การศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ปทุมมาโดยการผสมข้ามชนิดระหว่างพืชในกลุ่ม Eucurcuma และ Paracurcuma

ธีรนิติ พวงกฤษ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน

ชื่อเรื่อง

การศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ปทุมมาโดยการผสมข้ามชนิดระหว่างพืชในกลุ่ม Eucurcuma และ Paracurcuma

โดย

ธีรนิติ พวงกฤษ

พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี)
วันที่ 12 เดือน ก.ย. พ.ศ. 2555

กรรมการที่ปรึกษา .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประสิทธิ์ โนรี)
วันที่ 12 เดือน 9 พ.ศ. 55

กรรมการที่ปรึกษา .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต)
วันที่ 12 เดือน ก.ย. พ.ศ. 2555

ประธานกรรมการประจำหลักสูตร .....
(อาจารย์ ดร.พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์)
วันที่ 12 เดือน ก.ย. พ.ศ. 55

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จาตุพงศ์ วาฤทธิ์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
วันที่ 13 เดือน ก.ย. พ.ศ. 2555

ชื่อเรื่อง การศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ปทุมมาโดยการผสมข้ามชนิดระหว่างพืชในกลุ่ม Eucurcuma และ Paracurcuma

ชื่อผู้เขียน นายธีรนิติ พวงกฤษ

ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน

ประธานกรรมการหลักสูตร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี

บทคัดย่อ

การทดสอบความมีชีวิตของละอองเกสรของพืชสกุล *Curcuma* พบว่า *C. paviflora*, *C. alismatifolia* และ *C. angustifolia* มีความมีชีวิตของละอองเกสรมากที่สุดคือ 95.18, 94.74 และ 92.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ *C. paviflora* มีความสามารถในการงอกหลอดเกสรมากที่สุดคือ 92.63 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาความสามารถในการงอกของละอองเกสรบนยอดเกสรเพศเมียและการงอกหลอดเกสรลงในก้านชูเกสรเพศเมียนั้น พบว่า ละอองเกสรของพืชในกลุ่ม Eucurcuma (*C. angustifolia*, *C. aurantiaca*, *C. cordata*, C. *roscoeana* และ *C. rubrobractiata*) สามารถงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมียของพืชในกลุ่ม Paracurcuma (*C. alismatifolia* และ *C. parviflora*) แต่เมื่อใช้ยอดเกสรเพศเมียของพืชที่อยู่ในกลุ่ม Eucurcuma ละอองเกสรของพืชที่อยู่ในกลุ่ม Paracurcuma บางชนิด ได้แก่ คู่ผสมระหว่าง *C. angustifolia* X *C. alismatifolia*, *C. rubrobractiata* X *C. alismatifolia* และ *C. rubrobractiata* X *C. parviflora* ไม่สามารถงอกหลอดเกสรบนยอดเกสรเพศเมียได้ และคู่ผสมระหว่าง *C. angustifolia* X *C. parviflora* ละอองเกสรสามารถงอกบนยอดเกสรเพศเมียได้ แต่หลอดเกสรไม่สามารถงอกหลอดลงไปในก้านชูเกสรได้ เมื่อทำการผสมเกสรจำนวน 20 คู่ผสม พบว่า คู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. angustifolia* มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดมากที่สุดคือ 26.67 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลอยู่ในช่วง 0.67 - 1.33 เมล็ดต่อผล และคู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. roscoeana*, *C. paviflora* X *C. aurantiaca* และ *C. alismatifolia* X *C. angustifolia* มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์มากที่สุด คือ 66.67, 66.67 และ 60.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำเอ็มบริโอมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร, GA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เอ็มบริโอสามารถพัฒนาเป็นต้นกล้าได้ทั้งหมด และต้นกล้ามีอัตราการอยู่รอด 83.33 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูกผสม พบว่า ลูกผสมมีลักษณะที่เป็นกึ่งกลางระหว่างต้นแม่และต้นพ่อ เมื่อตรวจสอบลูกผสมโดยใช้เทคนิค RAPD พบว่า ลูกผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. aurantiaca* สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแม่และพ่อได้ โดยใช้ไพรเมอร์ OPU 14 (5'-TGGGTCCCTC-3') ลูกผสมทั้งหมดแสดงอาการเป็นหมัน และการศึกษาการแก้ไขความเป็นหมันโดยการเพิ่มปริมาณ

โครโมโซม พบว่า เมื่อให้สารโคลชิซิน 800 มิลลิกรัมต่อลิตร พืชมีอัตราการอยู่รอด 88.33 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนต้นที่มีการเพิ่มจำนวนของโครโมโซม 36.67 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นได้ทำการวัดระดับของโครโมโซมด้วยเครื่อง Flow cytometer พบว่ามีต้นปทุมมาที่ไม่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (2n = 2x) จำนวน 63.33 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่มีการเพิ่มขึ้นของโครโมโซมเป็น 4 ชุด (2n = 4x) จำนวน 26.67 เปอร์เซ็นต์ และต้นที่มีการเพิ่มขึ้นของโครโมโซมเป็น 8 ชุด (2n = 8x) จำนวน 10.00 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาเปรียบเทียบจำนวนเฉลี่ยของปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตรและจำนวนคลอโรพลาสต่อปากใบแล้ว พบว่า พืช 2n = 2x จะมีจำนวนปากใบเฉลี่ย 58.60 ปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร และมีจำนวนคลอโรพลาสเฉลี่ยอยู่ที่ 24.60 คลอโรพลาสต่อปากใบ พืช 2n = 4x จะมีจำนวนปากใบเฉลี่ย 40.60 ปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร และมีจำนวนคลอโรพลาสเฉลี่ยอยู่ที่ 45.00 คลอโรพลาสต่อปากใบ และพืช 2n = 8x จะมีจำนวนปากใบเฉลี่ย 28.30 ปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร และมีจำนวนคลอโรพลาสเฉลี่ยอยู่ที่ 72.20 คลอโรพลาสต่อปากใบ เมื่อศึกษาความสามารถในการงอกหลอดเกสรของต้นที่มีการเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซม พบว่า ละอองเกสรของปทุมมาลูกผสมที่มีการเพิ่มของระดับชุดโครโมโซมสามารถงอกหลอดได้ และสามารถติดผลได้เมื่อผสมกับพืช 2n = 2x ปกติ

คำสำคัญ: ปทุมมา, ลูกผสมข้ามชนิด, RAPD, โคลชิซิน, ปากใบ, คลอโรพลาส

Title A Study on Curcuma Breeding by Interspecific Hybridization between Eucurcuma and Paracurcuma

Auther Mr. Theeraniti Puangkrit

Degree of Master of Science in Horticulture

Advisory Committee Chairpersion Assistant Professor Dr. Chalermsri Nontaswatsri

ABSTRACT

The investigation on pollen viability of *Curcuma* found that *C. paviflora*, *C. alismatifolia* and *C. angustifolia* had highest viability percentages (95.18%, 94.74% and 92.88%, respectively), whereas *C. paviflora* had highest pollen germination percentage (92.63%). A study of pollen germination on the stigma surface and pollen tube growth into the style found that Eucurcuma pollens (*C. angustifolia*, *C. aurantiaca*, *C. cordata*, C. *roscoeana* and *C. rubrobractiata*) germinated well on the stigma surface of Paracurcuma (*C. alismatifolia* and *C. parviflora*) and pollen tubes grew normally into the style, but some Paracurcuma pollen could not germinate on the Eucurcuma stigma surface, i.e. *C. angustifolia* X *C. alismatifolia*, *C. rubrobractiata* X *C. alismatifolia* and *C. rubrobractiata* X *C. parviflora*. Only *C. parviflora* pollen was able to germinate on stigma surface of *C. angustifolia* but the pollen tube could not penetrate into the style at all. A total of 20 interspecific hybridization crosses were done and results showed that *C. alismatifolia* X *C. angustifolia* showed highest fruit setting percentage (26.67%) with 0.67-1.3 seed per fruit. The crosses between *C. alismatifolia* X *C. roscoeana*, *C. paviflora* X *C. aurantiaca* and *C. alismatifolia* X *C. angustifolia* showed highest vigorous seed percentages (66.67%, 66.67% and 60.00%, respectively). Embryo cultures were done on an MS medium containing 1 mg L^{-1} BA, 1 mg L^{-1} GA and 0.1 mg L^{-1} NAA resulting to successful embryo regeneration. The resulting plantlets showed high survival percentage (83.33%-100%). The interspecific hybrid morphologies were then investigated and found that the hybrids showed intermediate characteristic between parents. The hybrid between *C. alismatifolia* X *C. aurantiaca* could be confirmed by RAPD technique using OPU 14 primer (5'-TGGGTCCCTC-3'). However, all hybrids were sterile. To overcome pollen viability, 800 mg L^{-1} colchicines was applied and found that survival percentage was at 88.33% and chromosome doubling percentage at 36.67%, while producing 63.33% diploid plants (2n = 2x), 26.67% tetraploid plants (2n = 4x) and 10.00%

octaploid plants (2n = 8x) when investigated by flow cytometry. The number of stomata per 1 mm^2 was compared among diploid, tetraploid and octaploid plants, and found that the number of stomata per area of diploid plants was highest at 58.60 stomatas per area (1 mm^2) but showed lowest chloroplasts per stomata at 24.60 chloroplasts per stomata, tetraploid plants had moderate number of stomata per area at 40.60 stomata per area (1 mm^2) and number of chloroplasts per stomata at 45.00 chloroplasts per stomata with octaploid plant having the lowest stomata per area at 28.30 (1 mm^2) although highest chloroplasts per stomata was at 72.20 chloroplasts. Pollen germination of hybrids with chromosome doubling plants (2n = 4x and 2n = 8x) showed better germination and had successful fruit setting when crossed with diploid plants.

Keywords: Curcuma, Interspecific Hybrid, RAPD, Colchicines, Stomata, Chloroplast

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษา แนะนำในการวางแผนการดำเนินงานทดลองตลอดจนช่วยสนับสนุน วัสดุ อุปกรณ์ ห้องทดลอง ในการดำเนินการทดลองทั้งหมดจนกระทั่งงานทดลองเสร็จสมบูรณ์ ทั้งยังกรุณาอบรมสั่งสอนให้คำแนะนำในทุกๆ ด้าน และยังกรุณาช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้ จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประสิทธิ์ โนรี กรรมการที่ปรึกษาและผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรีสุลักษณ์ ธีรานุพัฒนา ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำ พร้อมทั้งตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ Prof. Dr.Seiichi Fukai มหาวิทยาลัย Kagawa ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้คำแนะนำและอนุญาตให้ใช้เครื่อง Flow cytometer ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อไป๋ คุณแม่นิตยา พวงกฤษ ผู้ให้กำเนิด ให้โอกาสทางการศึกษา สนับสนุนค่าใช้จ่ายในการศึกษาเล่าเรียน อีกทั้งคอยเป็นกำลังใจในการศึกษาตลอดมา และขอบคุณ คุณศรีจันทร์ อำชำฤทธิ์ คุณกัญญา คุณยศยิ่ง น้องๆ นักศึกษาปริญญาตรีสาขาพืชสวนประดับทุกคนในครอบครัว และอีกหลายๆ ท่านที่ไม่ได้เอ่ยนามในครั้งนี้ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ธีรนิติ พวงกฤษ

กันยายน 2555

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
สารบัญตาราง	(10)
สารบัญภาพ	(11)
สารบัญตารางผนวก	(13)
สารบัญภาพผนวก	(14)
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	3
ความหลากหลายของปทุมมา	5
การผสมเกสร	6
การงอกของหลอดละอองเกสร	7
การติดผล	8
การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อช่วยชีวิตลูกผสม	9
การตรวจสอบลูกผสมด้วยเทคนิค RAPD	10
การแก้ไขความเป็นหมันของลูกผสม	11
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	13
วัสดุและอุปกรณ์	13
การทดลองที่ 1 ศึกษาการผสมเกสรของปทุมมาและกระเจียว	13
การทดลองที่ 2 ศึกษาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (embryo rescue)	16
การทดลองที่ 3 ศึกษาการตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการใช้เทคนิค RAPD	18

หน้า

การทดลองที่ 4 ศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมเพื่อแก้ไขความเป็นหมัน และการตรวจสอบ 20
วิธีการวิจัย 21
การทดลองที่ 1 ศึกษาการผสมเกสรของปทุมมาและกระเจียว 21
การทดลองที่ 2 ศึกษาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (embryo rescue) 25
การทดลองที่ 3 ศึกษาการตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการใช้เทคนิค RAPD 26
การทดลองที่ 4 ศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมเพื่อแก้ไขความเป็นหมัน และการตรวจสอบ 28
บทที่ 4 ผลการทดลอง 32
การทดลองที่ 1 ศึกษาการผสมเกสรของปทุมมาและกระเจียว 32
การทดลองที่ 2 ศึกษาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (embryo rescue) 40
การทดลองที่ 3 ศึกษาการตรวจสอบความเป็นลูกผสม ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการใช้เทคนิค RAPD 42
การทดลองที่ 4 ศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมเพื่อแก้ไขความเป็นหมัน และการตรวจสอบ 57
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง 64
การทดลองที่ 1 ศึกษาการผสมเกสรของปทุมมาและกระเจียว 64
การทดลองที่ 2 ศึกษาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (embryo rescue) 67
การทดลองที่ 3 ศึกษาการตรวจสอบความเป็นลูกผสม ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการใช้เทคนิค RAPD 68
การทดลองที่ 4 ศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมเพื่อแก้ไขความเป็นหมัน และการตรวจสอบ 70
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง 72
บรรณานุกรม 74
ภาคผนวก 79
ภาคผนวก ก ภาพการทดลอง 80
ภาคผนวก ข ตารางผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ 84
ภาคผนวก ค ประวัติผู้วิจัย 90

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	สูตรอาหารของ Murashige and Skoog (1962)	17
2	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการงอกหลอดของละอองเกสรของพืชสกุล *Curcuma* จำนวน 8 ชนิด	33
3	เปอร์เซ็นต์การผสมติด จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล และเปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์ของการผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่มParacurcuma และ Eucurcuma จำนวน 20 คู่ผสม	38
4	จำนวนเมล็ดที่เพาะ เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่งอก เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่อยู่รอด และจำนวนวันที่เริ่มงอกของเอ็มบริโอลูกผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่ม Paracurcuma และ Eucurcuma จำนวน 7 คู่ผสม	41
5	จำนวนการเกิดต้น จำนวนปากใบเฉลี่ยต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร จำนวนคลอโรพลาสเฉลี่ยต่อปากใบ และความสามารถในการงอกหลอดเกสรของปทุมมาลูกผสมที่มีการเพิ่มขึ้นของระดับโครโมโซม	58
6	จำนวนผลเฉลี่ยที่ผสมติด และเปอร์เซ็นต์การติดผลของต้นพืชที่ได้รับการเพิ่มปริมาณโครโมโซมกับต้นพืชปกติ	63

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	ส่วนประกอบของพืชในสกุล *Curcuma*	4
2	ลักษณะช่อดอกของพืชในกลุ่มปทุมมา (Paracurcuma)	13
3	ลักษณะช่อดอกของพืชในกลุ่มกระเจียว (Eucurcuma)	14
4	ลักษณะของยอดเกสรเพศเมีย (stigma surface) และเกสรเพศผู้ (anther)	24
5	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการงอกหลอดของละอองเกสรของพืชสกุล *Curcuma* จำนวน 8 ชนิด	34
6	หลอดเกสรของ *C. aurantiaca* สามารถงอกบนยอดเกสรเพศเมียและสามารถงอกผ่านก้านชูเกสรเพศเมียของ *C. parviflora*	36
7	ละอองเกสรของ *C. angustifolia* ไม่สามารถงอกหลอดลงบนยอดเกสรเพศเมียของ *C. alismatifolia*	36
8	ละอองเกสรของ *C. angustifolia* งอกหลอดลงบนยอดเกสรเพศเมียของ *C. parviflora* แต่ไม่สามารถงอกหลอดลงในก้านชูเกสรเพศเมียได้	36
9	เปอร์เซ็นต์การผสมติดและจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลของการผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่ม Paracurcuma และ Eucurcuma จำนวน 20 คู่ผสม	39
10	ลักษณะของ *C. alismatifolia*, *C. angustifolia* และลูกผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. angustifolia*	43
11	ลักษณะของ *C. alismatifolia*, *C. aurantiaca* และลูกผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. aurantiaca*	45
12	ลักษณะของ *C. alismatifolia*, *C. cordata* และลูกผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. cordata*	47
13	ลักษณะของ *C. alismatifolia*, *C. roscoeana* และลูกผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. roscoeana*	49
14	ลักษณะของ *C. parviflora*, *C. aurantiaca* และลูกผสมระหว่าง *C. parviflora* X *C. aurantiaca*	51
15	ลักษณะของ *C. parviflora*, *C. roscoeana* และลูกผสมระหว่าง *C. parviflora* X *C. roscoeana*	53

ภาพ		หน้า
16	ลักษณะของ *C. parviflora*, *C. rubrobractiata* และลูกผสมระหว่าง *C. parviflora* X *C. rubrobractiata*	55
17	แถบดีเอ็นเอจาก RAPD-PCR	56
18	ปริมาณดีเอ็นเอของปทุมมาลูกผสมจากการวัดด้วยเครื่อง Flow cytometer	59
19	ลักษณะต้นปทุมมาที่ได้รับสาร โคลชิซิน	60
20	จำนวนปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตรของปทุมมาลูกผสมที่ได้รับสาร โคลชิซิน	61
21	จำนวนคลอโรพลาสต่อปากใบ ของปทุมมาลูกผสมที่ได้รับสาร โคลชิซิน	62

สารบัญตารางผนวก

ตารางผนวก		หน้า
1	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของละอองเกสรของพืชในสกุล *Curcuma*	85
2	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการงอกหลอดของพืชในสกุล *Curcuma*	85
3	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์การผสมติดของการผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่ม Paracurcuma และ Eucurcuma	86
4	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลของการผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่ม Paracurcuma และ Eucurcuma	86
5	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์ของการผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่ม Paracurcuma และ Eucurcuma	87
6	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์ต้นที่อยู่รอดของการผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่ม Paracurcuma และ Eucurcuma	87
7	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของจำนวนปากใบเฉลี่ยต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตรของปทุมมาลูกผสมที่มีการเพิ่มขึ้นของระดับโครโมโซม	88
8	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของจำนวนคลอโรพลาสเฉลี่ยต่อปากใบของปทุมมาลูกผสมที่มีการเพิ่มขึ้นของระดับโครโมโซม	88
9	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์การผสมติดของต้นพืชที่ได้รับการเพิ่มปริมาณโครโมโซมกับต้นพืชปกติ	89

สารบัญภาพผนวก

ภาพผนวก		หน้า
1	เครื่อง Flow cytometer	81
2	แถบดีเอ็นเอที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *C. alismatifolia* และ *C. aurantiaca* และไม่สามารถบ่งชี้ความเป็นลูกผสมได้	81
3	ความสัมพันธ์ของจำนวนปากใบต่อพื้นที่ และจำนวนคลอโรพลาสต่อปากใบของปทุมมาลูกผสมที่ได้รับการเพิ่มปริมาณโครโมโซม	82
4	การงอกหลอดเกสรของพืชเตตราพลอยด์ (2n = 4x)	82
5	การงอกหลอดเกสรของพืชออคตาพลอยด์ (2n = 8x)	83

