.70 ความผิดปกติที่เกิดขึ้นนี้สามารถสังเกตเห็นได้ตั้งแต่ระยะเมตาเฟส I โดยพบว่าเซลล์ที่อยู่ในระยะนี้จะมีการแบ่งของไซโทพลาสซึมหลาย ๆ ครั้งทำให้โครโมโซม และ ไซโทพลาสซึมถูกแยกออกมากกว่าสองส่วน เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะเทโลเฟส I จึงไม่มีการแบ่งไซโทพลาสซึมอีก นอกจากนี้ เมื่อเซลล์เข้าสู่กระบวนการแบ่งไมโอซิส II จึงทำให้พบการแบ่งไซโทพลาสซึมผิดปกติเป็นร้อยละ 10.90 เมื่อสิ้นสุดกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสจึงทำให้ได้ไมโครสปอร์ที่ยังคงเป็น dyads และเป็น binucleated

ความผิดปกติของการแบ่งไมโอซิสระยะต่างๆที่พบใน PMC ที่ได้กล่าวมาข้างต้นนั้น มีผลทำให้กระบวนการแบ่งเซลล์หยุดชะงัก ไม่สามารถแบ่งเซลล์ต่อไปในระยะอื่นได้อีก จึงส่งผลทำให้ปริมาณละอองเรณูลดลง และละอองเรณูมีลักษณะผิดปกติ โดยจากการศึกษาของ RuvalcabaRuiz and Rodriguez-Garay (2002) ใน *Agave tequilana* Weber var. azul พบว่า ความผิดปกติของโครโมโซมที่เกิดขึ้นในระยะแอนาเฟส I และ II ของพืชชนิดนี้มีทั้งแบบ chromosome

bridge และ chromosome lagging ทำให้ละอองเรณูมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่ผิดปกติสูงถึงร้อยละ 42 โดยละอองเรณูจะมีขนาดเล็ก มีผนังเซลล์หนา และไม่มีชีวิต

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ลักษณะพฤกษศาสตร์ของปทุมมาลูกผสม

ต้นปทุมมาลูกผสม (*C. alismatifolia* x *C. rhabdota*; 2n=28) ที่ใช้เป็นวัสดุทดลองเกิดจากการผสมข้ามชนิดระหว่างปทุมมา (*C. alismatifolia*; 2n=32) กับ บัวโกเมน (*C. rhabdota*; 2n=24) โดยคุณวิภาดา ทองทักษิณ (2543) ลักษณะเด่นของปทุมมาลูกผสมพันธุ์นี้ คือ ใบประดับส่วนล่างสีเขียวมีลายสีน้ำตาลและแต้มสีชมพูที่คล้ายบัวโกเมน และมีใบประดับส่วนบนสีขาวขนาดใหญ่คล้ายปทุมมา ใบมีรูปรียาวปลายใบแหลม แผ่นใบเรียบ เส้นกลางใบมีสีน้ำตาล โดยต้นที่เจริญเติบโตเต็มที่จะมีความสูงประมาณ 50-55 ซม มีใบ 7-8 ใบ ช่อดอกยาวประมาณ 11-12 ซม มีใบประดับส่วนล่าง (bract) 8-9 กลีบ และมีใบประดับส่วนบน (coma bract) 7 - 8 กลีบ

3.2 การเตรียมหัวพันธุ์ปทุมมาลูกผสม การบ่มหัวพันธุ์ และการย้ายปลูก

3.2.1 การเตรียมหัวพันธุ์

ต้นปทุมมาลูกผสม (*Curcuma alismatifolia* x *C. rhabdota*) เกิดจากการผสมข้ามชนิดระหว่างปทุมมา (*C. alismatifolia*; 2n=32) กับบัวโกเมน (*C. rhabdota*; 2n=24) โดยคุณวิภาดา ทองทักษิณ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จากนั้น พรพิมล สุริยภัทร และอรัญญา พิมพ์มงคล (2548) ได้ทำการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมลูกผสมดิพลอยด์ให้เป็นเททระพลอยด์ ที่คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ผู้วิจัยได้ปลูกต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ จากหัวพันธุ์ที่ได้จากต้นซึ่งย้ายปลูกจากหลอดแก้วในปีแรก แล้วเก็บหัวพันธุ์เพื่อใช้ปลูกในปีถัด ๆ ไป โดยทำการเก็บหัวพันธุ์ปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ซึ่งมีอายุ 2 และ3 ปี ที่เข้าสู่ระยะพักตัวแล้ว นำมาล้างทำความสะอาด และแช่ในยากันรา (เบนเลท) เป็นเวลา 15 นาที ผึ่งหัวพันธุ์ให้แห้งแล้วจึงเก็บหัวพันธุ์ในถุงกระดาษไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.2.2 การบ่มหัวพันธุ์

เมื่อถึงฤดูปลูกจึงนำหัวพันธุ์อายุ 1 ปี และ 2 ปี ของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระ มาวัดขนาด และนับจำนวนรากสะสมอาหาร เพื่อคัดเลือกให้ได้หัวพันธุ์ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน (หัวพันธุ์ดิพลอยด์ที่ใช้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.2 – 1.5 ซม จำนวนรากสะสมอาหาร 4 – 6 ราก

หัวพันธุ์เททระพลอยด์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 – 1.9 ซม และมีจำนวนรากสะสมอาหาร 5 – 8 ราก) จากนั้นนำหัวพันธุ์บ่มในตะกร้าที่มีขุยมะพร้าวที่มีความชื้นประมาณ 70 % คลุมด้วยพลาสติก วางไว้ในอุณหภูมิห้อง (30 – 34 องศาเซลเซียส) ประมาณ 14 – 25 วัน จึงทำการคัดหัวพันธุ์ที่งอกและมีขนาดความยาวยอดสูงใกล้เคียงกันขนาดเท่ากันลงปลูกในถุงพลาสติกสีดำขนาด 6x12 นิ้ว ซึ่งมีวัสดุปลูกดังแสดงในหัวข้อ 3.2.3

3.2.3 การเตรียมวัสดุย้ายปลูก

วัสดุสำหรับย้ายปลูกปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ ประกอบด้วย แกลบดิบ แกลบเผา ขุยมะพร้าว ดิน และปุ๋ยคอก (อัตราส่วน 3:2:2:2:1) นำส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นปุ๋ยคอก อบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นานเป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นจึงนำวัสดุชนิดต่าง ๆ มาผสมให้เข้ากัน

3.2.4 การย้ายปลูก

บรรจุวัสดุย้ายปลูกลงในถุงพลาสติกสีดำ ขนาด 6 x 12 นิ้ว แล้วจึงนำหัวพันธุ์ของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ ที่งอกแล้วปลูกลงในถุงจำนวน 1 หัวต่อถุง โดยมีสภาพแวดล้อมเป็นสภาพร่ม ทั้งนี้ต้นปทุมมาลูกผสมอายุ 2 ปี และ3 ปี ใช้ในการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา ส่วนความสมบูรณ์พันธุ์ใช้ต้นปทุมมาลูกผสมอายุ 3 ปี

3.2.5 การดูแลรักษา

การรดน้ำ ทำการรดน้ำต้นปทุมมาตอนเช้าวันละ 1 ครั้ง

การให้ปุ๋ย ใช้ปุ๋ยเกล็ดละลายน้ำสูตร 18-18-18 อัตราส่วน 5 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร โดยการใช้บัวรดน้ำไม่ให้ถูกใบ อาทิตย์ละ 2 ครั้ง หลังจากย้ายปลูก 1 เดือน

3.3 วิธีการศึกษา แผนการทดลอง และการบันทึกผล

3.3.1 การตรวจสอบต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์

ทำการตรวจสอบเพื่อยืนยันความเป็นดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ของต้นปทุมมาลูกผสม ที่ย้ายปลูกจากหัวพันธุ์ในทั้ง 2 ฤดูปลูก โดยวัดขนาด และจำนวนเซลล์คุมปากใบ ขนาดละอองเรณู และจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก

3.3.1.1 การศึกษาขนาดและจำนวนเซลล์คุมปากใบต่อพื้นที่

วิธีการทดลอง

วัดขนาดความยาวเซลล์คุมปากใบของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ อย่าง ละ 20 ต้น โดยทำการเก็บตัวอย่างใบที่เจริญเต็มที่ในขวดที่มีน้ำเล็กน้อยปิดฝาและเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้ปากใบปิด จากนั้นลอกเนื้อเยื่อผิวด้านใต้ใบบริเวณ

กึ่งกลางใบทั้งด้านซ้ายและขวาของเส้นกลางใบ วางบนแผ่นสไลด์ที่มีน้ำ 1 หยด ปิดทับด้วยกระจกสไลด์ แล้วนำมาวัดขนาดความยาวเซลล์คุมปากใบจำนวน 10 เซลล์ในแต่ละตำแหน่งรวมเป็น 20 เซลล์ต่อต้น และนับจำนวนปากใบต่อพื้นที่ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า แล้วจึงนำจำนวนปากใบที่นับได้จาก 2 ตำแหน่งมาหาค่าเฉลี่ย และคูณด้วย 625 จะได้จำนวนปากใบต่อพื้นที่ 1 ตร.ซม. (ภาคผนวก ก)

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design: CRD) โดยมีระดับพลอยดีของต้นปทุมมาลูกผสมเป็นสิ่งทดลอง คือ ต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ รวมเป็น 2 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 20 ซ้ำ (ต้น)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดยใช้ t –test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.3.1.2 การศึกษาการวัดขนาดละอองเรณู

วิธีการทดลอง

เก็บดอกบานจากต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ อายุ 2 ปี และ 3 ปี จำนวน 5 ดอกต่อต้น ในแต่ละระดับพลอยดีใช้ 20 ต้น แล้วใช้เข็มเขี่ยละอองเรณูมาวางบนสไลด์ที่มีสี aceto-orcein 1% จำนวน 1 หยด ปิดทับด้วยกระจกสไลด์และปิดขอบด้วยน้ำยาทาเล็บ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางละอองเรณูที่ย้อมติดสีด้วยไมโครมิเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยวัดจำนวน 20 pollen ต่อดอก และวัด 100 pollen ต่อต้น

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยมีระดับพลอยดีของต้นปทุมมาลูกผสมเป็นสิ่งทดลอง คือ ต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ รวมเป็น 2 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 20 ซ้ำ (ต้น)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดยใช้ t –test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.3.1.3 การศึกษาจำนวนโครโมโซมเซลล์ปลายราก

วิธีการทดลอง

การตรวจสอบจำนวนโครโมโซมเซลล์ปลายรากทำในหัวพันธุ์ อายุ 1 ปี และ 2 ปี โดยเก็บรากจำนวน 3 รากต่อต้นและตรวจสอบจำนวนโครโมโซมของพืชทุกต้นโดยใช้วิธี

การศึกษาโครโมโซมที่ปรับปรุงจากวิธีการของ พรพิมล สุริยจันทราทอง และอรัญญา พิมพ์มงคล (2548) ดังนี้

1) เก็บตัวอย่างรากที่งอกใหม่จากหัวพันธุ์ปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ ยาวประมาณ 0.3 – 0.5 เซนติเมตร ในเวลา 06.30 – 09.00 น.

2) นำมาหยุดวงชีพเซลล์ (pretreatment) โดยแช่ปลายรากในสารละลาย paradichlorobenzene (PDB) ที่อิ่มตัวด้วยน้ำ ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ทำให้โครโมโซมหดสั้น และสามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ชัดเจน

3) หยุดการทำงานของเซลล์ (fixative) ด้วยน้ำยาคงสภาพเซลล์ ซึ่งเตรียมจาก absolute alcohol และ glacial acetic acid อัตราส่วน 3:1 ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4) แยกเซลล์รากให้ออกจากกันโดยแช่ปลายรากใน 1 N HCl นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วล้างรากด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

5) ย้อมเซลล์ปลายรากด้วยสี aceto-orcein 1% โดยย้อมสีนานเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

6) ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ เคาะเนื้อเยื่อด้วยยางลบดินสอเพื่อให้เซลล์ มีการกระจายตัว และปิดขอบกระจกสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บ

7) ถ่ายรูปเซลล์ที่มีโครโมโซมกระจายตัวดี และติดสีชัดเจน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ด้วยกล้องดิจิตอลกำลังขยาย 6 เท่า (ภาพขนาด 1,600 x 1,200 pixel)

8) ถ่ายโอนภาพจากกล้องดิจิตอลมายังเครื่องคอมพิวเตอร์ แล้วทำการนับจำนวนโครโมโซมจากภาพบนจอคอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรม ACDSee version 8.00 ที่กำลังขยาย 3 -5 เท่า นับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ ที่กระจายตัวดีและติดสีชัดเจน จำนวน 3 – 5 เซลล์ต่อต้น

3.3.2 การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์

วิธีการทดลอง

ทำการเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n=2x=28 และต้นเททระพลอยด์ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n=4x=56 ที่มีอายุ 2 ปี และ 3 ปี โดยเริ่มทำการบันทึกข้อมูลเมื่อมีดอกแรกบาน

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยมีระดับพลอยดีของต้นปทุมมาลูกผสมเป็นสิ่งทดลอง คือ ต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ รวมเป็น 2 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 20 ซ้ำ (ต้น)

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกข้อมูลลักษณะต่างๆ ดังนี้ จำนวนวันตั้งแต่ย้ายปลูกถึงออกดอก อายุการใช้งานของดอก ความสูงของต้น ความกว้างทรงพุ่ม จำนวนใบ ขนาดใบ ขนาดช่อดอก ขนาดดอก และส่วนประกอบต่างๆ ของดอก

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดยใช้ t –test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.3.2.1 การวัดอัตราสังเคราะห์แสงของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์

วิธีการทดลอง

วัดอัตราการสังเคราะห์แสงด้วยเครื่องวัดการสังเคราะห์แสงของพืชแบบกระเป๋าหิ้ว (ADC) รุ่น LCA-4 ในช่วง เวลา 10.00 – 11.30 น. ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ที่มีอายุ 2 ปี

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยมีระดับพลอยดีของต้นปทุมมาลูกผสมเป็นสิ่งทดลอง คือ ลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ รวมเป็น 2 สิ่งทดลอง มีจำนวนอย่างละ 20 ซ้ำ (ต้น)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดยใช้ t – test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.3.2.2 การวัดพื้นที่ใบของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์

วิธีการทดลอง

วัดพื้นที่ใบโดยใช้เครื่องวัดพื้นที่ใบ ของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ที่มีอายุ 2 ปี ในช่วง เวลา 09.00 – 11.00 น.

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยมีระดับพลอยดีของต้นปทุมมาลูกผสมเป็นสิ่งทดลอง คือ ลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ รวมเป็น 2 สิ่งทดลอง มีจำนวนอย่างละ 20 ซ้ำ (ต้น)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดยใช้ t – test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.3.3 การศึกษาเปรียบเทียบความสมบูรณ์พันธุ์ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์

3.3.3.1 การศึกษาความมีชีวิตของละอองเรณู

วิธีการทดลอง

เก็บดอกบานจากต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์อายุ 3 ปี จากนั้น นำละอองเรณูมาย้อมด้วยสี aceto-orcein 1% ศึกษาการติดสีของละอองเรณูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า เปรียบเทียบการติดสีของละอองเรณูจากเปอร์เซ็นต์การติดสีที่แตกต่างกัน คือ

0% ละอองเรณูไม่ติดสีย้อม

25% ละอองเรณูย้อมติดสีเพียงบางส่วน

50% ละอองเรณูย้อมติดสีได้ครึ่งเซลล์

75% ละอองเรณูย้อมติดสีเกือบทั้งเซลล์

100% ละอองเรณูย้อมติดสีสม่ำเสมอทั่วทั้งเซลล์

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยมีระดับพลอยดีของต้นปทุมมาลูกผสมเป็นสิ่งทดลอง คือ ลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ รวมเป็น 2 สิ่งทดลอง มีจำนวนอย่างละ 20 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 5 ดอก แล้วนำไปหาค่าเฉลี่ยต่อต้น

การบันทึกผลการทดลอง

นับจำนวนละอองเรณูที่ย้อมติดสีจำนวน 500 pollen ต่อต้น (ดอกละ 100 pollen) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า ละอองเรณูที่ติดสี 100% เป็นละอองเรณูที่มีชีวิต

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดยใช้ t – test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.3.3.2 การงอกของละอองเรณูในอาหารสังเคราะห์

วิธีการทดลอง

เก็บดอกบานจากต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์อายุ 3 ปี มาศึกษาการงอกของหลอดละอองเรณูในอาหารสูตร Taylor's ซึ่งมีส่วนประกอบต่าง ๆ ดังนี้ แคลเซียมไนเตรต 300 มก./ลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 140 มก./ลิตร และกรดบอริค 50 ก./ลิตร โดยเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างกัน คือ 0, 10, 20, 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ และหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการงอกหลอดละอองเรณูต่างกัน 3 ช่วงคือ 1, 3 และ 5 ชั่วโมง โดยทำการทดลองในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2551 มีอุณหภูมิเฉลี่ย 30 - 32 องศาเซลเซียส

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยมีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่างกัน 5 ระดับคือ 0, 10, 20, 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 20 ซ้ำ

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกการงอกของละอองเรณูที่มีความยาวของหลอดละอองเรณูมากกว่าสองเท่าของเส้นผ่านศูนย์กลางละอองเรณู และวัดความยาวของหลอดละอองเรณูที่งอก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า จำนวน 20 pollen ต่อซ้ำ แล้วนำไปหาค่าเฉลี่ย

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้วิธี Analysis of variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Least Significant Difference (LSD) โดยใช้โปรแกรม IRRISTAT for Window version 4.03

3.3.3.3 การศึกษาเปอร์เซ็นต์การผสมติดของปทุมมาลูกผสมในคู่ผสมต่างๆ

วิธีการทดลอง

ทำการผสมเกสรระหว่างปทุมมาลูกผสมในช่วงเช้าเวลา 07.00 - 09.00 น. โดยกำจัดละอองเรณูที่ใช้เป็นต้นแม่ก่อนที่จะนำละอองเรณูจากต้นอื่นมาผสม แล้วครอบช่อดอกต้นที่ผสมด้วยถุงตาข่าย เพื่อป้องกันแมลง ทำการผสมทั้งหมด 6 คู่ดังนี้

คู่ผสมที่	ต้นแม่ x ต้นพ่อ
1	ปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ x ปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์
2	ปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ x ปทุมมา
3	ปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ x ปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์
4	ปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ x ปทุมมา
5	ปทุมมา x ปทุมมา
6	ปทุมมา x ปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์

3.3.3.4 การศึกษาการพัฒนาของผลที่เกิดจากการผสมเกสรปทุมมาลูกผสมคู่ผสมต่าง ๆ

วิธีการทดลอง

เก็บฝักปทุมมาลูกผสมที่เกิดจากการผสมติดเมล็ดในคู่ผสมต่าง ๆ เปรียบเทียบลักษณะผล และพัฒนาการของผล

การบันทึกผลการทดลอง

ทำการบันทึกข้อมูลจำนวนวันหลังผสมเกสร น้ำหนักฝัก ขนาดผล จำนวนเมล็ดทั้งหมด จำนวนเมล็ดดี จำนวนเมล็ดลีบ

3.3.3.5 การศึกษาการงอกของเมล็ดปทุมมาลูกผสมในหลอดแก้ว

วิธีการทดลอง

เก็บผลปทุมมาลูกผสมจากคู่ผสมต่างๆ ที่มีจำนวนวันหลังผสมเกสรอายุต่าง ๆ คือ 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 และ 45 วัน มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร Murashige & Skoog (1962) (ภาคผนวก ข) ที่ดัดแปลงโดยเติม BA ความเข้มข้น 5 มก./ลิตร

3.3.4 การศึกษาสาเหตุความเป็นหมันจากความผิดปกติของไมโอซิสใน PMC

3.3.4.1 ระยะพัฒนาการของดอกอ่อนกับระยะการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส

วิธีการทดลอง

เก็บดอกอ่อนจากต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ อย่างละ 5 ต้น ในเวลา 07.30 – 09.00 น. แบ่งกลุ่มตามความยาวของดอกออกเป็น 4 ระยะ ดังนี้ ระยะที่ 1 ยาว 0.08 – 0.20 ซม. ระยะที่ 2 ยาว 0.19 – 0.35 ซม. ระยะที่ 3 ยาว 0.38 – 0.55 ซม. และ ระยะที่ 4 ยาว 0.53 – 1.25 ซม.หยุดการทำงานของเซลล์ด้วยน้ำยาคงสภาพ ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ศึกษาระยะการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของ pollen mother cells ในดอกอ่อนด้วยเทคนิค squash method (ภาคผนวก ข) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยมีความยาวของดอกระยะต่าง ๆ จากต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ เป็นสิ่งทดลอง จำนวนอย่างละ 10 ซ้ำ (ต้น) (ต้นละ 4 ระยะ)

การบันทึกผลการทดลอง

ทำการบันทึกข้อมูล ขนาดของดอก ขนาดของอับเรณู และระยะการแบ่งเซลล์ที่พบในดอกระยะต่างๆ

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้วิธี Analysis of variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Least Significant Difference (LSD) โดยใช้โปรแกรม IRRISTAT for Window version 4.03

3.3.4.2 การศึกษาความยาวนานในการหยุดวงชีพจักรเซลล์

วิธีการทดลอง

เก็บดอกอ่อนจากต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ อย่างละ 3 ต้น แช่สารละลาย PDB ที่อิ่มตัวด้วยน้ำ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างกัน 5 ช่วง คือ 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง แล้วทำการศึกษาโครโมโซมด้วยเทคนิค squash method ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

การบันทึกผลการทดลอง

การบันทึกข้อมูล เปรียบเทียบลักษณะรูปร่างของโครโมโซม และลักษณะการหดตัวของโครโมโซม

3.3.4.3 การศึกษาชนิดสีและระยะเวลาในการย้อมสีโครโมโซม

วิธีการทดลอง

เก็บดอกอ่อนจากต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ อย่างละ 3 ต้น โดยเปรียบเทียบชนิดสีที่ใช้ย้อม 2 ชนิด คือ aceto-orcein และ lacto-propionic orcein และระยะเวลาในการย้อมสีต่างกัน 4 ระดับ คือ 10, 15, 20, และ 30 นาทีแล้วทำการศึกษาโครโมโซมด้วยเทคนิค squash method (ภาคผนวก ค) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

การบันทึกผลการทดลอง

การบันทึกผล เปรียบเทียบลักษณะการติดสีโครโมโซมจากการย้อมสีสองชนิด และลักษณะการติดสีของโครโมโซมที่ย้อมในระยะเวลาต่างๆ กัน

3.3.4.4 การศึกษาความผิดปกติของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส

วิธีการทดลอง

เก็บดอกอ่อนจากต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ อย่างละ 10 ต้น หยุดวงชีพจักรเซลล์ด้วย PDB นาน 2 ชั่วโมง แช่ในน้ำยาคงสภาพ ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วย้อมเซลล์ดอกอ่อนด้วยสี lacto - propionic orcein นาน 15 นาที ศึกษาโครโมโซมด้วยเทคนิค squash method ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

การบันทึกผลการทดลอง

การบันทึกผล เปรียบเทียบลักษณะการเข้าคู่ของโครโมโซม และความผิดปกติของโครโมโซมในระยะโปรเฟส I เมตาเฟส I แอนาเฟส I และไมโอซิส II (เปอร์เซ็นต์การเกิด chromosome bridges, chromosome lagging, micronuclei และ tetrads) โดยนับจำนวน 60 - 100 เซลล์

3.4 ระยะเวลาทำการวิจัย

มิถุนายน 2549 ถึง ตุลาคม 2551

3.5 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การตรวจสอบยืนยันความเป็นดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ในปทุมมาลูกผสม

ผลการตรวจสอบขนาดความยาวเซลล์คุมปากใบ ขนาดละอองเรณูและจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าต้นปทุมมาลูกผสมที่ย้ายปลูกทั้งสองฤดูปลูกมีความเป็นดิพลอยด์และเททระพลอยด์อย่างแท้จริง