บทที่ 1
บทนำ

ปทุมมาเป็นพืชสำคัญทางเศรษฐกิจที่มีการค้าขาย และส่งออกเป็นจำนวนมาก ทำให้มีการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ลักษณะที่หลากหลายเพื่อให้ได้สายพันธุ์การค้าที่มีลักษณะใหม่ๆ แม้ว่าการผสมเกสรของพืชในกลุ่มเดียวกันนั้นสามารถทำได้ง่าย แต่ลูกผสมที่ได้มักไม่มีความหลากหลายของลักษณะมากนัก ดังนั้นเพื่อให้ได้ความหลากหลายของลักษณะช่อดอก กลีบประดับและสีสัน จึงมีผู้พยายามผสมข้ามชนิด แต่การผสมข้ามชนิดนั้น มีอุปสรรคต่างๆ มากมาย ตั้งแต่การผสมเกสรจนถึงการพัฒนาของผลและเมล็ด เฉลิมศรี (2549) ได้กล่าวว่า ในการผสมพันธุ์พืชข้ามชนิดจะทำได้ยากกว่าการผสมพันธุ์ในพืชชนิดเดียวกันเนื่องจากจะพบปัญหาและอุปสรรคต่างๆ ที่แตกต่างกันไปตามแต่กรณี เช่น การบานของดอกไม่พร้อมกัน เกสรไม่สามารถงอกได้ เกสรงอกได้แต่ไม่สามารถงอกลงไปถึงไข่ได้ หรืองอกผิดทิศทางจนไม่สามารถผสมกับไข่ได้ ผสมไม่ติด ผสมติดแต่เอ็มบริโอหยุดการเจริญเติบโตหรือตายก่อนจะสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ ซึ่งอาจจะเกิดจากความอ่อนแอของเอ็มบริโอเอง หรืออาจเกิดจากสารยับยั้งที่อยู่ในเอ็นโดสเปิร์ม และต้นลูกที่ได้อาจเกิดจากการพัฒนาของเซลล์ร่างกายต้นแม่ ไม่ใช่ลูกผสมที่แท้จริง ในการปรับปรุงพันธุ์ปทุมมานั้นจะต้องใช้ระยะเวลานาน เนื่องจากเมล็ดของปทุมมานั้นมีการพักตัว ทำให้ต้องใช้เวลาตั้งแต่ผสมเกสรจนกระทั่งลูกผสมออกดอก จนคัดเลือกได้ นาน 2 - 3 ปี และนอกจากนี้ลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามชนิดมักเป็นหมัน ไม่สามารถใช้ปรับปรุงพันธุ์ต่อได้ ทำให้การปรับปรุงพันธุ์ปทุมมาโดยการผสมข้ามชนิดในปัจจุบันจึงยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากปัญหาดังกล่าวทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่าย และเวลาในการปรับปรุงพันธุ์มาก

ในการศึกษานี้ ได้ทำการศึกษาถึงการผสมเกสรและอุปสรรคในการผสมข้ามระหว่าง Eucurcuma และ Paracurcuma การช่วยชีวิตลูกผสม การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะจากพ่อและแม่ไปสู่ลูกผสม การตรวจสอบลูกผสมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) เพื่อช่วยในการคัดเลือกและลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ ทำให้ได้พันธุ์ใหม่ๆที่มีลักษณะสีสันสวยงาม และหลังจากนั้นได้ทำการแก้ปัญหาความเป็นหมันของลูกผสมด้วยการเพิ่มจำนวนโครโมโซม ลักษณะของลูกผสมที่มีการเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซมกับต้นลูกผสมก่อนการเพิ่มจำนวนโครโมโซม และความสามารถในการผสมของลูกผสมที่ได้รับการเพิ่มจำนวนโครโมโซม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาถึงความมีชีวิต ความสามารถในการงอกของละอองเกสร และการงอกของละอองเกสรบนเกสรเพศเมีย (pistil) ในแต่ละกลุ่มของปทุมมา
2. เพื่อศึกษาความสามารถในการติดผลและติดเมล็ดในการผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่ม Paracurcuma และ Eucurcuma
3. เพื่อศึกษาการงอกและการพัฒนาเป็นต้นของเอ็มบริโอลูกผสม
4. เพื่อหาวิธีการตรวจสอบความเป็นลูกผสมได้รวดเร็ว
5. เพื่อศึกษาลักษณะของลูกผสมที่ได้จากการผสมข้าม
6. เพื่อศึกษาการแก้ความเป็นหมันของลูกผสม

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาการผสมเกสรระหว่างปทุมมาและกระเจียว ความสามารถในการติดผลและเมล็ด การงอกและการพัฒนาของเอ็มบริโอลูกผสม
2. ตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยเทคนิคทางเครื่องหมายดีเอ็นเอ และศึกษาการถ่ายทอดลักษณะของลูกผสม
3. ศึกษาแนวทางในการแก้ไขความเป็นหมันของลูกผสม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงอุปสรรคและสาเหตุของการผสมข้ามชนิด
2. ทราบถึงการผสมเกสร พัฒนาการของเมล็ดที่ผสมข้ามชนิด
3. ทราบถึงเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดของปทุมมาและกระเจียว
4. ได้ลูกผสมที่มีลักษณะแปลกใหม่จากการผสมข้ามชนิด
5. ลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์
6. สามารถนำลูกผสมที่ได้ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

ปัจจุบันไม้ดอกในกลุ่มปทุมมา ซึ่งเป็นพันธุ์ไม้พื้นเมืองของประเทศไทยได้เป็นที่รู้จักกันมากขึ้นในฐานะไม้ดอกเมืองร้อนที่เป็นที่ต้องการของตลาดโลก (จุไรรัตน์, 2544) ซึ่งรู้จักกันในนามของ "Siamese Tulip" โดยทั่วแล้วประเทศในแถบยุโรป และอเมริกาเหนือ จะขายปทุมมาในรูปของไม้กระถาง และไม้ตัดดอก (Larsen and Larsen, 2006) ประเทศไทยจะส่งจำหน่ายในลักษณะของหัวพันธุ์ ซึ่งเริ่มมีการส่งออกหัวพันธุ์ไปเนเธอร์แลนด์ในปี พ.ศ. 2536 (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2548) ซึ่งมีแนวโน้มการส่งออกที่สูงขึ้น ปัจจุบันประเทศไทยมีมูลค่าการส่งออกปทุมมา ปีละประมาณ 30-40 ล้านบาท ขณะที่ตลาดโลกมี ความต้องการหัวปทุมมาไม่น้อยกว่า 200 ล้านบาทต่อปี โดยมีตลาดนำเข้าหลัก ได้แก่ ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกา เยอรมนี โปรตุเกส อิสราเอล เบลเยียม อิตาลี จีน และไต้หวัน ถือเป็นตลาดที่มีคุณภาพและมีกำลังซื้อสูง ซึ่งมีความต้องการหัวพันธุ์ปทุมมา รวมปีละ 2-3 ล้านหัว (นิทยา, 2548; เดชา, 2550; รัฐศักดิ์, 2553)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ปทุมมา มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นพืชที่มีการปลูกอยู่ในเขตร้อน จัดอยู่ในสกุลขมิ้น (Genus *Curcuma*) วงศ์ขิง (Zingiberaceae) (Dahlgrem *et al*., 1985) พืชในสกุลนี้มีอยู่ไม่น้อยกว่า 70 ชนิด ในประเทศไทยพบประมาณ 30 ชนิด ซึ่งกระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย (พิมพ์ใจ และคณะ, 2539) นักพฤกษศาสตร์ได้จำแนกพืชสกุลนี้เป็น 2 สกุลย่อย ได้แก่ สกุลย่อย Eucurcuma หรือกลุ่มกระเจียว ลักษณะเด่นของพืชกลุ่มนี้คือ ปากกลีบของดอกจริงจะมีสีขาวหรือสีเหลือง สำหรับการออกดอกนั้น ช่อดอกที่เกิดจะเกิดจากเหง้าโดยตรง หรือช่อดอกเกิดจากตายอดของลำต้นเทียม ก้านช่อดอกสั้น ช่อดอกมีขนาดใหญ่ สกุลย่อย Paracurcuma หรือกลุ่มปทุมมา ลักษณะเด่นของพืชกลุ่มนี้คือ ดอกจริงปากกลีบดอกจะมีสีขาวหรือสีม่วง การออกดอกนั้น ช่อดอกที่เกิดจะเกิดจากตายอดของลำต้นเทียมก้านช่อดอกยาว (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2548; Maknoi, 2006; Wood, 2008)

พืชในสกุล *Curcuma* เป็นไม้หัวอายุยืนหลายปีที่ไม่มีเนื้อไม้ (herbaceous perennial) มีการพักตัวในช่วงอากาศแห้งแล้งและช่วงวันสั้น โดยมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ทั่วไปดังนี้ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2548)

ภาพ 1 ส่วนประกอบของพืชในสกุล *Curcuma*

ต้น พืชกลุ่ม *Curcuma* มีลำต้นใต้ดินทำหน้าที่สะสมน้ำและอาหารเรียกว่า เหง้า ตาข้างของเหง้าจะเจริญเติบโตไปเป็นลำต้นเทียม (pseudostem) ที่เห็นอยู่เหนือดิน โดยลำต้นเทียมมีลักษณะเป็นกาบซึ่งเกิดจากโคนก้านใบ แผ่โอบซ้อนกันสูงประมาณ 50 เซนติเมตร เมื่อต้นเริ่มแก่ส่วนของโคนลำต้นใต้ดินจะโป่งออกด้านข้างและไปเป็นหัวในที่สุด สำหรับเหง้านั้นจะมีลักษณะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันไป เช่น พวกที่แตกเป็นแง่งคล้ายนิ้วมือเหมือนขิง พวกที่เหง้ายืดยาวคลุมพื้นที่กว้าง พวกที่สร้างเหง้าใหม่ที่โคนลำต้นเทียม ซึ่งเกิดจากตาข้างของเหง้าเดิม และพวกที่สร้างเหง้าในแนวดิ่ง (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2548) (ภาพ 1)

ใบ มีลักษณะเป็นใบเดี่ยวขอบใบเรียบหรือเป็นคลื่น รูปร่างใบแตกต่างกันไปตามชนิดของพืชส่วนก้านใบอาจมีขนหรือไม่มีขน และก้านใบจะร่วมตัวกันแน่นเป็นลำต้นเทียม (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2548) (ภาพ 1)

ช่อดอก เป็นแบบช่อแน่น (compact spike) มีใบประดับ (bract) โอบรอบช่อดอกทำให้เห็นใบประดับเรียงซ้อนกันเกิดเป็นช่อที่มีลักษณะเป็นทรงกระบอก หรือทรงกระสวยภายในเป็นที่อยู่ของดอกจริงประมาณ 2-7 ดอก ส่วนใบประดับส่วนบน (coma bract) มีลักษณะรูปร่างและสีสันแตกต่างจากใบประดับปกติ นอกจากนี้การเกิดช่อดอกของพืชกลุ่มนี้จะเกิดในตำแหน่งที่แตกต่างกัน

ตามชนิด ซึ่งอาจเกิดจากปลายลำต้นเทียม หรือเกิดจากเหง้าโดยตรง (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2548) (ภาพ 1)

ดอก ช่อดอกย่อยแต่ละช่อมีดอก 2 – 7 ดอก ซึ่งไม่มีก้านดอก โดยแต่ละดอกในช่อดอกย่อยเดียวกันจะบานห่างกันในช่วง 2 – 6 วัน ดอกของพืชสกุลนี้บานได้เพียง 1 วัน ดอกมีกลีบเลี้ยง 3 กลีบ อยู่เหนือรังไข่เชื่อมกันเป็นหลอดหุ้มส่วนโคนของกลีบดอกไว้ ซึ่งกลีบดอกเองนั้นก็มีโคนที่เชื่อมกันเป็นหลอดแต่ปลายแยกเป็น 3 กลีบ เกสรเพศผู้วงนอกซึ่งเป็นหมัน 3 อัน ถูกเปลี่ยนรูปเป็นกลีบ 3 กลีบ เรียกกลีบสเตมิโนด (staminode) โดย 1 กลีบถูกเปลี่ยนรูปไป เรียกว่า ปาก ก้านชูเกสรเพศผู้ 3 อัน เชื่อมรวมกันโอบหุ้มก้านชูเกสรเพศเมียไว้ เกสรเพศผู้วงในนี้ลดรูปไป 1 อัน เหลืออับละอองเรณู 2 อัน ที่อยู่ด้านเดียวกับปากเท่านั้น (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2548) (ภาพ 1)

ผลและเมล็ด ผลมีทรงกลมขนาดต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและความสมบูรณ์ ผลมี 3 พู แบ่งอย่างชัดเจน ภายในมีเมล็ดรูปร่างและขนาดคล้ายเมล็ดองุ่น ด้านปลายแหลมของเมล็ดมีเยื่อบางสีขาวมีลักษณะเป็นแฉกหลายแฉกติดอยู่ เมล็ดมักมีการพักตัวเหมือนกับการพักตัวของเหง้า (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2548) (ภาพ 1)

ราก เป็นฝอย รากส่วนหนึ่งมีปลายที่บวมพองออกมีลักษณะเป็นตุ้ม ทำหน้าที่เก็บสะสมน้ำและอาหาร ไม่สามารถตัดไปใช้ขยายพันธุ์ได้ ทั้งนี้ตุ้มรากจะค่อยๆ เหี่ยวไปก่อนเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน โดยเหง้าเป็นส่วนที่เหี่ยวช้าที่สุด หัวพันธุ์ที่มีตุ้มรากมากจึงสามารถเก็บรักษาได้นาน และถึงแม้ว่าหัวพันธุ์ที่ไม่มีตุ้มรากหรือถูกตัดตุ้มรากทิ้งก่อนปลูกก็สามารถงอกได้เช่นเดียวกับหัวพันธุ์ที่มีตุ้มราก (สุรวิช, 2540) (ภาพ 1)

ความหลากหลายของปทุมมา

Maknoi (2006) ได้กล่าวไว้ว่า มีการแบ่งพืชสกุล *Curcuma* ออกเป็นสกุลย่อยและหมู่ (section) โดยนักพฤกษศาสตร์หลายท่าน ซึ่งใช้เกณฑ์ในการจำแนกที่แตกต่างกัน ในปี 1892 Baker ได้จัดแบ่งออกเป็น 3 หมู่ (section) คือ Exantha, Mesantha และ Hitcheniopsis ซึ่งขึ้นอยู่กับตำแหน่งของช่อดอก ช่วงเวลาการเกิดดอก และลักษณะของกลีบประดับ (bract) ต่อมาในปี 1904 Schumann ใช้ลักษณะความเหมือนกันของกลีบประดับ (bract) และเดือยบริเวณอับเรณูแบ่งพืชสกุล *Curcuma* ออกเป็น 2 สกุลย่อย (subgenus) ได้แก่ Eucurcuma และ Hitcheniopsis ได้มีการแบ่งสกุลย่อย Eucurcuma ออกเป็น 2 กลุ่ม (section) โดยใช้ตำแหน่งของช่อดอก คือ Exantha และ Mesantha ในปี 1918 Valeton ได้ทำการศึกษาและแบ่งพืชสกุลนี้โดยใช้รูปทรงของใบโดยแบ่งออกเป็น 2 สกุลย่อย คือ Paracurcuma และ Eucurcuma

จากการศึกษาทางอนุกรมวิธานพืชสกุลขมิ้น-กระเจียวของ Maknoi (2006) สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ Alismatifolia, Cochinchinensis, Ecomata, Longa และ Petiolata โดยใช้เดือยบริเวณอับเรณูเป็นลักษณะสำคัญในการจดจำกลุ่ม

Wood (2008) ได้จำแนกพืชในสกุล *Curcuma* ในแถบประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้านออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

Clade 1 เป็นกลุ่มที่ดอกจริงมีกลีบดอกส่วน staminode เป็นสีม่วง และสีขาว บริเวณอับละอองเรณูไม่มีเดือย ก้านช่อดอกสูงประมาณ 4.5-47 เซนติเมตร ได้แก่ *Curcuma alismatifolia, C. parviflora, C. rhabdota, C. sparganifolia* และ *C. thorelii* เป็นต้น

Clade 2 เป็นกลุ่มที่ดอกจริงมีกลีบดอกส่วน staminode เป็นสีเหลือง ส่วนใหญ่จะมีเดือยบริเวณอับละอองเรณู ก้านช่อดอกสูงประมาณ 0.5-24 เซนติเมตร ตัวอย่างในกลุ่มนี้ได้แก่ *C. harmandii, C. aeruginosa, C. aurantiaca, C. petiolata, C. roscoeana, C. amada* และ *C. comosa* เป็นต้น

Clade 3 กลุ่มนี้จะมีลักษณะของช่อดอกที่สั้นติดดิน โดยมีความยาวของก้านช่อดอกตั้งแต่ 0 - 0.5 เซนติเมตร ดอกจริงมีกลีบดอกส่วน staminode เป็นสีเหลือง สีขาว หรือสีแดง บริเวณอับละอองเรณูมีเดือย ได้แก่ *C. pierreana, C. glans* และ *C. rubrobracteata* เป็นต้น

การผสมเกสร

ดอกจริงของปทุมมาจะมีการบานของดอกครั้งละ 1 วัน ในการผสมเกสรจะอยู่ในช่วง 08.00 - 10.00 น. การผสมกระทำโดยรวบรวมละอองเกสรจากพันธุ์พ่อแล้วนำไปแตะเบาๆ บนยอดเกสรเพศเมีย (สุรวิช, 2539) เกสรเพศผู้ที่เจริญเต็มที่ ผนังที่กั้นระหว่างถุงเกสรเพศผู้จะแตกออก ทำให้ละอองเกสรเพศผู้ปลิวออกมาภายนอก และความพร้อมในการผสมเกสรของเกสรเพศเมียนั้น จะเห็นได้จากการที่ยอดเกสรเพศเมียผลิตสารเหนียวๆ ออกมา (กฤษฎา, 2519) ในงานทดลองของ Gao *et al.* (2004) ได้กล่าวไว้ว่าระยะเวลาในการบานของดอกขิงนั้นไม่พร้อมกันโดยเกสรเพศผู้จะบาน (anthesis) ก่อนเกสรเพศเมีย ฉะนั้นโอกาสที่จะผสมข้ามจึงเป็นไปได้สูงแต่โอกาสที่จะผสมตัวเองนั้นก็มีเช่นเดียวกัน

ศิริพร (2541) พบว่า เกสรเพศผู้ของดอกว่านมหาลาภ พร้อมผสมก่อนเกสรเพศเมีย 1-2 วัน และละอองเกสรจากดอกที่บานได้ 1 วัน มีเปอร์เซ็นต์การงอกมากกว่าละอองเกสรที่ได้จากดอกที่บานได้ 2 วัน

จากการศึกษาการผสมข้ามชนิดในลิลลี่ ระหว่าง *Lilium rubellum* และ *L. regule* โดย Niimi *et al.* (1996) พบว่า ช่วงเวลาในการผสมเกสรมีผลต่อการงอกของหลอดละอองเกสร โดยผสมเกสรบนเกสรเพศเมียในระยะที่ดอกเริ่มบาน การงอกของหลอดละอองเกสรในก้านชูเกสรเพศเมียจะถูกยับยั้งในระยะเริ่มแรก แต่ถ้าผสมเกสรในช่วง 2-5 วันหลังจากดอกบาน หลอดละอองเกสรจะเจริญลงไปในก้านชูเกสรเพศเมียได้ และถ้าผสมเกสรในช่วง 5 วันหลังจากดอกบาน จะผสมติดและเอ็มบริโอสามารถพัฒนาได้

พวงพรรณ (2549) ได้รายงานว่า ช่วงเวลาที่พร้อมผสมเกสรเป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งที่จำกัดความสามารถในการผสมติดของพืชซึ่งช่วงเวลาของการพร้อมผสมของพืชนั้นแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิดและแต่ละพันธุ์และขึ้นกับสภาพแวดล้อมด้วย

การงอกของหลอดละอองเกสร

ปัจจัยที่มาเกี่ยวข้องกับการงอกของละอองเรณู ได้แก่ อายุของละอองเรณู ชนิดของดอกไม้ และสภาพแวดล้อม เช่น แสง และอุณหภูมิ และยังมีปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ ระดับของสารเคมีในละอองเรณู โครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อเยื่อของเกสรเพศเมีย จำนวนและชนิดของละอองเรณู ความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาล และสรีระวิทยาปลายยอดของเกสรเพศเมีย (ลาวัลย์, 2539)

Rhee *et al.* (2005) ได้ทดลองการงอกของหลอดละอองเกสรบนยอดเกสรเพศเมียของดอกลิลลี่พบว่า ในการผสมข้ามชนิดของดอกลิลลี่นั้น หลอดละอองเกสรสามารถงอกลงไปถึงปลายสุดของ ก้านชูเกสรเพศเมียได้ในเวลา 2 ถึง 3 วันภายหลังการผสมเกสร

Frank *et al.* (1988) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการงอกของหลอดละอองเกสรของ *Curcumis sativa* และ *C. metuliferus* พบว่าที่อุณหภูมิ 23 และ 26 องศาเซลเซียส หลอดละอองเกสรสามารถงอกลงไปในรังไข่ได้ ส่วนที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ละอองเกสรอยู่บริเวณปลายยอดเกสรเพศเมียเท่านั้น

การศึกษาของ Shinichi (2001) พบว่า เปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสรในสภาพปลอดเชื้อของขิงที่เป็นเตตราพลอยด์ มีแนวโน้มสูงสุดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และหลอดละอองเกสรเจริญในก้านชูเกสรเพศเมียได้ดีมากขึ้นในอุณหภูมิ 17 องศาเซลเซียส และหลอดละอองเกสรผ่านทะลุลงไปได้จนสุดความยาวของก้านชูเกสรเพศเมีย

การศึกษาของ หยกทิพย์ (2550) พบว่า ความสามารถในการงอกหลอดของละอองเกสรของพืชในสกุล *Curcuma* บนอาหารสังเคราะห์ร่วมกับน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้น 10 % เหมาะ

สำหรับการงอกของละอองเกสรดีที่สุด และการศึกษาการงอกของละอองเกสรบนยอดเกสรเพศเมียนั้น ละอองเกสรของว่านนางคำ (*C. angustifolia*) ว่านมหาจักรพรรดิ (*C. emperor*) และ บัวชั้น (*C. cordata*) สามารถงอกบนยอดเกสรเพศเมียของปทุมมากลุ่มกลีบแหลม (*C. alismatifolia*)ได้ ละอองเกสรของว่านนางคำ (*C. angustifolia*) สามารถงอกบนยอดเกสรเพศเมียของเชียงใหม่เรด (*C. alismatifolia*)ได้ แต่มีการงอกบนยอดเกสรเพศเมียของช่อมรกต (*C. harmandii*) ที่ผิดปกติ

การติดผล

เมื่อละอองเกสรเพศผู้ไปสัมผัสกับยอดเกสรเพศเมีย จะเกิดการพัฒนา โดยการงอกหลอดเกสรจะงอกไปตามก้านชูเกสรเพศเมีย เพื่อเข้าไปผสมกับไข่ซึ่งอยู่ภายในรังไข่ และเกิดการปฏิสนธิขึ้นซึ่งเป็นจุดเริ่มแรกของการติดผล ดังนั้นปัจจัยสำคัญในการติดผล จึงขึ้นอยู่กับความสามารถในการงอกของละอองเกสรเพศผู้และความสามารถในการปฏิสนธิภายในรังไข่ ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมหลายอย่าง เช่น อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ ความเข้ากันได้ สัดส่วนเพศดอก ธาตุอาหาร และอาหารสะสม เป็นต้น (พีรเดช, 2537)

การศึกษาของหยกทิพย์ (2550) ได้รายงานเกี่ยวกับการผสมข้ามชนิดของปทุมมาไว้ว่า คู่ผสมระหว่าง ปทุมมากลุ่มกลีบแหลม (*C. alismatifolia*) x ว่านนางคำ(*C. angustifolia*) มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดสูงสุดเท่ากับ 80.00 ส่วนอายุผลเฉลี่ยของการผสมข้ามระหว่างชนิดนั้นพบว่าคู่ผสมระหว่างปทุมมากลุ่มกลีบแหลม (*C. alismatifolia*) x ปทุมรัตน์ (*C. sparganifolia*) และ ปทุมรัตน์ (*C. sparganifolia*) x เทพอัปสร (*C. parviflora*) มีอายุผลเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 44.00 วัน ส่วนจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล พบว่า คู่ผสมระหว่างปทุมมากลุ่มกลีบแหลม (*C. alismatifolia*) x ปทุมรัตน์ (*C. sparganifolia*) มีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยสูงสุด 64.00 เมล็ดต่อผล

การศึกษาของพรพรรณ (2551) พบว่า หลังทำการผสมปทุมมากลุ่มกลีบแหลม (*C. alismatifolia*) ได้ 3 วัน ผลจะมีสีเขียว ขนาดของผลจะขยายใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ อายุของผลนับตั้งแต่วันที่ผสมและพัฒนาจนผลสุกแก่และแตกออกให้เห็นเมล็ดสีน้ำตาลที่อยู่ภายในใช้ระยะเวลาทั้งสิ้น 33 วัน ลักษณะภายในของเมล็ดปทุมมา ในช่วง 12 วันแรกหลังการผสม เมล็ดจะมีขนาดใหญ่ขึ้น สีของเมล็ดจะมีสีขาวใส เมื่อผ่าดูภายในเมล็ดในระยะนี้ ยังไม่พบเอ็มบริโอ เมื่อเมล็ดมีอายุได้ 15-24 วันหลังการผสม เมล็ดเริ่มมีสีขาวขุ่น ในระยะนี้จะเริ่มมองเห็นเอ็มบริโอขนาดเล็ก เมล็ดอายุ 27-33 วันหลังการผสม เมล็ดมีสีขาวขุ่นทั่วทั้งเมล็ด เอ็มบริโอมีขนาดใหญ่ขึ้น เอ็นโดสเปิร์ม มีสีขาวขุ่นทั่วทั้งเมล็ด เยื่อหุ้มเมล็ดเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อช่วยชีวิตลูกผสม

เนื่องจากการผสมข้ามชนิด และข้ามสกุล มักไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากสาเหตุหลายประการ ดังนั้นจึงมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาช่วยในการพัฒนา และการเจริญเติบโตของเมล็ดลูกผสมเพื่อเป็นต้นกล้าได้ (บุญยืน, 2544) ซึ่งได้แก่ การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอหรือเรียกว่าการช่วยชีวิตลูกผสม (embryo rescue) เป็นการนำเอาส่วนของเอ็มบริโอออกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ก่อนที่เอ็มบริโอนั้นจะฝ่อหรือหยุดการพัฒนาเนื่องจากลูกผสมจากการผสมข้ามชนิด (interspecific) นั้น จะมีปัญหาทางพันธุกรรม (genetic barriers) และมักไม่สามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอและเมล็ดที่สมบูรณ์ได้ นอกจากนั้นปัญหาการไม่สามารถงอกของเมล็ดก็เป็นปัญหาที่พบบ่อยเช่นกัน ทั้งนี้อาจเกิดจากอาหารสะสมไม่เพียงพอ เช่นในมะพร้าวกะทิและกล้วยไม้ (รังสฤษดิ์, 2545) หรือกรณีมีสิ่งยับยั้งในการงอก (germination inhibiters) เช่น เปลือกเมล็ดมีลักษณะแข็ง มีสารเคลือบเปลือกเมล็ด หรือมีสารเคมีบางชนิดไปยับยั้งการงอกของเมล็ด (abscissic acid; ABA) (นพดล, 2537)

Buitendijk *et al.* (1995) รายงานว่าลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามในกลุ่ม *Alstroemeria* จะมีปัญหาในการผสมและหลังจากการผสมแล้วของโอวุล 18 วัน การพัฒนาของเอ็นโดสเปิร์มจะน้อยลงโดยเกิดความผิดปกติ เนื่องจากการแท้งของเอ็มบริโอ จึงได้พัฒนาเทคนิค โดยการหาอิทธิพลของอายุ ความเข้มของน้ำตาลในอาหาร อุณหภูมิ และแสงสว่าง พบว่า เมื่อเลี้ยงโอวุลอายุ 14 วันหลังจากการผสมเกสรบนอาหารที่มีน้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส ในที่มืด สามารถช่วยให้เอ็มบริโองอกได้

Sato *et al.* (2000) ได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงโอวุลของ *Dianthus caryophyllus* หลังจากผสม 2-3 สัปดาห์ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์ โอวุลสามารถเจริญเป็นต้นได้และลูกผสมมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างจากต้นแม่ แสดงว่าไม่ได้เกิดมาจากเซลล์ร่างกายของต้นแม่

Takuo and Koji (2004) ได้ศึกษาการเลี้ยงเอ็มบริโอของ *Lilium auratum* พบว่า การนำเอาโอวุลมาแกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก มีเปอร์เซ็นต์การงอก และพัฒนาไปเป็นต้นกล้าได้สูงกว่าโอวุลที่ไม่ได้แกะเปลือกหุ้มเมล็ด เนื่องจากการงอกของเมล็ดถูกยับยั้งโดยเปลือกหุ้มเมล็ด และยังพบว่าเมล็ดที่มีอายุ 50 วันหลังจากการผสมเกสรหรือเมล็ดที่มีอายุมากกว่านั้นมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูง

Nazeem *et al.* (1996) ได้ศึกษาการผสมเกสรในสภาพปลอดเชื้อของ *Zingiber officinale* พบว่า สามารถติดเมล็ด และเอ็มบริโอสามารถพัฒนาต่อไปได้ จนกระทั่งสามารถแยกเอาเอ็มบริโอออกมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เพื่อชักนำให้เกิดยอดและรากได้เป็นผลสำเร็จ

หยกทิพย์ (2550) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของลูกผสมปทุมมา พบว่า เมื่อนำผลที่มีอายุ 14 วันมาเพาะเลี้ยง โดยเอ็มบริโอที่แกะนำมาเลี้ยงนั้นมีขนาดเล็กกว่า 0.5 มิลลิเมตร จะใช้เวลาตั้งแต่วันเพาะถึงวันที่เมล็ดงอกโดยเฉลี่ยเท่ากับ 9.70 วัน สามารถเกิดต้น 53.13 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนต้นที่สามารถอยู่รอดคิดเป็นเปอร์เซ็นต์สูงสุดเท่ากับ 22.50 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำผลที่มีอายุ 28 วันมาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอที่แกะนำมาเลี้ยงนั้นมีขนาดตั้งแต่ 0.5 มิลลิเมตรขึ้นไป ใช้เวลาตั้งแต่วันเพาะถึงวันที่เอ็มบริโองอกโดยเฉลี่ยเท่ากับ 12.31 วัน สามารถเกิดต้น 60 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนต้นที่สามารถอยู่รอดสูงสุดเท่ากับ 40.83 เปอร์เซ็นต์ สำหรับอายุของผล 52 วันภายหลังการผสมเกสร ในสภาพปลอดเชื้อเอ็มบริโอจะพัฒนาเป็นแคลลัสที่มีลักษณะสีขาว หลังจากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารโดยใช้และอาหารสูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมนพบว่า แคลลัสสามารถเกิดรากและจุดกำเนิดยอดสีเขียวชัดเจนแต่ยังไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้อย่างสมบูรณ์

การตรวจสอบลูกผสมด้วยเทคนิค RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) คือการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการตรวจสอบถึงความแตกต่างในระดับของยีน หรือดีเอ็นเอในพืชที่ทำการศึกษา ซึ่งข้อมูลทางด้านดีเอ็นเอนั้น สามารถนำไปใช้ประโยชน์เกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์พืชได้ โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอแต่ละตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางฟีโนไทป์ ซึ่งทราบได้จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมหรือลิงเกจ (linkage) ทำให้สามารถติดตามการถ่ายทอดของลักษณะนั้นๆ ไปยังรุ่นต่อไปได้ เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ทำให้สามารถคัดเลือกพันธุ์พืชได้ในระยะแรกของการเจริญเติบโต (สุรินทร์, 2545) ในการผสมข้ามพันธุ์ ลูกผสมที่ได้รับหน่วยพันธุกรรมจากเซลล์พ่อ 1 หน่วย และเซลล์แม่ 1 หน่วย ในระหว่างการปฏิสนธิ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอทุกตำแหน่งของลูกผสมจึงต้องได้รับมาจากพ่อและแม่เท่านั้น ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจึงสามารถใช้พิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดได้ (อัญชลี, 2546)

สุรินทร์ (2545) กล่าวว่า ในการทดสอบลูกผสมโดยการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) โดยวิธีอาร์เอพีดี (Random amplified polymorphic DNA ; RAPD) เป็นวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยา Polymerase Chian Reaction (PCR) โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลที่เกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (ambitrary primer) เป็นการจำลองการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสซ้ำกันหลายๆ รอบ เพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. Denature คือ แยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง

2. Annealing คือ การที่ไพรเมอร์เข้าเกาะกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิต่ำ

3. Extension คือ กระบวนการสงเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยการทำงานของดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ใช้อุณหภูมิประมาณ 70-73 องศาเซลเซียส

Hussain *et al.* (2008) ได้รายงานเกี่ยวกับการใช้ อาร์เอพีดีมาร์คเกอร์ เพื่อศึกษาความหลากหลายของ genetic ใน Curcuma นั้น ได้ทำการศึกษาหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมกับพืชชนิดนี้ และพบว่า ไพรเมอร์ OPC-20, OPO-06, OPC-01 และ OPL-03 ให้ผลที่ดีที่สุดกับการศึกษาความแตกต่างทาง genetic ของ Curcuma

Grzebelus *et al.* (2001) ได้ตรวจสอบความสัมพันธ์จากพ่อและแม่ไปสู่ลูกผสมของ *Daucus carota* โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี 3 คู่ผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 33 ไพรเมอร์ พบว่า 15 ไพรเมอร์สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจน และบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างพ่อ แม่ และลูกผสมทั้ง 3 คู่ได้

Chen *et al.* (2001) ได้ใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ในการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของ *Phalaenopsis* โดยใช้ไพรเมอร์ OPC07 กับดีเอ็นเอของ พันธุ์ป่า 3 ชนิด กับลูกผสม พบว่า ไพรเมอร์นี้สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่แยก *Phalaenopsis* ชนิดต่างๆ ออกจากกันได้ นอกจากนั้นแล้วดีเอ็นเอของลูกผสมชั่วที่ 1 ยังแสดงให้เห็นแถบดีเอ็นเอที่มาจากของพ่อและแม่อย่างละครึ่ง

Tanaka and Taniguchi (2002) ได้รายงานเกี่ยวกับการใช้เทคนิค RAPD ในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *Camellia sinensis* สายพันธุ์ Sayamakaori, Kana-CK17 และลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้จากการผสมแบบสลับ (reciprocal cross) ระหว่างสายพันธุ์ Sayamakaori และ Kana-CK17 โดยใช้ไพรเมอร์ OPU06 ที่มีลำดับเบส 5'-ACCTTTGCGG-3' แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างพ่อ แม่ และลูกผสม

การแก้ไขความเป็นหมันของลูกผสม

ในการผสมข้ามชนิดนั้น ส่วนใหญ่ลูกผสมจะมีลักษณะที่เป็นหมัน โดยจะแสดงอาการเป็นหมันของเกสรเพศผู้ในระดับต่างๆ คือ ระดับที่สามารถพบเกสรเพศผู้ แต่เกสรเพศผู้นั้นไม่สามารถงอกได้ และการเป็นหมันในระดับที่ลูกผสมนั้นไม่มีละอองเกสรเพศผู้ในอับละอองเกสรเลย เพื่อให้ลูกผสมข้ามที่ได้สามารถทำการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้ จำเป็นต้องมีการแก้การเป็นหมัน ซึ่งการเพิ่มชุดโครโมโซมสามารถทำได้โดยการใช้สารเคมีหลายชนิดแต่พบว่าโคลชิซินเป็นสารที่มีการใช้มากที่สุด เพราะให้ผลค่าเฉลี่ยในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ที่สม่ำเสมอที่สุด (อดิศร, 2539) พืช

ส่วนใหญ่ที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นนั้น พบว่าจะมีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงหรือแตกต่างไปจากเดิม ลักษณะบางอย่างอาจไม่เคยปรากฏในพืชพันธุ์เดิมมาก่อน และบางลักษณะสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ (อรุณี, 2550) ทั้งยังสามารถแก้การเป็นหมันของพืชได้อีกด้วย

การศึกษาของ Wu *et al.* (2007) พบว่า เมื่อใช้โคลชิซินความเข้มข้น 0.02, 0.05 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้ลิลลี่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโอวุล ที่เป็นพืช haploid ให้เป็น diploid ได้สำเร็จ และต้นที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมนั้นสามารถใช้ในการผสมเกสรได้เหมือนต้นปกติทั่วไป

การเพิ่มจำนวนโครโมโซมในกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก โดยการนำต้นกล้าอายุ 3 เดือนหลังการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ มาแช่ในสารละลายโคลชิซิน พบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารโคลชิซินสูงขึ้น ความหนาของใบมีแนวโน้มสูงขึ้น ขณะที่ความสูงของต้นและจำนวนใบต่อต้นมีแนวโน้มลดลง และต้นกล้าที่ในสารละลายโคลชิซิน เจริญเติบโตช้ากว่าหน่วยการทดลองควบคุม (อุษา และคณะ, 2552)

การทดลองของดวงจันทร์ (2549) พบว่า โคลชิซินที่ระดับ 800 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่ให้จำนวนต้นพอลิพลอยด์มากที่สุดสำหรับปทุมมาลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง (*C. alismatifolia* X *C. rhabdota*) ที่เป็นหมัน และพบว่าต้นปทุมมาลูกผสมออคตาพลอยด์และเตตราพลอยด์ มีความหนาของใบ และความยาวเซลล์คุมปากใบมากกว่าต้นดิพลอยด์ แต่มีความสูงของต้นและจำนวนปากใบต่อพื้นที่น้อยกว่าต้นดิพลอยด์

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

การทดลองที่ 1 ศึกษาการผสมเกสรของปทุมมาและกระเจียว

1. พืชในกลุ่มปทุมมา (Paracurcuma) ที่ใช้ทดลอง จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *C. alismatifolia*, *C. parviflora* และ *C. rhabdota* ดังภาพ 2

C. alismatifolia *C. parviflora* *C. rhabdota*

ภาพ 2 ลักษณะช่อดอกของพืชในกลุ่มปทุมมา (Paracurcuma)

2. พืชในกลุ่มกระเจียว (Eucurcuma) จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *C. angustifolia*, *C. aurantiaca*, *C. cordata*, *C. roscoeana*, *C. rubrobracteata* ดังภาพ 3

C. angustifolia *C. aurantiaca* *C. aurantiaca*

C. cordata *C. roscoeana* *C. rubrobractiata*

ภาพ 3 ลักษณะช่อดอกของพืชในกลุ่มกระเจียว (Eucurcuma)

3. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะปลูก

3.1 ดิน : แกลบดิบ : แกลบเผา : ปุ๋ยคอก ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 : ½

3.2 กระถางพลาสติกขนาด 8 นิ้ว และ 12 นิ้ว

4. อุปกรณ์ในการผสมเกสร ได้แก่ ปากคีบปลายแหลม (forceps) ป้ายบันทึกคู่ผสม (Tag) สมุด และดินสอสำหรับจดบันทึก

5. อุปกรณ์ในการทดสอบความมีชีวิต ความสามารถในการงอกของละอองเกสร และความสามารถในการงอกหลอดเกสรบนยอดเกสรเพศเมีย ได้แก่ ละอองเกสร, แผ่นสไลด์ (slide), จานแก้ว (petri-dish), บีกเกอร์(beaker), หลอดหยด (dropper), แผ่นปิดสไลด์ (cover slip), ปากคีบปลายแหลม (forceps), ใบมีดผ่าตัด และกล่องพลาสติก

6. สารเคมีต่างๆ

6.1 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 4 N.

6.2 สีย้อม Aniline blue ความเข้มข้น 0.01 M.