4.1.1 ขนาด และจำนวนเซลล์คุมปากใบ

ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 1 และ 2 พบว่าต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์มีขนาดเซลล์คุมปากใบใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ แต่มีจำนวนเซลล์คุมปากใบเฉลี่ยต่อพื้นที่น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทั้งสองฤดูปลูก ทั้งนี้ขนาดเซลล์คุมปากใบของต้นเททระพลอยด์ใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ 1.32 และ 1.36 เท่า ในต้นอายุ 2 และ 3 ปี ตามลำดับ แต่จำนวนปากใบต่อพื้นที่ของต้นเททระพลอยด์น้อยกว่าในต้นดิพลอยด์ 1.6 และ 1.7 เท่า ในต้นอายุ 2 และ 3 ปี ตามลำดับ ขนาดและจำนวนปากใบต่อพื้นที่แสดงในภาพที่ 3 และ 4

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยความยาวเซลล์คุมปากใบ และจำนวนปากใบต่อพื้นที่ของปทุมมาลูกผสม ดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ อายุ 2 ปี

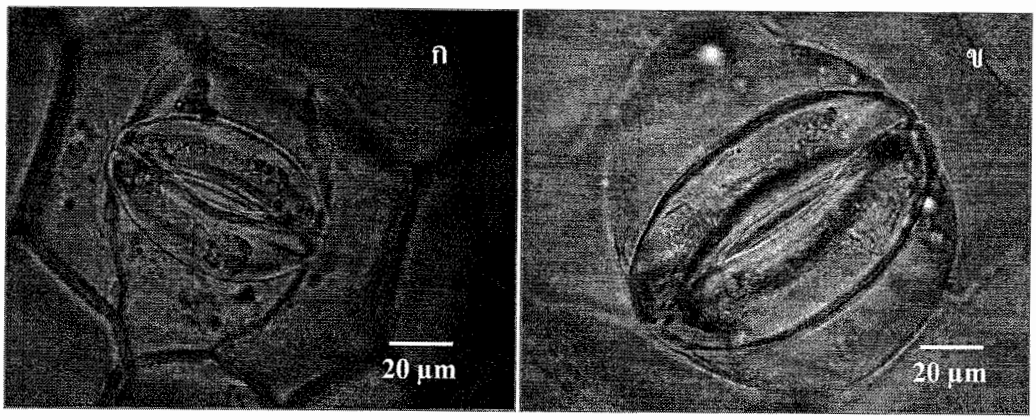
ลักษณะที่วัด	ระดับพลอยดี	
	ดิพลอยด์	เททระพลอยด์
ความยาวเซลล์คุมปากใบ (ไมครอน)	45.98 b [1/]	60.86 a
จำนวนปากใบต่อพื้นที่ (ตร.ซม.)	5,218.75 a	3,312.50 b

[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

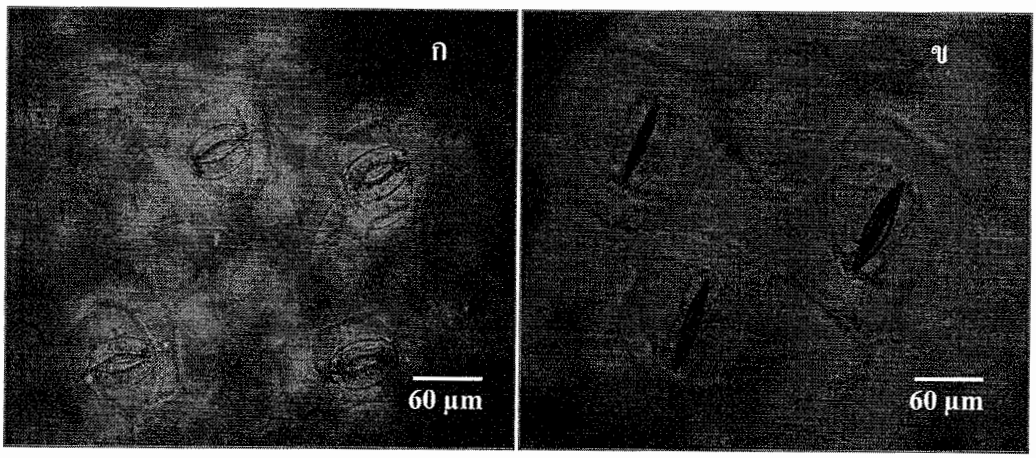
ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยความยาวเซลล์คุมปากใบและจำนวนปากใบต่อพื้นที่ของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ อายุ 3 ปี

ลักษณะที่วัด	ระดับพลอยดี	
	ดิพลอยด์	เททระพลอยด์
ความยาวเซลล์คุมปากใบ (ไมครอน)	43.44 b [1/]	59.15 a
จำนวนปากใบต่อพื้นที่ (ตร.ซม.)	5,435.29 a	3,188.29 b

[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$



ภาพที่ 3 ขนาดเซลล์คุมปากใบของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ (ก) และเททระพลอยด์ (ข)



ภาพที่ 4 จำนวนปากใบต่อพื้นที่ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ (ก) และเททระพลอยด์ (ข)

4.1.2 จำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก

ผลการตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ พบว่าต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเป็น 2n=2x=28 แท่ง (ภาพที่ 5ก) ส่วนต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเป็น 2n=4x=56 แท่ง (ภาพที่ 5ข)

ภาพที่ 5 โครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ (ก) และเททระพลอยด์ (ข)

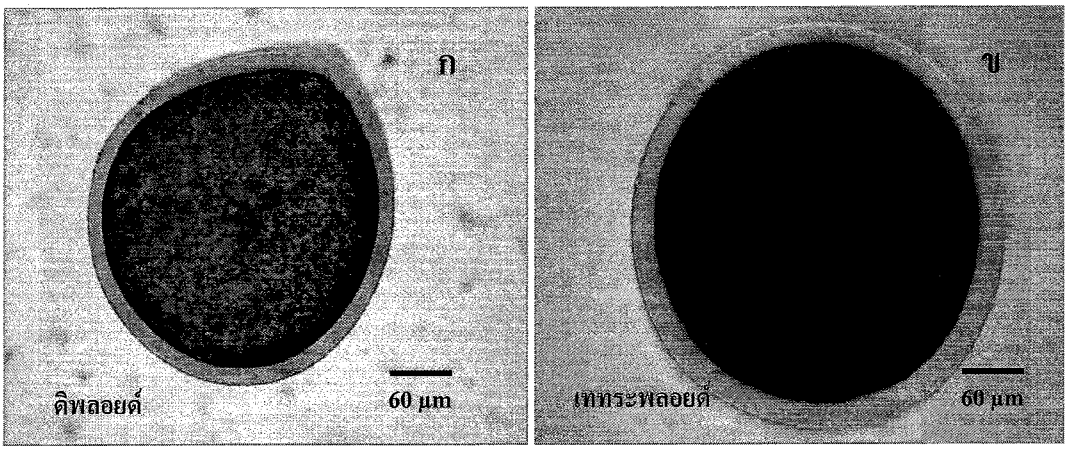
4.1.3 ขนาดละอองเรณู

ผลการตรวจสอบความเป็นเททระพลอยด์ของต้นปทุมมาลูกผสมโดยการวัดขนาดละอองเรณูของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ พบว่า ต้นเททระพลอยด์มีเส้นผ่านศูนย์กลางของละอองเรณูมากกว่าต้นดิพลอยด์ ประมาณ 1.3 เท่า แสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 6

ตารางที่ 3 ขนาดละอองเรณูของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ อายุ 2 และ 3 ปี

ระดับพลอยดี	ขนาดละอองเรณู (ไมครอน)	
	ต้นอายุ 2 ปี	ต้นอายุ 3 ปี
ดิพลอยด์	65.25 ± 5.81 b	66.45 ± 7.51 b
เททระพลอยด์	83.55 ± 7.77 a	84.63 ± 8.22 a

[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$



ภาพที่ 6 ละอองเรณูของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ (ก) และเททระพลอยด์ (ข) อายุ 3 ปี

4.2 การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์

4.2.1 ลักษณะต้น

ลักษณะต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์อายุ 2 และ 3 ปี แสดงในตารางที่ 4 และ 5 และภาพที่ 7 พบว่า การเจริญเติบโตด้านความสูงของต้น และจำนวนใบต่อต้นของต้นปทุมมาลูกผสมทั้งสองระดับพลอยดีมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์มีขนาดความกว้าง และความยาวใบมากกว่าต้นดิพลอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่งผลให้พื้นที่ใบเฉลี่ยต่อต้นมากขึ้น และทำให้มีความกว้างทรงพุ่มเพิ่มขึ้น แต่ต้นปทุมมาลูกผสมที่มีอายุ 3 ปี มีการเจริญเติบโตด้านความสูงได้มากกว่าต้นอายุ 2 ปี สังเกตได้จากค่าเฉลี่ยที่เพิ่มมากขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยความสูงของต้นจะเพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณ 5–6 ซม. และความกว้างทรงพุ่มเพิ่มขึ้น 2 – 5 ซม.

นอกจากนี้ผลการเปรียบเทียบการวัดอัตราการสังเคราะห์แสง และวัดขนาดพื้นที่ใบของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ ที่มีอายุ 2 ปี พบว่า ต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์มีอัตราการสังเคราะห์แสงที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยเป็น 2.44 และ 3.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์มีขนาดพื้นที่ใบมากกว่าต้นดิพลอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพื้นที่ใบของต้นเททระพลอยด์มีพื้นที่ใบเฉลี่ยเป็น 650.41 ตารางเซนติเมตร ส่วนต้นดิพลอยด์มีค่าเฉลี่ยเป็น 493.91 ตารางเซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์

ลักษณะที่ศึกษา	ต้นอายุ 2 ปี	
	ดิพลอยด์ [1/]	เททระพลอยด์
ความสูงของต้น (ซม.)	45.42 ± 4.69 a	46.43 ± 4.14 a
ความกว้างทรงพุ่ม (ซม.)	53.50 ± 3.89 b	60.00 ± 4.75 a
จำนวนใบต่อต้น	4.60 ± 0.94 a	5.38 ± 0.80 a
ความกว้างใบ (ซม.)	7.23 ± 1.43 b	9.11 ± 1.18 a
ความยาวใบ (ซม.)	24.44 ± 2.90 b	29.13 ± 3.51 a

[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์

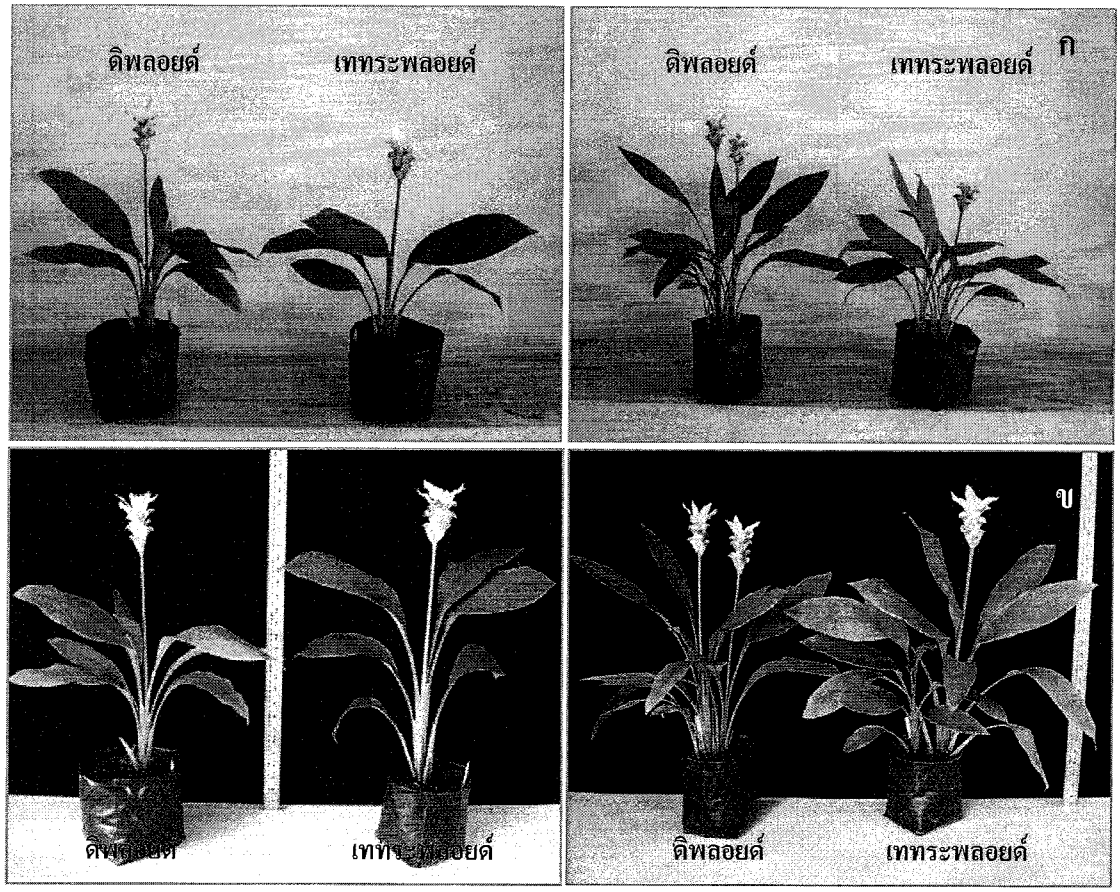
ลักษณะที่ศึกษา	ต้นอายุ 3 ปี	
	ดิพลอยด์[1/]	เททระพลอยด์
ความสูงของต้น (ซม.)	50.18 ± 5.62 a	52.01 ± 3.83 a
ความกว้างทรงพุ่ม (ซม.)	55.50 ± 4.10 b	65.00 ± 3.75 a
จำนวนใบต่อต้น	5.45 ± 1.05 a	5.05 ± 1.10 a
ความกว้างใบ (ซม.)	7.43 ± 1.29 b	9.62 ± 1.20 a
ความยาวใบ (ซม.)	26.00 ± 2.99 b	28.48 ± 3.43 a

[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยอัตราการสังเคราะห์แสง และขนาดพื้นที่ใบทั้งหมดของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ อายุ 2 ปี

ระดับพลอยดี	อัตราการสังเคราะห์แสง ($\mu mol/s^{-1}$)	พื้นที่ใบ $(ซม.)^2$
ดิพลอยด์	2.44 a[1/]	493.91±116.76 b
เททระพลอยด์	3.67 a	650.41±158.27 a

[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$



ภาพที่ 7 ลักษณะต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ ที่มีอายุ 2 ปี (ก) และ 3 ปี (ข)

4.2.2 ลักษณะช่อดอกและดอก

ลักษณะช่อดอกแสดงในภาพที่ 8 และขนาดช่อดอกแสดงในตารางที่ 7 และ 8 โดยลักษณะช่อดอกของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ที่มีอายุ 2 ปี จะมีความยาวของช่อดอก ความยาวก้านช่อดอก จำนวนกลีบประดับส่วนบน และจำนวนกลีบประดับส่วนล่าง มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ความกว้างของช่อดอกและขนาดก้านช่อดอกของต้นที่เป็นเททระพลอยด์มีขนาดที่ใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยความกว้างของช่อดอกต้นเททระพลอยด์มีค่าเป็น 10.17 และ 9.43 ซม ตามลำดับ และเส้นรอบวงก้านช่อดอกของต้นเทระพลอยด์และต้นดิพลอยด์มีค่าเป็น 1.76 และ 1.22 ซม ตามลำดับ ขนาดความกว้างของช่อดอกและเส้นรอบวงก้านช่อดอกที่ใหญ่ขึ้นนี้ มีผลทำให้ต้นเททระพลอยด์มีอายุการใช้งานของดอกมากกว่าต้นดิพลอยด์ถึง 7 วัน ในขณะเดียวกันต้นปทุมมาทั้งสองระดับพลอยดีนี้มีจำนวนวันตั้งแต่ย้ายปลูกถึงออกดอกใกล้เคียงกัน คือ 107 วัน ในต้นดิพลอยด์ และ 105 วัน ในต้นเททระพลอยด์

ในทำนองเดียวกันลักษณะช่อดอกของต้นปทุมมาลูกผสมอายุ 3 ปี มีแนวโน้มเป็นไปในทางเดียวกันกับต้นที่มีอายุ 2 ปี แต่จำนวนกลีบประดับส่วนบน และกลีบประดับส่วนล่างเฉลี่ยต่อต้นของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ที่มีอายุ 3 ปี จะมีจำนวนมากกว่าต้นอายุ 2 ปี ประมาณ 1 – 2 กลีบ นอกจากนี้ยังพบว่าต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ที่มีอายุ 3 ปี จะมีการเจริญเติบโตได้เร็วกว่าต้นอายุ 2 ปี ซึ่งสังเกตได้จากจำนวนวันตั้งแต่ย้ายปลูกถึงดอกแรกบานที่มีจำนวนวันลดลงประมาณ 19 – 25 วัน

ผลการเปรียบเทียบลักษณะดอกของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ที่มีอายุ 2 และ 3 ปี แสดงในตารางที่ 9 และ 10 พบว่า ความยาวดอก และส่วนประกอบต่าง ๆ ของดอก เช่น ความยาวก้านดอก ความยาวอับเรณู ความยาวก้านเกสรเพศเมีย และความหนาของกลีบปากสตามิโนด ในต้นที่เป็นเททระพลอยด์จะมีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ความกว้างของดอกมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน การเปรียบเทียบขนาดของดอกและส่วนประกอบของดอกในต้นทั้งสองพลอยดีแสดงในภาพที่ 9 นอกจากนี้ยังสังเกตพบว่า อับเรณูของต้นที่เป็นเททระพลอยด์นอกจากจะมีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์แล้ว ยังมีปริมาณละอองเรณูที่เพิ่มมากขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 10 ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้จะสามารถสังเกตเห็นได้ในระยะดอกบานเท่านั้น

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบลักษณะช่อดอกของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์

ลักษณะที่ศึกษา	ต้นอายุ 2 ปี	
	ดิพลอยด์	เททระพลอยด์
จำนวนวันตั้งแต่ย้ายปลูกถึงออกดอก	107 ± 8.93 a	105 ± 9.14 a
อายุการใช้งาน(จำนวนวันตั้งแต่ออกดอกถึงดอกสุดท้ายบาน)	50 ± 3.61 b	57 ± 6.20 a
ความยาวช่อดอก (ซม.)	9.43 ± 1.02 a	10.17 ± 1.03 a
ความยาวก้านช่อดอก (ซม.)	22.73 ± 3.45 a	23.71 ± 2.97 a
เส้นรอบวงก้านช่อดอก (ซม.)	1.22 ± 0.11 b	1.76 ± 0.225 a
ความกว้างช่อดอก (ซม.)	6.40 ± 0.97 b	8.10 ± 1.14 a
จำนวนกลีบประดับส่วนล่าง (bract)	7.60 ± 0.75 a	7.48 ± 0.81 a
จำนวนกลีบประดับส่วนบน (comma bract)	6.45 ± 1.10 a	5.43 ± 0.93 a

[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบลักษณะดอกของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์

ลักษณะที่ศึกษา	ต้นอายุ 3 ปี	
	ดิพลอยด์	เททระพลอยด์
จำนวนวันตั้งแต่ย้ายปลูกถึงออกดอก	82 ± 3.20 a[1/]	84 ± 7.39 a
อายุการใช้งาน(จำนวนวันตั้งแต่ออกดอกถึงดอกสุดท้ายบาน)	59 ± 8.51 b	65 ± 6.20 a
ความยาวช่อดอก (ซม.)	9.68 ± 1.35 b	11.05 ± 1.42 a
ความยาวก้านช่อดอก (ซม.)	23.40 ± 3.53 a	24.15 ± 2.47 a
เส้นรอบวงก้านช่อดอก (ซม.)	1.24 ± 0.11 b	1.84 ± 0.18 a
ความกว้างช่อดอก (ซม.)	6.52 ± 0.45 b	8.54 ± 1.29 a
จำนวนกลีบประดับส่วนล่าง (bract)	8.54 ± 0.85 a	8.12 ± 1.02 a
จำนวนกลีบประดับส่วนบน (comma bract)	7.60 ± 1.20 a	7.75 ± 1.36 a

[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

ตารางที่ 9 การเปรียบเทียบลักษณะดอกของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์

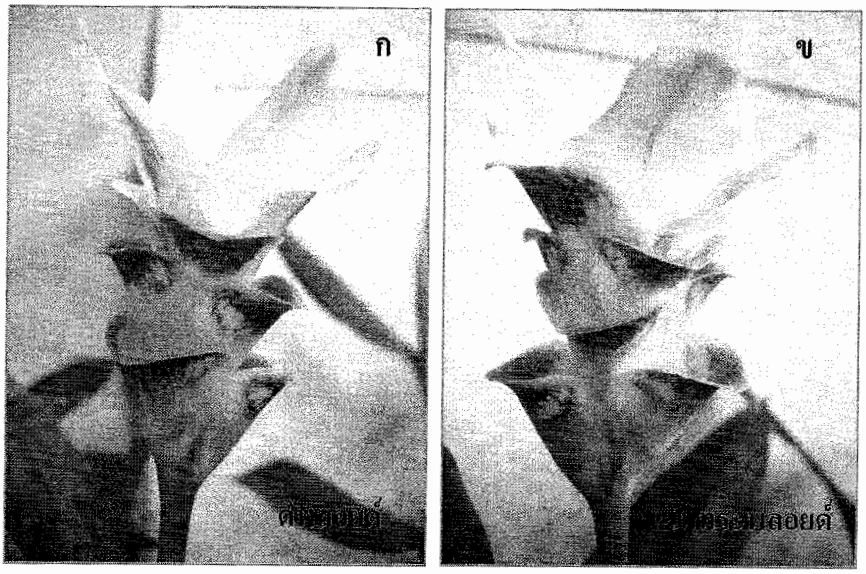
ลักษณะที่ศึกษา	ต้นอายุ 2 ปี	
	ดิพลอยด์	เททระพลอยด์
ความยาวดอก (ซม.)	3.21±0.12 b [1/]	3.81±0.23 a
ความกว้างดอก (ซม.)	1.63±0.15 a	1.88±0.69 a
ความยาวก้านดอกจริง (ซม.)	1.11±0.04 b	1.31±0.06 a
ความยาวอับละอองเกสร (ซม.)	0.55±0.02 b	0.66±0.06 a
ความยาวก้านเกสรเพศเมีย (ซม.)	2.41±0.07 b	2.72±0.22 a
ความหนากลีบปากสตามิโนด (ซม.)	0.07±0.01 b	0.11±0.01 a

[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

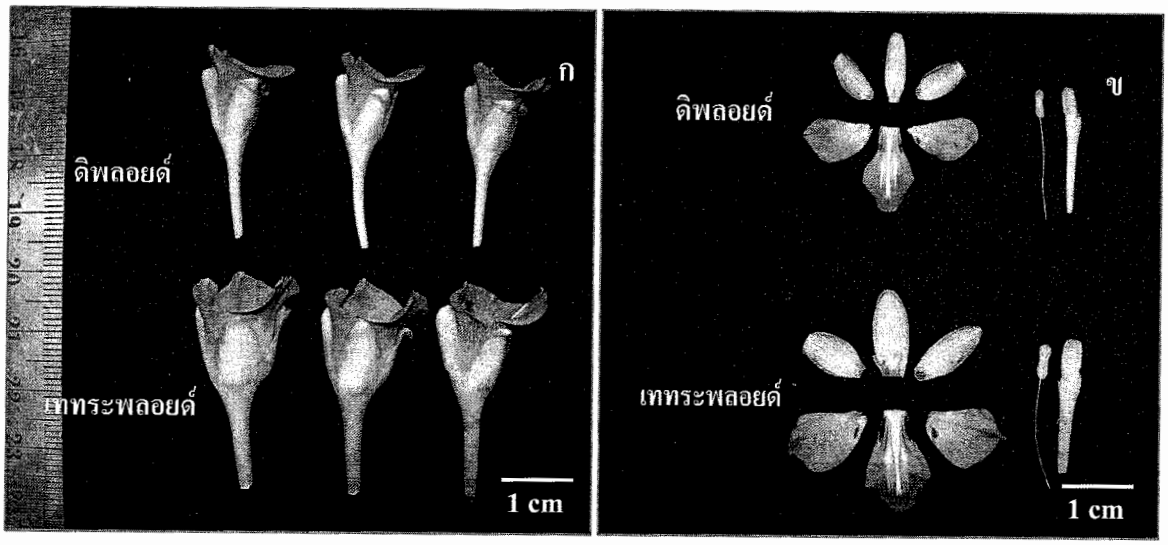
ตารางที่ 10 การเปรียบเทียบลักษณะดอกของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์