6.3 สีย้อม Acetone carmine ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

6.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับเลี้ยงละอองเรณู (Baloch *et al*, 2001) ประกอบด้วย

$(CaNO_3)_2$	0.3	กรัมต่อลิตร
$MgSo_4$	0.14	กรัมต่อลิตร
H_3BO_3	0.05	กรัมต่อลิตร
Sucrose	200	กรัมต่อลิตร

7. กล้องจุลทรรศน์ (Binocular microscope) และกล้องฟลูออเรสเซนต์ (Fluoresence microscope)

การทดลองที่ 2 ศึกษาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (embryo rescue)

1. เมล็ดลูกผสมจำนวน 7 คู่ผสม ได้แก่ คู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. angustifolia*, *C. alismatifolia* X *C. aurantiaca*, *C. alismatifolia* X *C. cordata*, *C. alismatifolia* X *C. roscoeana*, *C. parviflora* X *C. aurantiaca*, *C. parviflora* X *C. roscoeana* และ *C. parviflora* X *C. rubrobracteata*

2. อุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง, เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter), หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (auto clave), เครื่องคนสาร (magnetic stirrer), บีกเกอร์ (beaker), และไปเปท (pipette)

3. อุปกรณ์สำหรับปฏิบัติงานในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ (laminar flow) ได้แก่ จานแก้ว (petri-dish), มีดผ่าตัด, ปากคีบปลายแหลม (forceps) และตะเกียงแอลกอฮอล์

4. สารเคมีต่างๆ

4.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับฆ่าเชื้อ ได้แก่ แอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และ 90 เปอร์เซ็นต์, โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่มีความเข้มข้นของคลอรีน 1 เปอร์เซ็นต์

4.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ 6- Benzylaminopurine (BA), Naphthaleneacetic acid (NAA) และ Gibberellin (GA)

4.3 สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962) ประกอบด้วย

ตาราง 1 สูตรอาหารของ Murashige and Skoog

สารเคมี	ปริมาตร (มิลลิกรัมต่อลิตร)
KH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4 4H_2O$	16.9
$ZnSO_4 7H_2O$	8.6
KI	0.83
$Na_2MoO_4 2H_2O$	0.25
$CuSO_4 5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Na_2- EDTA	37.25
$FeSO_4 7H_2O$	27.85
Glycine	2.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine- HCl	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Sucrose	30,000

ที่มา : Murashige and Skoog (1962)

การทดลองที่ 3 ศึกษาการตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการใช้เทคนิค RAPD

1. ปทุมมาต้นแม่ ต้นพ่อ และต้นลูกผสม จำนวน 7 คู่ผสม ได้แก่ คู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. angustifolia*, *C. alismatifolia* X *C. aurantiaca*, *C. alismatifolia* X *C. cordata*, *C. alismatifolia* X *C. roscoeana*, *C. parviflora* X *C. aurantiaca*, *C. parviflora* X *C. roscoeana* และ *C. parviflora* X *C. rubrobracteata*

2. อุปกรณ์สำหรับสกัดดีเอ็นเอ เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction) และเจลอิเลคโตรโฟเรซิส (gel electrophoresis) ได้แก่ เครื่องโฮโมจิไนเซอร์ (homoginizer), เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge), เครื่องตกตะกอนสาร (spin down), เครื่องพีซีอาร์, เครื่องให้กระแสไฟฟ้า (power supply), อ่างรันเจล (chamber), หลอด (eppendrof tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร, หลอด (ependrof tube) ขนาด 0.2 มิลลิลิตร, ไมโครไปเปท (micro pipette), จานแก้ว (petri-dish), มีดผ่าตัด และปากคีบปลายแหลม (forceps)

3. ตู้สังเกตแผ่นเจล (Gel Document)

4. สารเคมีต่างๆ ที่ใช้สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

4.1 2x Extraction buffer ประกอบด้วย

- 0.6 M NaCl
- 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5)
- 40 mM EDTA (pH 8.0)
- 1% SDS

4.2 1x Extraction buffer ประกอบด้วย

- 1 vol. 2x Extraction buffer
- 5 M Urea
- 10 mM 2-Mercaptoethanol
- 10% Phenol
- น้ำกลั่นนึ่งสำหรับปรับปริมาตร

4.3 24:1 CI ประกอบด้วย

- 24 vol. Chloroform
- 1 vol. Iso-amyl alcohol

4.4 TE buffer ประกอบด้วย

- 10 mM Tris-HCl (pH 7.6-8.0)
- 1 mM EDTA (pH 8.0)

5. ไพรเมอร์ที่ใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างปทุมมาและกระเจียว และตรวจสอบความเป็นลูกผสมจำนวน 70 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPU3, OPU5, OPU6, OPU7, OPU12, OPU13, OPU14, OPU16, OPA01, OPA05, OPA08, OPA09, S21, S22, S23, S24, S25, S26, S27, S28, S29, S30, S31, S32, S33, S34, S35, S36, S37, S38, S40, S61, S62, S63, S64, S65, S66, S67, S68, S71, S72, S73, S74, S75, S76, S77, S78, S80, S441, S442, S443, S444, S445, S446, S447, S448, S449, S450, S451, S452, S453, S455, S456, S457, S458, S459, S460, NPTII3, NPTII5 และ B2

การทดลองที่ 4 ศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมเพื่อแก้ไขความเป็นหมันและการตรวจสอบ

1. ต้นปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อของคู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. roscoeana*

2. อุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง, เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter), หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (auto clave), เครื่องคนสาร (magnetic stirrer), บีกเกอร์ (beaker) และไปเปท (pipette)

3. อุปกรณ์สำหรับปฏิบัติงานในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ (laminar flow) ได้แก่ จานแก้ว (petri-dish), มีดผ่าตัด, ปากคีบปลายแหลม (forceps), หลอดหยด (dropper) และตะเกียงแอลกอฮอล์

4. อุปกรณ์ในการตรวจสอบพืชที่ได้รับการเพิ่มโครโมโซม ได้แก่ แผ่นสไลด์ (slide), จานแก้ว (petri-dish), บีกเกอร์(beaker), หลอดหยด (dropper), แผ่นปิดสไลด์ (cover slip), ปากคีบปลายแหลม (forceps), ใบมีดผ่าตัดและใบมีดโกน

5. สารเคมีต่างๆ

5.1 สารโคลชิซิน (colchicine) ความเข้มข้น 800 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ Thidiazuron (TDZ), Indole-3-acetic acid (IAA) และ Adenine

5.3 สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อ คือ อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962)

5.4 สีย้อม DAPI

6. กล้องจุลทรรศน์ (Binocular microscope)

7. เครื่อง Flow cytometer

วิธีการวิจัย

การทดลองที่ 1 ศึกษาการผสมเกสรของปทุมมาและกระเจียว

1.1 ทดสอบความมีชีวิตของละอองเกสร

ปทุมมาจำนวน 3 ชนิด (species) ได้แก่ *C. alismatifolia*, *C. parviflora* และ *C. rhabdota* (ภาพ 2) และกระเจียว 5 ชนิด (species) ได้แก่ *C. angustifolia*, *C. aurantiaca*, *C. cordata*, *C. roscoeana* และ *C. rubrobracteata* (ภาพ 3) ได้นำมาใช้ในการทดลอง โดยทำการวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำทำการสุ่มนับการติดสีของละอองเกสร จำนวน 5 ตำแหน่งต่อ 1 สไลด์ โดยนำละอองเกสรเพศผู้ที่พร้อมจะผสมเขี่ยละอองเกสรลงบนแผ่นสไลด์ย้อมด้วยสีย้อม Acetone carmine เป็นเวลา 5 นาทีแล้วปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูการติดสีของละอองเกสร โดยละอองเกสรที่มีลักษณะกลมและติดสีแดง คือละอองเกสรที่มีชีวิต ละอองเกสรที่มีลักษณะเหี่ยวย่นและไม่ติดสีถือว่าไม่มีชีวิต

การบันทึกข้อมูล

1. เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต โดยคำนวณจาก

$$\frac{\text{จำนวนละอองเกสรที่ติดสี}}{\text{จำนวนละอองเกสรที่ทำการนับทั้งหมด}} \times 100$$

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (Statistical Analysis System) โดยใช้ Model CRD และแสดงผลในรูปของตาราง ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละค่าสังเกตโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

1.2 ทดสอบความสามารถในการงอกหลอดของละอองเกสรบนอาหารสังเคราะห์

ปทุมมาจำนวน 3 ชนิด (species) ได้แก่ *C. alismatifolia*, *C. parviflora* และ *C. rhabdota* (ภาพ 2) และกระเจียว 5 ชนิด (species) ได้แก่ *C. angustifolia*, *C. aurantiaca*, *C. cordata*, *C. roscoeana* และ*C. rubrobracteata* (ภาพ 3) ได้นำมาใช้ในการทดลอง โดยทำการวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำทำการสุ่มนับการงอกของละอองเกสรจำนวน 5 ตำแหน่งต่อ 1 สไลด์ โดยใช้อาหารสังเคราะห์ร่วมกับน้ำตาล ที่ระดับ

ความเข้มข้น 10% ตามการทดลองของหยกทิพย์ (2550) ที่เตรียมไว้มาหยดลงบนแผ่นสไลด์แล้วนำละอองเกสรเขี่ยลงบนแผ่นสไลด์ตามวิธีการ hanging drop technique และรักษาความชื้นให้กับละอองเกสรโดยนำไปเลี้ยงในกล่องพลาสติกใสใส่น้ำพอประมาณเป็นเวลา 20 นาทีแล้วนำแผ่นสไลด์ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูการงอกของละอองเกสร

การบันทึกข้อมูล

1. เปอร์เซ็นต์ความงอกของละอองเกสร โดยคำนวณจาก

$$\frac{\text{จำนวนละอองเกสรที่งอก}}{\text{จำนวนละอองเกสรที่ทำการนับทั้งหมด}} \times 100$$

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (Statistical Analysis System) โดยใช้ Model CRD และแสดงผลในรูปของตาราง ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละค่าสังเกตโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

1.3 ทดสอบความสามารถในการงอกของละอองเกสร (pollen) บนยอดเกสรเพศเมีย (stigma surface) และการงอกของหลอดละอองเกสรลงในก้านชูเกสรเพศเมีย

โดยจะนำเกสรเพศเมียในแต่ละคู่ผสม ที่ได้รับการผสมแล้ว เป็นเวลา 12 และ24 ชั่วโมง แช่ในโซเดียมไฮดอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 4 N เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการย้อมด้วยสี Aniline blue ความเข้มข้น 0.01 M เป็นเวลา 5-10 นาที และทำความสะอาดเซลล์ด้วยการล้างน้ำกลั่น หลังจากนั้นนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (Fluoresence microscope) (Nikon Eclipse 80i Epi-Fl Attachment)

การบันทึกข้อมูล

1. ตรวจสอบความสามารถในการงอกหลอดของละอองเกสรบนยอดเกสรเพศเมีย (stigma) และการงอกหลอดลงในก้านเกสรเพศเมีย (style) พร้อมบันทึกภาพ

1.4 การผสมเกสร

ทำการวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) มี 20 สิ่งทดลอง (คู่ผสม) ในแต่ละสิ่งทดลองทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำทำการผสมเกสรจำนวน 20 ดอกโดยทำการผสมข้ามชนิดกันระหว่างกลุ่มของปทุมมา (Paracurcuma) และกระเจียว (Eucurcuma) โดยการผสมแบบสลับพ่อสลับแม่ (reciprocal cross) จำนวน 20 คู่ผสม ดังนี้

1. *C. alismatifolia* X *C. angustifolia*
2. *C. alismatifolia* X *C. aurantiaca*
3. *C. alismatifolia* X *C. cordata*
4. *C. alismatifolia* X *C. roscoeana*
5. *C. alismatifolia* X *C. rubrobracteata*
6. *C. parviflora* X *C. angustifolia*
7. *C. parviflora* X *C. aurantiaca*
8. *C. parviflora* X *C. cordata*
9. *C. parviflora* X *C. roscoeana*
10. *C. parviflora* X *C. rubrobracteata*
11. *C. angustifolia* X *C. alismatifolia*
12. *C. angustifolia* X *C. parviflora*
13. *C. aurantiaca* X *C. alismatifolia*
14. *C. aurantiaca* X *C. parviflora*
15. *C. cordata* X *C. alismatifolia*
16. *C. cordata* X *C. parviflora*
17. *C. roscoeana* X *C. alismatifolia*
18. *C. roscoeana* X *C. parviflora*
19. *C. rubrobracteata* X *C. alismatifolia*
20. *C. rubrobracteata* X *C. parviflora*

ขั้นตอนในการผสมเกสร

1. ใช้ปากคีบปลายแหลม (forceps) เขี่ยเกสรเพศผู้จากบริเวณ anther จากดอกของต้นพ่อมาแตะปิดบริเวณยอดเกสรเพศเมีย (stigma surface) ของต้นแม่ (ภาพ 4)

2. แขวนป้ายระบุชื่อคู่ผสม และวันที่ผสม

ภาพ 4 ลักษณะของยอดเกสรเพศเมีย (stigma surface) และ เกสรเพศผู้ (anther)

การบันทึกข้อมูล

1. เปอร์เซ็นต์การผสมติด โดยคำนวณจาก

$$\frac{\text{จำนวนดอกที่ผสมติด}}{\text{จำนวนดอกที่ผสมทั้งหมด}} \times 100$$

2. จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล โดยคำนวณจาก

$$\frac{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมดในแต่ละคู่ผสม}}{\text{จำนวนผลทั้งหมดในแต่ละคู่ผสม}}$$

3. เปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์ โดยคำนวณจาก

$$\frac{\text{จำนวนเมล็ดที่สมบูรณ์ในแต่ละคู่ผสม}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมดในแต่ละคู่ผสม}} \times 100$$

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (Statistical Analysis System) โดยใช้ Model CRD และแสดงผลในรูปของตาราง ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละค่าสังเกตโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 2 ศึกษาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (embryo rescue)

โดยการนำผลของลูกผสมอายุ 14-30 วันหลังผสม ในแต่ละคู่ผสมทั้งหมด 7 คู่ผสม ได้แก่ คู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. angustifolia*, *C. alismatifolia* X *C. aurantiaca*, *C. alismatifolia* X *C. cordata*, *C. alismatifolia* X *C. roscoeana*, *C. parviflora* X *C. aurantiaca*, *C. parviflora* X *C. roscoeana* และ *C. parviflora* X *C. rubrobracteata* มาทำความสะอาดโดยการฟอกด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (ที่มีความเข้มข้นของคลอรีน 1%) เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆ ละ10 นาที ในตู้ปลอดเชื้อ ผึ่งให้แห้งบนกระดาษที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นผ่าเอาเมล็ดที่อยู่ภายในมาแยกเอ็มบริโอ และนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962) ดัดแปลงโดยเติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร, NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, GA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร, น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 7 กรัมต่อลิตร นำไปเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้หลอดฟลูออเรสเซ็นต์ที่มีความเข้มแสง 36 $\mu mol/m^2/s$ ตามวิธีของหยกทิพย์ (2550)

การบันทึกข้อมูล

1. เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่งอก โดยคำนวณจาก

$$\frac{\text{จำนวนเอ็มบริโอที่งอก}}{\text{จำนวนเอ็มบริโอที่ทำการเพาะทั้งหมด}} \times 100$$

2. เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่อยู่รอด โดยคำนวณจาก

$$\frac{\text{จำนวนต้นที่เจริญเติบโตปกติ}}{\text{จำนวนต้นที่เกิดทั้งหมด}} \times 100$$

3. จำนวนวันที่เริ่มงอก (นับจากวันที่เริ่มทำการเพาะเลี้ยงถึงวันที่เกิดยอดและราก)

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (Statistical Analysis System) โดยใช้ Model CRD และแสดงผลในรูปของตาราง ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละค่าสังเกตโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 3 ศึกษาการตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการใช้เทคนิค RAPD

ทำการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะที่แสดงออกของลูกผสมกับสายพันธุ์แม่และสายพันธุ์พ่อ และทำการเก็บตัวอย่างใบอ่อนของพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่ และลูกผสมข้ามชนิด จำนวน 7 คู่ผสม ได้แก่ คู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. angustifolia*, *C. alismatifolia* X *C. aurantiaca*, *C. alismatifolia* X *C. cordata*, *C. alismatifolia* X *C. roscoeana*, *C. parviflora* X *C. aurantiaca*, *C. parviflora* X *C. roscoeana* และ *C. parviflora* X *C. rubrobracteata* มาสกัดดีเอ็นเอ วัดปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพ จากนั้นนำไปตรวจสอบโดยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ต่าง ๆ เพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการคัดเลือกลูกผสมข้ามชนิด

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

1. นำใบอ่อนของพืชที่ต้องการตรวจสอบมาทำการบดร่วมกับ extraction buffer จนชิ้นส่วนใบอ่อนของพืชละเอียด
2. เติม 24 : 1 Chloroform : Iso-amyl alcohol ลงไป 3-4 Vol.
3. เขย่าแรงๆ 20 วินาที
4. Centrifuge ด้วยความเร็ว 12,000 - 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
5. ดูด supernatant ด้วย tip ที่ตัดปลายออกเพื่อป้องกันสายดีเอ็นเอขาด ใส่ลงใน eppendrof tube อันใหม่
6. เติม Ethanol 95% ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 2 เท่าของปริมาตร supernatant
7. ทำการเขย่าแบบสลับขึ้นลงอย่างช้าๆ 2-3 ครั้ง และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที
8. Centrifuge ด้วยความเร็ว 12,000 - 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
9. เทสารที่เป็นน้ำทิ้งให้หมด แล้วล้างด้วย Ethanol 95% และ70% อย่างละครั้ง
10. คว่ำ eppendrof tube บนกระดาษที่นึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อให้ดีเอ็นเอแห้ง
11. ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer
12. เติม RNase 1 µl. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที

เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction)

1. ผสมดีเอ็นเอตัวอย่างกับบัฟเฟอร์และไพรเมอร์ โดยในการทดลองนี้ ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 70 ไพรเมอร์ คือ OPU3, OPU5, OPU6, OPU7, OPU12, OPU13, OPU14, OPU16, OPA01, OPA05, OPA08, OPA09, S21, S22, S23, S24, S25, S26, S27, S28, S29, S30, S31, S32, S33, S34, S35, S36, S37, S38, S40, S61, S62, S63, S64, S65, S66, S67, S68, S71, S72, S73, S74, S75, S76, S77, S78, S80, S441, S442, S443, S444, S445, S446, S447, S448, S449, S450, S451, S452, S453, S455, S456, S457, S458, S459, S460, NPTII3, NPTII5 และ B2

2. นำไปใส่ในเครื่องพีซีอาร์ โดยใช้ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1. ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (denature)

ขั้นตอนที่ 2. ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (denature)

ขั้นตอนที่ 3. ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (annealing)

ขั้นตอนที่ 4. ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที (extension)

ขั้นตอนที่ 5. ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (extension)

โดยจะให้ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 จนถึงขั้นตอนที่ 4 เป็นจำนวน 45 รอบ

3. ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ โดยการทำ เจลอิเล็คโตรโฟเรซิส

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอ โดยการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยแสง UV. บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอของพ่อ แม่ และลูกผสม

การทดลองที่ 4 ศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมเพื่อแก้ไขความเป็นหมันและการตรวจสอบ

ในการศึกษานี้ ได้ใช้ลูกผสมข้ามชนิดของ *C. alismatifolia* X *C. roscoeana* มาทำการชักนำให้เกิดต้นในสภาพปลอดเชื้อ และทำให้เกิดยอดจำนวนมากโดยการตัดตามยาวบริเวณส่วนโคนของต้นปทุมมา แล้วเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 5.75 เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 16 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายชิ้นส่วนปทุมมาไปยังอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 16 ชั่วโมง หลังจากนั้น ให้สาร โคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 800 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามการทดลองของควงจันทร์ (2549) โดยการหยดลงบริเวณส่วนที่มีการพัฒนาของตาอ่อน

ขั้นตอนการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Flow cytometer

1. นำตัวอย่างของใบ หรือต้นพืชที่ต้องภารตรวจสอบมาทำการสับร่วมกับ nuclei extraction buffer ให้ละเอียดประมาณ 30-40 ครั้ง แล้วแช่ไว้ประมาณ 10 นาที
2. กรองใส่ในหลอดแก้ว
3. เติม DAPI ลงไปประมาณ 4 เท่าของสารละลายที่ได้
4. แช่ทิ้งไว้นาน 1 – 10 นาที
5. นำหลอดแก้วใส่ในเครื่อง Flow cytometer เพื่อวัดปริมาณดีเอ็นเอ
6. อ่านค่าที่ได้จากการวัดและพิมพ์ค่าที่ได้ออกมา