ลักษณะที่ศึกษา	ต้นอายุ 3 ปี	
	ดิพลอยด์	เททระพลอยด์
ความยาวดอก (ซม.)	3.23±0.18 b [1/]	3.85±0.29 a
ความกว้างดอก (ซม.)	1.69±0.15 a	1.90±1.38 a
ความยาวก้านดอกจริง (ซม.)	1.12±0.10 b	1.33±0.11 a
ความยาวอับละอองเกสร (ซม.)	0.56±0.05 b	0.68±0.05 a
ความยาวก้านเกสรเพศเมีย (ซม.)	2.52±0.13 b	2.84±0.25 a
ความหนากลีบปากสตามิโนด (ซม.)	0.08±0.01 b	0.12±0.01 a

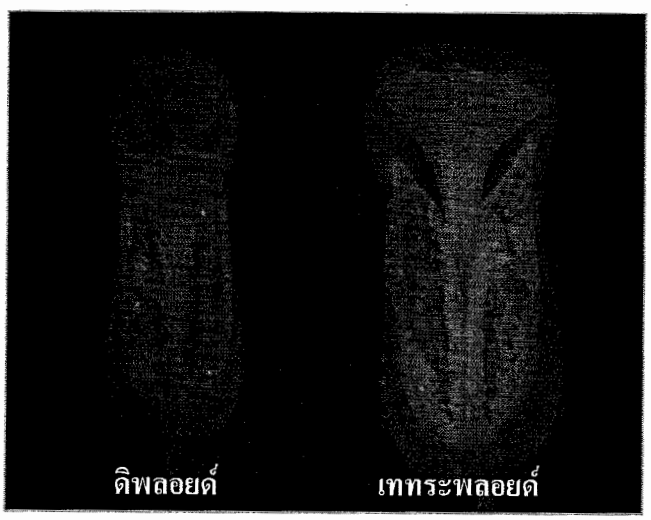
[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$



ภาพที่ 8 ลักษณะช่อดอกของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ (ก) และเททระพลอยด์ (ข)



ภาพที่ 9 ดอกจริงของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ (ก) และส่วนประกอบของดอก



ภาพที่ 10 ลักษณะอับเรณูของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์

4.2.3 ลักษณะหัวพันธุ์

ลักษณะต่างๆ ของหัวพันธุ์ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ อายุ 2 ปี และ 3 ปี แสดงในตารางที่ 11 และ 12 หัวพันธุ์ของต้นเททระพลอยด์มีขนาดใหญ่กว่าหัวพันธุ์ของต้นดิพลอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยต้นเททระพลอยด์มีน้ำหนักหัวเฉลี่ยต่อต้นในต้นอายุ 2 ปี และ 3 ปี เป็น 34.43 และ 92.84 กรัม ตามลำดับ ส่วนต้นดิพลอยด์มีค่าเฉลี่ยเป็น 28.08 และ 77.52 กรัม ตามลำดับ ทั้งนี้หัวพันธุ์ที่ได้จากต้นเททระพลอยด์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัว และจำนวนรากสะสมอาหารมากกว่าต้นดิพลอยด์ ในขณะที่จำนวนหัวต่อต้นมีแนวโน้มใกล้เคียงกัน และไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ลักษณะของหัวพันธุ์ปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ อายุ 3 ปี แสดงในภาพที่ 11 จะเห็นได้ว่า หัวพันธุ์ของต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์มีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ และมีขนาดของรากและตุ้มสะสมอาหาร ที่ใหญ่กว่ามาก นอกจากนี้ หัวพันธุ์ที่ได้จากต้นอายุ 3 ปี ของทั้งสองระดับพลอยดีมีขนาดใหญ่กว่าหัวพันธุ์จากต้นอายุ 2 ปี ถึง 2.7 เท่า

ตารางที่ 11 ลักษณะหัวพันธุ์ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ จากต้นอายุ 2 ปี

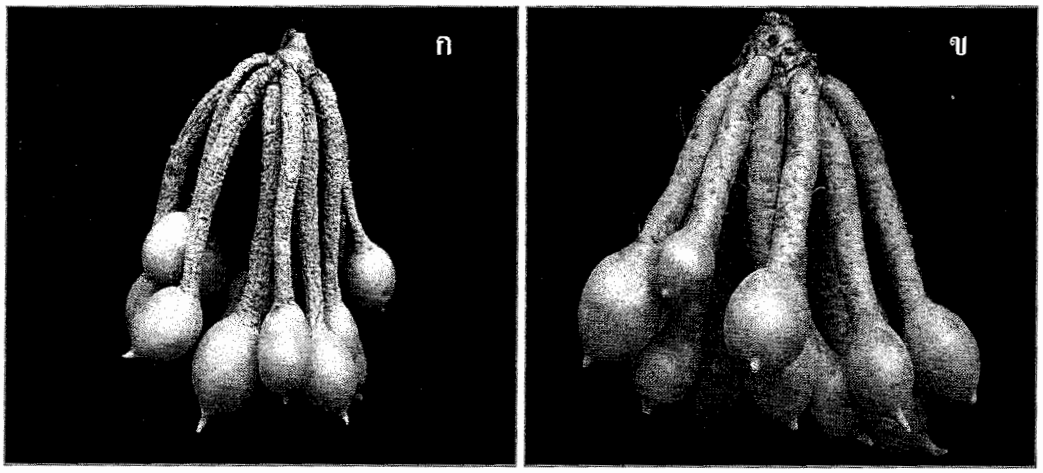
ลักษณะที่วัด	ระดับพลอยดี	
	ดิพลอยด์	เททระพลอยด์
น้ำหนักสดของหัวต่อต้น (กรัม)	28.08±14.02 b [1/]	34.43±19.06 a
จำนวนหัวต่อต้น	1.40±0.49 a	1.70±0.56 a
จำนวนรากสะสมอาหารต่อหัวพันธุ์หลัก	5.83±2.95 b	8.00±3.83 a
เส้นผ่านศูนย์กลางหัวพันธุ์ (ซม.)	0.59±0.72 a	0.72±0.32 a

[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

ตารางที่ 12 ลักษณะหัวพันธุ์ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ จากต้นอายุ 3 ปี

ลักษณะที่วัด	ระดับพลอยดี	
	ดิพลอยด์	เททระพลอยด์
น้ำหนักหัวต่อต้น (กรัม)	77.52±32.82 b [1/]	92.84±36.01 a
จำนวนหัวต่อต้น	2.38±0.92 a	2.48±1.04 a
จำนวนรากสะสมอาหาร	11.15±3.01 b	15.55±4.71 a
เส้นผ่านศูนย์กลางหัวพันธุ์ (ซม.)	1.43±0.22 b	1.95±0.24 a

[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$



ภาพที่ 11 ลักษณะหัวพันธุ์ปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ (ก) และเททระพลอยด์ (ข)

4.3 การศึกษาเปรียบเทียบความสมบูรณ์พันธุ์ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์

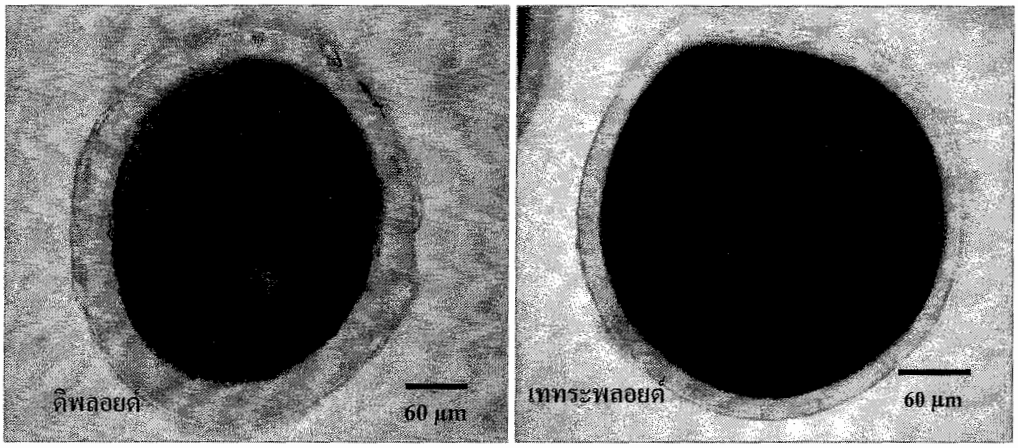
4.3.1 การศึกษาความมีชีวิตของละอองเรณู

การเปรียบเทียบความมีชีวิตของละอองเรณูของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์อายุ 3 ปี พบว่า ละอองเรณูของต้นดิพลอยด์ที่มีชีวิตจะย้อมติดสีอะซีโตออซีนมีเพียงร้อยละ 0.74 ส่วนละอองเรณูที่เหลือเกือบทั้งหมดไม่มีชีวิต และไม่ติดสีย้อมสูงถึงร้อยละ 61.24 แต่ละอองเรณูของต้นเททระพลอยด์ที่มีชีวิต และย้อมติดสีอะซีโตออซีนมีค่าเป็นร้อยละ 17.97 ดังแสดงในตารางที่ 13 และภาพที่ 12 นอกจากนี้ การตรวจสอบความมีชีวิตของละอองเรณูยังพบความผิดปกติทางด้านสัณฐานวิทยาของละอองเรณูทั้งต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ได้หลายแบบ เช่น การมีผนังเซลล์หนา ขนาดของละอองเรณูมีหลายขนาด และละอองเรณูมีรูปร่างบิดเบี้ยว (ภาพที่ 13)

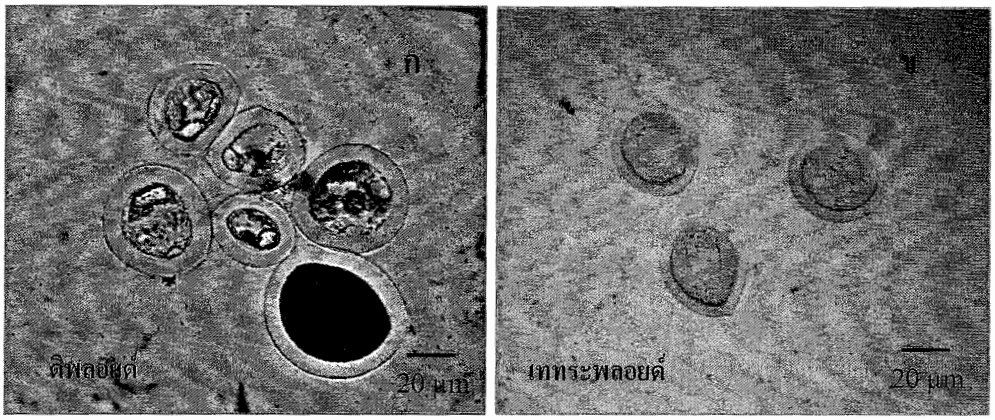
ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์การย้อมติดสีอะซีโตออซีนของละอองเรณูของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ อายุ 3 ปี

ระดับพลอยดี	เปอร์เซ็นต์การย้อมติดสี (%)				
	0%	25%	50%	75%	100%
ดิพลอยด์[1/]	61.24 a	31.40 a	5.00 b	1.62 b	0.74 b
เททระพลอยด์[1/]	41.80 b	16.46 b	10.00 a	10.45 a	17.97 a

[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$



ภาพที่ 12 ละอองเรณูของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ (ก) และเททระพลอยด์ (ข)



ภาพที่ 13 ละอองเรณูของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ที่ผิดปกติย้อมไม่ติดสีอะซีโตออซีน มีผนังเซลล์หนา และมีหลายขนาดปะปนกัน

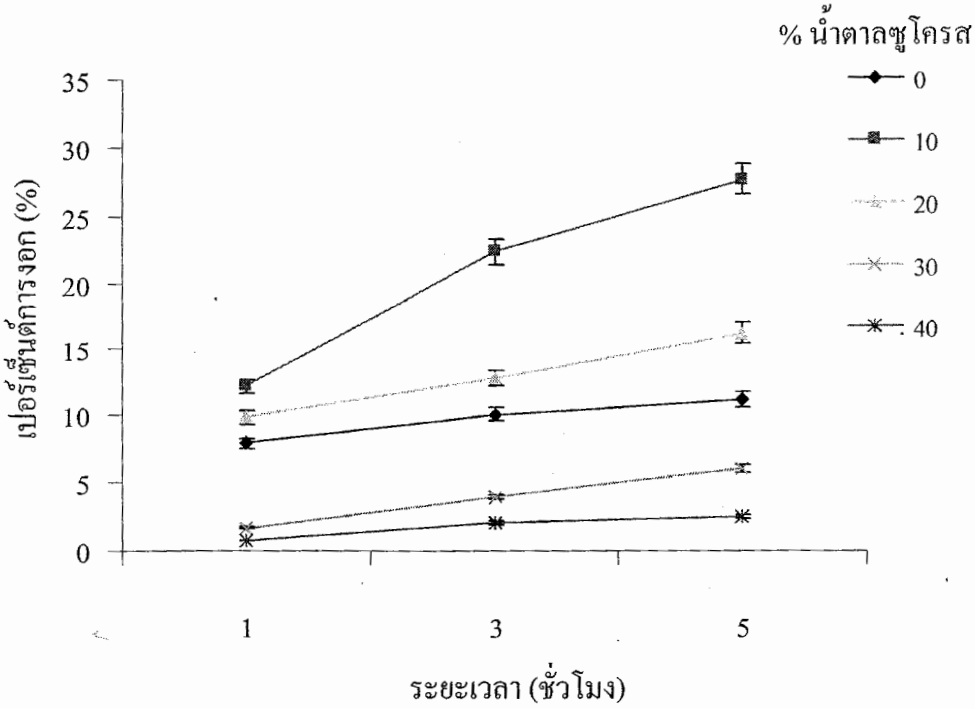
4.3.2 การงอกของละอองเรณู

การตรวจสอบความงอกของละอองเรณูของต้นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ในอาหารสูตร Taylor's ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่า ละอองเรณูของต้นดิพลอยด์ไม่สามารถงอกหลอดเรณูได้ในทุกระดับความเข้มข้นของน้ำตาล แต่ละอองเรณูของต้นเททระพลอยด์สามารถงอกหลอดละอองเรณูได้ดีที่สุดในอาหารสูตร Taylor's ที่เติมซูโครสความเข้มข้น 10% คิดเป็นร้อยละ 12.22, 22.38 และ 27.62 ที่ระยะเวลา 1, 3 และ 5 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 14 และภาพที่ 14) ส่วนการยืดยาวของหลอดละอองเรณูมีความยาวมากที่สุดหลังจากเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์นานเป็นเวลา 5 ชั่วโมง (ตารางที่ 15 และภาพที่ 15, 16) นอกจากนี้ยังพบว่า ละอองเรณูของต้นดิพลอยด์ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ มีลักษณะโปร่งแสงปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 17ก) แต่ละอองเรณูของต้นเททระพลอยด์มีละอองเรณูที่ทึบแสงเกือบทั้งหมด (ภาพที่ 17ข)

ตารางที่ 14 เปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเรณูปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ในอาหารสูตร Taylor's ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, และ 40 % นานเป็นระยะเวลา 1, 3 และ 5 ชั่วโมง

ความเข้มข้นซูโครส	ระยะเวลาที่เลี้ยงในอาหาร (ชั่วโมง)		
(%)	1	3	5
0	7.94 b[1/]	10.10 b	11.24 b
10	12.22 a	22.38 a	27.62 a
20	9.84 ab	12.84 b	16.26 b
30	1.68 c	3.94 c	6.04 c
40	0.72 c	2.06 c	2.50 c
$LSD_{p\leq 0.05}$	**2.90**	**4.14**	**5.04**

[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

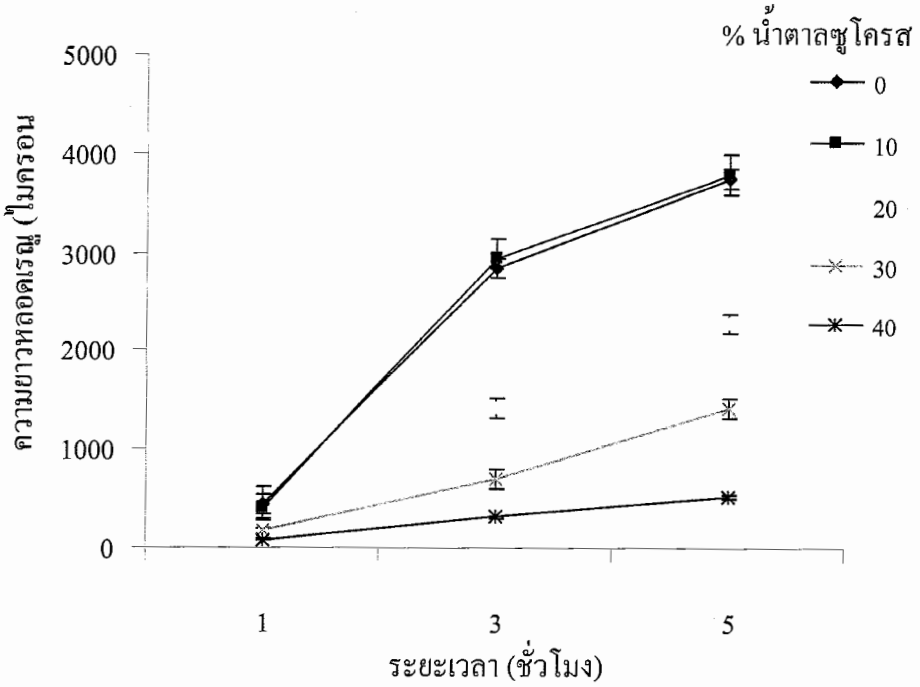


ภาพที่ 14 เปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเรณูในปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ในอาหารสูตร Taylor's ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นระดับต่างๆในระยะเวลาต่าง ๆ กัน

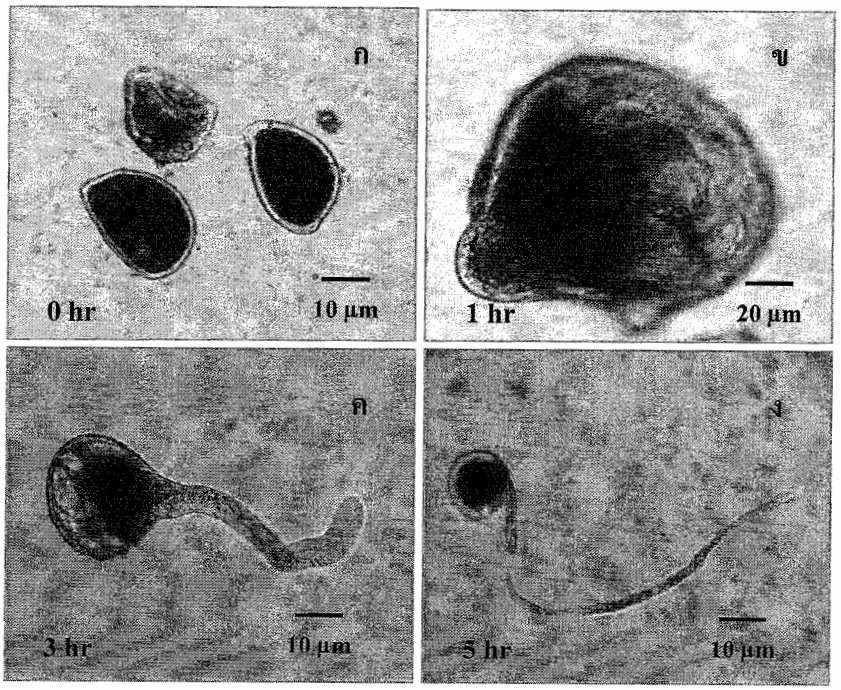
ตารางที่ 15 ความยาวของหลอดละอองเรณู (ไมครอน) ปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ในอาหารสูตร Taylor's ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, และ 40 % นานเป็นระยะเวลา 1, 3 และ 5 ชั่วโมง

ความเข้มข้นซูโครส	**ระยะเวลาที่เลี้ยงในอาหาร (ชั่วโมง)**		
(%)	**1**	**3**	**5**
0	435.40 a[1/]	2850.50 a	3770.00 a
10	405.20 a	2956.00 a	3810.00 a
20	196.30 b	1410.70 b	2280.70 b
30	173.80 b	705.70 c	1400.00 c
40	89.60 c	310.50 d	520.50 d
LSD $_{P \leq 0.05}$	**44.59**	**267.71**	**355.74**

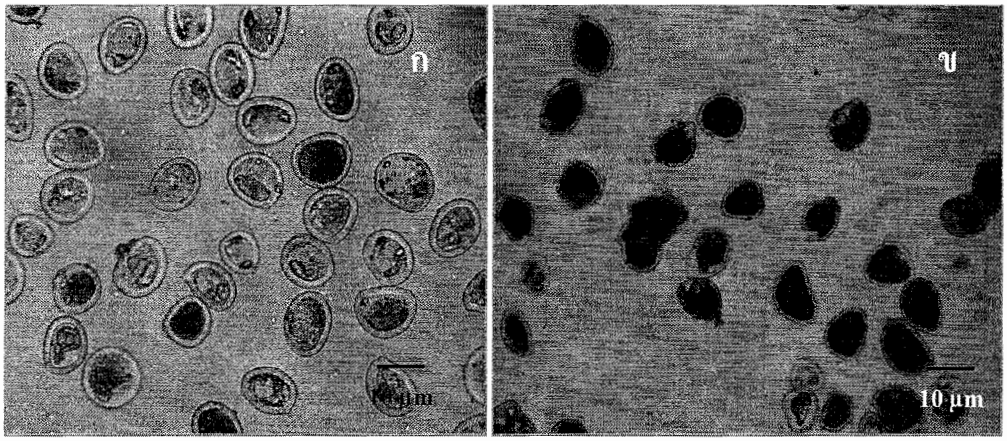
[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$



ภาพที่ 15 ความยาวของหลอดเรณูปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ในอาหารสูตร Taylor's ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, และ 40 % นานเป็นระยะเวลาต่างๆ



ภาพที่ 16 การงอกของละอองเรณูปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ในอาหารสังเคราะห์สูตร Taylor's ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 10 % นานเป็นระยะเวลา 0, 1, 3 และ 5 ชั่วโมง (ก - ง)



ภาพที่ 17 ละอองเรณูปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ (ก) และเททระพลอยด์ (ข) ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร Taylor's

4.3.3 การศึกษาเปอร์เซ็นต์ผสมติดของปทุมมาลูกผสม

การถ่ายละอองเรณูในต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ ปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ และปทุมมา ที่มีอายุ 3 ปี โดยการจับคู่ผสมทั้งหมด 7 คู่ผสม ผลการศึกษา พบว่า ในคู่ผสมที่ 6 ซึ่งผสมระหว่างปทุมมา x ปทุมมา มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดมากที่สุด คือ 22.80% รองลงมา คือ คู่ผสมที่ 4 (ลูกผสมเททระพลอยด์ x เททระพลอยด์) คู่ผสมที่ 5 (ลูกผสมเททระพลอยด์ x ปทุมมา) และคู่ผสมที่ 7(ปทุมมา x ลูกผสมเททระพลอยด์) มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดเป็นร้อยละ 15.63 ร้อยละ 14.44 และร้อยละ 12.59 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 16 ในขณะที่คู่ผสมที่ 1 และ 2 ซึ่งเป็นคู่ผสมระหว่างปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดต่ำที่สุด คือ ร้อย 1.33 และ ร้อยละ 5 เท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่าต้นลูกผสมดิพลอยด์มีละอองเรณูที่เป็นหมัน เพราะเกิดจากการผสมข้ามชนิดระหว่างปทุมมากับบัวโกเมน พืชทั้งสองชนิดนี้มีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน ลูกผสมที่ได้จึงเป็นหมันไม่สามารถที่จะขยายพันธุ์ต่อไปได้

ตารางที่ 16 เปอร์เซ็นต์การผสมติดของปทุมมาลูกผสมในคู่ผสมต่าง ๆ

คู่ผสม	จำนวนดอกที่ผสม	จำนวนดอกที่ผสมติด	% การผสมติด
1. ดิพลอยด์ x ดิพลอยด์	200	0	0.00
2. ดิพลอยด์ x เททระพลอยด์	150	2	1.33
3. ดิพลอยด์ x ปทุมมา	100	5	5.00
4. เททระพลอยด์ x เททระพลอยด์	480	75	15.63
5. เททระพลอยด์ x ปทุมมา	360	52	14.44
6. ปทุมมา x ปทุมมา	250	57	22.80
7. ปทุมมา x เททระพลอยด์	270	34	12.59