ขั้นตอนการตรวจสอบจำนวนปากใบต่อพื้นที่ และจำนวนคลอโรพลาสต่อปากใบ

1. ดึงผิวใบในส่วนของท้องใบวางบนแผ่นสไลด์
2. ใส่น้ำลงไปเล็กน้อย
3. ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover slip)
4. สังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่เลนส์วัตถุกำลังขยาย 10 เท่าในการนับจำนวนปากใบ และ 40 เท่าในการนับจำนวนคลอโรพลาส

การบันทึกข้อมูล

1. วัดระดับการเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซมด้วยเครื่อง Flow cytometer

2. เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่อยู่รอดในการให้สารโคลชิซิน โดยคำนวณจาก

$$\frac{\text{จำนวนต้นที่เจริญเติบโตปกติ}}{\text{จำนวนต้นที่ได้รับสารโคลชิซินทั้งหมด}} \times 100$$

3. เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่มีการเพิ่มจำนวนของโครโมโซม โดยคำนวณจาก

$$\frac{\text{จำนวนต้นที่มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซม}}{\text{จำนวนต้นที่ได้รับสารโคลชิซินทั้งหมด}} \times 100$$

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (Statistical Analysis System) โดยใช้ Model CRD และแสดงผลในรูปของตาราง ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละค่าสังเกตโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การนับจำนวนปากใบ ทำการวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) มี 3 สิ่งทดลอง ได้แก่ พืช 2n, 4n และ 8n ในแต่ละสิ่งทดลองทำการทดลองจำนวน 10 ซ้ำ (สไลด์) ในแต่ละซ้ำทำการนับจำนวนปากใบในพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร โดยนับในช่องสีเหลี่ยมที่มีขนาด 500 μm^2 จำนวน 4 ช่องต่อซ้ำ

การนับจำนวนคลอโรพลาส ทำการวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) มี 3 สิ่งทดลอง ได้แก่ พืช 2n, 4n และ 8n ในแต่ละสิ่งทดลองทำการทดลองจำนวน 10 ซ้ำ (ปากใบ) ในแต่ละซ้ำทำการนับจำนวนคลอโรพลาส

การบันทึกข้อมูล

1.จำนวนของปากใบเฉลี่ยต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร โดยคำนวณจาก

$$\frac{\text{จำนวนปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร}}{\text{จำนวนพื้นที่ทั้งหมดที่นับ}}$$

2. จำนวนของคลอโรพลาสเฉลี่ยต่อปากใบ โดยคำนวณจาก

$$\frac{\text{จำนวนคลอโรพลาสทั้งหมดที่นับ}}{\text{จำนวนปากใบที่นับทั้งหมด}}$$

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (Statistical Analysis System) โดยใช้ Model CRD และแสดงผลในรูปของตาราง ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละค่าสังเกตโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบความงอกหลอดเกสรของต้นที่มีการเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซม (ตามวิธีการดังการทดลองที่ 1.2) โดยทำการสุ่มนับการงอกของละอองเกสรจำนวน 3 ตำแหน่งต่อ 1 สไลด์ นับทั้งหมด 3 สไลด์ต่อชนิดของพืช

การบันทึกข้อมูล

1.ความสามารถในการงอกหลอดเกสรของต้นที่มีการเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซม โดยคำนวณจาก

$$\frac{\text{จำนวนละอองเกสรที่งอก}}{\text{จำนวนละอองเกสรที่ทำการนับทั้งหมด}} \times 100$$

การทดสอบความสามารถในการผสมเกสรของต้นที่ได้รับการเพิ่มปริมาณโครโมโซม โดยทำการวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) มี 4 สิ่งทดลอง (คู่ผสม) ในแต่ละสิ่งทดลองทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ๆละ 3 ดอก ดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1. พืช 2n ต้นปกติ (*C. alismatifolia*) X พืช 4n (ลูกผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. roscoeana*)

สิ่งทดลองที่ 2. พืช 2n ต้นปกติ (*C. alismatifolia*) X พืช 8n (ลูกผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. roscoeana*)

สิ่งทดลองที่ 3. พืช 4n (ลูกผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. roscoeana*) X พืช 2n ต้นปกติ (*C. alismatifolia*)

สิ่งทดลองที่ 4. พืช 8n (ลูกผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. roscoeana*) X พืช 2n ต้นปกติ (*C. alismatifolia*)

โดยมีขั้นตอนในการผสมเกสรตามวิธีการดังการทดลองที่ 1.4

การบันทึกข้อมูล

1.เปอร์เซ็นต์การผสมติด โดยคำนวณจาก

$$\frac{\text{จำนวนดอกที่ผสมติด}}{\text{จำนวนดอกที่ผสมทั้งหมด}} \times 100$$

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (Statistical Analysis System) โดยใช้ Model CRD และแสดงผลในรูปของตาราง ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละค่าสังเกตโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาการผสมเกสรของปทุมมาและกระเจียว

1.1 ทดสอบความมีชีวิตของละอองเกสร

จากการศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสรของพืชสกุล *Curcuma* จำนวน 8 ชนิด โดยแบ่งเป็นพืชที่อยู่ในกลุ่ม Paracurcuma จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *C. alismatifolia*, *C. parviflora* และ *C. rhabdota* และพืชที่อยู่ในกลุ่ม Eucurcuma จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *C. aurantiaca*, *C. angustifolia*, *C. cordata*, *C. roscoeana* และ *C. rubrobracteata* พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยชนิดที่มีความมีชีวิตของละอองเกสรมากที่สุด คือ *C. parviflora*, *C. alismatifolia* และ *C. angustifolia* มีความมีชีวิตของละอองเกสร 95.18, 94.74 และ 92.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ *C. rhabdota*, *C. aurantiaca*, *C. cordata*, *C. rubrobracteata* และ *C. roscoeana* ซึ่งมีความมีชีวิตของละอองเกสรเท่ากับ 62.80, 61.04, 59.74, 51.07 และ 49.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตาราง 2 และภาพ 5)

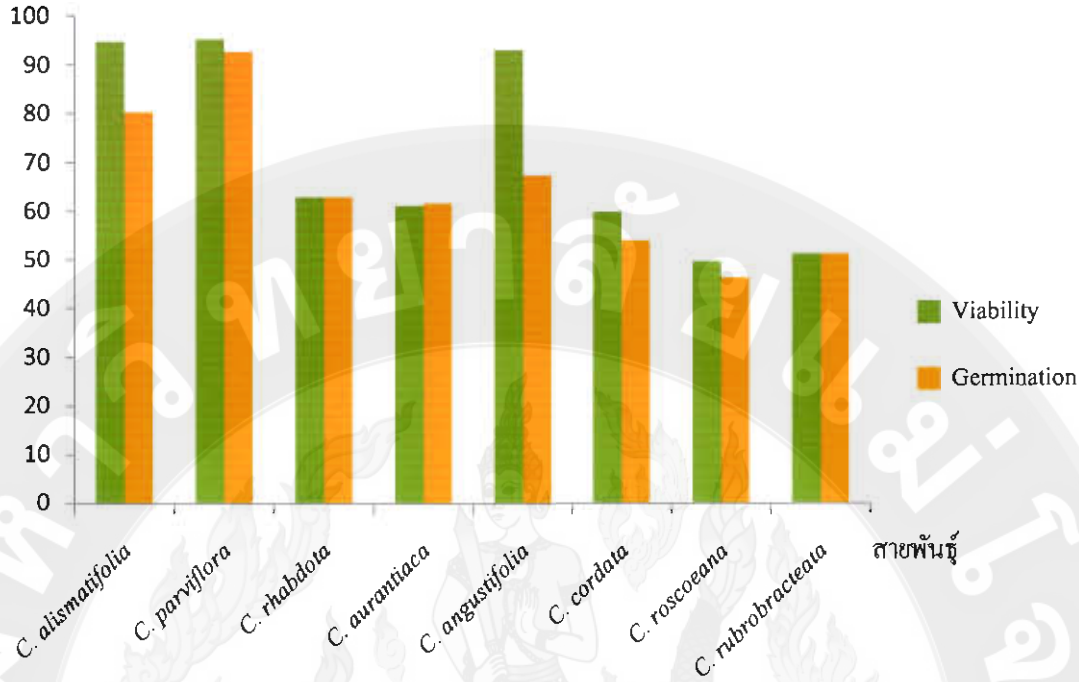
1.2 ทดสอบความสามารถในการงอกหลอดของละอองเกสรบนอาหารสังเคราะห์

จากการศึกษาความสามารถในการงอกหลอดละอองเกสรของพืชสกุล *Curcuma* จำนวน 8 ชนิด ในอาหารเลี้ยงละอองเกสรที่ประกอบด้วยน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย *C. parviflora* มีความสามารถในการงอกหลอดเกสรมากที่สุดคือ 92.63 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *C. alismatifolia* มีความสามารถในการงอกหลอดเกสร 80.20 เปอร์เซ็นต์ และชนิดที่มีอัตราการงอกหลอดเกสรต่ำสุด คือ *C. rubrobracteata* และ *C. roscoeana* มีความสามารถในการงอกหลอดเกสร 51.07 และ 46.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตาราง 2 และภาพ 5)

ตาราง 2 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการงอกหลอดของละอองเกสรของพืชสกุล *Curcuma* จำนวน 8 ชนิด

ชนิด	ความมีชีวิตของละอองเกสร (%)	ความสามารถในการงอกหลอดของละอองเกสร (%)
C. alismatifolia	94.74[a]	80.20[b]
C. parviflora	95.18[a]	92.63[a]
C. rhabdota	62.80[b]	62.80[cd]
C. aurantiaca	61.04[b]	61.48[cd]
C. angustifolia	92.88[a]	67.15[c]
C. cordata	59.74[b]	53.85[de]
C. roscoeana	49.50[b]	46.12[e]
C. rubrobracteata	51.07[b]	51.07[c]
Sig.	**	**
C.V. (%)	**10.61**	**8.80**

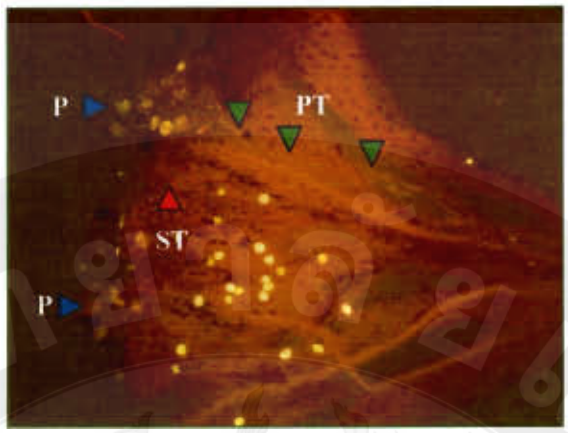
หมายเหตุ ** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %
ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ตามการเปรียบเทียบแบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)



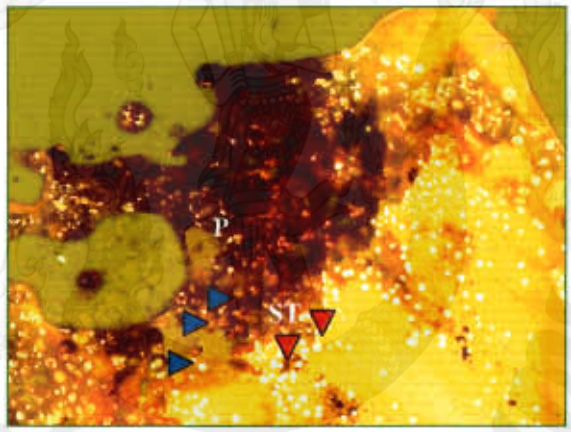
ภาพ 5 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการงอกหลอดของละอองเกสรของพืชสกุล *Curcuma* จำนวน 8 ชนิด

1.3 ทดสอบความสามารถในการงอกของละอองเกสร (pollen) บนยอดเกสรเพศเมีย(stigma surface) และการงอกของหลอดละอองเกสรลงในก้านชูเกสรเพศเมีย

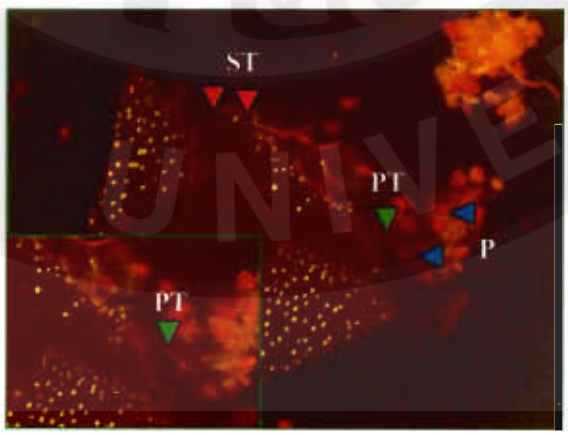
จากการศึกษาความสามารถในการงอกของละอองเกสรบนยอดเกสรเพศเมียและการงอกหลอดเกสรลงในก้านชูเกสรเพศเมียนั้น พบว่า ละอองเกสรของพืชในกลุ่ม Eucurcuma สามารถงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมียของพืชในกลุ่ม Paracurcuma เมื่อใช้ *C. alismatifolia* และ *C. parviflora* เป็นแม่ ละอองเกสรของ *C. angustifolia*, *C. aurantiaca*, *C. cordata*, C. *roscoeana* และ *C. rubrobracteata* สามารถงอกหลอดเกสรบนยอดเกสรเพศเมียได้ และหลอดเกสรสามารถงอกผ่าน ก้านชูเกสรเพศเมียของ *C. alismatifolia* และ *C. parviflora* ได้แบบปกติ (ภาพ 6) แต่เมื่อใช้พืชที่อยู่ในกลุ่ม Eucurcuma เป็นแม่ ละอองเกสรของพืชที่อยู่ในกลุ่ม Paracurcuma บางชนิดไม่สามารถงอกหลอดเกสรบนยอดเกสรเพศเมียได้ ซึ่งได้แก่ คู่ผสมระหว่าง *C. angustifolia* X *C. alismatifolia*, *C. rubrobracteata* X *C. alismatifolia* และ *C. rubrobracteata* X *C. parviflora* (ภาพ 7) เมื่อศึกษาคู่ผสมระหว่าง *C. angustifolia* X *C. parviflora* ละอองเกสรสามารถงอกบนยอดเกสรเพศเมียได้ แต่หลอดเกสรไม่สามารถงอกหลอดลงไปในก้านชูเกสรได้ (ภาพ 8) เมื่อใช้ *C. aurantiaca*, *C. cordata* และ C. *roscoeana* เป็นแม่ ละอองเกสรของ *C. alismatifolia* และ *C. parviflora* สามารถงอกบนยอดเกสรเพศเมียได้และมีการงอกหลอดลงไปในก้านชูเกสรเพศเมียได้ปกติ



ภาพ 6 หลอดเกสร (PT) ของ *C. aurantiaca* สามารถงอกบนยอดเกสรเพศเมีย (ST) และสามารถงอกผ่านก้านชูเกสรเพศเมียของ *C. parviflora* ; P = ละอองเกสร



ภาพ 7 ละอองเกสร (P) ของ *C. angustifolia* ไม่สามารถงอกหลอดลงบนยอดเกสรเพศเมีย (ST) ของ *C. alismatifolia*



ภาพ 8 ละอองเกสร (P) ของ *C. angustifolia* งอกหลอดลงบนยอดเกสรเพศเมีย (ST) ของ *C. parviflora* แต่ไม่สามารถงอกหลอดลงในก้านชูเกสรเพศเมียได้ ; PT = หลอดเกสร

1.4 การผสมเกสร

เปอร์เซ็นต์การผสมติดจากการศึกษาการผสมเกสร โดยการผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่มของปทุมมาจำนวน 20 คู่ผสม (ตาราง 3) พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยคู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. angustifolia* มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดมากที่สุดคือ 26.67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือคู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. cordata* มีเปอร์เซ็นต์การผสมติด 5.00 และคู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. rubrobracteata*, C. *parviflora* X *C. angustifolia*, *C. parviflora* X *C. cordata*, *C. angustifolia* X *C. alismatifolia*, *C. angustifolia* X *C. parviflora*, *C. aurantiaca* X *C. alismatifolia*, *C. cordata* X *C. parviflora*, *C. roscoeana* X *C. alismatifolia*, *C. roscoeana* X *C. parviflora*, *C. rubrobracteata* X *C. alismatifolia* และ *C. rubrobracteata* X *C. parviflora* นั้นไม่สามารถผสมติต (ภาพ 9)

จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลจากการผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่มนั้น พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลจะอยู่ในช่วง 0.67 - 1.33 เมล็ดต่อผล (ตาราง 3 และภาพ 9)

เปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์จากการผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่มนั้น ได้จากจำนวนเมล็ดของผลจากคู่ผสมที่มีการผสมติด พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตาราง 3) โดยคู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. roscoeana*, *C. parviflora* X *C. aurantiaca* และ *C. alismatifolia* X *C. angustifolia* มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์มากที่สุด คือ 66.67, 66.67 และ 60.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตาราง 3 เปอร์เซ็นต์การผสมติด จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล และเปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์ของการผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่ม Paracurcuma และ Eucurcuma จำนวน 20 คู่ผสม

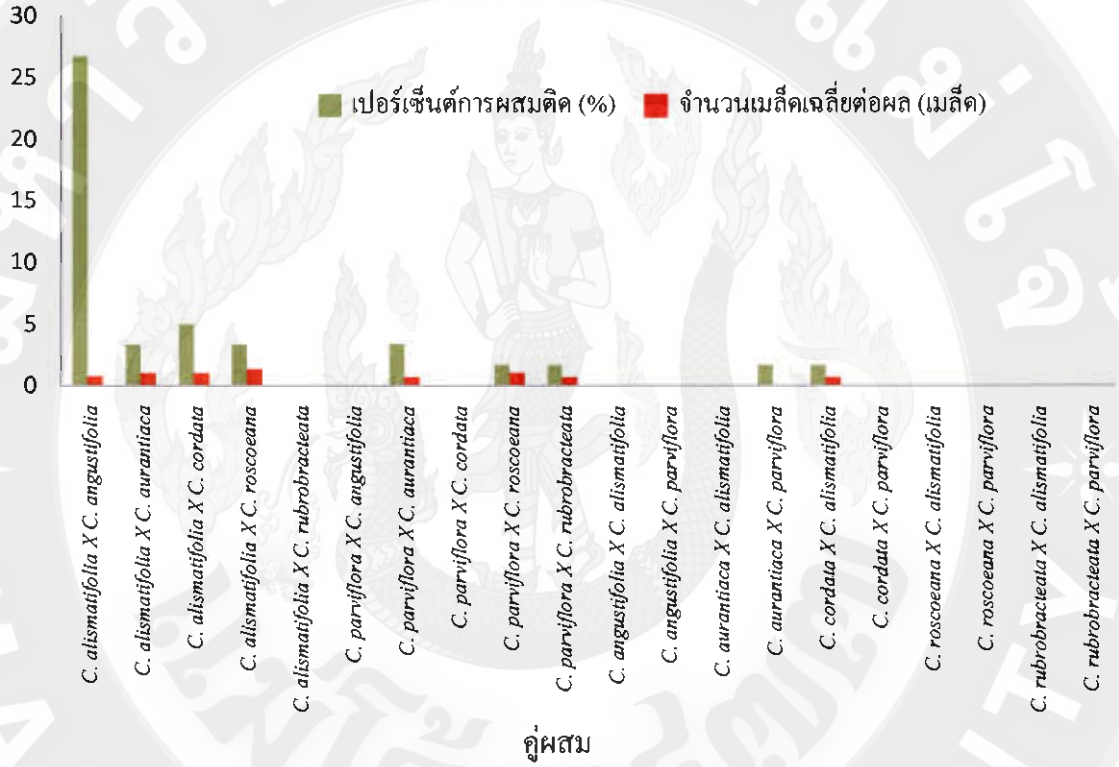
สายพันธุ์คู่ผสม	เปอร์เซ็นต์การผสมติด (%)	จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล (เมล็ด)	เปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์ (%)
C. alismatifolia X *C. angustifolia*	26.67^{a}	0.74^{a}	60.00^{a}
C. alismatifolia X *C. aurantiaca*	3.33^{bc}	1.00^{a}	16.67^{ab}
C. alismatifolia X *C. cordata*	5.00^{b}	1.00^{a}	50.00^{ab}
C. alismatifolia X *C. roscoeana*	3.33^{bc}	1.33^{a}	66.67^{a}
C. alismatifolia X *C. rubrobracteata*	0.00^{c}	0.00^{a}	0.00^{b}
C. parviflora X *C. angustifolia*	0.00^{c}	0.00^{a}	0.00^{b}
C. parviflora X *C. aurantiaca*	3.33^{bc}	0.67^{a}	66.67^{a}
C. parviflora X *C. cordata*	0.00^{c}	0.00^{a}	0.00^{b}
C. parviflora X *C. roscoeana*	1.67^{bc}	1.00^{a}	33.33^{ab}
C. parviflora X *C. rubrobracteata*	1.67^{bc}	0.67^{a}	33.33^{ab}
C. angustifolia X *C. alismatifolia*	0.00^{c}	0.00^{a}	0.00^{b}
C. angustifolia X *C. parviflora*	0.00^{c}	0.00^{a}	0.00^{b}
C. aurantiaca X *C. alismatifolia*	0.00^{c}	0.00^{a}	0.00^{b}
C. aurantiaca X *C. parviflora*	1.67^{bc}	0.00^{a}	0.00^{b}
C. cordata X *C. alismatifolia*	1.67^{bc}	0.67^{a}	0.00^{b}
C. cordata X *C. parviflora*	0.00^{c}	0.00^{a}	0.00^{b}
C. roscoeana X *C. alismatifolia*	0.00^{c}	0.00^{a}	0.00^{b}
C. roscoeana X *C. parviflora*	0.00^{c}	0.00^{a}	0.00^{b}
C. rubrobracteata X *C. alismatifolia*	0.00^{c}	0.00^{a}	0.00^{b}
C. rubrobracteata X *C. parviflora*	0.00^{c}	0.00^{a}	0.00^{b}
Sig	**	ns	*
C.V. (%)	**88.59**	**204.05**	**182.99**