4.3.4 การเจริญของผล

ภายหลังจากที่ทำการผสมเกสรในคู่ผสมต่าง ๆ แล้ว สามารถสังเกตพัฒนาการของผลจากการเปลี่ยนแปลงภายหลังจากวันที่ผสมเกสรเป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน โดยภายหลังจากผสมเกสรเป็นเวลา 3 วัน ที่บริเวณโคนของก้านช่อดอกสังเกตเห็นการขยายขนาดของรังไข่ เนื่องจากเมล็ดมีการพัฒนา และหลังจากผสมเกสรไปแล้ว 7 วัน หากไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นแสดงว่าผสมไม่ติด จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาของผลจากคู่ผสมต่าง ๆ พบว่า ในแต่ละคู่ผสมสามารถผสมติดได้ในเปอร์เซ็นต์ที่แตกต่างกันไป โดยผลที่เกิดจากการผสมระหว่างคู่ผสมที่ 2 และ 3 จะมีการพัฒนาของผลได้เพียง 15 วัน หลังจากนั้นผลและเมล็ดจะเกิดการฝ่อและแห้ง ไม่สามารถพัฒนาเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์ได้ แต่ในและคู่ผสมอื่น ๆ มีการพัฒนาของผลได้ดีที่สุดภายหลังจากที่ผสมเกสรแล้ว 30 วัน สังเกตจากขนาดของผลและน้ำหนักสดเฉลี่ยต่อผลที่มากที่สุด โดยเฉพาะในคู่ผสมที่ 7 มีน้ำหนักสดผลสูงถึง 55 มก. รองลงมาคือ คู่ผสมที่ 6 คู่ผสมที่ 5 และคู่ผสมที่ 4 ดังแสดงในตารางที่ 17

นอกจากนี้ ยังได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบและการพัฒนาการของผลและเมล็ดที่เกิดจากคู่ผสมระหว่างต้นปทุมมาเททระพลอยด์กับเททระพลอยด์ และคู่ผสมระหว่างปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ผสมกับปทุมมา ภายหลังจากที่ทำการผสมเกสรเป็นเวลาต่าง ๆ กัน คือ 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 และ 45 วัน พบว่า การเปลี่ยนแปลงขนาดของผล น้ำหนักและจำนวนเมล็ดมีความสัมพันธ์กับจำนวนวันหลังจากที่ผสมเกสร โดยขนาดและน้ำหนักของผลจะเพิ่มขึ้นตามอายุหลังจากผสมเกสรที่มากขึ้น ซึ่งขนาดของผลและน้ำหนักผลของผลที่เกิดจากปทุมมาลูกผสมเททระ

พลอยด์ผสมตัวเองจะสูงที่สุดเมื่อมีอายุ 35 วัน เนื่องจากมีผลมีขนาดใหญ่จึงทำให้มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อผลเท่ากับ 42.88 มก. และจำนวนเมล็ดประมาณ 26.85 เมล็ด จากนั้นน้ำหนักของผลจะค่อย ๆ ลดลง ดังแสดงในตารางที่ 18 และภาพที่ 18 ส่วนการพัฒนาของผลที่เกิดจากการผสมระหว่างต้นปทุมมาเททระพลอยด์กับปทุมมามีแนวโน้มเป็นไปในทางเดียวกัน แต่ผลที่เกิดจากคู่ผสมนี้เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงขนาดของผลและน้ำหนักของผลเมื่อมีอายุได้ 30 วัน โดยมีน้ำหนักของผลเป็น 43 มก. และมีเมล็ดเฉลี่ยต่อผลประมาณ 29.26 เมล็ด (ตารางที่ 19 และ ภาพที่ 19) นอกจากนี้ยังพบว่า ในทั้งสองคู่ผสมจะมีเมล็ดดีหรือเมล็ดที่สมบูรณ์ยังไม่เกิดการฝ่อมากที่สุดภายหลังจากผสมเกสรนานเป็นเวลา 15 วัน โดยลักษณะของผลและเมล็ดดีของปทุมมาลูกผสมที่เกิดจากปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ผสมตัวเอง และเมล็ดของปทุมมาเททระพลอยด์กับปทุมมาแสดงในภาพที่ 20 และ 21

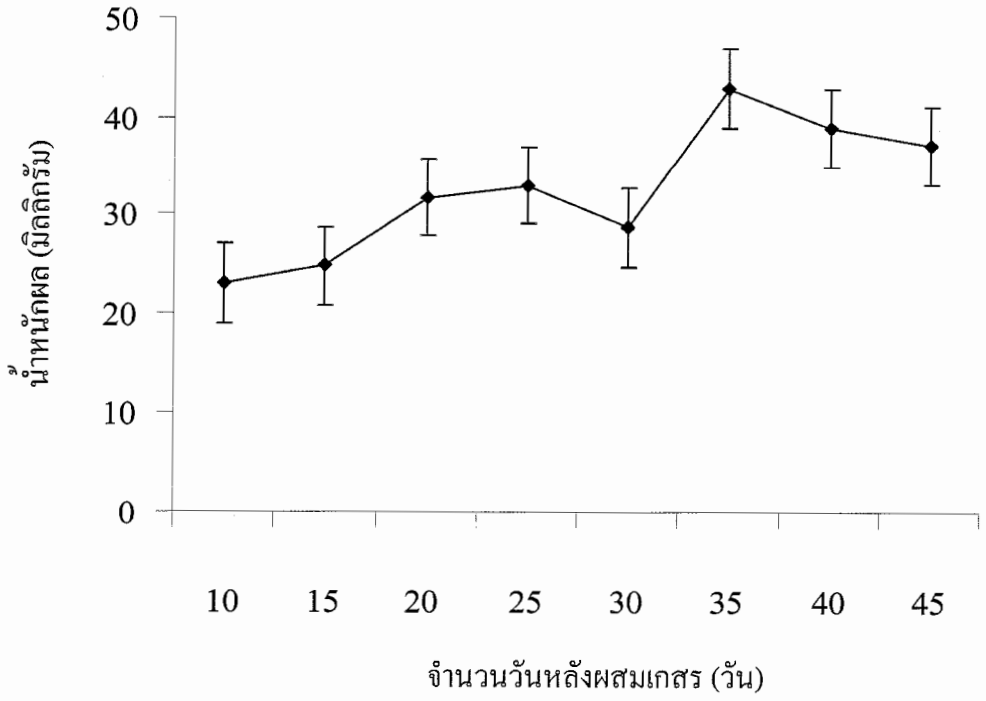
ตารางที่ 17 การเปรียบเทียบลักษณะของผลปทุมมาลูกผสมที่ได้จากคู่ผสมต่าง ๆ

คู่ผสม	อายุผล (วัน)	ขนาดผล (มม.)		น้ำหนักผล (มก.)	จำนวนเมล็ดต่อผล	
		กว้าง	ยาว		เมล็ดดี	เมล็ดลีบ
2. ดิพลอยด์ x เททระพลอยด์	15	0.27±0.11[1/]	0.41±0.17	4.30	0.80±1.10	8.93±2.82
3. ดิพลอยด์ x ปทุมมา	15	0.20±0.22	0.26±0.01	3.70	0.47±0.27	10.43±2.42
4. เททระพลอยด์ x เททระพลอยด์	30	2.22±0.92	3.17±1.20	32.40	5.49±3.19	14.95±7.78
5. เททระพลอยด์ x ปทุมมา	30	2.68±0.61	3.70±0.71	37.50	3.74±1.45	20.77±4.99
6. ปทุมมา x ปทุมมา	30	2.67±0.63	3.45±1.11	54.30	5.05±4.95	22.00±7.87
7. ปทุมมา x เททระพลอยด์	30	3.01±0.95	4.10±1.26	55.10	2.21±1.08	23.81±9.18

[1/] จำนวนผลที่ศึกษาในแต่ละคู่ผสมเรียงจากลำดับที่ 2-7 มีจำนวน 2, 3, 7, 5, 8 และ 6 ผล

ตารางที่ 18 การเปลี่ยนแปลงขนาดของผล น้ำหนักและจำนวนเมล็ดที่เกิดจากการผสมระหว่างต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์กับเททระพลอยด์ (ค่าเฉลี่ยในแต่ละช่วงอายุจากจำนวน 3 ผล)

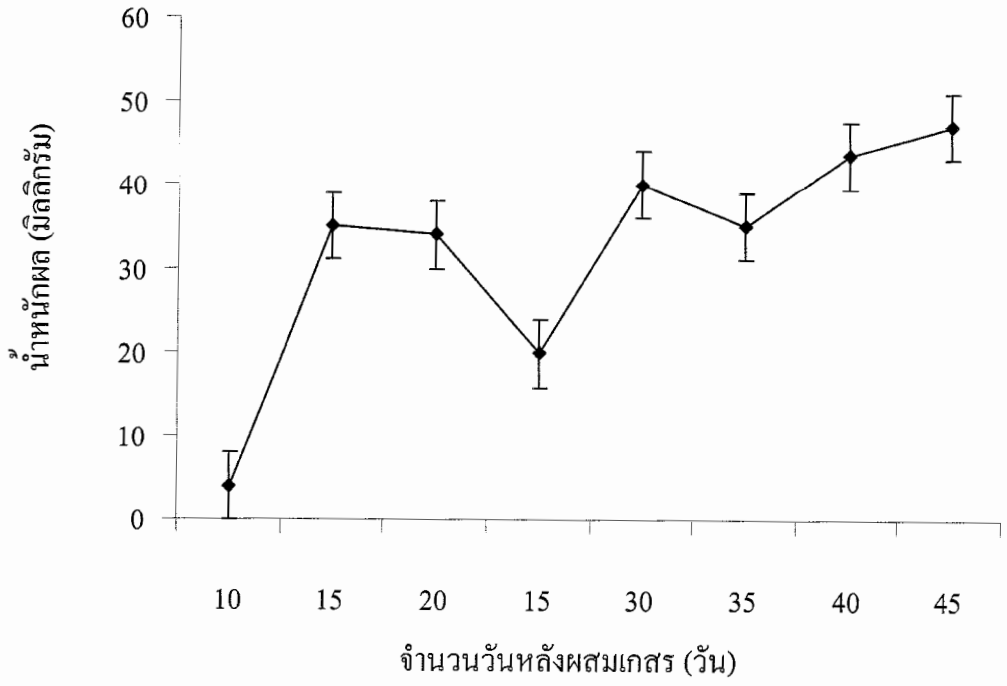
อายุ (วัน)	ความกว้าง (มม.)	ความยาว (มม.)	น้ำหนัก (มก.)	จำนวนเมล็ดทั้งหมด	
				เมล็ดดี	เมล็ดลีบ
10	1.00	1.37	22.93	9.00	8.50
15	0.75	1.25	24.70	11.00	4.30
20	2.01	3.23	31.75	6.40	9.30
25	2.74	3.74	32.94	7.25	15.40
30	2.27	3.58	28.58	5.00	14.25
35	3.22	4.53	42.88	3.25	23.60
40	3.01	3.90	38.94	3.00	22.40
45	2.91	3.91	37.15	2.30	26.50



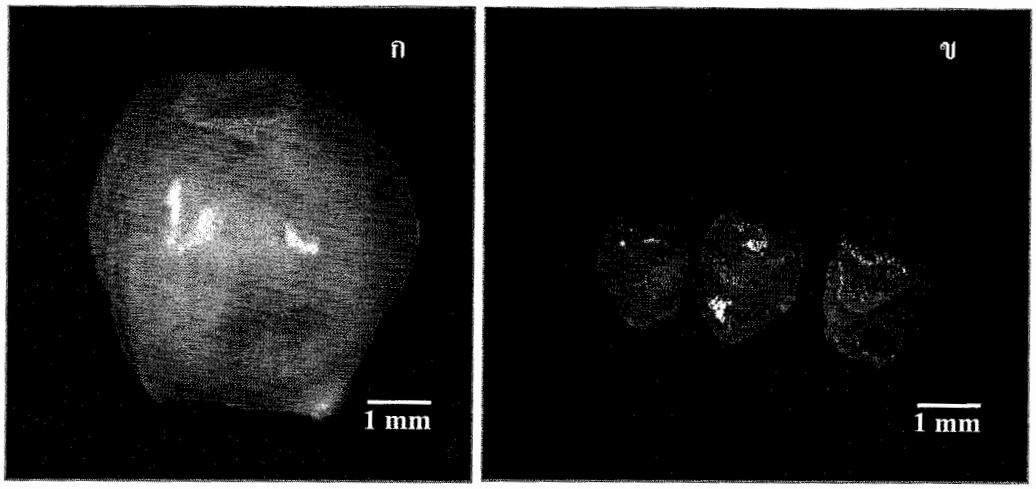
ภาพที่ 18 ความสัมพันธ์ระหว่างอายุ และน้ำหนักผลของปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ที่ผสมตัวเอง

ตารางที่ 19 การเปลี่ยนแปลงขนาดของของผล น้ำหนักและจำนวนเมล็ดที่เกิดจากการผสมระหว่างต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ผสมกับปทุมมา (ค่าเฉลี่ยในแต่ละช่วงอายุจากจำนวน 3 ผล)

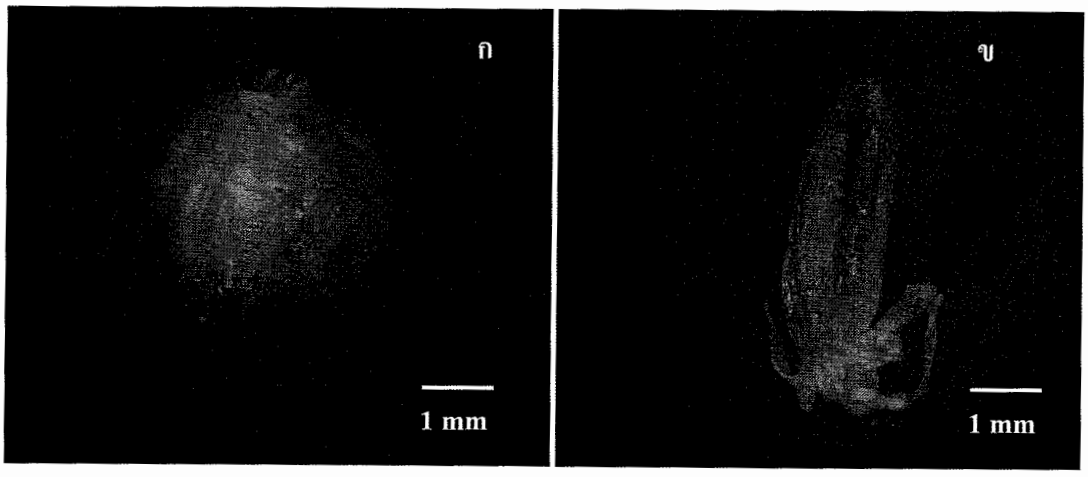
อายุ (วัน)	ความกว้าง (มม.)	ความยาว (มม.)	น้ำหนัก (มก.)	จำนวนเมล็ดทั้งหมด	
				เมล็ดดี	เมล็ดลีบ
10	1.30	2.10	4.50	9.00	15.00
15	2.05	2.60	35.00	8.25	16.25
20	2.20	3.25	34.50	7.25	12.00
25	1.00	3.10	21.30	6.00	14.00
30	3.11	4.31	43.00	3.86	25.70
35	3.18	4.53	36.50	3.00	25.30
40	3.10	4.80	45.55	1.75	21.00
45	2.79	2.94	47.00	2.71	15.86



ภาพที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างอายุ และน้ำหนักผลของปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ผสมปทุมมา



ภาพที่ 20 ลักษณะผล (ก) และเมล็ดอายุ 30 วัน (ข) ที่เกิดจากการผสมตัวเองของปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์



ภาพที่ 21 ลักษณะผล (ก) และเมล็ดอายุ 30 วัน (ข) ที่เกิดจากการผสมปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์กับปทุมมา

4.3.5 การงอกของเมล็ดปทุมมาลูกผสมในหลอดแก้ว

จากการศึกษาพบว่า การเพาะเมล็ดที่มีอายุ 20 และ 30 วัน ของปทุมมาลูกผสมจากคู่ผสมระหว่างปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ x เททระพลอยด์, ปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ x ปทุมมา, ปทุมมา x เททระพลอยด์ และ ปทุมมาx ปทุมมา ในอาหารวุ้นสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต benzylamino purine 5 มก/ลิตร ที่อุณหภูมิ 25 – 27 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีแสง 14 ชั่วโมง/วัน (35 $\mu molm^{-2}s^{-1}$) พบว่าเมล็ดเหล่านี้ไม่สามารถงอกได้และได้ตายไปเป็นส่วนใหญ่ ยกเว้นเมล็ดที่เกิดจากคู่ผสมของปทุมมา x เททระพลอยด์ และจากคู่ผสมเททระพลอยด์กับ ปทุมมา เมล็ดมีการขยายขนาดของเมล็ดหลังจากเลี้ยงนานเป็นเวลา 45 วัน

4.4 การศึกษาสาเหตุความเป็นหมันจากความผิดปกติของการแบ่งไมโอซิสของเซลล์ต้นกำเนิดละอองเรณู

4.4.1 การศึกษาระยะพัฒนาการของดอกอ่อนกับระยะการแบ่งไมโอซิสของ PMC

ผลการศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ จากเซลล์ดอกอ่อนระยะต่างๆ จำนวน 4 ระยะ พบว่า ขนาดความยาวของดอกอ่อนทั้ง 4 ระยะ ของต้นดิพลอยด์มีความยาวน้อยกว่าขนาดดอกอ่อนของต้นเททระพลอยด์ คือ ในต้นดิพลอยด์มีค่าเฉลี่ยเป็น 0.13, 0.22, 0.43 และ 0.60 ซม. ตามลำดับ และในต้นเททระพลอยด์มีค่าเฉลี่ยเป็น 0.18, 0.28, 0.49 และ 0.82 ซม. ตามลำดับ สำหรับขนาดอับเรณูก็มีแนวโน้มไปในทางเดียวกันกับขนาดดอกอ่อน โดยมีค่าเฉลี่ยเป็น 0.10, 0.20, 0.33 และ 0.47 ซม. ตามลำดับ ตั้งแต่ระยะ 1 ถึง 4 ในต้นดิพลอยด์ และอับเรณูของต้นเททระพลอยด์มีค่าเฉลี่ยเป็น 0.15, 0.23, 0.40 และ 0.55 ซม. ตามลำดับ (ตารางที่ 20 และ ภาพที่ 22)

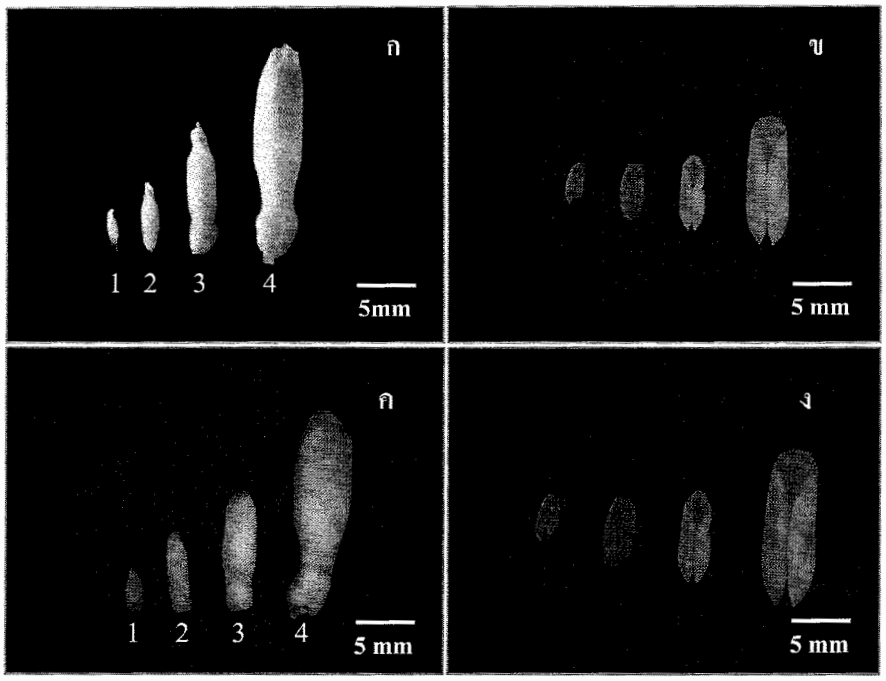
ตารางที่ 20 ค่าเฉลี่ยความยาวดอกอ่อนและความยาวอับเรณูของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์

ระยะดอก[ก/]	ดิพลอยด์		เททระพลอยด์	
	ความยาวดอกอ่อน	อับเรณู	ความยาวดอกอ่อน	อับเรณู
1	0.13 ± 0.03 d	0.10 ± 0.01 d	0.18 ± 0.02 d	0.15 ± 0.01 d
2	0.22 ± 0.02 c	0.20 ± 0.02 c	0.28 ± 0.03 c	0.23 ± 0.02 c
3	0.43 ± 0.04 b	0.33 ± 0.02 b	0.49 ± 0.05 b	0.40 ± 0.05 b
4	0.60 ± 0.06 a	0.47 ± 0.06 a	0.82 ± 0.09 a	0.55 ± 0.03 a

[1/] ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.05$

[ก/] หมายเหตุ: ความยาวดอกอ่อนของต้นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ระยะต่างๆ

ต้นดิพลอยด์	ต้นเททระพลอยด์
ระยะที่ 1 ยาว 0.08 – 0.16 ซม.	ระยะที่ 1 ยาว 0.15 – 0.20 ซม.
ระยะที่ 2 ยาว 0.19 – 0.25 ซม.	ระยะที่ 2 ยาว 0.25 – 0.35 ซม.
ระยะที่ 3 ยาว 0.38 – 0.50 ซม.	ระยะที่ 3 ยาว 0.40 – 0.55 ซม.
ระยะที่ 4 ยาว 0.53 – 0.70 ซม.	ระยะที่ 4 ยาว 0.60 – 1.25 ซม.



ภาพที่ 22 ขนาดดอกอ่อนและอับเรณูของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ (ก, ข) และเททระพลอยด์ (ค, ง)

(ความยาวดอกอ่อนของต้นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ระยะต่าง ๆ)

ต้นดิพลอยด์	ต้นเททระพลอยด์
ระยะที่ 1 ยาว 0.08 – 0.16 ซม.	ระยะที่ 1 ยาว 0.15 – 0.20 ซม.
ระยะที่ 2 ยาว 0.19 – 0.25 ซม.	ระยะที่ 2 ยาว 0.25 – 0.35 ซม.
ระยะที่ 3 ยาว 0.38 – 0.50 ซม.	ระยะที่ 3 ยาว 0.40 – 0.55 ซม.
ระยะที่ 4 ยาว 0.53 – 0.70 ซม.	ระยะที่ 4 ยาว 0.60 – 1.25 ซม.

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดดอกกับระยะการแบ่งไมโอซิส พบว่า ดอกอ่อนที่ใช้ศึกษาทุกระยะของต้นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ (ตารางที่ 21 และ 22) มีการแบ่ง ไมโอซิสส่วนใหญ่ของ PMC อยู่ในระยะไมโอซิส I ยกเว้นดอกอ่อนระยะที่ 4 ที่พบการแบ่งเซลล์ระยะเทโลเฟส II ของไมโอซิส II ด้วย โดยในดอกระยะ 1 ของทั้งดิพลอยด์และเททระพลอยด์ พบการแบ่งเซลล์ในระยะอินเตอร์เฟส โปรเฟส I เมตาเฟส I และแอนาเฟส I โดยในดอกระยะนี้พบเปอร์เซ็นต์ความถี่ของเซลล์ที่แบ่งตัวอยู่ในระยะอินเตอร์เฟสสูงถึงร้อยละ 49.32 และ 52.64 ตามลำดับ ในดอกระยะที่ 2 พบระยะการแบ่งเซลล์เช่นเดียวกันกับดอกอ่อนระยะที่ 1 แต่เซลล์ส่วนใหญ่ของดอกระยะมีการแบ่งตัวในระยะเมตาเฟส I โดยมีเปอร์เซ็นต์ความถี่ของเซลล์ PMC ที่

แบ่งตัวในระยะนี้ร้อยละ 48.16 และ 58.24 เช่นเดียวกันกับดอกอ่อนระยะที่ 3 ทั้งในต้นดิพลอยด์และเททระพลอยด์เซลล์ส่วนใหญ่มีการแบ่งเซลล์อยู่ในระยะเมตาเฟส I สูงถึงร้อยละ 50.94 และ 56.18 ตามลำดับ แต่ในดอกอ่อนระยะที่ 4 พบว่า การแบ่งเซลล์ของ PMC ของดอกอ่อนทั้งในต้นดิพลอยด์ และเททระพลอยด์อยู่ในไมโอซิส II ที่ระยะเทโลเฟส II สูงถึงร้อยละ 54 และ 51 ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบเซลล์ที่พัฒนาเป็นละอองเรณูในต้นดิพลอยด์ และเททระพลอยด์มีความถี่เป็นร้อยละ 10 และ 20 ตามลำดับ ดังนั้น การศึกษาระยะพัฒนาการในดอกอ่อนทั้ง 4 ระยะ พบการแบ่งเซลล์ของ PMC ทั้งในปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ อยู่ในช่วงไมโอซิส I ซึ่งประกอบด้วย อินเตอร์เฟส โปรเฟส I เมตาเฟส I แอนาเฟส I เทโลเฟส I และช่วงไมโอซิส II ประกอบด้วย โปรเฟส II และเทโลเฟส II ดังแสดงในภาพที่ 23

ตารางที่ 21 เปอร์เซ็นต์ความถี่ของเซลล์ในระยะต่าง ๆ ของการแบ่งไมโอซิสของ PMC ที่มาจากดอกระยะต่าง ๆ ในต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์

ระยะดอก[1/]	Meiosis I				Meiosis II				
	Interphase	Prophase I	Metaphase I	Anaphase I	Prophase II	Metaphase II	Telophase II	Tetrads	Pollen
1	49.32	18.76	8.10	3.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	16.70	48.16	11.58	2.74	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	2.52	14.10	50.94	18.64	6.42	2.70	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.02	53.76	20.14	10.24

[1/] หมายเหตุ: ความยาวดอกอ่อนของต้นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ระยะต่างๆ

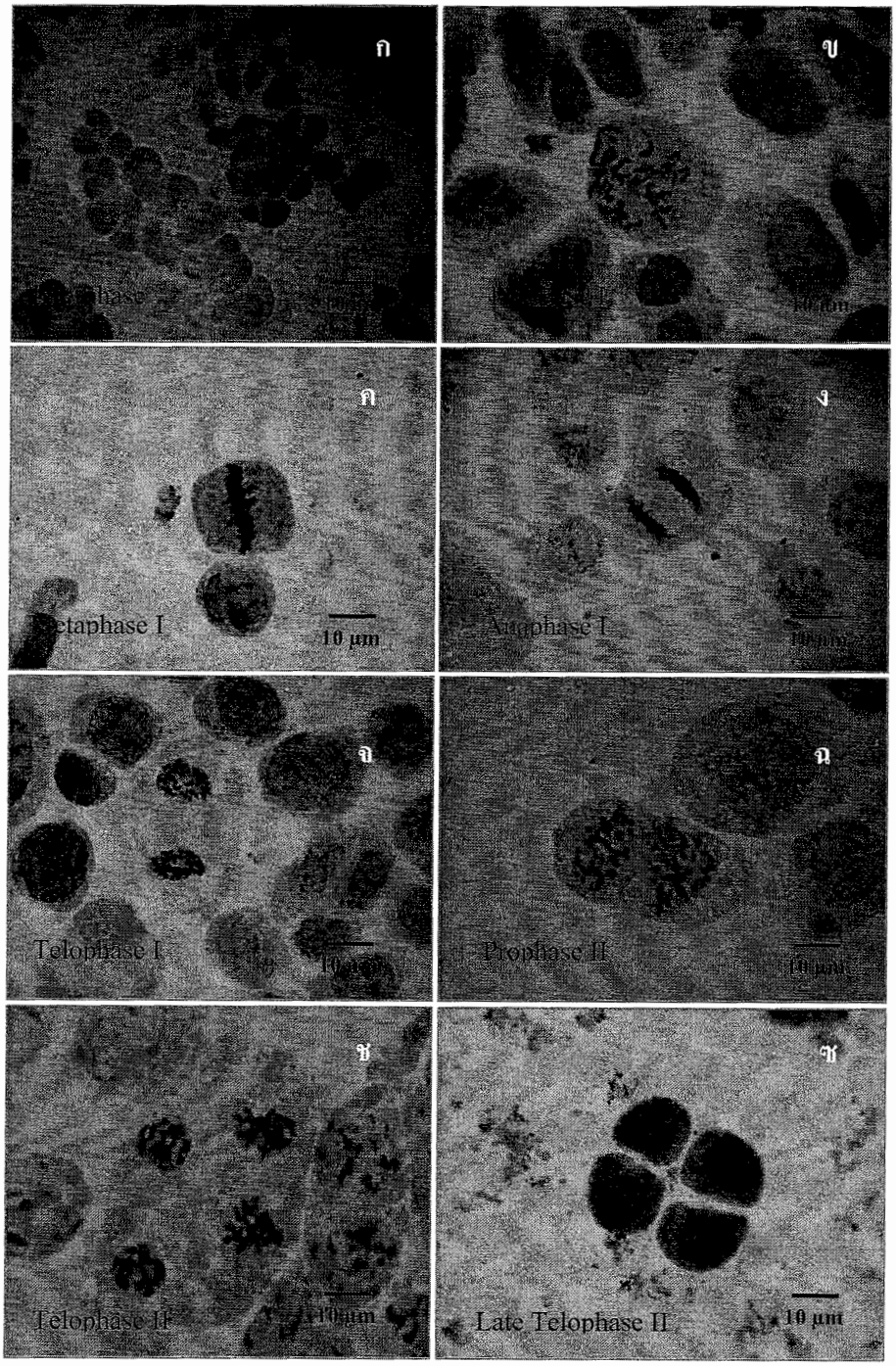
ต้นดิพลอยด์	ต้นเททระพลอยด์
ระยะที่ 1 ยาว 0.08 – 0.16 ซม.	ระยะที่ 1 ยาว 0.15 – 0.20 ซม.
ระยะที่ 2 ยาว 0.19 – 0.25 ซม.	ระยะที่ 2 ยาว 0.25 – 0.35 ซม.
ระยะที่ 3 ยาว 0.38 – 0.50 ซม.	ระยะที่ 3 ยาว 0.40 – 0.55 ซม.
ระยะที่ 4 ยาว 0.53 – 0.70 ซม.	ระยะที่ 4 ยาว 0.60 – 1.25 ซม.

ตารางที่ 22 เปอร์เซ็นต์ความถี่ของเซลล์ในระยะต่าง ๆ ของการแบ่งไมโอซิสของ PMC ที่มาจากดอกระยะต่าง ๆ ในต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์

ระยะดอก[1/]	Meiosis I				Meiosis II				
	Interphase	Prophase I	Metaphase I	Anaphase I	Prophase II	Metaphase II	Telophase II	Tetrads	Pollen
1	52.64	19.64	7.60	3.84	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	20.04	58.24	22.64	10.18	3.58	0.00	0.00	0.00	0.00
3	4.20	14.76	56.18	23.02	12.58	6.26	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	51.44	6.58	20.40

[1/] หมายเหตุ: ความยาวดอกอ่อนของต้นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ระยะต่างๆ

ต้นดิพลอยด์	ต้นเททระพลอยด์
ระยะที่ 1 ยาว 0.08 – 0.16 ซม.	ระยะที่ 1 ยาว 0.15 – 0.20 ซม.
ระยะที่ 2 ยาว 0.19 – 0.25 ซม.	ระยะที่ 2 ยาว 0.25 – 0.35 ซม.
ระยะที่ 3 ยาว 0.38 – 0.50 ซม.	ระยะที่ 3 ยาว 0.40 – 0.55 ซม.
ระยะที่ 4 ยาว 0.53 – 0.70 ซม.	ระยะที่ 4 ยาว 0.60 – 1.25 ซม.

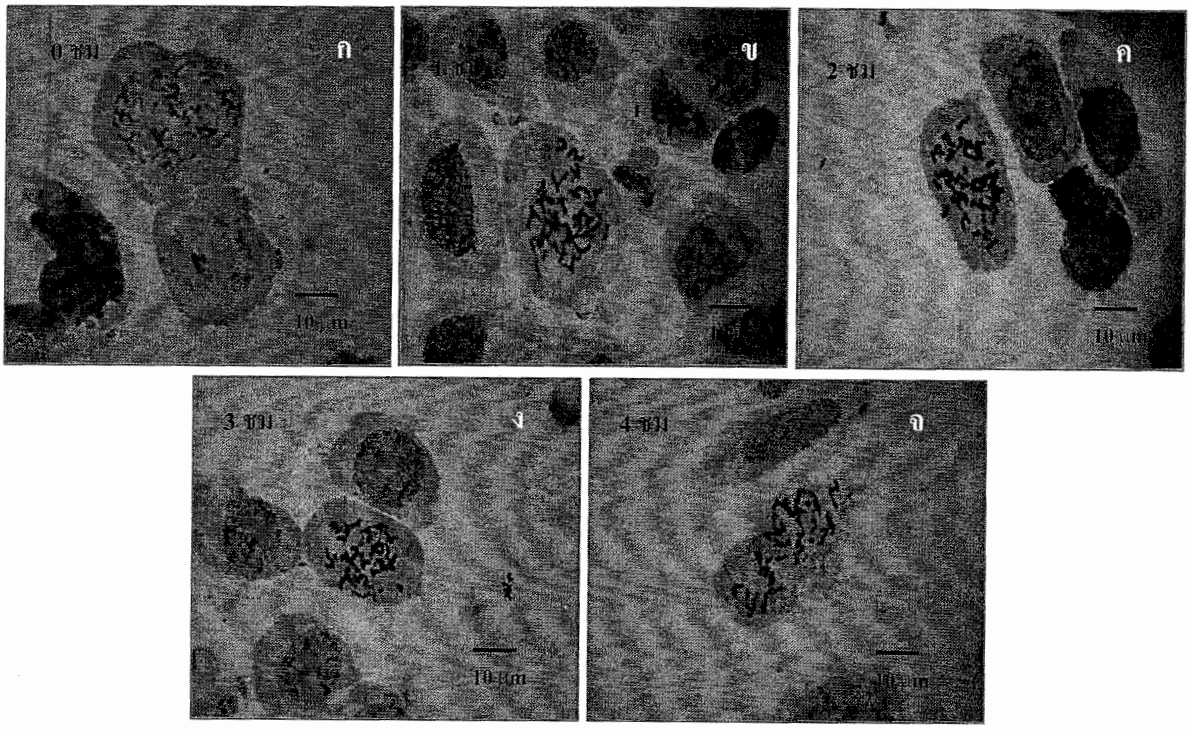


ภาพที่ 23 การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส I และไมโอซิส II ของ PMC ในเซลล์ดอกอ่อนของปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์

4.4.2 การศึกษาเทคนิคการย้อมสีโครโมโซมในดอกอ่อน

4.4.2.1 การศึกษาความยาวในการหยุดวงชีพจักรเซลล์

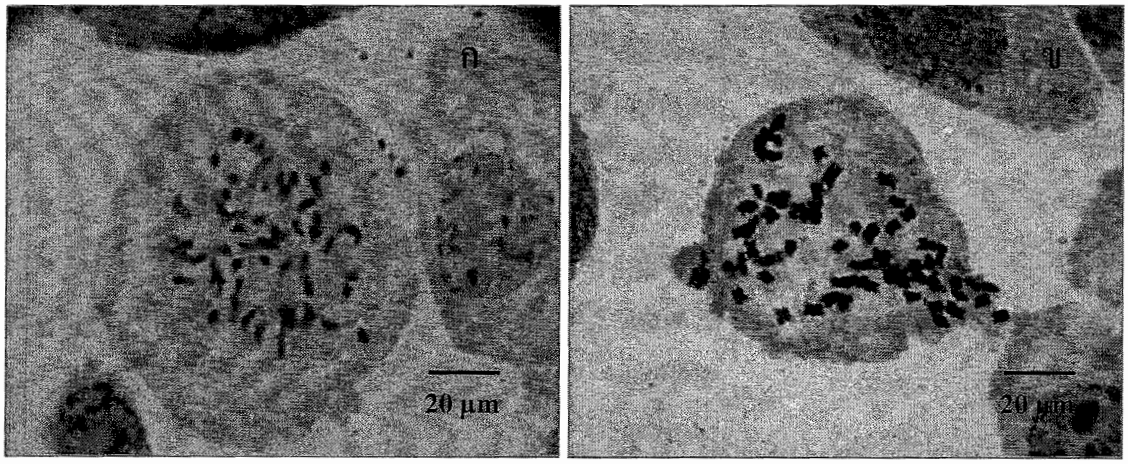
จากผลการศึกษาพบว่า การที่ไม่หยุดวงชีพจักรเซลล์ก่อนที่จะศึกษาโครโมโซมจากเซลล์ดอกอ่อนจะทำให้ไม่สามารถตรวจนับจำนวน และการเข้าคู่กันของโครโมโซมได้ เนื่องจากโครโมโซมที่อยู่ในเซลล์เซลล์มีลักษณะเป็นเส้นยาวและพันกัน (ภาพที่ 24ก) รวมทั้งการใช้เวลาในการหยุดวงชีพจักรเซลล์นาน 1 ชั่วโมง ทำให้พบเซลล์ที่อยู่ในลักษณะเป็นเส้นยาว (ภาพที่ 24 ข) เมื่อมีการเพิ่มระยะเวลาในการหยุดวงชีพจักรเซลล์ เป็น 2 ชั่วโมง พบว่าโครโมโซมหดสั้นลงและสามารถสังเกตรูปร่างของโครโมโซมได้ชัดเจน (ภาพที่ 24ค) การใช้เวลา 3 ชั่วโมง พบว่าโครโมโซมมีการหดตัวมากขึ้น (ภาพที่ 24ง) แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาเป็น 4 ชั่วโมง จะพบเซลล์ที่มีโครโมโซมที่หดตัวสั้นกว่าระยะเวลาอื่นๆ แต่ไม่สามารถจำแนกรูปร่างของโครโมโซมแต่ละคู่ได้ (ภาพที่ 24จ)



ภาพที่ 24 โครโมโซมจากเซลล์ดอกอ่อนของต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ที่ได้รับการหยุดวงชีพจักรเซลล์นานเป็นระยะเวลาต่างๆ กัน คือ 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง

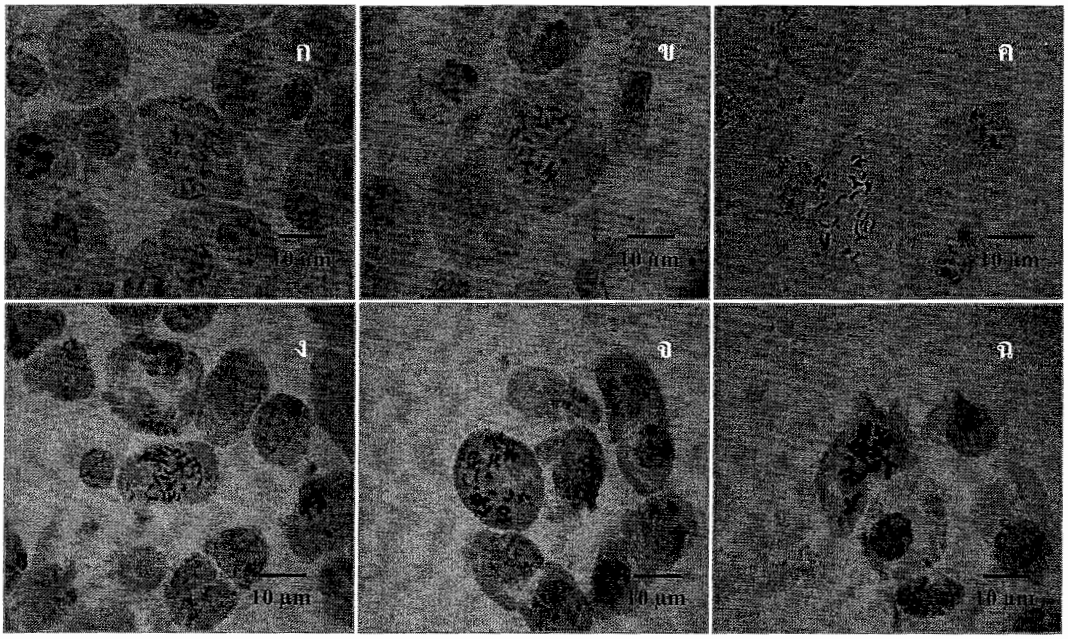
4.4.2.2 การศึกษาชนิดสีย้อมโครโมโซมและระยะเวลาในการย้อมสีโครโมโซม

ผลของการศึกษาประสิทธิภาพของสีที่ใช้ในการย้อมโครโมโซมจากเซลล์ดอกอ่อน พบว่า สีที่ใช้ในการทดลองทั้ง 2 ชนิด มีประสิทธิภาพในการย้อมโครโมโซมไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 25) แต่โครโมโซมที่ย้อมด้วยสี lacto-propionic orcein จะมีความสม่ำเสมอของการติดสีที่ดีกว่าโครโมโซมที่ย้อมด้วยสี aceto-orcein โดยโครโมโซมทุกแท่งมีความเข้มของสีใกล้เคียงกัน



ภาพที่ 25 โครโมโซมจากเซลล์ดอกอ่อนของปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ ที่ย้อมด้วยสี aceto-orcein (ก) และ สี lacto-propionic orcein (ข)

จากการทดลองเปรียบเทียบความยาวนานในการย้อมสีของโครโมโซมจากเซลล์ดอกอ่อนโดยใช้สีทั้งย้อม 2 ชนิด เป็นระยะเวลา 10 - 15 นาที โครโมโซมจากเซลล์ดอกอ่อนจะติดสีจาง ๆ ได้เพียงบางส่วนเท่านั้น เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการย้อมสีให้นานเป็นเวลา 15 – 20 นาที (ภาพที่ 26ข, 26จ) จะช่วยให้โครโมโซมติดสีได้สม่ำเสมอทั้งแท่งสามารถสังเกตรูปร่างของโครโมโซมได้ชัดเจนขึ้น แต่ถ้าหากย้อมสีเป็นเวลานานกว่า 20 นาที ขึ้นไป สีย้อมทั้ง 2 ชนิด จะติดโครโมโซมเข้มมากเกินไป อีกทั้งสีย้อมบางส่วนยังติดไซโตพลาสซึมมากขึ้น อาจเป็นอุปสรรคต่อการศึกษาลักษณะรูปร่างของโครโมโซมได้ (ภาพที่ 26ค, 26จ)



ภาพที่ 26 โครโมโซมจากเซลล์ดอกอ่อนของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ ที่ย้อมด้วยสี aceto-orcein (ก-ค) และสี lacto-propionic orcein (ง-ฉ) นานเป็นระยะเวลา 10, 15 และ 20 นาที (ซ้าย → ขวา)

4.4.3 การศึกษาความผิดปกติของการแบ่งไมโอซิสของ PMC

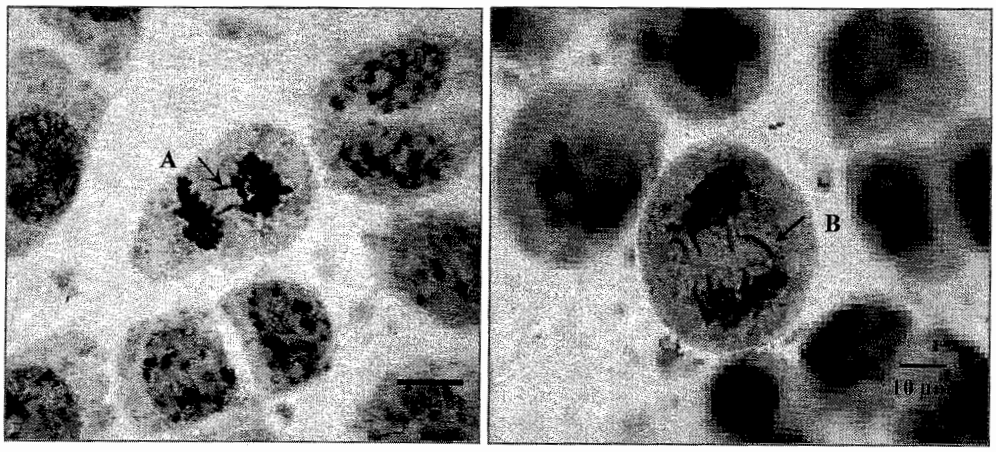
ผลการวิเคราะห์การแบ่งแบบไมโอซิสของ PMC ในต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ ไม่พบความผิดปกติในการเข้าคู่กันของโครโมโซม (synapsis) ในระยะไดอะไคเนซิส (diakinesis) ทั้งๆ ที่ปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์นี้เกิดจากพ่อแม่ต่างชนิดที่มีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน แต่พบความผิดปกติในระยะแอนาเฟส I มีเปอร์เซ็นต์ความถี่ของการพบ chromosome bridges และ chromosome lagging ใน PMC สูงถึง ร้อยละ 24 และ 22 ตามลำดับ (ตารางที่ 23 และ ภาพที่ 27) โดย PMC มีการแบ่งโครโมโซมที่เป็นปกติคิดเป็นร้อยละ 54 ในต้นดิพลอยด์ ส่วนเปอร์เซ็นต์ความถี่ของการพบ chromosome bridges และ chromosome lagging ใน PMC ของต้นเททระพลอยด์ มีความถี่ในการเกิดความผิดปกติเพียงร้อยละ 6 และ 4 ตามลำดับ (ตารางที่ 24 และ ภาพที่ 28) โดย PMC มีการแบ่งของโครโมโซมที่เป็นปกติได้ 90 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 23 เปอร์เซ็นต์ความถี่ของการพบ chromosome bridge และ chromosome lagging ในระยะแอนาเฟส I ของการแบ่งไมโอซิสของ pollen mother cells จากเซลล์ดอกอ่อนของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ (ค่าเฉลี่ยจากทั้งหมด 50 ตัวอย่าง จำนวนเซลล์ที่นับในแต่ละระยะมากกว่า 60 เซลล์)

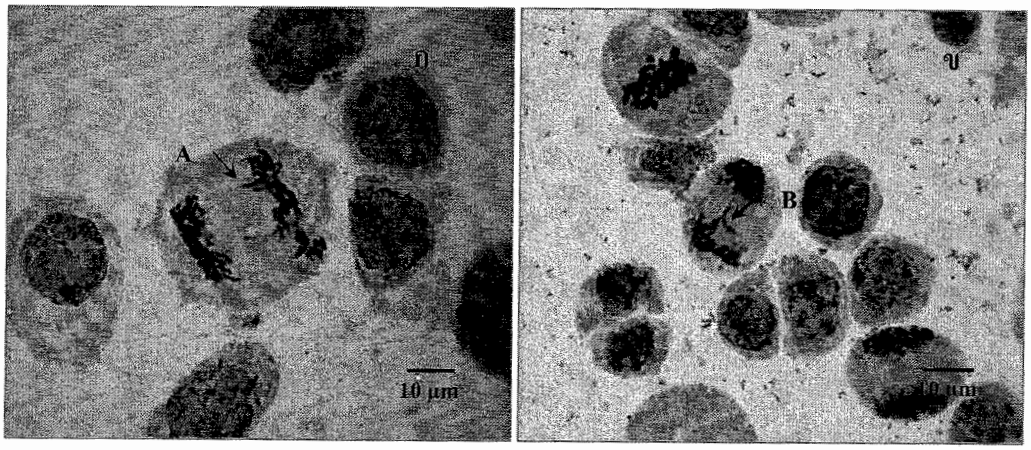
ชนิดความผิดปกติ	จำนวนของ chromosome bridge และ chromosome lagging				
	1	2	3	4	รวม
chromosome bridge	6.25	9.97	5.39	2.07	23.68
chromosome lagging	7.00	9.08	4.73	1.46	22.27