หมายเหตุ * มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ตามการเปรียบเทียบแบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)



ภาพ 9 เปอร์เซ็นต์การผสมติดและจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลของการผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่ม Paracurcuma และ Eucurcuma จำนวน 20 คู่ผสม

การทดลองที่ 2 ศึกษาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (embryo rescue)

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของลูกผสมข้ามชนิดที่มีการผสมติดจำนวน 7 คู่ผสม คือ คู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. angustifolia*, C. *alismatifolia* X *C. aurantiaca*, *C. alismatifolia* X *C. cordata*, *C. alismatifolia* X *C. roscoeana*, *C. parviflora* X *C. aurantiaca*, *C. parviflora* X *C. roscoeana* และ *C. parviflora* X *C. rubrobracteata* พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในทุกคู่ผสมเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนเมล็ดของคู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. angustifolia* จำนวน 6 เมล็ด, C. *alismatifolia* X *C. aurantiaca* จำนวน 1 เมล็ด, *C. alismatifolia* X *C. cordata* จำนวน 3 เมล็ด, *C. alismatifolia* X *C. roscoeana* จำนวน 4 เมล็ด, *C. parviflora* X *C. aurantiaca* จำนวน 2 เมล็ด, *C. parviflora* X *C. roscoeana* จำนวน 3 เมล็ด และ *C. parviflora* X *C. rubrobracteata* จำนวน 2 เมล็ด เปอร์เซ็นต์ต้นที่อยู่รอดจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอนั้นอยู่ที่ระดับ 83.33 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และเอ็มบริโอเริ่มมีการงอกภายใน 7 วัน ในทุกคู่ผสม (ตาราง 4) โดยเอ็มบริโอจะเริ่มเกิดรากสีขาวและมีขนเล็กๆ บริเวณรากก่อน หลังจากนั้นจะเริ่มเกิดเป็นยอดสีเขียวอ่อน และเริ่มเกิดเป็นใบขึ้นมา หลังจากนั้นทำการย้ายไปยังอาหารใหม่ เมื่อต้นกล้ามีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน ภายใน 1-2 เดือนหลังจากการย้ายอาหาร จะนำต้นกล้าออกปรับสภาพให้คุ้นชินกับสภาพแวดล้อม และย้ายลงปลูกในกระถางขนาด 8 นิ้ว และปลูกเลี้ยงในโรงเรือนพลาสติก

ตาราง 4 จำนวนเมล็ดที่เพาะ เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่งอก เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่อยู่รอด และจำนวนวันที่เริ่มงอกของเอ็มบริโอลูกผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่ม Paracurcuma และ Eucurcuma จำนวน 7 คู่ผสม

คู่ผสม	จำนวนเมล็ดที่เพาะ (เมล็ด)	เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่งอก (%)	เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่อยู่รอด (%)	จำนวนวันที่เริ่มงอก (วัน)
C. alismatifolia X *C. angustifolia*	6	100	83.33	7
C. alismatifolia X *C. aurantiaca*	1	100	100	7
C. alismatifolia X *C. cordata*	3	100	100	7
C. alismatifolia X *C. roscoeana*	4	100	100	7
C. parviflora X *C. aurantiaca*	2	100	100	7
C. parviflora X *C. roscoeana*	3	100	100	7
C. parviflora X *C. rubrobracteata*	2	100	100	7
Sig	-	-	**ns**	-
C.V. (%)	-	-	**19.05**	-

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ตามการเปรียบเทียบแบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

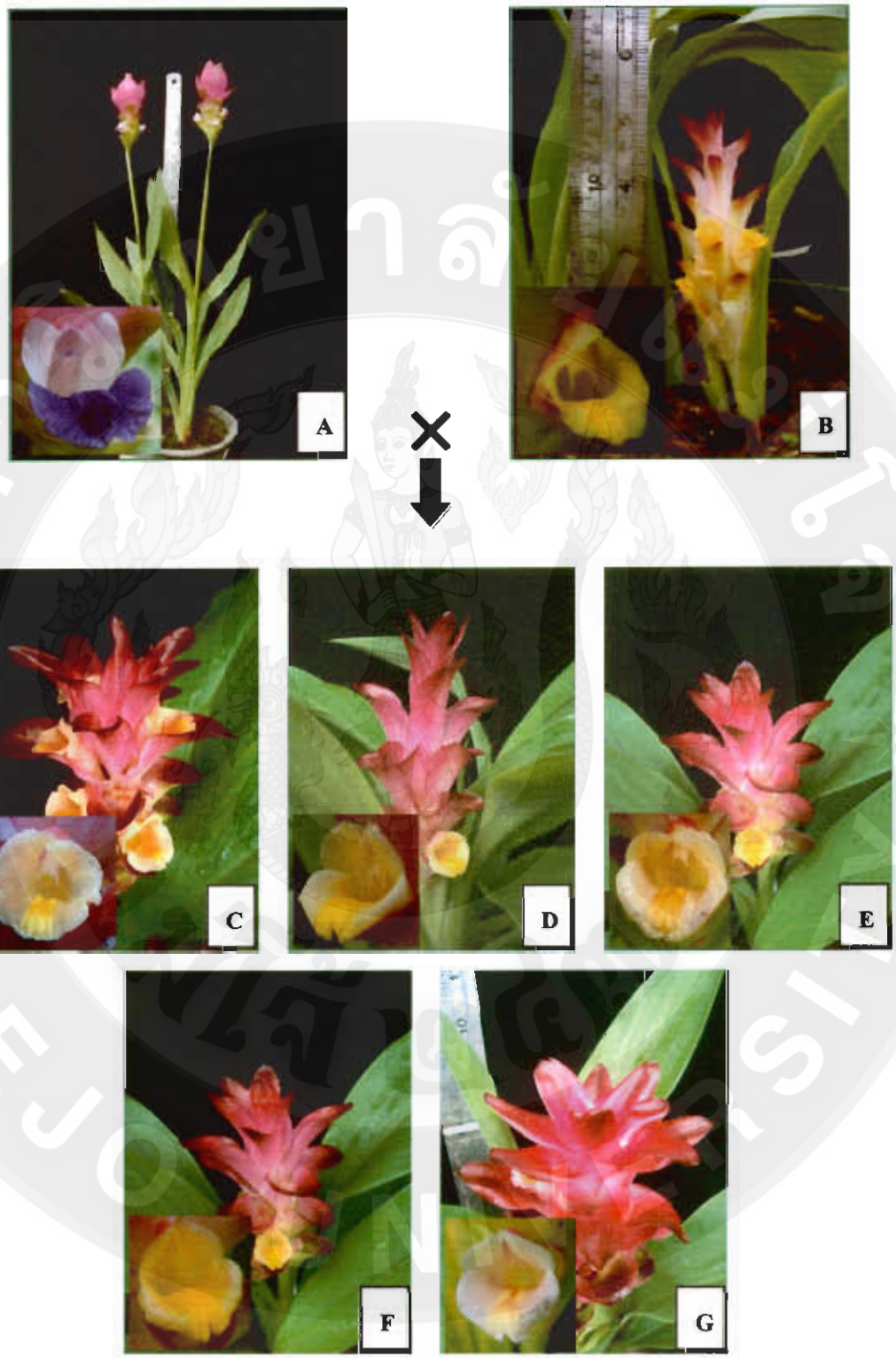
การทดลองที่ 3 ศึกษาการตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการใช้เทคนิค RAPD

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูกผสม

การผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่ม Paracurcuma และกลุ่ม Eucurcuma พบว่าลูกผสมมีลักษณะต่างๆ ที่เป็นกึ่งกลางระหว่างแม่และพ่อ ดังนี้

ลักษณะของลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. angustifolia*

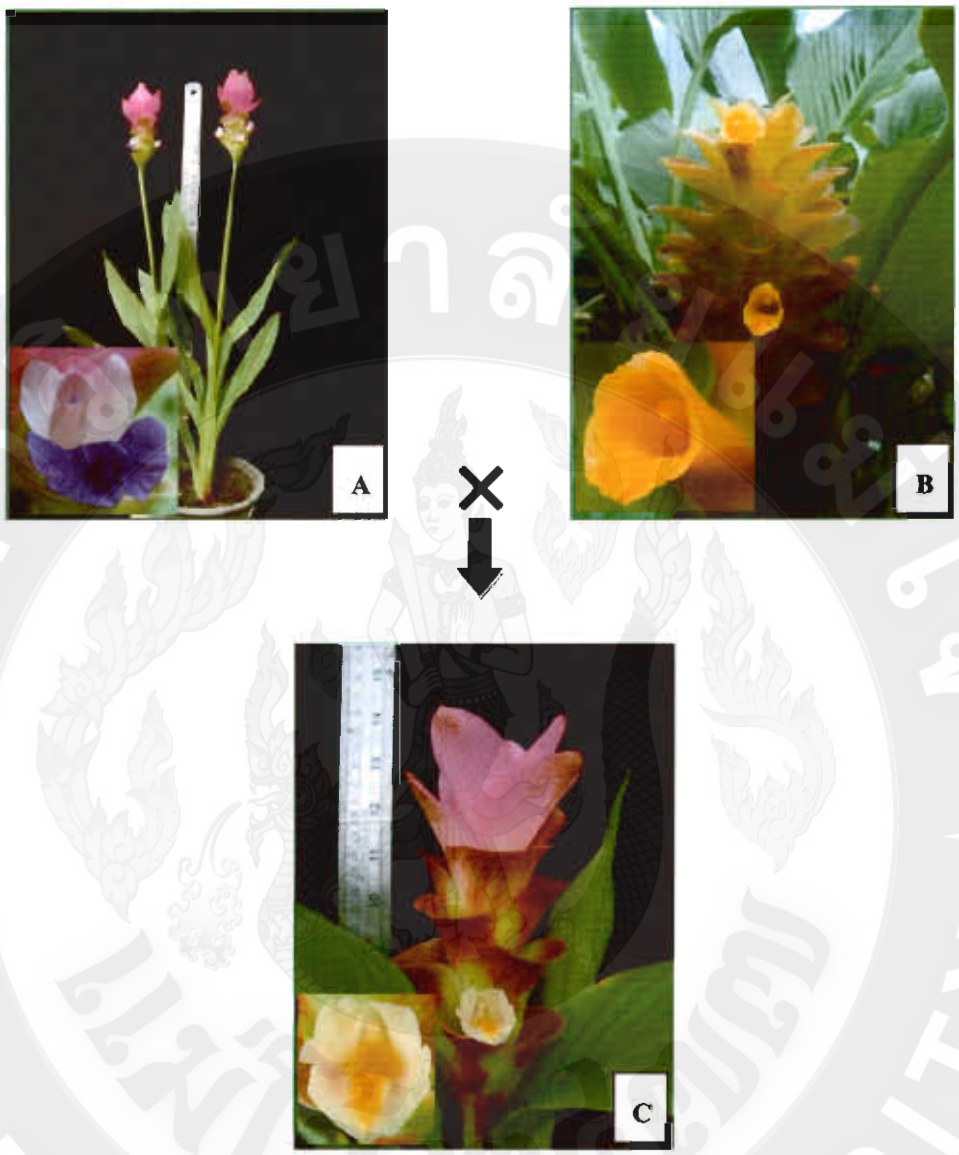
การผสมข้ามระหว่าง *C. alismatifolia* และ *C. angustifolia* พบว่า ลูกผสม (ภาพ 10 C-G) มีลักษณะกึ่งกลางระหว่างแม่ (ภาพ 10 A) และพ่อ (ภาพ 10 B) ก้านช่อดอกยาวกว่าพ่อ แต่สั้นกว่าแม่ ขนาดของกลีบประดับใหญ่กว่ากลีบประดับของพ่อ แต่เล็กกว่ากลีบประดับของแม่ ในลูกผสมบางมีกลีบประดับมากกว่าทั้งแม่และพ่อ สีและลักษณะของกลีบประดับคล้ายกับกลีบประดับของพ่อคือมีสีแดง ปลายกลีบแหลม กลีบประดับด้านล่างสีเขียว ปลายกลีบสีแดง ซึ่งในลูกผสมแต่ละจะมีสีแดงที่ต่างกันออกไป บางต้นมีสีแดงเข้มมากจนเกือบดำ บางต้นสีแดงอ่อนๆ สีของดอกจริงเป็นสีที่ผสมระหว่างสีดอกจริงของแม่และพ่อ แต่จะมีลักษณะสีเหลืองจากพ่อค่อนข้างชัดเจน และเจือด้วยสีม่วงของแม่เล็กน้อยในบางต้น ใบชูขึ้นด้านบนมีขนมากและค่อนข้างหนา แต่เมื่อมองโดยรวมแล้ว ลักษณะช่อดอกของลูกผสมจะคล้ายไปทางพ่อมากกว่าแม่ แต่อย่างไรก็ตามลูกผสมที่ได้ก็มีลักษณะที่คล้ายแม่ถึงแม้จะไม่มากก็ตาม



ภาพ 10 ลักษณะของ *C. alismatifolia* (A), *C. angustifolia* (B) และลูกผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. angustifolia* (C-G)

ลักษณะของลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. aurantiaca*

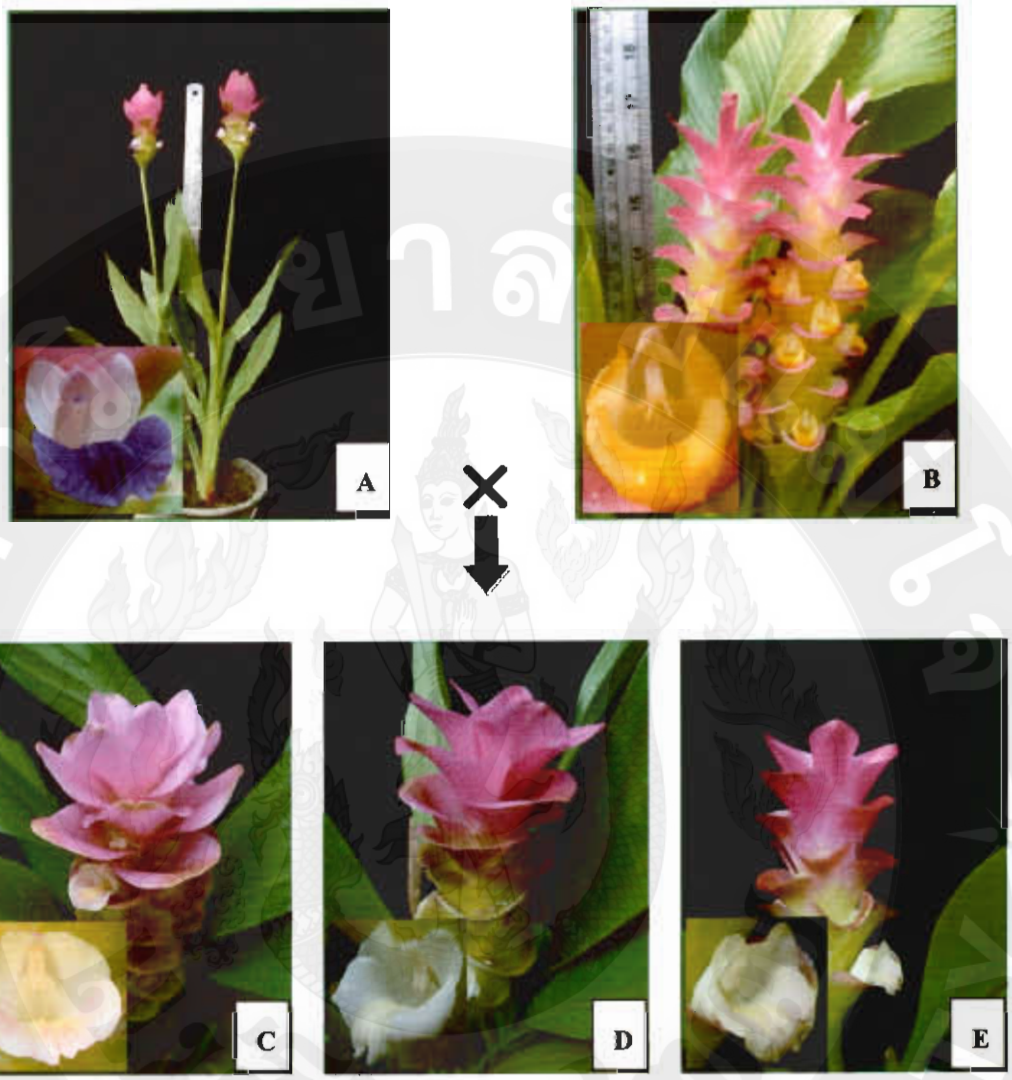
การผสมข้ามระหว่าง *C. alismatifolia* และ *C. aurantiaca* พบว่า ลูกผสม (ภาพ 11 C) มีลักษณะกึ่งกลางระหว่างแม่ (ภาพ 11 A) และพ่อ (ภาพ 11 B) กล่าวคือ ก้านช่อดอกยาวกึ่งกลางระหว่างพ่อและแม่ ช่อดอกมีขนาดใหญ่ ขนาดของกลีบประดับใหญ่กว่ากลีบประดับของพ่อ แต่เล็กกว่ากลีบประดับของแม่ กลีบประดับด้านล่างสีเขียวแต้มด้วยสีน้ำตาลอมเหลืองบริเวณส่วนปลายกลีบ กลีบประดับด้านบนสีชมพู สีของดอกจริงเป็นสีที่ผสมระหว่างสีดอกจริงของแม่และพ่อ โดยมีพื้นสีเหลือง ปากเป็นสีม่วงแดง เส้นกลางปากมีสีเข้มกว่าบริเวณอื่น ใบชูขึ้นด้านบนมีขนเล็กน้อยบริเวณส่วนบนของใบและท้องใบ ใบหนาเล็กน้อย มีทรงพุ่มขนาดใหญ่ โดยภาพรวมแล้ว ลูกผสมมีลักษณะของช่อดอกคล้ายไปทางแม่มากขึ้น คือมีก้านยาวมากขึ้น และได้ลักษณะของสีที่หลากหลายเพิ่มขึ้น ช่อดอกมีขนาดใหญ่ขึ้น



ภาพ 11 ลักษณะของ *C. alismatifolia* (A), *C. aurantiaca* (B) และลูกผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. aurantiaca* (C)

ลักษณะของลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. cordata*

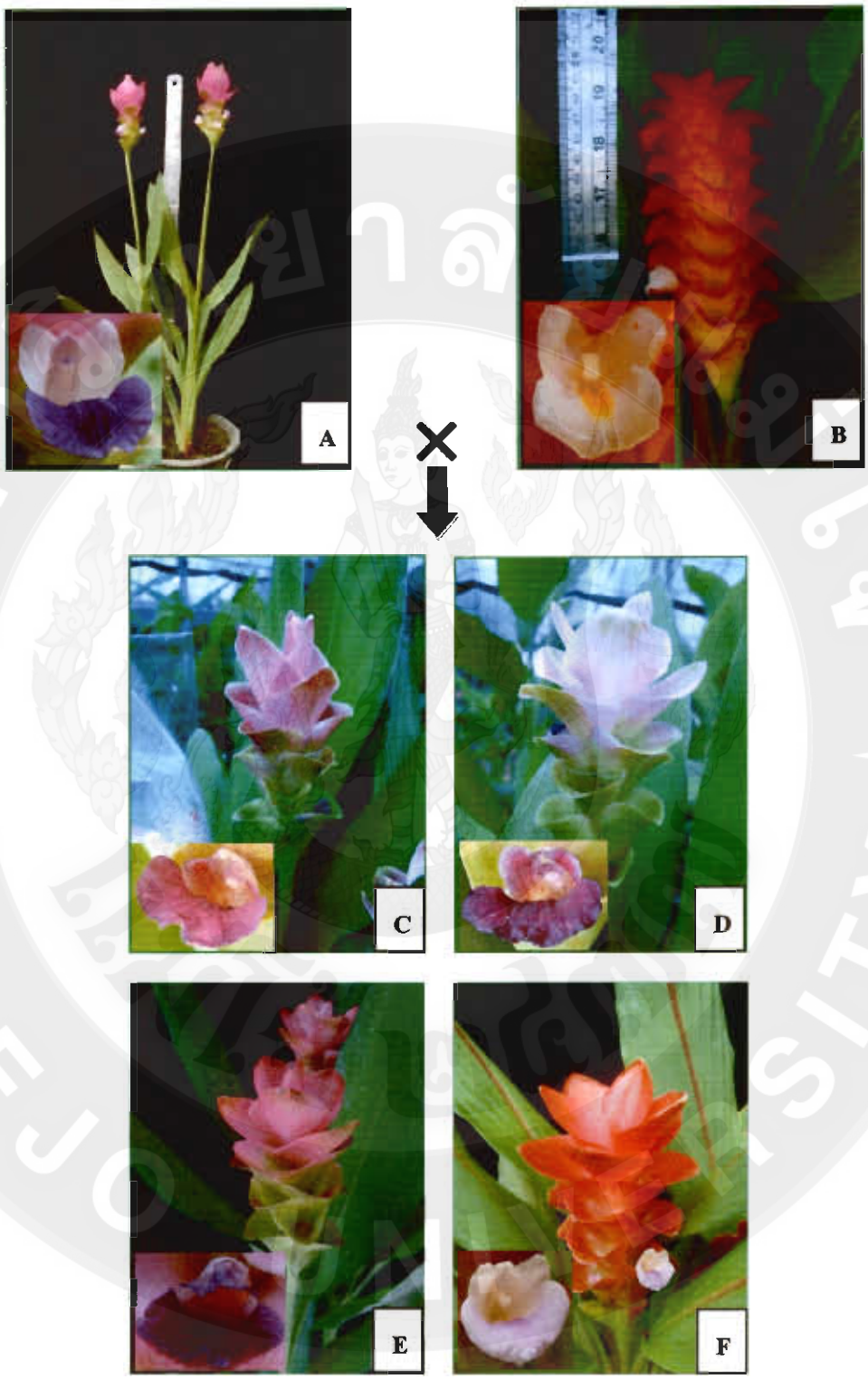
ลูกผสมระหว่าง *C. alismatifolia* และ *C. cordata* (ภาพ 12 C-E) นั้น มีลักษณะกึ่งกลางระหว่างแม่ (ภาพ 12 A) และพ่อ (ภาพ 12 B) ก้านช่อดอกและช่อดอก ยาวกึ่งกลางระหว่างพ่อและแม่ ช่อดอกมีขนาดใหญ่ ขนาดของกลีบประดับใหญ่กว่ากลีบประดับของพ่อ แต่เล็กกว่ากลีบประดับของแม่ กลีบประดับกลมคล้ายแม่ กลีบประดับด้านล่างสีเขียว บริเวณส่วนปลายกลีบแต้มด้วยสีน้ำตาลอ่อน กลีบประดับด้านบนสีชมพูเข้มจนถึงชมพูอ่อน กลีบประดับมันวาวคล้ายพ่อ สีของดอกจริงเป็นสีเหลืองอ่อนจนถึงสีขาว เส้นกลางปากดอกมีสีเข้มกว่าบริเวณอื่น ดอกจริงมีขนาดใหญ่ ในบางต้นดอกจริงมีสีชมพูอ่อนแต้มอยู่บริเวณปากดอกเล็กน้อย ใบมีขนาดใหญ่และยาวชูขึ้นด้านบนเหนือช่อดอก มีขนเล็กน้อยทั้งบริเวณส่วนบนของใบและท้องใบ แผ่นใบมีร่องเส้นใบตามความยาวของใบ โดยรวมแล้วลูกผสมมีลักษณะของช่อดอกคล้ายไปทางแม่มากขึ้น มีความยาวของก้านช่อดอกเพิ่มขึ้น แต่ช่อดอกก็ยังไม่พ้นทรงพุ่มมากนัก



ภาพ 12 ลักษณะของ *C. alismatifolia* (A), *C. cordata* (B) และลูกผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. cordata* (C-E)

ลักษณะของลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. roscoeana*

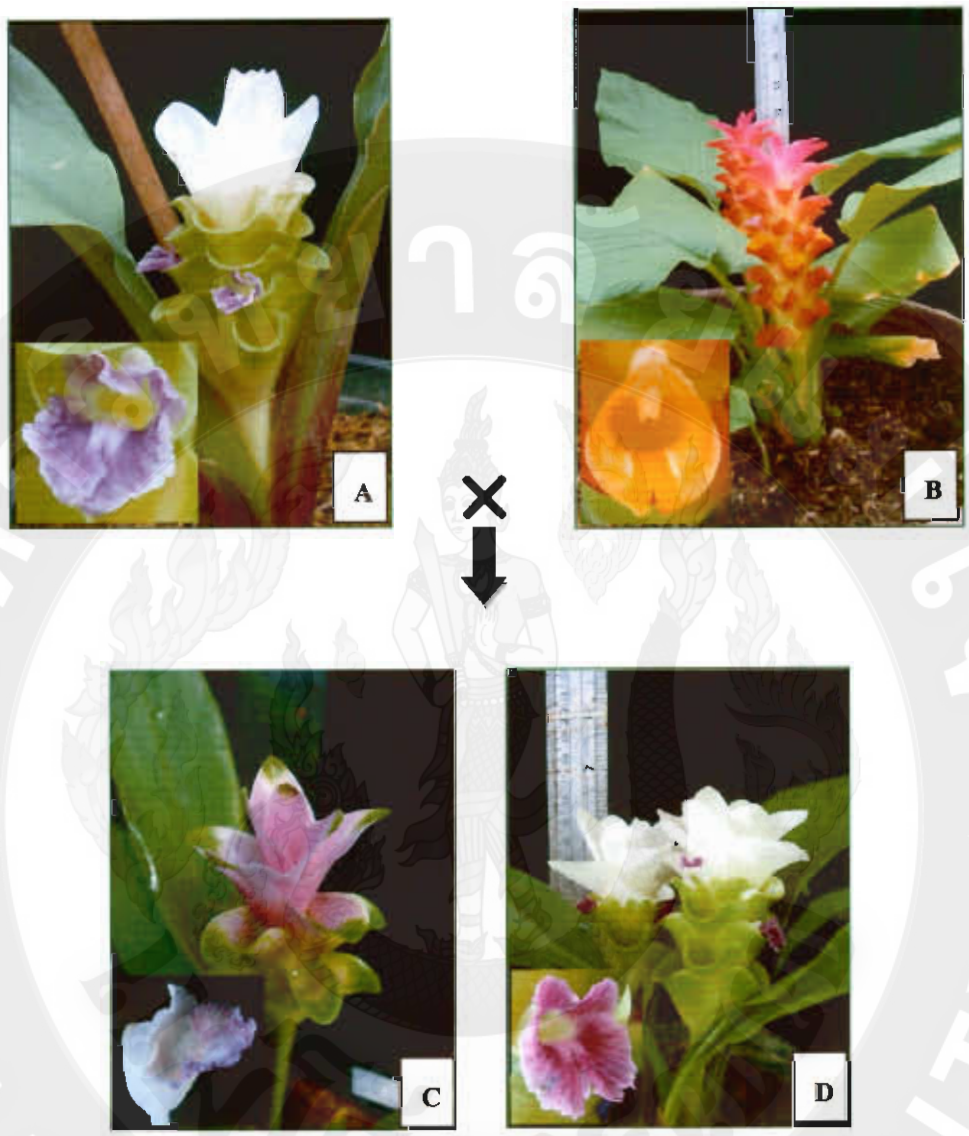
ลูกผสมระหว่าง *C. alismatifolia* และ *C. roscoeana* (ภาพ 13 C-F) มีก้านช่อดอกยาวกึ่งกลางระหว่างพ่อและแม่ ช่อดอกมีขนาดใหญ่ กลีบประดับมีลักษณะกลมและสั้นคล้ายแม่ (ภาพ 13 C) กลีบประดับด้านล่างสีเขียวปนกับสีชมพูอมส้มเล็กน้อยบริเวณปลายกลีบ กลีบประดับด้านบนสีชมพูอมส้ม (ภาพ 13 C-E) บางต้นเป็นสีส้มแดง (ภาพ 13 F) ดอกจริงมีขนาดกึ่งกลางระหว่างแม่และพ่อ บริเวณโคนของกลีบดอกจริงมีสีเหลือง ส่วนกลางและปลายกลีบเป็นสีม่วงอ่อน บางต้นเป็นสีม่วงเข้ม บริเวณเส้นกลางใบมีขีดสีแดง ใบยาวชูขึ้นด้านบนเหนือช่อดอก มีขนเล็กน้อยบริเวณส่วนท้องใบ แผ่นใบมีร่องเส้นใบตามความยาวของใบ โดยภาพรวมแล้ว ลูกผสมมีความคล้ายไปทางแม่มากขึ้น คือ มีก้านช่อดอกยาวขึ้น แต่จะได้ลักษณะของสีที่แปลกใหม่ออกมา แต่ลักษณะของก้านช่อดอกก็ยังยาวไม่มากพอ



ภาพ 13 ลักษณะของ *C. alismatifolia* (A), *C. roscoeana* (B) และลูกผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. roscoeana* (C-F)

ลักษณะของลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *C. parviflora* X *C. aurantiaca*

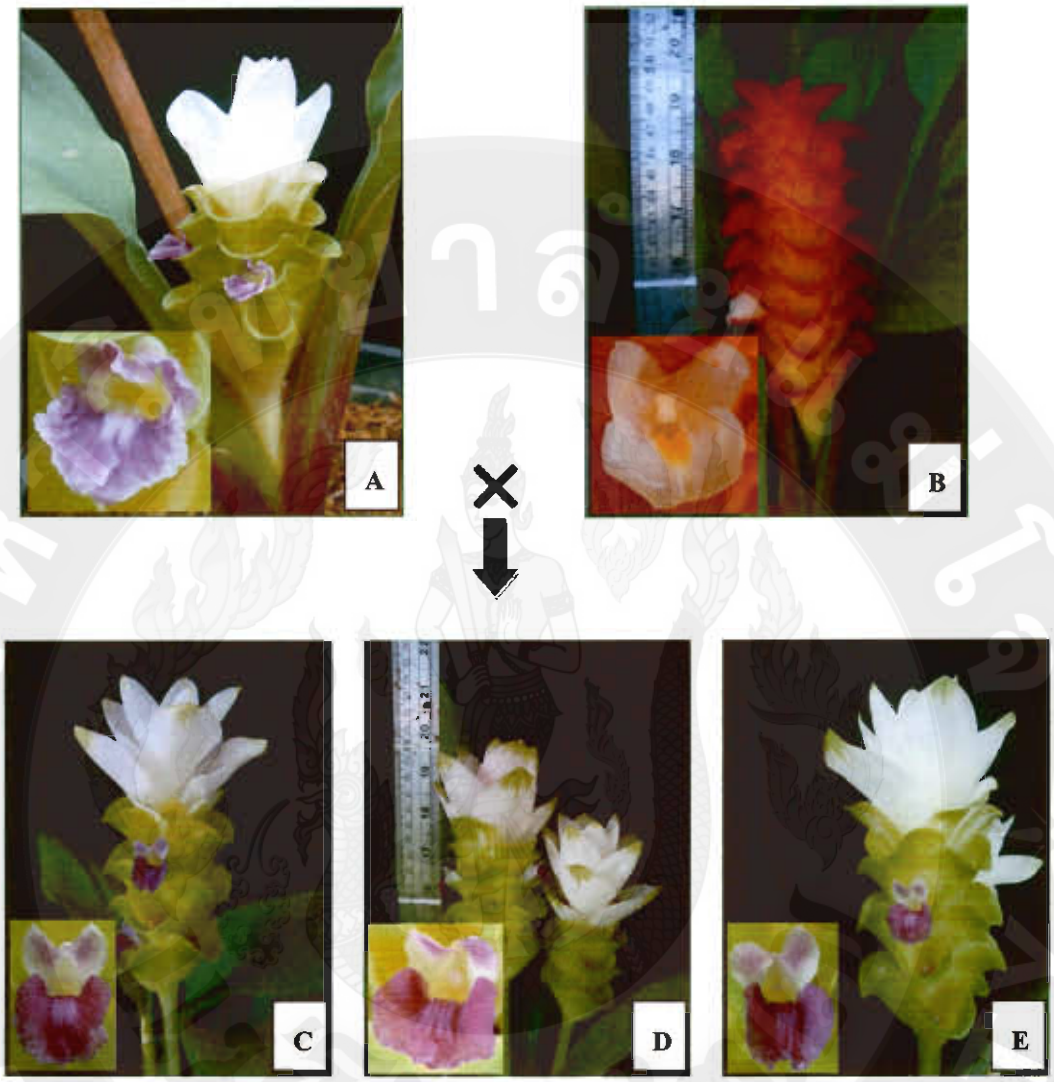
การผสมข้ามระหว่าง *C. parviflora* และ *C. aurantiaca* พบว่า ลูกผสมมีก้านช่อดอกค่อนข้างยาวกว่าแม่ กลีบประดับด้านบนสีชมพู (ภาพ 14 C) ซึ่งเป็นสีที่ได้จากการผสมระหว่างแม่และพ่อ ในบางต้นเป็นสีขาวเหมือนแม่ (ภาพ 14 D) กลีบประดับด้านล่างสีเขียว มีแต้มสีชมพูเล็กน้อย กลีบประดับหนาและแข็งกว่าแม่และพ่อ ช่อดอกมีขนาดเล็ก ดอกจริงมีลักษณะคล้ายดอกจริงของแม่ สีของดอกจริงเป็นสีม่วงอ่อนมีแต้มของสีเหลืองขีดเป็นเส้นเล็กน้อยบริเวณปากกลีบ ใบแผ่ออกด้านข้าง ใบหนาเล็กน้อย โดยรวมแล้วลูกผสมมีลักษณะที่คล้ายแม่มาก แต่ลักษณะของสีนั้นจะได้สีที่แปลกใหม่ออกมาในบางต้น



ภาพ 14 ลักษณะของ *C. parviflora* (A), *C. aurantiaca* (B) และลูกผสมระหว่าง *C. parviflora* X *C. aurantiaca* (C-D)

ลักษณะของลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *C. parviflora* X *C. roscoeana*

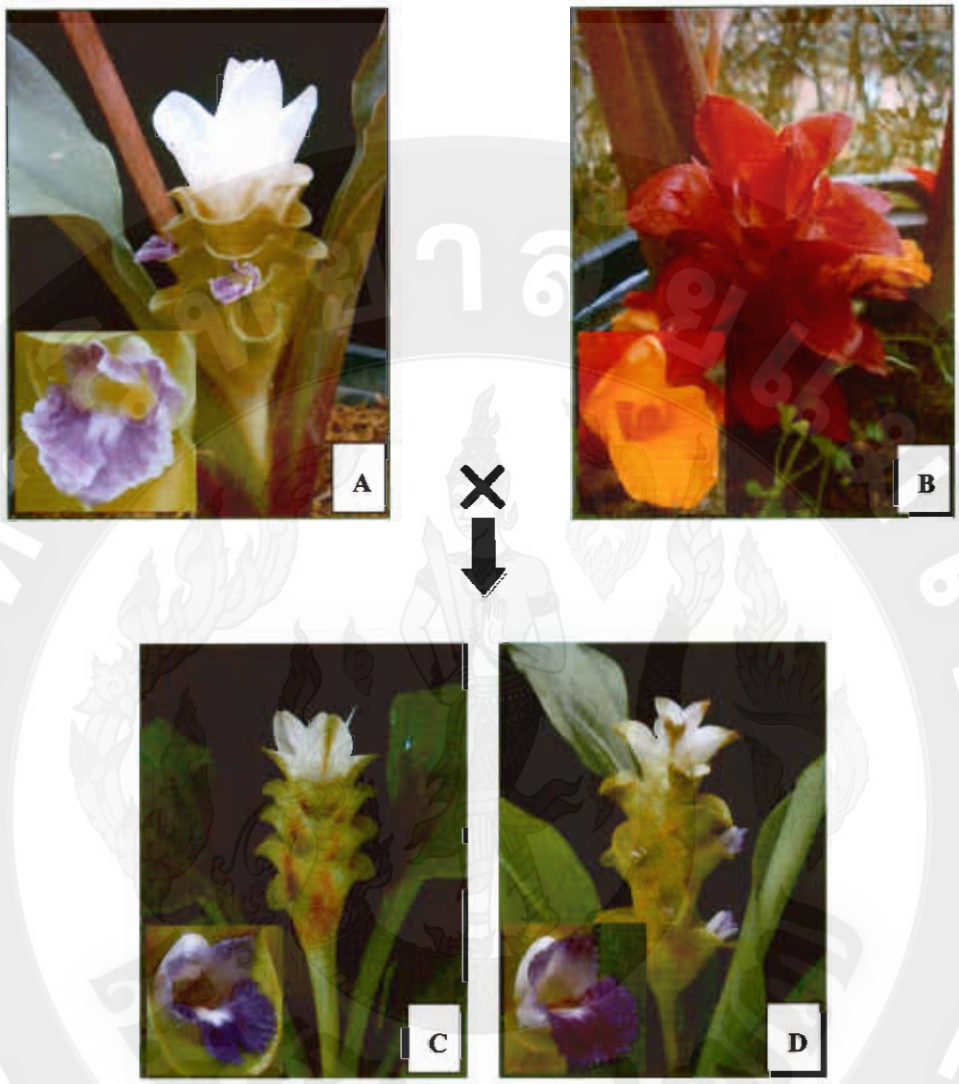
การผสมข้ามระหว่าง *C. parviflora* และ *C. roscoeana* พบว่า ลูกผสม (ภาพ 15 C-E) มีความยาวของก้านช่อดอกที่ยาวกว่าแม่ (ภาพ 15 A) และพ่อ (ภาพ 15 B) ช่อดอกมีขนาดใหญ่ ชูขึ้นเหนือทรงพุ่ม กลีบประดับใหญ่และกลม กลีบประดับด้านล่างสีเขียวอ่อนล้วน ไม่มีแต้มสีอื่น กลีบประดับด้านบนสีขาว ค่อนข้างกลม ดอกจริงเป็นสีขาว ปากสีม่วงเข้ม โคนของกลีบดอกด้านในเป็นสีเหลืองอ่อน บางต้นขีดเป็นเส้นออกมาบริเวณเส้นกลางปากกลีบ บางต้นไม่มี กลีบดอกด้านบนเป็นสีขาว แต้มด้วยสีม่วงอ่อน ดอกบานแผ่ออกมาด้านนอกเหมือนพ่อ ใบมีขนาดใหญ่และหนา แผ่ออกด้านข้าง บางต้นมีเส้นกลางใบสีแดง โดยรวมแล้ว ลูกผสมมีลักษณะที่ดีกว่าพ่อและแม่ แต่ลักษณะของช่อดอกจะคล้ายไปทางพ่อ ส่วนลักษณะของสีนั้นจะคล้ายไปทางแม่