ตารางที่ 24 เปอร์เซ็นต์ความถี่ของการพบ chromosome bridge และ chromosome lagging ในระยะแอนาเฟส I ของการแบ่งไมโอซิสของ pollen mother cells จากเซลล์ดอกอ่อนของต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ (ค่าเฉลี่ยจากทั้งหมด 50 ตัวอย่าง จำนวนเซลล์ที่นับในแต่ละระยะมากกว่า 60 เซลล์)

ชนิดความผิดปกติ	จำนวนของ chromosome bridge และ chromosome lagging				
	1	2	3	4	รวม
chromosome bridge	1.93	2.28	1.30	0.06	5.57
chromosome lagging	1.39	1.35	0.81	0.00	3.55



ภาพที่ 27 ความผิดปกติในการแบ่งไมโอซิสในระยะแอนาเฟส I ของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ แบบ (ก) chromosome bridge (A) และ (ข) chromosome lagging (B)



ภาพที่ 28 ความผิดปกติในการแบ่งไมโอซิสในระยะแอนาเฟส I ของปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ (ก) แบบ chromosome bridge (A) และ (ข) chromosome lagging (B)

บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง

5.1 การตรวจสอบยืนยันความเป็นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ในปทุมมาลูกผสม

การตรวจสอบยืนยันลักษณะต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ที่แท้จริงจากขนาดความยาวเซลล์คุมปากใบ ขนาดละอองเรณู และจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากเป็นการยืนยันการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เจริญมาจากเนื้อเยื่อปลายยอดทั้งชั้น L1 L2 และ L3

5.1.1 ปากใบ

ขนาดเซลล์คุมปากใบของต้นที่เป็นเททระพลอยด์ใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ ในทำนองเดียวกันกับการรายงานของวัชรินทร์ รัตพันธ์ (2544) ที่พบว่าต้นขมิ้นชันและขมิ้นอ้อยที่เป็นโพลีพลอยด์จะมีขนาดความยาวเซลล์คุมปากใบที่ใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ แต่ต้นโพลีพลอยด์มีจำนวนปากใบต่อพื้นที่น้อยกว่าต้นดิพลอยด์ และ Lu และ Bridgen (1997) พบว่าลูกผสม *Alstroemeria aurea x A. caryophyllaea* ที่เป็นเททระพลอยด์มีขนาดเซลล์คุมปากใบใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้จำนวนปากใบต่อพื้นที่ของต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์มีจำนวนลดลงซึ่งสอดคล้องกับ De Oliveira et al. (2004) ได้รายงานถึงจำนวนปากใบต่อพื้นที่ของต้น *Stevia rebaudiana* Bertoni ที่เป็นโพลีพลอยด์ว่าจะมีจำนวนปากใบลดลงเมื่อเทียบกับต้นดิพลอยด์ และต้นกล้วยไข่ (*Musa acuminata*) ที่เป็นเททระพลอยด์มีจำนวนปากใบกับจำนวนต่อพื้นที่น้อยน้อยกว่าต้นดิพลอยด์เช่นกัน (Saradholdhat and Silayoi, 2001)

เป็นที่น่าสังเกตว่าความยาวเซลล์คุมปากใบในต้นปทุมมาลูกผสมทั้งสองระดับพลอยดีในทั้งสองฤดูปลูกมีค่าใกล้เคียงกัน โดยความยาวเซลล์คุมปากใบของต้นเททระพลอยด์มีค่ามากกว่าต้นดิพลอยด์ประมาณ 1.3 เท่า ดังนั้นความยาวเซลล์คุมปากใบหรือขนาดเซลล์คุมปากใบจึงเป็นดัชนีที่ดีในการคัดเลือกเบื้องต้นของพืชเททระพลอยด์ หรือพืชโพลีพลอยด์ออกจากต้นปกติดังเป็นที่ทราบกันและนำมาใช้ในการคัดเลือกเบื้องต้นของต้นโพลีพลอยด์และต้นเททระพลอยด์ออกจากต้นปกติ (Tan and Dunn, 1973; Krishnaswami and Andal, 1978; Ramachandran, 1982; McCuistion and Gary, 1993; Mishra, 1997; Song et al., 1996 ; นิตย์ศรี แสงเดือน, 2541 ; สาริณี ไชยเจริญ, 2538 ; Kadota and Niimi, 2002; De Oliveira et al., 2004; Smith et al., 2004; Beck et al., 2005; Wongpiyasatid et al., 2005; Wan et al., 2006)

5.1.2 จำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก

จำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ 2n=2x=28 โดยมาจากฝ่ายแม่คือปทุมมา (2n=2x=32) 16 แท่ง และจากฝ่ายพ่อ คือบัวโกเมน (2n=2x=24) 12 แท่ง เมื่อมีการเพิ่มโครโมโซมเป็นต้นเททระพลอยด์จึงมีโครโมโซม 2n=4x=56 ต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์เหล่านี้ขยายพันธุ์โดยใช้หัว จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมในเวลา 2 ฤดูปลูก เช่นเดียวกันกับการรายงานของ พิมพ์ใจ อาภาวัชรุตน์ และคณะ (2539) ว่าจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของต้นปทุมมาพันธุ์คัดเลือก (*C. alismatifolia* Gagnep.) มีจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากเท่ากับ 32 แท่ง ส่วนบัวโกเมนมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 24 แท่ง เช่นเดียวกันกับที่มีรายงานโดย Eksomtramage et al. (2002) ว่าจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของ *C. rhabdota* Sirirugsa & M.F. Newman มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 24 แท่ง

5.1.3 ขนาดละอองเรณู

ขนาดละอองเรณูใช้เป็นดัชนีหนึ่งในการคัดเลือกต้นเททระพลอยด์ โดยต้นเททระพลอยด์มีละอองเรณูที่มีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ (Kelley et al., 2002; Ghaffari, 2006) ซึ่งในปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์นี้มีขนาดละอองเรณูใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ แสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในชั้น L2 ซึ่งพัฒนามาเป็นอวัยวะสืบพันธุ์ คือ ดอกและองค์ประกอบของดอก การใช้ขนาดละอองเรณูในการคัดเลือกต้นเททระพลอยด์หรือต้นโพลีพลอยด์มีรายงานในพืช เช่น *Sorghum bicolor* (Ghaffari, 2006) และ *Mimulus guttatu* (Kelley et al., 2002)

5.2 การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นดิพลอยด์และเททระพลอยด์

ระดับพลอยดีมีอิทธิพลต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของพืชโดยการเพิ่มขึ้นของจำนวนชุดโครโมโซมมีผลต่อขนาดของนิวเคลียส การแสดงออกของยีนและการผลิตเอนไซม์ รวมทั้งการผลิตสารทุติยภูมิอื่น ๆ (Lavania, 1986) ส่งผลให้พืชโพลีพลอยด์มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไป เช่น ดอกมีขนาดใหญ่ขึ้น (สาริณี ไชยเจริญ, 2538; Escandon et al., 2005; Takamura and Miyajima, 1996) ผลและเมล็ดมีขนาดใหญ่ขึ้น (Ali et al., 1992; Kuspira and Bhambhani, 1985) เหง้าและรากพืชสมุนไพรมีขนาดใหญ่ขึ้น (Gao et al., 1996; Gao et al., 2002; Lavanai, 1988; Smith et al., 2004)

ในการเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยา ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ กับเททระพลอยด์นี้ได้ใช้หัวพันธุ์จากต้นอายุ 1 ปี ปลูกเพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นและหัวอายุ 2 ปี หลังจากนั้นเก็บหัวพันธุ์อายุ 2 ปี มาปลูกศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นและอายุ 3 ปี นอกจากนี้ได้ตรวจนับจำนวนโครโมโซมในหัวพันธุ์ก่อนย้ายปลูก เพื่อยืนยันความเป็นเททระพลอยด์ของต้น

ทุกต้นที่ใช้ศึกษาแล้วจึงปลูกเพื่อศึกษาเปรียบเทียบกับต้นดิพลอยด์ในลักษณะต่างๆทางสัณฐานวิทยา เป็นเวลา 2 ฤดูปลูก

5.2.1 ลักษณะต้น

จากผลการศึกษาพบว่าต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ มีขนาดความสูงของต้นใกล้เคียงกับต้นดิพลอยด์ สอดคล้องกับการรายงานของ Gao et al. (2002) ที่รายงานในต้น *Scutellaria baicalensis* ว่าต้นที่เป็นเททระพลอยด์จะมีความสูงใกล้เคียงกันกับต้นดิพลอยด์ ซึ่งแตกต่างจากการายงานของวัชรินทร์ รัตนพันธ์ (2544) ที่รายงานว่าต้นขมิ้นชัน และขมิ้นอ้อยที่เป็นต้นโพลีพลอยด์จะมีขนาดความสูงของต้นน้อยกว่าต้นดิพลอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยของ Smith et al. (2004) ในขิง (*Zingiberaceae officinale*) ที่เป็น ออโตเททระพลอยด์ซึ่งมีใบสีเขียวเข้ม ใบและหัวมีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ เช่นเดียวกันกับการรายงานของ Song et al. (1996) ที่รายงานลักษณะของต้น *Alstroemeria* ที่เป็นเททระพลอยด์ว่ามีพื้นที่ใบเฉลี่ยต่อต้นมากกว่าต้นดิพลอยด์ แต่อัตราการสังเคราะห์แสงของทั้งสองพลอยดีมีค่าใกล้เคียงกัน

5.2.2 ลักษณะช่อดอกและดอก

จากผลการศึกษา พบว่า ความยาวช่อดอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางก้านช่อดอก และขนาดดอกของต้นเททระพลอยด์มีค่ามากกว่าต้นดิพลอยด์ ดอกของต้นเททระพลอยด์ใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ 16 % และมีกลีบดอกหนามากกว่าโดยทำให้ระยะเวลาการบานของดอกนานกว่าต้นดิพลอยด์เป็นเวลา 6 – 7 วัน ต้นเททระพลอยด์มีอับเรณูขนาดใหญ่มากกว่าและมีละอองเรณูใหญ่กว่าดิพลอยด์ 22% สอดคล้องกับการรายงานของ สุธนา เกตุมาโร และคณะ, (2552) รายงานว่าช่อดอกของปทุมมาลูกผสม (*Curcuma alismatifolia* x *C. parvifora*) ที่เป็นต้นโพลีพลอยด์มีความยาวช่อดอกเพิ่มขึ้น และมีจำนวนดอกจริงเพิ่มขึ้นกว่าต้นดิพลอยด์ นอกจากนี้การเพิ่มชุดโครโมโซมเป็นเททระพลอยด์ยังทำให้ขนาดของดอก และก้านช่อดอกของปทุมมาลูกผสมมีขนาดใหญ่กว่าดิพลอยด์ เช่นเดียวกันกับในต้นเจอราเนียม (*Pelargonium x hortorum* Bailey) เททระพลอยด์มีดอกขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ (Cramer, 1991 อ้างโดย Cramer, 1999) เช่นเดียวกันกับการชักนำให้กล้วยไม้หวายลูกผสมดิพลอยด์เป็นเททระพลอยด์ จะทำให้ดอกมีขนาดใหญ่ขึ้น กลีบดอกหนาขึ้น ก้านดอกตั้งตรง และมีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ ทำให้มีอายุการบานของดอกนานขึ้น (สาริณี ไชยเจริญ, 2538) ส่วนการชักนำให้เกิดออโตเททระพลอยด์ในพืชสมุนไพร ช่วยทำให้ต้นและเหง้ามีขนาดใหญ่ขึ้น จึงทำให้ผลผลิตมีปริมาณสารสำคัญมากขึ้นกว่าเดิม ดังใน *Salvia miltiorrihiza* Bge. (Gao et al., 1996)

5.2.3 ขนาดของหัวพันธุ์

หัวพันธุ์ของต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์มีขนาดและน้ำหนักใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ ทั้งจากต้นที่มีอายุ 2 และ 3 ปี โดยต้นเททระพลอยด์น้ำหนักหัวเฉลี่ยต่อต้นเป็น 34.43 และ 92.84 กรัม ส่วนต้นดิพลอยด์มีค่าเฉลี่ยเป็น 28.08 และ 77.52 กรัม นอกจากนี้ หัวพันธุ์ที่ได้จากต้นอายุ 3 ปี มีขนาดใหญ่กว่าหัวพันธุ์จากต้นอายุ 2 ปี ถึง 2.7 เท่า ในทั้งสองระดับพลอยดี แสดงให้เห็นว่ามีการสะสมอาหารในหัวพันธุ์ได้มากขึ้นเมื่อต้นมีอายุมากขึ้น ซึ่งเหมือนกับลักษณะของพืชหัว เช่น ปทุมมา (นันทรัตน์ ศุภกำเนิด และคณะ, 2538) หัวพันธุ์ของปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์นอกจากมีขนาดใหญ่กว่าแล้วยังสังเกตได้ว่า มีรากสะสมอาหารขนาดใหญ่ที่อ้วนและสั้นกว่าในต้นดิพลอยด์ อาจเป็นลักษณะที่ดีของหัวพันธุ์ในการขนส่ง ลดปัญหารากหัก หรือรากพันกันที่พบเกิดขึ้นเสมอในการส่งออกหัวพันธุ์ (ลิขิต มณีสินธุ์ : ติดต่อส่วนตัว) ผลการศึกษาที่ได้นี้มีความสอดคล้องกับงานทดลองในขิง (Ramachandran, 1982; Smith et al., 2004) *Alstroemeria* (Lu and Bridgen, 1997) ที่รายงานว่าหัวหรือเหง้าของต้นที่เป็นเททระพลอยด์จะมีขนาดของหัว และน้ำหนักหัวพันธุ์ที่มากกว่าต้นดิพลอยด์ ขนาดของรากและตุ้มสะสมอาหารที่ใหญ่กว่า

5.3 การเปรียบเทียบความสมบูรณ์พันธุ์ของต้นปทุมมาดิพลอยด์และเททระพลอยด์

การศึกษาความมีชีวิตของละอองเรณูพบว่า ละอองเรณูของต้นดิพลอยด์ที่มีชีวิตย้อมติดสีอะซีโตออซีนมีเพียงร้อยละ 0.74 ส่วนละอองเรณูที่เหลือเกือบทั้งหมดไม่มีชีวิต แต่ละอองเรณูของต้นเททระพลอยด์มีชีวิตร้อยละ 17.97 จะเห็นได้ว่าละอองเรณูที่ไม่ติดสีของต้นดิพลอยด์ และเททระพลอยด์มีค่าเป็นร้อยละ 61 และ 42 ตามลำดับ โดยความมีชีวิตของละอองเรณูในปทุมมาลูกผสมต้นเททระพลอยด์ที่พบมีค่าน้อยกว่าในปทุมมา (*C. alismatifolia*) เป็นอย่างมาก (98%) (เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ และคณะ, 2552ก) อย่างไรก็ตามการศึกษาคุณภาพของละอองเรณูที่วัดจากการย้อมติดสีอะซีโตออซีน (18%) และการงอกหลอดละอองเรณู (28%) พบว่ามีค่าที่แตกต่างกันมาก ดังนั้นการเปลี่ยนชนิดของสีย้อมเป็นเททระโซเลียม (2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride) ซึ่งตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ดีไฮโรจิเนสในกระบวนการหายใจ (Trognitz, 1991) อาจช่วยให้เพิ่มค่าความมีชีวิตของละอองเรณูได้ นอกจากนี้ยังพบความผิดปกติทางด้านสัณฐานวิทยาของละอองเรณู ทั้งในต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ได้หลายแบบ เช่น การมีผนังเซลล์หนา ขนาดของละอองเรณูมีหลายขนาด และมีรูปร่างบิดเบี้ยว

การตรวจสอบความงอกของละอองเรณูของต้นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ในอาหารสูตร Taylor's ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นระดับต่างๆกัน พบว่า ละอองเรณูของต้นดิพลอยด์ไม่สามารถงอกหลอดเรณูได้ในทุกระดับความเข้มข้น แต่ละอองเรณูของต้นเททระพลอยด์สามารถ

งอกหลอดละอองเรณูได้ดีที่สุดในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 10% นานเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ส่วนการยืดยาวของหลอดละอองเรณูเป็นไปในทำนองเดียวกัน ดังนั้นการเลี้ยงละอองเรณูในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 10% นานเป็นเวลา 5 ชั่วโมง เป็นวิธีการที่เหมาะสมต่อการงอกของละอองเรณูในปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ สอดคล้องกับการรายงานในปทุมมา 3 สายพันธุ์ (เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ และคณะ, 2552ข) ส่วนความยาวของหลอดละอองเรณูในปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์(3,800 ไมครอน) มีความยาวมากกว่าของปทุมมา (2,000 ไมครอน) (หยกทิพย์ สุดารีย์ และเฉลิมศรี นนทสวัสดิ์, 2549) นอกจากนี้ยังพบว่า ละอองเรณูของต้นดิพลอยด์ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์มีลักษณะโปร่งแสงปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก แต่ละอองเรณูของต้น เททระพลอยด์มีละอองเรณูที่ทึบแสงเกือบทั้งหมด

การเปรียบเทียบความสมบูรณ์พันธุ์จากเปอร์เซ็นต์การผสมติดระหว่างลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ พบว่า ต้นปทุมมาลูกผสมที่เป็นเททระพลอยด์จะมีความสมบูรณ์พันธุ์เพิ่มมากขึ้นกว่าต้นดิพลอยด์ประมาณ 11.75 เปอร์เซ็นต์ ในคู่ผสมที่ใช้ละอองเรณูจากต้นเททระพลอยด์ และเพิ่มขึ้น 3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ละอองเรณูจากต้นปทุมมา เช่นเดียวกันกับที่มีรายงานการศึกษาความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ของกล้วยไม้หวาย *Dendrobium superbiens* ที่เป็นดิพลอยด์ และเททระพลอยด์ พบว่า ต้นกล้วยไม้ที่เป็นเททระพลอยด์จะมีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะการผสมเกสรที่ใช้ละอองเรณูจากต้นเททระพลอยด์จะทำให้มีการติดฝักเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 62 - 70 % ในขณะเดียวกันหากใช้ละอองเรณูจากต้นดิพลอยด์มาผสมจะทำให้มีการติดฝักได้เพียงร้อยละ 16 เท่านั้น (สาริณี ไชยเจริญ, 2538)

5.4 การศึกษาความผิดปกติของการแบ่งไมโอซิสของเซลล์ต้นกำเนิดละอองเรณู

5.4.1 การศึกษาระยะพัฒนาการของดอกอ่อนกับระยะการแบ่งไมโอซิสของ PMC

การศึกษาการแบ่งไมโอซิสของ PMC ในดอกอ่อนขนาดต่าง ๆ กันนั้น ทำให้ทราบได้ว่าดอกอ่อนระยะที่ 1 ซึ่งมีความยาวเฉลี่ย 0.13 และ 0.18 ซม. ในต้นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ ตามลำดับนั้น เป็นดอกที่อ่อนเกินไป ไม่สามารถนำมาใช้ศึกษาการแบ่งไมโอซิสของ PMC ได้ เนื่องจากเซลล์ PMC ส่วนใหญ่อยู่ในระยะอินเตอร์เฟส คิดเป็นร้อยละ 49 และ 53 ในต้นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ตามลำดับ นอกจากนี้ในดอกทุกระยะยังไม่สามารถพบระยะต่าง ๆ ในช่วงแรกของไมโอซิส II เช่น โปรเฟส II เมตาเฟส II และ แอนาเฟส II ซึ่งมีผลให้ไม่สามารถศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมในไมโอซิส II ได้ หากจำเป็นต้องทำการศึกษาไมโอซิส II อาจต้องใช้ดอกที่มีขนาดอยู่ระหว่างระยะ 3 กับระยะ 4 ทั้งในต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ อย่างไรก็ดี การศึกษาความผิดปกติของการแบ่งไมโอซิสของ PMC ในปลายระยะไมโอ

ซิส II ยังสามารถทำได้โดยใช้ดอกระยะที่ 4 ซึ่งพบความถี่การแบ่งเซลล์ของ PMC ในระยะเทโลเฟส II สูงถึงร้อยละ 54 และ 51 ในต้นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ตามลำดับ โดยการศึกษาการแบ่งเซลล์ของ PMC ระยะเทโลเฟส II จะช่วยให้สามารถศึกษาความผิดปกติในการแบ่งไซโทพลาสซึมของPMC ได้ ซึ่งความผิดปกติในระยะนี้ เป็นผลสืบเนื่องมาจากความผิดปกติของการแบ่งไมโอซิส ในช่วงแรก และมีผลให้ละอองเรณูฝ่อ หรือละอองเรณูมีขนาดต่าง ๆ กันดังที่ได้มีการศึกษาในขิง (Adaniya และ Shoda, 1998) ข้าว (Song , 2001; XueLin et al., 2007) *Alstroemeria* (Sanso and Juan, 1998; Sanso and Rulfe, 2007) และพืชสกุล *Brachiaria* (Mendes-Bonato et al., 2002; Mendes-Bonato et al., 2004; 2007; Boldrini et al., 2006; Adamowski et al., 2007)

เป็นที่น่าสังเกตว่าในดอกระยะที่ 4 ของทั้งสองระดับพลอยดี มีการสร้างละอองเรณูแล้วโดยต้นเททระพลอยด์มีละอองเรณูมากกว่าต้นดิพลอยด์ ในการศึกษาครั้งนี้ ดอกระยะที่ 3 ซึ่งมีความยาวเฉลี่ย 0.43 และ 0.49 ซม ในต้นดิพลอยด์และเททระพลอยด์ ตามลำดับ เป็นระยะที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาเข้าคู่กันของโครโมโซมในระยะโปรเฟสI และการแยกออกจากกันของโครโมโซมในระยะแอนาเพส I เพราะเป็นระยะที่ PMC มีการแบ่งเซลล์อยู่ในระยะดังกล่าวมากที่สุด การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระยะพัฒนาการของดอกอ่อนกับระยะแบ่งไมโอซิสของ PMC ทำให้ทราบถึงขนาดดอกที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นดัชนีในการคัดเลือกดอกมาใช้ศึกษาดังในตัวอย่างของ *Arabidopsis* (Smyth et al., 1990) และกล้วยไม้ (Winston et al., 2002)

5.4.2 การศึกษาความผิดปกติของการแบ่งไมโอซิสของ PMC

จากผลการวิเคราะห์การแบ่งไมโอซิสของ PMC ไม่พบความผิดปกติในการเข้าคู่กันของโครโมโซม (synapsis) ในระยะไดอะไคเนซิส (diakinesis) ทั้งๆที่ปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์นี้เกิดจากพ่อแม่ต่างชนิดที่มีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน โดยในระยะแอนาเฟส I มีเปอร์เซ็นต์ความถี่ของการพบ chromosome bridge และ chromosome lagging ใน PMC มีค่าเป็นร้อยละ 23.68 และ 22.27 ตามลำดับ โดย PMC มีการแบ่งโครโมโซมเป็นปกติร้อยละ 54 การเพิ่มชุดโครโมโซมเป็นเททระพลอยด์ทำให้ PMC มีการแบ่งโครโมโซมเป็นปกติสูงถึงร้อยละ 90 อย่างไรก็ดียังคงพบจำนวนของ chromosome bridge ต่อ PMC และ จำนวน chromosome lagging ต่อ PMC ซึ่งมีตั้งแต่ 1- 4 ในทั้งสองระดับพลอยดี

ต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ซึ่งเกิดจากการเพิ่มชุดโครโมโซมของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ มีการแบ่งไมโอซิสของ PMC เป็นปกติสูงถึงร้อยละ 90 ซึ่งมีผลทำให้ละอองเรณูมีชีวิตเพิ่มขึ้นจากต้นดิพลอยด์เป็นร้อยละ 18 อย่างไรก็ดียังคงพบความผิดปกติของการแยกออกจากกันของโครโมโซมในระยะแอนาเฟสอยู่ร้อยละ 10 และละอองเรณูร้อยละ 82 ไม่มีชีวิต

ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์โครโมโซมของ PMC ในครั้งนี้ศึกษาเฉพาะระยะไมโอซิส I ก็ตาม แต่ก็ยังทำให้ทราบว่าความผิดปกติของโครโมโซมที่เกิดในระยะแอนาเฟส I มีผลต่อความมีชีวิตของละอองเรณูเป็นอย่างมาก โดยละอองเรณูของต้นดิพลอยด์ที่มีชีวิตที่ย้อมติดสีอะซีโตออซีนมีเพียงร้อยละ 0.74 ส่วนละอองเรณูที่เหลือเกือบทั้งหมดไม่มีชีวิตและไม่ติดสีอะซีโตออซีน ในขณะที่ละอองเรณูของต้นเททระพลอยด์สามารถย้อมติดสีอะซีโตออซีนได้สูงถึงร้อยละ 18 นอกจากนี้สังเกตพบความผิดปกติทางด้านสัณฐานวิทยาของละอองเรณูหลายแบบ เช่น การมีผนังเซลล์หนา ขนาดของละอองเรณูมีหลายขนาด และละอองเรณูมีรูปร่างบิดเบี้ยว ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในต้นดิพลอยด์และเททระพลอยด์

อย่างไรก็ดีความผิดปกติที่พบในการแบ่งไมโอซิสของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ทั้งแบบ chromosome bridge และ chromosome lagging ที่พบใน PMC ในระยะแอนาเฟส I เหมือนกับความผิดปกติที่พบในขิง (*Curcuma lorzengii*) และสอดคล้องกับการรายงานของ Sastrapradja and Aminah (1970) ที่ได้รายงานไว้ว่าเป็นสาเหตุที่ทำให้ละอองเรณูเป็นหมัน นอกจากนี้ Adaniya and Shoda (1998) ได้วิเคราะห์การแบ่งไมโอซิสของ PMC ในขิงพันธุ์ Sanchu และพันธุ์ Philippine พบว่า ถึงแม้โครโมโซมใน PMC ส่วนใหญ่ร้อยละ 80 ในทั้งสองสายพันธุ์มีการเข้าคู่กันได้อย่างปกติ แต่ก็พบความถี่ของการเกิด chromosome bridges และ chromosome lagging สูงมากกว่าร้อยละ 25 และยังพบว่าในระยะแอนาเฟส II มี chromosome bridges มากกว่าร้อยละ 15 ในทั้งสองพันธุ์ ซึ่งเป็นผลทำให้ความสมบูรณ์พันธุ์ของละอองเรณู (pollen fertility) มีเพียงร้อยละ 21 และ 2 ในพันธุ์ Philippine และพันธุ์ Sanchu ตามลำดับ

ถึงแม้ว่าการแบ่งไมโอซิสของ PMC ที่พบในปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์มีการเข้าคู่กันของโครโมโซมเป็นปกติก็ตาม แต่เพราะเหตุใดละอองเรณูจึงเป็นหมันเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ สาเหตุส่วนหนึ่งมาจากการแยกออกจากกันของโครโมโซมในระยะแอนาเฟส I มีความผิดปกติสูงถึงร้อยละ 46 อีกสาเหตุหนึ่งอาจจะเกิดจากความผิดปกติของการแบ่งไมโอซิส II ก็ได้ ทั้งนี้หากมีการเกิด chromosome bridges ทั้งในระยะแอนาเฟส I และ II ซึ่งเป็นความผิดปกติที่เกิดจาก chromosome inversion อาจช่วยให้สรุปได้ว่าสาเหตุความเป็นหมันของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์เกิดจากความผิดปกติทางด้านโครงสร้างของโครโมโซมลูกผสม(chromosome structural hybridility) เหมือนดังในขิง (Adaniya and Shoda, 1998)

บทที่ 6
สรุป

6.1 การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ และเททระพลอยด์

การตรวจสอบขนาดความยาวเซลล์คุมปากใบ ขนาดละอองเกสร และจำนวนโครโมโซมปลายราก ทำให้ยืนยันได้ว่าต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์เป็นเททระพลอยด์ที่แท้จริง โดยต้นเททระพลอยด์และดิพลอยด์มีความสูงของต้นใกล้เคียงกัน แต่ต้นเททระพลอยด์มีความกว้างทรงพุ่มมากกว่าต้นดิพลอยด์ เนื่องจากต้นเททระพลอยด์มีขนาดใบ และพื้นที่ใบมากกว่าต้นดิพลอยด์ ส่วนความยาวช่อดอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางก้านช่อดอก และขนาดดอกของต้นเททระพลอยด์ มีค่ามากกว่าต้นดิพลอยด์ ดอกของต้นเททระพลอยด์ใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ 16 % และมีกลีบดอกหนามากกว่าโดยทำให้ระยะเวลาการบานของดอกนานกว่าต้นดิพลอยด์เป็นเวลา 6 – 7 วัน ต้นเททระพลอยด์มีอับเรณูขนาดใหญ่มากกว่าและมีละอองเรณูใหญ่กว่าดิพลอยด์ 22% นอกจากนี้ ขนาดหัวพันธุ์ของต้นเททระพลอยด์มีขนาดใหญ่กว่าต้นดิพลอยด์ โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางหัวพันธุ์ และจำนวนรากสะสมอาหารมากกว่าต้นดิพลอยด์

6.2 การเปรียบเทียบความสมบูรณ์พันธุ์ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์

การศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของปทุมมาลูกผสมโดยดูจากความมีชีวิตและการงอกของละอองเรณู และเปอร์เซ็นต์การผสมติด พบว่า ละอองเรณูเกือบทั้งหมด (99%) ของต้นปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ไม่มีชีวิต ในขณะที่ละอองเรณูของต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์มีชีวิตร้อยละ 18 และสามารถงอกได้ในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลซูโครส 10% โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกเป็นร้อยละ 28 เมื่อนำละอองเรณูของต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ไปทำการผสมตรงและผสมสลับกับปทุมมา (*Curcuma alismatifolia*) ซึ่งมีจำนวนโครโมโซม 2n=2x=32 พบว่าต้นเททระพลอยด์ที่ผสมตัวเอง และที่ใช้ปทุมมาเป็นต้นแม่มีการผสมติดเป็นร้อยละ16 และ 13 ตามลำดับ ทั้งนี้เมล็ดที่เกิดจากการผสมนี้ไม่สามารถงอกได้ในอาหารสังเคราะห์

6.3 การศึกษาความผิดปกติของการแบ่งไมโอซิสของเซลล์ต้นกำเนิดละอองเรณู

การศึกษาความผิดปกติของการแบ่งไมโอซิสของ PMC เพื่อหาสาเหตุความเป็นหมันของละอองเรณูของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ พบว่า มีความผิดปกติในการแยกจากกันของโครโมโซมในระยะแอนาเฟส I แบบ chromosome bridge และ chromosome lagging รวมเป็นร้อยละ 46 แต่ไม่พบความผิดปกติของการเข้าคู่กันของโครโมโซมที่ระยะไดอะไคเนซิส อาจสรุปได้ว่าสาเหตุการเป็นหมันของปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์ เกิดจากความผิดปกติทางด้านโครงสร้างของโครโมโซมลูกผสม (chromosome structural hybridity) โดยกระบวนการอินเวอร์ชัน (inversion) และการเพิ่มชุดโครโมโซมได้เป็นต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์ ช่วยให้พบความผิดปกติในการแยกจากกันของโครโมโซมในระยะแอนาเฟส I แบบ chromosome bridge และ chromosome lagging รวมเป็นร้อยละ 10

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2544. "ปทุมมาและกระเจียว", ใน ผลงานวิชาการประจำปี 2544 (เล่ม 2). กรมวิชาการเกษตร : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ และคณะ. 2552 ก. "การศึกษาการผสมเกสรของพืชในสกุลขมิ้นที่ผสมในชนิดเดียวกันและต่างชนิดกัน", ใน บทคัดย่อ PF-39 การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 8. ณ โรงแรมดิเอ็มเพรส : เชียงใหม่.

_____. 2552 ข. "การศึกษาการติดผล การพัฒนาและการงอกของเมล็ดในพืชสกุลขมิ้นที่ผสมในชนิดเดียวกันและต่างชนิดกัน", ใน บทคัดย่อ PF-40 การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 8. ณ โรงแรมดิเอ็มเพรส : เชียงใหม่.

ดิเรก ตนพะยอม และคณะ. 2538. "ผลของจำนวนโครโมโซมต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเยอบีร่า", ใน รายงานการประชุมวิชาการไม้ดอกไม้ประดับแห่งชาติ ครั้งที่ 1. น. 96 – 107.

ดวงจันทร์ เกตุบุตร. 2549. การเพิ่มจำนวนยอดและการชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมในปทุมมาลูกผสม (*Curcuma alismatifolia* x *C. rhabdota*) โดยโคลชิซินในสภาพหลอดแก้ว. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) : มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

ดวงทิพย์ วิทยศักดิ์ และคณะ. 2545. "การศึกษาโครโมโซมว่านสี่ทิศ", ว. เกษตรศาสตร์ (พิเศษ). 33(4-5) : 23 -26.

นันทรัตน์ ศุภกำเนิด และคณะ. 2538. "ความสัมพันธ์ของรากสะสมอาหารกับการงอกและการเจริญเติบโตของปทุมมา", ใน รายงานการประชุมวิชาการไม้ดอกไม้ประดับแห่งชาติ ครั้งที่ 1. น. 12 – 17.

นิตย์ศรี แสงเดือน. 2541. "การชักนำให้เกิดหม่อนเททราพลอยด์โดยใช้โคลชิซินร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ", ว. เกษตรศาสตร์. 32 : 424 – 430.

นิตย์ศรี แสงเดือน. 2551. พันธุศาสตร์พืช. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประดิษฐ์ พงษ์ทองคำ. 2543. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2551. เทคนิคเนื้อเยื่อพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

พนิต รพิพันธุ์. 2544. ผลของความเข้มข้น และระยะเวลาการให้สารโคลชิซินต่อการงอก การเจริญและจำนวนโครโมโซมของพืชที่มีศักยภาพด้านไม้ดอกไม้ประดับบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พรพิมล สุริยจันทราทอง และอรัญญา พิมพ์มงคล. 2548. "การเพิ่มชุดโครโมโซมลูกผสมระหว่างปทุมมากับบัวโกเมนโดยใช้โคลชิซินในสภาพหลอดแก้ว", อุบลราชธานี : คณะเกษตรศาสตร์ และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

พิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์ และคณะ. 2539. "การศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืชกลุ่มกระเจียวไทย 17 ชนิด", ใน รายงานการประชุมวิชาการไม้ดอกไม้ประดับแห่งชาติ ครั้งที่ 2. น. 86 – 99. คณะอนุกรรมการประสานงานวิจัยและพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้ และสมาคมวิทยาศาสตร์การเกษตรแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์.

ลิลลี่ กาวีต๊ะ. 2546. การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาและพัฒนาการของพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัชรินทร์ รัตนพันธ์. 2544. การเพิ่มจำนวนโครโมโซมของขมิ้นชันและขมิ้นอ้อยด้วยโคลชิซินในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัชรินทร์ รัตนพันธ์ และอรดี สหวัชรินทร์. 2543. "การขยายพันธุ์ขมิ้นชันและขมิ้นอ้อย และการชักนำให้เพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้โคลชิซิน", ใน เอกสารสัมมนาเรื่องแนวทางการพัฒนาสมุนไพรของประเทศไทย. น. 19 – 20.

วิภาดา ทองทักษิณ. 2543. "การปรับปรุงพันธุ์ปทุมมา", ใน ไม้ตัดดอกเศรษฐกิจและการปรับปรุงพันธุ์. หน้า 79 – 84. เอกสารประกอบวิชาการที่ 24 สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร.

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2538. พันธุศาสตร์ พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์เอ็นพีซับพลายพริ้นติ้ง.

ศิริพร เชื้อจีน. 2546. การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์และความสมบูรณ์พันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวายบางพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

สาริณี ไชยเจริญ. 2538. "การศึกษาจำนวนโครโมโซม ลักษณะดอก และความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ของกล้วยไม้ *Dendrobium superbients* ดิพลอยด์ และเททระพลอยด์", วิทยาศาสตร์เกษตร. 29 : 150 – 157.

สุทธิชาติ อารีวิลาศ. 2537. การใช้กลูโคส ซูโครส กรดบอริคและแคลเซียมไรเตรตในการเพาะเรณูของกล้วยไม้หวายซาบิน. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุธนา เกตุมาโร และคณะ. 2552. "การศึกษาความมีชีวิตละอองเรณูของปทุมมาลูกผสม (F1 Hybrid) เมื่อมีการใช้สารโคลชิซิน", ใน บทคัดย่อ PF-41 การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 8. ณ โรงแรมดิเอ็มเพรส : เชียงใหม่.

สุพรรณญิกา เนตรทัศน์. 2539. การปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข7 ให้ต่านทานต่อแมลงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดยการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนร่วมกับการชักนำด้วยโคลชิซิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2535. รายงานผลการวิจัยเรื่องการรวบรวมเชื้อพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกสกุล *Curcuma* เพื่อการส่งออก. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2539. ปทุมมาและกระเจียว (Curcuma) ไม้ดอกไม้ประดับ. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน).

หยกทิพย์ สุดารีย์ และเฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี. 2549. "การศึกษาการงอกของละอองเกสรในการผสมข้ามชนิดของพืชในสกุลขมิ้น", Agricultural Sci. J. 37 (6): 231 – 234.

อมรา คัมภิรานนท์. 2540. พันธุศาสตร์ของเซลล์ สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ.

Adaniya, S. and M. Shoda. 1998. "Meiotic irregularity of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe)", Chromosome Science. 2: 141 -144.

Adaniya, S. 2001. "Optimal pollination environment of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) evaluated by *in vitro* pollen germination and pollen tube growth styles", Scientia Horticulturae. 90 (3-4): 219 – 226.

Adamowski, E.V. and et al. 2007. "Abnormal cytokinesis in microsporogenesis of *Brachiaria humidicola* (Poaceae:Paniceae)", Genetics Molecular Research. 6 (3): 616 – 621.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Ali, M., H. Okubo and K. Fujieda. 1992. "Production and characterization of *Solanum* amphidiploids and their resistance to bacterial wilt", Scientia Horticulturae. 49: 181 – 196.

Anderson, J.A. and et al. 1990. "An *in vitro* chromosome doubling method for clovers (*Trifolium* spp.)", Genome. 34: 1- 5.

Armstrong, S.J. and H.J. Gareth. 2003. "Meiotic cytology and chromosome behavior in wide-type *Arabidopsis thaliana*", Journal of Experimental Botany. 54 (380): 1 – 10.

Baloch, M.J. and et al. 2000. "Impact of sucrose concentration on *in vitro* pollen germination of Okra, *Hibiscuc esculentus*", Pakistan Journal of Biological Science. 4 (4): 402 – 403.

Beck, S.L. and et al. 2003. "Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle *Acacia mearnsii*(de Wild)", Botanical Journal of the Linnean Society. 141 (2): 177– 181.

Beck, S.L., Visser G. and Dunlop R. W. 2005. "A comparison of direct (flow cytometry) and indirect (stomatal guard cell lengths and chloroplast numbers) techniques a measure of ploidy in black wattle, *Acacia mearnsii*(de Wild)", South African Journal of Botany. 71 (3, 4): 354 – 358.

Boldrini, K.R., Maria S.P. and Cacilda B.D.V. 2006. "Abnormal timing of cytokinesis in microsporogenesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Paniceae)", Journal of Genetics. 85 (3): 225 – 228.

Cardoso, M.B. and et al. 2004. " Initial segmentation pattern of microspores and pollen viability in soybean cultured anthers: indication of chromosome doubling", Brazilian Archives of Biology and Technology. 47 (5): 703 – 712.

Cavalcante, H.C., M.T. Schifino Wittmann and A.L.C. Dornelles. 2000. "Meiotic behaviour and pollen fertility in an open-pollinated population of 'Lee' mandarin [*Citrus clementina* x (*C. paradise* x *C.tangerine*)]", Scientia Horticulturae. 86: 103 – 114.

Cohen, D. and J. Yao. 1996. " *In vitro* chromosome doubling of nine *Zantedeschia* cultivars", Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 47: 43 – 49.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Contreras, R.N. and Thomas G.R. 2007. " Reproductive behavior of diploid and allotetraploid *Rhododendron* L. 'Fragrant Affinity'", Hortscience. 42 (1): 31 – 34.

Cramer, C. S. 1999. "Laboratory techniques for determining ploidy in plants", Horttechnology. 9(4): 594 – 596.

De Oliveira, V.M. and et al. 2004. "Chromosome and morphological studies of diploid and polyploidy cytotypes of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Eupatorieae, Asteraceae)", Genetics and Molecular Biology. 27 (2): 215 – 222.

Dobzhansky, T. 1953. "Genetic and the Origin of Species", Amer. Orch. Soc. Bull. 60: 45-57.

Eksomtramage, L. and et al. 2002. "Chromosome counts of some zingiberaceous species from Thailand", Sonklanakarin Journal of Science and Technology. 24: 311 – 319.

Ercisli, S. 2007. "Determination of pollen viability and *in vitro* pollen germination of *Rosa dumalis* and *Rosa villosa*", Bangladesh J. Bot. 36 (2): 185 – 187.

Escandon, A.S. and et al. 2005. "*In vitro colchicine treatment to obtain a new cultivar of Scoparia montevidiensis*", Journal of Biotechnology. 8 (2): 204 - 211.

Felismino, M.F. and et al. 2008. "Meiotic behavior in root tips pf *Brachiaria* genotypes with meiotic chromosome elimination during microsporogenesis", Genetics and Molecular Research. 7 (2): 336 – 341.

Furness, C. A. and P.J. Rudall. 1999. "Microsporogenesis in monocotyledons", Annals of Botany. 84: 475 – 499.

Fuzinatto, V. A. and et al. 2008. "Evaluation of microsporogenesis in an interspecific *Brachiaria* hybrid (Poaceae) collected in distinct years", Genetics and Molecular Research. 7 (2): 424 – 432.

Gao, S.L. and et al. 1996. "Autotetraploid plants from colchicines-treated bud culture of *Salvia miltiorrihiza* Bge", Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 47: 73 – 77.

Gao, S.L. and et al. 2002. "*In vitro* production and identification of autotetraploids of *Scutellaria baicalensis*", Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 70: 289 – 293.

Gao, J.Y. and et al. 2004. "The floral biology of *Curcumorpha longiflora* (Zingiberaceae): A ginger with two-day flowers", American Journal of Botany. 91 (2): 289 – 293.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Geetha, K., S. Vijayabaskaran and N. Jayaraman. 2004. "*In vitro* studies on pollen germination and pollen tube growth in maize", Food Agriculture & Environment. 2 (1): 205 – 207.

Ghaffari, S.M. 2006. "Occurrence of diploid and polyploid microspores in *Sorghum bicolor* (Poaceae) is the result of cytomixis", African Journal of Biotechnology. 5: 1450 – 1453.

Goldberg R.B., Beals T.P., Sanders P.M. 1993. "Anther development: basis principles and practical applications ", The Plant Cell. 5: 1217 – 1229.

Ishikawa, T., T. Takayama and H. Ishikawa. 1999. "Amphidiploids between *Alstroemeria ligtu* L. hybrid and *A. pelegrina* L. var *rosea* induced through colchicine treatment and their reproductive characteristics", Scientia Horticulturae. 80: 235 – 246.

Kadota, M. and Y. Niimi. 2002. "*In vitro* induction of tetraploid plants from a diploid Japanese Pear cultivar (*Pyrus purifolia* N. Cv. Hosui)", Plant Cell Reports. 21 (3): 282 – 286.

Kelley, J.K., Aaron R. and Susan K. 2002. "A method to estimate pollen viability from pollen size variation", American Journal of Botany. 89 (6): 1021 – 1023.

Kharabian, A. and A. Darabi. 2005. "Characterization of some chromosomal aberrations in regenerated rice plants (*Oryza sativa*)", Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 83: 161 – 168.

Khazanehdari, K.A. and V. Jones. 1997. "The causes and consequences of meiotic irregularity in the leek (*Allium ampeloprasum*spp. *Porrum*); amplications for fertility, quality and uniformity", Euphytica. 93: 313 – 319.

Khrustaleva, L.I. and C. Kik. 1998. "Cytogenetic studies in the bridge cross *Allium cepa* x (*A. fistulosum* x *A. royei*)", Theory Appl Genet. 96: 8 -14.

Krishnaswami, R. and Andal R. 1978. "Stomatal chloroplast number in diploids and tetraploids of *Gossipium*", Proc. Indian Acad.Sac. 87 (B): 109 – 112.

Lalitha, R. and M.N. Premachandran. 2007. "Meiotic abnormalities in intergeneric hybrids Between *Saccharum spontaneum* and *Erianthus arundinaceus* (Gramineae)", Cytologia. 72 (3): 337 – 343.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Lavania, U.C. 1988. "Enhanced productivity of the essential oil in the artificial autotetraploid of Vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash)", Euphytica. 38: 271 – 276.

Lavania, U.C. and S. Srivastava. 1991. "Enhanced productivity of tropane alkaloids and fertility in artificial autotetraploids of *Hyoscyamus niger* L.", Euphytica. 52: 73 – 77.

Leong-Skonickova, J. and et al. 2007. "Chromosome numbers and genome size variation in Indian species of *Curcuma* (Zingiberaceae)", Annal of botany. 100: 505 – 526.

Lu, C.Y. and M.P. Bridgen. 1997. "Chromosome doubling and fertility study of *Alstroemeria aurea* x *A. caryophyllaea*", Euphytica. 94: 75 – 81.

Mangaly J.K. and K. Sworrupanandan. 1977. "Some aspects of morphology of the ovule and seed of *Costus malortieanus* (Zingiberaceae)", Proc. Indian Acad. Sci. 86(3): 175 – 179.

Marcellan, O.N. and E.L. Camadro. 1996. "The viability of asparagus pollen after storage at low temperature", Scientia Horticulturae. 67: 101 – 104.

Marcotrigiano, M. 1990. "Genetic mosaics and chimeras: implications in biotechnology, In Baja YPS (eds) Somaclonal variation in crop improvement. I. Biotechnology in agriculture and forestry", Springer. 11: 85 – 111.

McCuistion, F. and Gary W.E. 1993. "Identifying polyploid of various Cucurbits by stomatal guard cell chloroplast number", Proc. Fla. State Hort. Soc. 106: 155 – 157.

McCuistion, F. and T.C. Wehner. "Seedless watermelon breeding", Cucurbit breeding horticulture science. http://cuke.hort.ncsu.edu/cucurbit/wmelon/seedless.html. June 10, 2007.

Mendes-Bonato, A.B. and et al. 2002. "Chromosome numbers and microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Gramineae)", Euphytica. 125: 419 – 425.

Mendes-Bonato, A.B. and et al. 2004. "Abnormal pollen mitoses (PM I and PM II) in an interspecific hybrid of *Brachiaria ruziziensis* and *B. decumbens* (Gramineae)", Journal of Genetics. 83 (3): 279 – 283.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Mendes-Bonato, A.B. and et al. 2007. "Meiotic arrest compromises pollen fertility in an interspecific hybrid between *Brachiaria ruziziensis* and *B. decumbens* (Poaceae: Paniceae)", Brazilian Archives of Biology and Technology. 50 (5): 831 – 837.

Mishra M.K. 1997. "Stomatal characteristics at different ploidy levels in *Coffea* L.", Annals of Botany. 80: 689 – 692.

Mochizuki, M. and Ohki S. T. 2004. "Shoot meristem tissue of tobacco inoculated with Cucumber mosaic virus is infected with the virus and subsequently recovers from infection by RNA silencing", Journal Gen. Plant. Pathol. 70: 363 – 366.

Nassar, N.M.A. 2004. "Fertility and chimera induction in cassava, *Manihot esculenta* Crantz interspecific hybrids", http://www/geneconserve.pro.br/artigo 16.html. June 12, 2004.

Palma-Silva, C. and et al. 2004. "Chromosome numbers, meiotic behaviour, and pollen viability of species of *Vriesea* and *Aechmea* genera (Bromeliaceae) native to Rio Grande Do Sul, Brazil", American Journal of Botany. 91 (6): 804 – 807.

Ramachandran, K. 1982. "Polyploidy induced in ginger by colchicine treatment", Current Science. 51 (6): 288 – 289.

Ranney, T.G. 2004. "Polyploid: From evolution to landscape plant improvement", North Carolina Cooperative Extension. http://www.ces.ncsu.edu/fletcher/programs/nursery/metria/metria11/ranney/polyploidy.htm. August 15, 2004.

Rhee, H.K. and et al. 2005. "Comparison of pollen morphology in interspecific hybrid lilies after *in vitro* chromosome doubling", In Proceeding of the Ninth International Symposium on Flower Bulbs, Okubo, H., W. B. Miller and G.A. Chastagner, eds. pp. 639 – 643.

Risso-Pascotto, C. and M.S. Pagliarini. 2004. "Asynchronous meiosis in an interspecific hybrid of *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha*", Plant Cell Rep. 23: 304 – 310.

Risso-Pascotto, C. and et al. 2005. "Symmetric pollen mitosis I and suppression of pollen mitosis II prevent pollen development in *Brachiaria jubata* (Gramineae)", Braz.Med.Biol. Res. 38 (11): 1603 – 1608.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Rose, J.B., J. Kubba and K.R.Tobutt. 2000(a). "Chromosome doubling I sterile *Syringa vulgaris* x *S. pinnatifolia hybrids by in vitro* culture of nodal explants", Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 63: 127-132.

_____. 2000(b). "Induction of tetraploidy in *Buddleia globosa*", Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 63 (2): 121-125.

Ruvalcaba-Ruiz, D. and B. Rodriguez-Garay. 2002. "Aberrant meiotic behavior in *Agave tequilana* Weber var. azul. BMC", Plant Biology. 2: 2 – 4.

Saradhuldhat, P. and B. Silayoi. 2001. "Some chemical treatment on Kluai Khai Through tissue culture for mutation breeding", Kasetsart Journal (National Science). 35: 231 – 241.

Saensouk, S., Sumonthip, B. and Luangpirom, A. 1998. "Chromosome numbers of *Zingiberaceae* in Phu Phan National Park", 24th Congress on Science and Technology of Thailaand. 19-21. October 1998. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok.

Sanso, A.M. and H.H. Juan. 1998. "Karyological studies in *Alstroemeria* and *Bomarea* (Alstroemeriaceae)", Hereditas. 129: 67-74.

Sanso, A.M. and A.F. Rulfe. 2007. "Meiotic irregularities in *Alstroemeria andina* var. *venustula* (Alstroemeriaceae)", Botanical Studies. 48: 311 – 317.

Sari, N., Abak K. and Pitrat M. 1999. "Comparisons of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrus lanatus* (Thunb.) Matsum. And Nakai", Scientia Horticulturae. 82: 256 -277.

Sastrapradja, S. and S.H. Aminah. 1970. "Factors affecting fruit production in *Curcuma* species", Annales Bogoriensis. Vol. V. Part II: 99 -107.

Sato, S. and et al. 1998. "Establishment of reliable methods of *in vitro* pollen germination and pollen preservation of *Brassica rapa* (syn. *B. campestris*)", Euphytica. 103: 29 – 33.

Schifino, M.T. and M.I.M. Fernandes. 1987. "Induction of polyploidy and cytological characterization of autotetraploids of *Trifolium riograndense* Burkart (Leguminosae)", Euphytica. 36: 863 – 872.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Scott, R.J., M. Spielman. and H.G Dickinson. 2004. "Stamen structure and function", The Plant Cell. 16: 46 – 60.

Shivanna, K.R. 2003. Pollen biology and biotechnology. Science Publishers, Inc.

Smith, M.K. and et al. 2004. "Ginger (*Zingiberaceae officinale*) autotetraploids with improved processing quality produced by an in vitro colchicine treatment", Aus. J. Exp. Agri. 44: 1065 – 1072.

Smyth, D.R., J.L. Bowman and E.M. Meyerowitz. 1990. "Early flower development in *Arabidopsis*", The Plant Cell. 2: 755 – 767.

Song, P., K. Wanhee and B.P. Ellen. 1997. "Chromosome doubling of *Allium fistulosum* x *A. cepa* interspecific F1 hybrids through colchicines treatment of regenerating callus", Euphytica. 93: 257 – 262.

Song, Z.P. 2001. "A study of pollen viability and longevity in *Oryza rufipogon, O. sativa* and their hybrids", Genetic resources. IRRN: 26. 2.

Speranza, P., M. Vaio. And C. Mazzella. 2003. "Karyotypes of two cytotypes of *Paspalum quadrifarium* Lam. (Poaceae) an alternative technique for small chromosomes in plants", Genetics and Molecular Biology. 26 (4): 499 – 503.

Srivastava, S., U.C. Lavania and J. Stbenga. 1991. "Genetic variation in meiotic behaviour and fertility in tetraploid *Hyoscyamus muticus*: correlation with diploid meiosis", Heredity. 68: 231 – 239.

Stanley, R.G. and F.A. Loewus. 1963. "Boron and myo-inisitol in pollen pectin biosynthesis, pp 120 – 139. ใน H.F. Linkens (ed.). Pollen physiology and fertilization", A symponium held at the University if Nijmegen, The Netherland.

Steffen, K. 1963. "Male gametophyte", In Maheshware(ed.), Recent advance in the embryology of angiosperms Delhi: Interm. Soc. Plant morphologists.

Tan, G.Y. and G.M. Dunn. 1973. "Relationship of stomatal length and frequency and pollen grain diameter to ploidy level in *Bromus inermis* Leyss", Crop Sci. 13: 332 -334.

Thao, N.T.P.and et al. 2003. "Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatment", Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 72: 19-25.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Trognitz, B.R. 1991. "Comparison of differenr pollen viability assays to evaluate pollen sterility of potato diploids", Euphyrica. 56 (2): 143 – 148.

Vainstein, A. 2002. "Breeding for ornamentals: Classical and molecular approaches", Kluwer Academic Publisher.

Wan, H.Y., J.M. Widholm and A.L. Rayburn. 2006. "The use of stomata chloroplast number for rapid determination of ploidy level in maize", Plant Breedung. 105 (3): 203 – 210.

Winston, C.C.and et al. 2002. "A cytogenetical study of the fertility of three local orchid hybrid", http://www.staff.science.nus.edu.sg/~scilooe/srp2002/sci_paper/SBS/reseach_paper/Koh%20Ee%20Mei%20Amelia1.pdf. November 12, 2008.

Wongpiyasatid, A. and et al. 2005. "Stomatal size, stomatal frequency and pollen grain diameter as indirect method for identification of ploidy level in Cotton", Kasesart J.(Nat. Sci.). 39: 552 -559.

XueLin, F. L. and et al. 2007. "Cytological mechanisms of interspecific incrossability and hybrid sterility etween *Oryza sativa* L. and *O. alta* Swallen", Chinese Science Bulletin. 52 (6): 755 – 765.

Zong, N.Y., Aung T. and Yam T.W. 2007. "Comparative study on diploid and tetraploid *Spathoglottis* Lion of Singapore", http://www.staff.science.nus.edu.sg/~scilooe/srp_2003/sci_paper/botanic/research_paper/ng_yao_zong.pdf. August 12, 2007.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การคำนวณ

ภาผนวก ก การคำนวณพื้นที่ใบ

1. การคำนวณ

1.1 การคำนวณพื้นที่ในการนับจำนวนปากใบต่อพื้นที่ซม.^{2}

1.1.1 นับจำนวนช่องไมโครมิเตอร์ที่วางทับเส้นผ่านศูนย์กลางวงกลมที่มองเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า ได้เส้นผ่านศูนย์กลางวงกลม 43 ช่อง รัศมีของวงกลมจึงมีค่าเท่ากับ 21.5 ช่อง

1.1.2 คำนวณรัศมีของวงกลมในหน่วยซม เมื่อ 1 ช่องของไมโครมิเตอร์เท่ากับ 0.01 มม.

21.5 ช่อง x 0.01 มม. = 0.215 มม.

0.215 มม. x 10 = 0.0215 ซม.

1.1.3 คำนวณพื้นที่วงกลมด้วยสูตร πr^2

พื้นที่วงกลมที่กำลังขยาย 400 เท่า = $(22/7) \times (0.0215)^2$

= $(22/7) \times (0.0005)$

= 3.1428×0.0005

= 0.0016 ซม.^{2}

ดังนั้น พื้นที่วงกลมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า เท่ากับ 0.0016 ซม.^{2}

1.1.4 คำนวณพื้นที่ 1 ซม.^{2} เป็นจำนวนกี่เท่าของพื้นที่วงกลมที่กำลังขยาย 400 เท่า

พื้นที่วงกลม 0.0016 ซม.^{2} = 1 เท่า

พื้นที่ 1.0000 ซม.^{2} = (1x1)/0.0016

= 625 เท่า

ดังนั้น พื้นที่วงกลมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า เมื่อคูณด้วย 625 จะได้พื้นที่เท่ากับ 1 ซม.^{2}

1.1.5 การคำนวณจำนวนปากใบต่อพื้นที่ซม.^{2} ทำโดยนับจำนวนปากใบในพื้นที่วงกลมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า (เป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 ตำแหน่งของใบ) มาคูณด้วย 625 จะได้จำนวนปากใบต่อพื้นที่ 1 ซม.^{2}

<u>ตัวอย่างการคำนวณ</u> ในต้นปทุมมาลูกผสมเททระพลอยด์มีจำนวนปากใบที่นับได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า จาก 2 ตำแหน่ง คือ 5 และ 4 เซลล์ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.5 เซลล์ คูณด้วย 625 เท่ากับ $4.5 \times 625 = 2,812.50$ เซลล์ต่อซม.^{2}

ภาคผนวก ข

การเตรียมอาหาร และสารเคมี

ภาผนวก ข การเตรียมอาหาร และสารเคมี

1. วิธีการเตรียมอาหารและสารเคมี

1.1 การเตรียมอาหารสูตร MS (1962)

1.1.1 การเตรียมสารละลายเข้มข้น(Stock solution)

1.1.1.1 เตรียมสารละลายเข้มข้นแยกเป็น 6 ขวด ตามตารางที่ ก.1

1.1.1.2 ชั่งสารเคมีแต่ละชนิดตามปริมาณสารต่อลิตรในตารางที่ ก.1 ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.1.1.3 ละลายสารด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงนำสารละลายแต่ละชนิดที่อยู่ในขวดเดียวกันมาเทรวมกัน และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร โดยสารละลายเข้มข้นขวดที่ 1- 6 มีความเข้มข้นของสารดังนี้ ขวดที่ 1 มีความเข้มข้น 20 เท่า และขวดที่ 2- 6 มีความเข้มข้น 100 เท่า

1.1.1.4 การเตรียม $CuSO_4.5H_2O$ ปริมาณ 1.25 มก. ให้ใช้วิธีชั่ง $CuSO_4.5H_2O$ 125 มก. ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล แล้วใช้สารละลาย 1 มล. ในการเตรียมสารละลายเข้มข้นขวดที่ 2

1.1.1.5 การเตรียม $CoC1_2.6H_2O$ ปริมาณ 1.25 มก. ให้ใช้วิธีชั่ง $CoC1_2.6H_2O$ 125 มก. ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล แล้วใช้สารละลาย 1 มล ในการเตรียมสารละลายเข้มข้นขวดที่ 3

1.1.1.6 การเตรียมสารละลายเข้มข้นขวดที่ 5 ให้ละลาย $FeSO_4.7H_2O$ ในน้ำกลั่น 400 มล. และละลาย $Na_2EDTA.2H_2O$ ในน้ำกลั่น 400 มล. นำสารทั้งสองมาผสมกันใน volumetric flask ขนาด 1,000 มล. วางบนเตาไฟฟ้าที่มีเครื่องกวนแบบแม่เหล็ก (hot plate stirrer) ที่อุณหภูมิ 60^0C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นปล่อยให้สารละลายเย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้องจึงปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร และเก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา

1.1.1.7 เก็บสารละลายเข้มข้นขวดที่ 1- 5 ไว้ที่อุณหภูมิ 8-10^0C (ในตู้เย็น) และเก็บสารละลายเข้มข้นขวดที่ 6 ไว้ที่อุณหภูมิ -5^0C (ในช่องแช่แข็งของตู้เย็น)

1.1.2 การเตรียมอาหารสูตร MS

1.1.2.1 การเตรียมอาหารสูตร MS ปริมาตร 1 ลิตร เริ่มจากเติมน้ำกลั่นปริมาณ 500 มล. ลงใน volumetric flask ขนาด 1 ลิตร

1.1.2.2 เติมน้ำตาลและเขย่าให้น้ำตาลละลาย เติมสารละลายเข้มข้นขวดที่ 1- 6 ตามปริมาตรที่ใช้เตรียมอาหาร 1 ลิตร ดังในตารางที่ ก และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกรณีที่ใช้ BAP แล้วปรับปริมาตรอาหารให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.1.2.3 เทสารละลายจาก volumetric flask ลงในบิกเกอร์ขนาด 1 ลิตร และปรับ pH ของสารละลายด้วย HCl และKOH ความเข้มข้น 0.1 N และ 1N ให้อาหารมีค่า pH 5.8

1.1.2.4 กรณีการเตรียมอาหารวุ้นให้ละลายวุ้น 6.5 กรัม โดยค่อยๆโรยผงวุ้นลงในบิกเกอร์อาหารที่ตั้งไฟจนร้อนทีละน้อย และใช้แท่งแก้วคนอาหารเป็นระยะๆ จนกว่าวุ้นจะละลายทั้งหมด ซึ่งสังเกตจากอาหารจะใสเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเทอาหารวุ้นลงในขวดแก้วขนาด 4 ออนซ์ ปริมาตร 20 มล./ขวด ปิดฝาขวดและนำขวดอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดัน ไอน้ำที่อุณหภูมิ 121° C ความดัน 1.15 กก/ซม^2 เป็นเวลา 15 นาที จึงนำขวดอาหารวุ้นมาวางพักไว้จนวุ้นแข็งตัวและเย็นที่อุณหภูมิห้องและนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

1.2 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP

1.2.1 การเตรียม BAP เข้มข้น 1,000 มก./ล เริ่มจากการชั่ง BAP 100 มก. ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.2.2 เท BAP จากกระดาษชั่งสารลงใน volumetric flask ขนาด 100 มล. ละลาย BAP ด้วย 1N KOH ประมาณ 5 มล.

1.2.3 เติมน้ำกลั่นทีละน้อยและเขย่าสารเบาๆจนมีปริมาตรครบ 100 มล.

1.2.4 เก็บ BAP ความเข้มข้น 1,000 มก./ลิตร ไว้ในขวดแก้วที่อุณหภูมิ 8-10 ° C

ตารางที่ ข.1 สูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962)

Stock solution (ความเข้มข้น)	ส่วนประกอบ	ปริมาณสารต่อลิตร	ปริมาณที่ใช้เพื่อเตรียมอาหาร 1 ลิตร
ขวดที่ 1 Nitrate	NH_4NO_3	16.5 ก.	50 มล.
(20 เท่า)	KNO_3	19.0 ก.	
ขวดที่ 2 Sulfate	$MgSO_4.7H_2O$	18.5 ก.	10 มล.
(100 เท่า)	$MnSO_4.4H_2O$	1.11 ก.	
	$ZnSO_4.7H_2O$	0.43 ก.	
	$CuSO_4.5H_2O$	1.25 มก.	
ขวดที่ 3 Halide	$CaCl_2.2H_2O$	22.0 ก.	10 มล.
(100 เท่า)	KI	41.5 มก.	
	$CoCl_2.6H_2O$	1.25 มก.	
ขวดที่ 4 PBMo	KH_2PO_4	8.5 ก.	10 มล.
(100 เท่า)	H_3BO_3	310.0 มก.	
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	12.5 มก.	
ขวดที่ 5 NaFeEDTA	$FeSO_4.7H2O$	1.39 ก.	10 มล.
(100 เท่า)	$Na_2EDTA.2H_2O$	1.87 ก.	
ขวดที่ 6 Vitamins	Nicotinic acid	50.0 มก.	10 มล.
(100 เท่า)	Thiamine HCl	10.0 มก.	
	Pyridoxine HCl	50.0 มก.	
	Glycine	200.0 มก.	
	Myo-inositol	1.0 ก.	
น้ำตาล (sucrose)	30 ก./ล.		
วุ้น (agar)	6.5 ก./ล.		
pH	5.8		

ภาคผนวก ค
การศึกษาโครโมโซมโดยเทคนิค squash method

ภาผนวก ค การศึกษาจำนวนโครโมโซมโดยใช้เทคนิค squash method

1. วิธีการเตรียมสารละลายในการศึกษาจำนวนโครโมโซม

1.1 การเตรียมสารละลายสำหรับหยุดวงชีพจักรเซลล์

1.1.1 ชั่งสาร 2, 4-paradichlorobenzene (PDB) มา 10 กรัม ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.1.2 ละลายสาร PDB ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มล ที่อุณหภูมิ 60 ° C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้สารละลายอิ่มตัวด้วยน้ำ

1.1.3 เก็บสารละลายนี้ใส่ขวดสีชาแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5-8 ° C

1.2 การเตรียมสารละลายสำหรับคงสภาพเซลล์

1.2.1 ตวง absolute alcohol และ glacial acetic acid (อัตราส่วน 3:1) ใส่ในบิกเกอร์

1.2.2 ผสมสารทั้งสองชนิดให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปใช้แช่ตัวอย่างพืช (ควรเตรียมสารละลายให้พอดี และใช้ให้หมดในการเตรียมแต่ละครั้ง)

1.3 การเตรียมสีย้อม

1.3.1 การเตรียมสี aceto-orcein

1.3.1.1 ชั่งสี orcein ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่งมา 2 กรัม

1.3.1.2 ต้ม glacial acetic acid 100 มล. ให้เดือดแล้วละลายสี orcein ลงไปในกรดที่กำลังเดือด คนให้สีละลายจนหมด

1.3.1.3 ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 เพื่อเก็บเป็น stock solution เก็บใส่ขวดสีชาไว้ที่อุณหภูมิ 5-8 ° C

1.3.1.4 เมื่อต้องการใช้จะต้องเจือจางกรดให้เป็น 45% ด้วยน้ำกลั่น แล้วกรองอีกครั้ง จึงนำไปใช้ย้อมสีโครโมโซม

1.3.2 การเตรียมสี lacto-propionic orcein

1.3.2.1 ชั่งสี orcein ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่งมา 1 กรัม

1.3.2.2 ผสม lactic acid และ propionic acid อย่างละ 50 มล. ให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปอุ่นให้ร้อนที่อุณหภูมิ 60 ° C

1.3.2.3 จากนั้นค่อย ๆ เทสี orcein ลงไปผสมและคนให้เป็นเนื้อเดียวกันหรือจนสีละลายหมด

1.3.2.4 ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 เก็บเป็น stock solution เก็บใส่ขวดสีชาไว้ที่อุณหภูมิ 5-8 ° C

1.3.2.5 เมื่อต้องการใช้จะต้องเจือจางกรดให้เป็น 45% - 60% ด้วยน้ำกลั่น แล้วกรองอีกครั้ง จึงนำไปใช้ย้อมสีโครโมโซม

2. การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก

2.1 การเตรียมตัวอย่างราก

2.1.1 เก็บตัวอย่างรากปทุมมาลูกผสมดิพลอยด์และเททระพลอยด์ ในช่วงเช้าเวลา 06.30 – 09.00 น.

2.1.2 ล้างตัวอย่างรากในน้ำกลั่น 2 ครั้ง

2.1.3 หยุดวงชีพจักรเซลล์ในสารละลาย PDB ที่อิ่มตัวด้วยน้ำ ที่อุณหภูมิ 5 °C นานเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

2.1.4 ล้างตัวอย่างรากด้วย 70% alcohol 2 ครั้ง

2.1.5 คงสภาพเซลล์ในสารละลายที่มีส่วนผสมของ absolute alcohol และ glacial acetic acid (3:1) ที่อุณหภูมิ 5 °C นานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.1.6 ล้างตัวอย่างรากด้วย 70% alcohol 2 ครั้ง แล้วเก็บตัวอย่างรากไว้ใน 70% alcohol ที่อุณหภูมิ 5 °C จนกว่าจะนำมาใช้ (ไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 6 เดือน)

2.2 การเตรียมสไลด์ตัวอย่างราก

2.2.1 นำตัวอย่างรากที่เก็บไว้ใน 70% alcohol มาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที

2.2.2 จากนั้นนำตัวอย่างรากมาย่อยด้วยกรด 1N HCl ที่อุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 60 °C นานเป็นเวลา 15 นาที

2.2.3 ใช้เข็มเขี่ยตัดเฉพาะส่วนปลายรากยาวประมาณ 0.5 มม. แล้วนำไปวางบนกระจกสไลด์

2.2.4 หยดสีย้อม aceto-orcein หรือ lacto-propionic orcein จำนวน 1 หยด แล้วนำไปวางบนเตาไฟฟ้าที่มีอุณหภูมิ 60 °C นานเป็นเวลา 15 นาที

2.2.5 ใช้เข็มเขี่ยแยกเนื้อเยื่อปลายรากให้ออกจากกัน แล้วใช้ด้ามเข็มเขี่ยค่อย ๆ เคาะบนเนื้อเยื่อ เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวๆ

2.2.6 ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วใช้ด้ามเข็มเขี่ยค่อย ๆ เคาะด้านบนหลาย ๆ ครั้ง

2.2.7 นำกระดาษทิชชูมาพับซ้อนกันหลาย ๆ ชั้น วางบนกระจกปิดสไลด์แล้วใช้หัวแม่มือกดลงตรงๆบริเวณที่มีเซลล์อยู่

2.2.8 นำสไลด์ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูการกระจายของเซลล์

2.2.9 หากพบว่าโครโมโซมมีการกระจายตัวดีแล้ว ให้ปิดขอบสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บจำนวน 2-3 ครั้ง และเก็บสไลด์ในกล่องเก็บสไลด์เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างแห้ง

3. การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ดอกอ่อน

3.1 การเตรียมตัวอย่างดอกอ่อน

3.1.1 เก็บช่อดอกอ่อนปทุมมาลูกผสมยาวประมาณ 5-7 ซม. ในช่วงเช้าเวลา 07.00 – 08.30 น.

3.1.2 ใช้มีดผ่าช่อดอกอ่อนแล้วนำดอกอ่อนมาแช่ในสารละลาย PDB ที่อิ่มตัวด้วยน้ำ ที่อุณหภูมิ 5 $^{\circ}$C นานเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.1.3 ล้างตัวอย่างรากด้วย 70% alcohol 2 ครั้ง

3.1.4 คงสภาพเซลล์ในสารละลายที่มีส่วนผสมของ absolute alcohol และ glacial acetic acid (3:1) ที่อุณหภูมิ 5 $^{\circ}$C นานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.1.5 ล้างตัวอย่างดอกอ่อนด้วย 70% alcohol 2 ครั้ง แล้วเก็บตัวอย่างดอกอ่อนไว้ใน 70% alcohol ที่อุณหภูมิ 5 $^{\circ}$C จนกว่าจะนำมาศึกษาโครโมโซม

3.2 การเตรียมสไลด์

3.2.1 นำตัวอย่างดอกอ่อนที่เก็บไว้ใน 70% alcohol มาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที

3.2.2 ใช้เข็มเขี่ยตัดเฉพาะส่วนของอับเรณูออกมาวางบนกระจกสไลด์ แล้วมาย่อยด้วยกรด 1N HCl ที่อุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 60 $^{\circ}$C นานเป็นเวลา 10 นาที

3.2.3 นำอับเรณูมาแช่ในน้ำกลั่นนานเป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างกรดออกให้หมด

3.2.4 ใช้เข็มเขี่ยขยี้อับเรณูให้แตก และดันให้ละอองเรณูออกมาอยู่บนกระจกสไลด์

3.2.5 หยดสีย้อม lacto-propionic orcein จำนวน 1 หยด แล้วนำไปวางบนเตาไฟฟ้าที่มีอุณหภูมิ 60 $^{\circ}$C นานเป็นเวลา 15 นาที

3.2. 6 ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วใช้ด้ามเข็มเขี่ยค่อย ๆ เคาะด้านบนหลาย ๆ ครั้ง

3.2.7 นำกระดาษทิชชูมาพับซ้อนกันหลาย ๆ ชั้น วางบนกระจกปิดสไลด์แล้วใช้หัวแม่มือกดลงตรง ๆ บริเวณที่มีเซลล์อยู่

3.2.8 นำสไลด์ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูการกระจายของเซลล์

3.2.9 เมื่อพบเซลล์ในระยะที่ต้องการ และโครโมโซมมีการกระจายตัวดีแล้ว ให้ปิดขอบสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บจำนวน 2-3 ครั้ง เก็บในกล่องเก็บสไลด์เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างแห้ง