ภาพ 15 ลักษณะของ *C. parviflora* (A), *C. roscoeana* (B) และลูกผสมระหว่าง *C. parviflora* X *C. roscoeana* (C-E)

ลักษณะของลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *C. parviflora* X *C. rubrobracteata*

ลูกผสมข้ามระหว่าง *C. parviflora* และ *C. rubrobracteata* (ภาพ 16 C-D) มีลักษณะคล้ายแม่ (ภาพ 16 A) กลีบประดับด้านบนสีขาว บานออกด้านนอก แต่บางต้นซ้อนกันอยู่แน่น ไม่บานออก กลีบประดับด้านล่างสีเขียว แต่มีลักษณะแต้มสีน้ำตาลแดงปนอยู่เฉพาะส่วนโคนของกลีบประดับด้านล่าง ดอกจริงสีม่วงอ่อน บางต้นเป็นสีม่วงเข้ม ปลายปากกลีบเป็นแฉก 2 แฉก บางต้นไม่เป็นแฉก แต่มีลักษณะหยักเป็นริ้ว กลางปากกลีบดอกเป็นแถบสีขาวจนถึงกลางปากกลีบ ช่อดอกชูขึ้นเหนือแผ่นใบเล็กน้อย แผ่นใบมีขนาดใหญ่และกว้าง มีร่องใบตามความยาวของเส้นใบคล้ายใบของพ่อ (ภาพ 16 B) ใบแผ่ออกด้านข้าง โดยรวมแล้วลูกผสมมีลักษณะคล้ายไปทางแม่มากกว่าพ่อ จะได้ลักษณะของพ่อมาเพียงเล็กน้อย คือลักษณะของสีที่แต้มกลีบประดับ และลักษณะของใบ



ภาพ 16 ลักษณะของ *C. parviflora* (A), *C. rubrobracteata* (B) และลูกผสมระหว่าง *C. parviflora* X *C. rubrobracteata* (C-D)

การตรวจสอบลูกผสมด้วยเทคนิค RAPD

การตรวจสอบความเป็นลูกผสมทั้งหมด 7 คู่ผสม โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่า การใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มทั้งหมด 70 ไพรเมอร์ มีจำนวน 1 ไพรเมอร์ คือ OPU 14 (5'-TGGGTCCCTC-3') (ภาพ 17) สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *C. alismatifolia*, *C. aurantiaca* และสามารถบ่งบอกความเป็นลูกผสมได้ โดยแถบของแม่ *C. alismatifolia* ที่ปรากฏนั้นอยู่สูงกว่าแถบของพ่อ *C. aurantiaca* และจากการตรวจสอบพบแถบของลูกผสมแสดงแถบดีเอ็นเอที่อยู่ในตำแหน่งเดียวกันกับทั้งแถบดีเอ็นเอของแม่และแถบดีเอ็นเอของพ่อ แต่ในคู่ผสมอื่นที่ทำการศึกษา ยังไม่พบไพรเมอร์ที่ใช้บ่งบอกลูกผสมได้

ภาพ 17 แถบดีเอ็นเอจาก RAPD-PCR ไพรเมอร์ OPU 14 (5'-TGGGTCCCTC-3')

▼ = แถบดีเอ็นเอของแม่

▲ = แถบดีเอ็นเอของพ่อ

การทดลองที่ 4 ศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมเพื่อแก้ไขความเป็นหมันและการตรวจสอบ

การศึกษาการแก้ไขความเป็นหมันโดยการเพิ่มปริมาณโครโมโซม โดยการหยดสารโคลชิซิน ความเข้มข้น 800 มิลลิกรัมต่อลิตร บริเวณส่วนที่มีการพัฒนาของยอดของปทุมมาลูกผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. roscoeana* พบว่า เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่อยู่รอดจากการให้สารโคลชิซินคือ 50 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนยอดที่ได้รับสารโคลชิซินทั้งหมด 60 ยอด โดยจากการวัดระดับของโครโมโซมด้วย Flow cytometer สามารถแยกได้เป็นต้นที่ไม่มีการเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซม (2n = 2x) จำนวน 19 ต้น (ภาพ 18 A) ซึ่งใบของพืช 2n = 2x จะมีสีเขียวอ่อนลักษณะใบเรียวยาว (ภาพ 19 A) ต้นเตตราพลอยด์ (2n = 4x) จำนวน 8 ต้น (ภาพ 18 B) ลักษณะของพืชจะมีใบสีเขียวเข้ม ใบหนาและสั้นกว่าต้นดิพลอยด์ (ภาพ 19 B) และต้นออคตาพลอยด์ (2n = 8x) จำนวน 3 ต้น (ภาพ 17 C) ซึ่งจะมีลักษณะของใบหนามาก และใบมีสีเขียวเข้ม ใบและลำต้นสั้น ใบม้วนไม่คลี่ออก การเจริญเติบโตค่อนข้างช้า (ภาพ 19 C)

การศึกษาเปรียบเทียบจำนวนเฉลี่ยของปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร ของปทุมมาลูกผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. roscoeana* พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตาราง 5) โดย ต้น 2n = 2x มีจำนวนปากใบต่อพื้นที่เฉลี่ยสูงสุด 58.60 ปากใบต่อตารางมิลลิเมตร (ภาพ 20 A) รองลงมาคือต้น 2n = 4x มีจำนวนปากใบเฉลี่ย 40.60 ปากใบต่อตารางมิลลิเมตร (ภาพ 20 B) และต้น 2n = 8x มีปากใบเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 28.30 ปากใบต่อตารางมิลลิเมตร (ภาพ 20 C)

เมื่อศึกษาจำนวนคลอโรพลาสในเซลล์คุมปากใบของปทุมมาลูกผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. roscoeana* พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตาราง 5) โดย พืชที่มีคลอโรพลาสต่อปากใบเฉลี่ยมากที่สุดคือต้น 2n = 8x มี 72.20 คลอโรพลาสต่อปากใบ (ภาพ 21 C) รองลงมาคือ ต้น 2n = 4x มีค่าเฉลี่ย 45.00 คลอโรพลาสต่อปากใบ (ภาพ 21 B) และต้น 2n = 2x มีคลอโรพลาสเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 24.60 คลอโรพลาสต่อปากใบ (ภาพ 21 A)

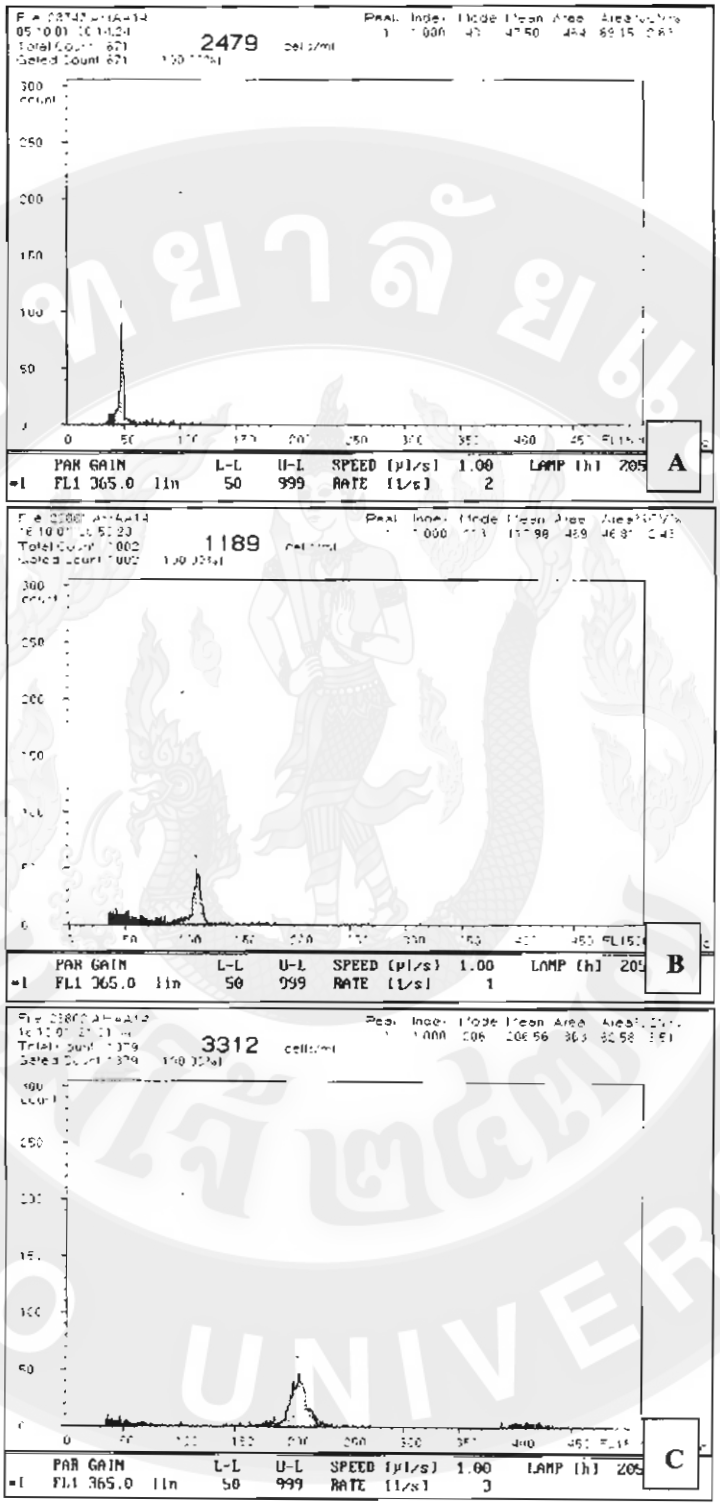
การศึกษาความสามารถในการงอกหลอดเกสรของต้นที่มีการเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซมของปทุมมาลูกผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. roscoeana* จากการเพาะเลี้ยงละอองเกสรบนอาหารสังเคราะห์ พบว่า ละอองเกสรของปทุมมาที่มีการเพิ่มของระดับชุดโครโมโซมสามารถงอกหลอดได้ โดยพืช 2n = 4x มีความสามารถในการงอกหลอดเกสร 30.23 เปอร์เซ็นต์ และพืช 2n = 8x มีความสามารถในการงอกหลอดเกสร 17.98 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 6) และเมื่อทำการผสมเกสรเพื่อศึกษาความสามารถในการผสมเกสร พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย คู่ผสมระหว่าง (2n = 2x ; *C. alismatifolia*) X (2n = 4x) และ (2n = 4x) X (2n = 2x ; *C. alismatifolia*) มีอัตราการผสมติดมากที่สุดคือ 77.87 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนผลเฉลี่ยของทั้ง 2 คู่ผสม เท่ากับ 2.33 ผล

รองลงมาคือคู่ผสมระหว่าง (2n = 2x ; *C. alismatifolia*) X (2n = 8x) มีจำนวนผลเฉลี่ยเท่ากับ 1.33 ผล และมีอัตราการผสมติด 44.44 เปอร์เซ็นต์ และคู่ผสมระหว่าง (2n = 8x) X (2n = 2x ; *C. alismatifolia*) มีอัตราการผสมติดน้อยที่สุดเท่ากับ 11.11 เปอร์เซ็นต์ โดยจำนวนผลเฉลี่ยเท่ากับ 0.33 ผล (ตาราง 6)

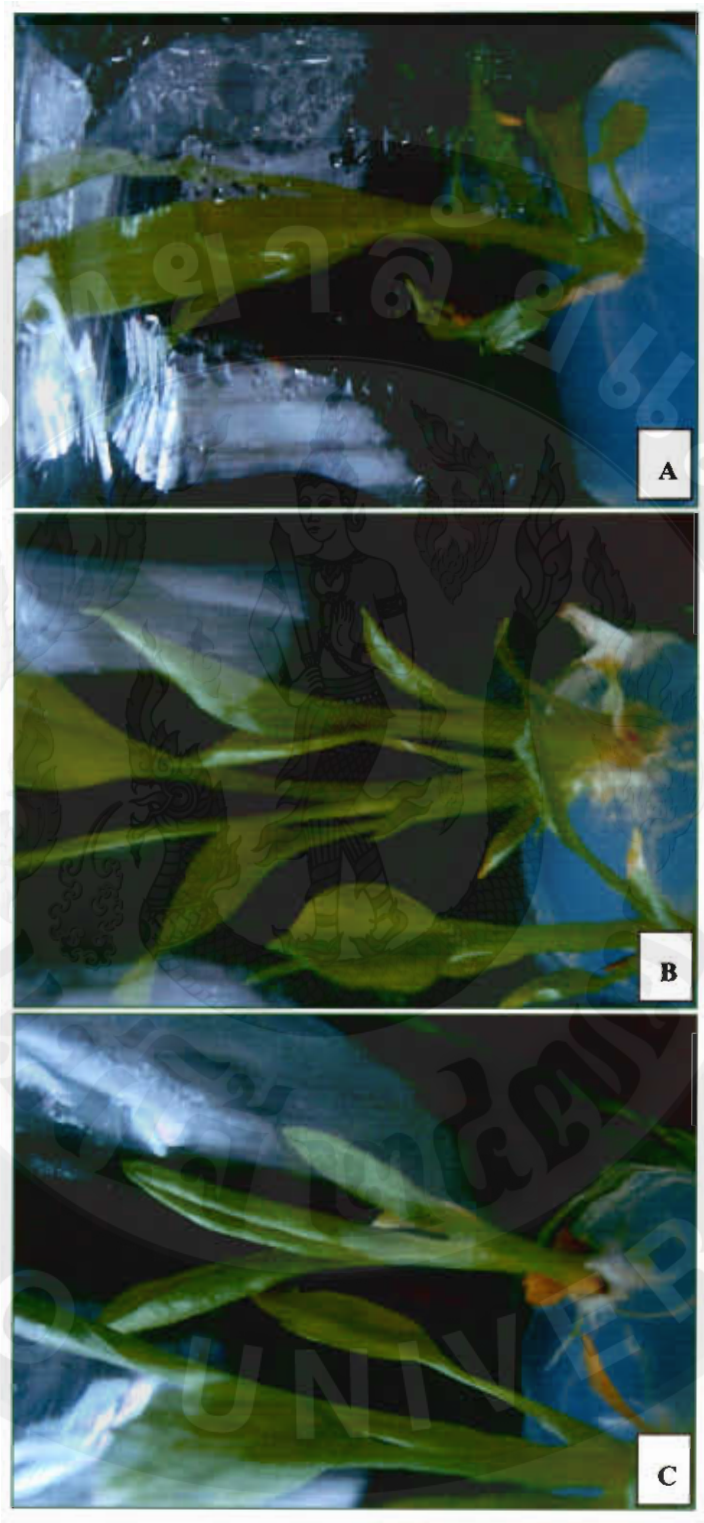
ตาราง 5 จำนวนการเกิดต้น จำนวนปากใบเฉลี่ยต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร จำนวนคลอโรพลาสเฉลี่ยต่อปากใบ และความสามารถในการงอกหลอดเกสรของปทุมมาลูกผสมที่มีการเพิ่มขึ้นของระดับโครโมโซม

ระดับโครโมโซม	จำนวนการเกิดต้น (ต้น)	จำนวนปากใบเฉลี่ยต่อพื้นที่ 1 mm^2 (ปากใบ)	จำนวนคลอโรพลาสเฉลี่ยต่อปากใบ (คลอโรพลาส)	ความสามารถในการงอกหลอดเกสร (%)
2n = 2x	19	58.60^{a}	24.60^{c}	0
2n = 4x	8	40.60^{b}	45.00^{b}	30.23
2n = 8x	3	28.30^{c}	72.20^{a}	17.98
Sig	-	**	**	-
C.V. (%)	-	**1.75**	**2.07**	-

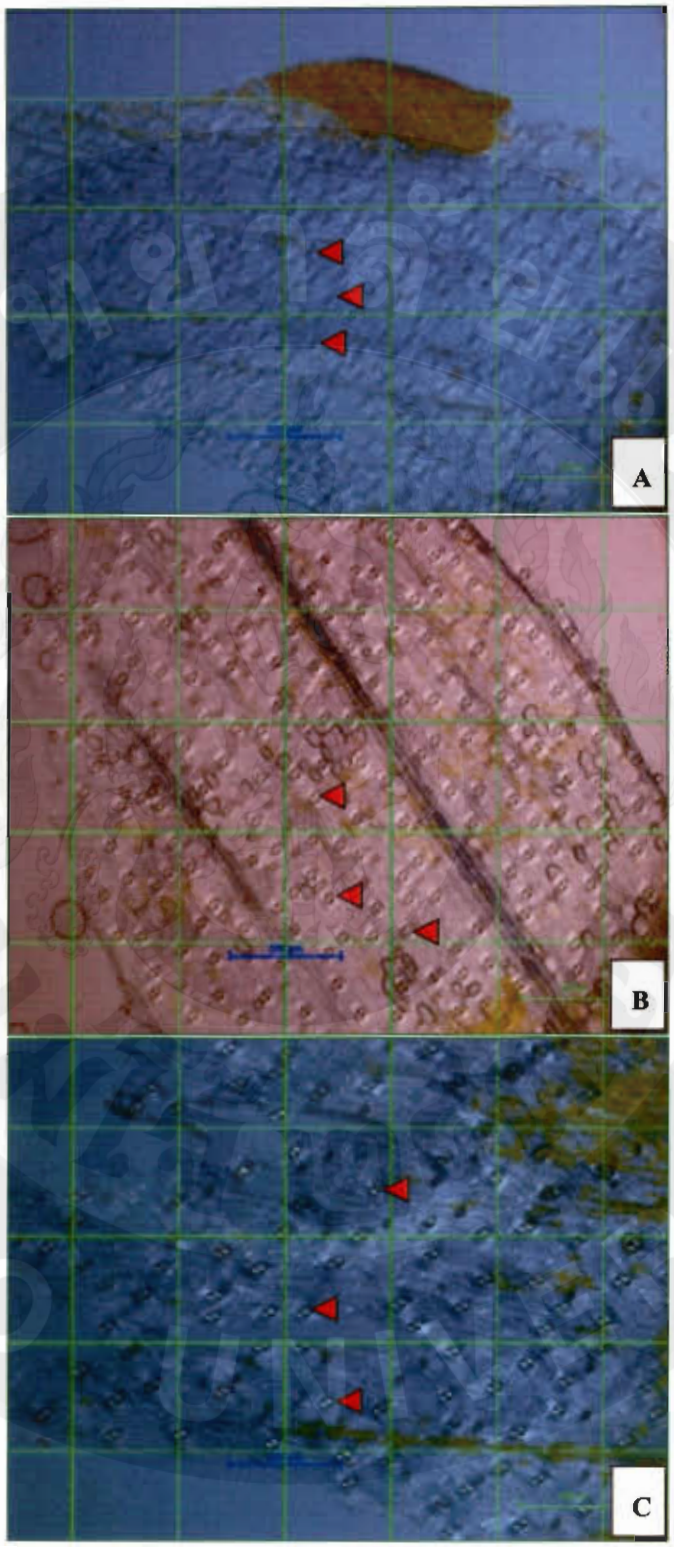
หมายเหตุ ** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %
ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ตามการเปรียบเทียบแบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)



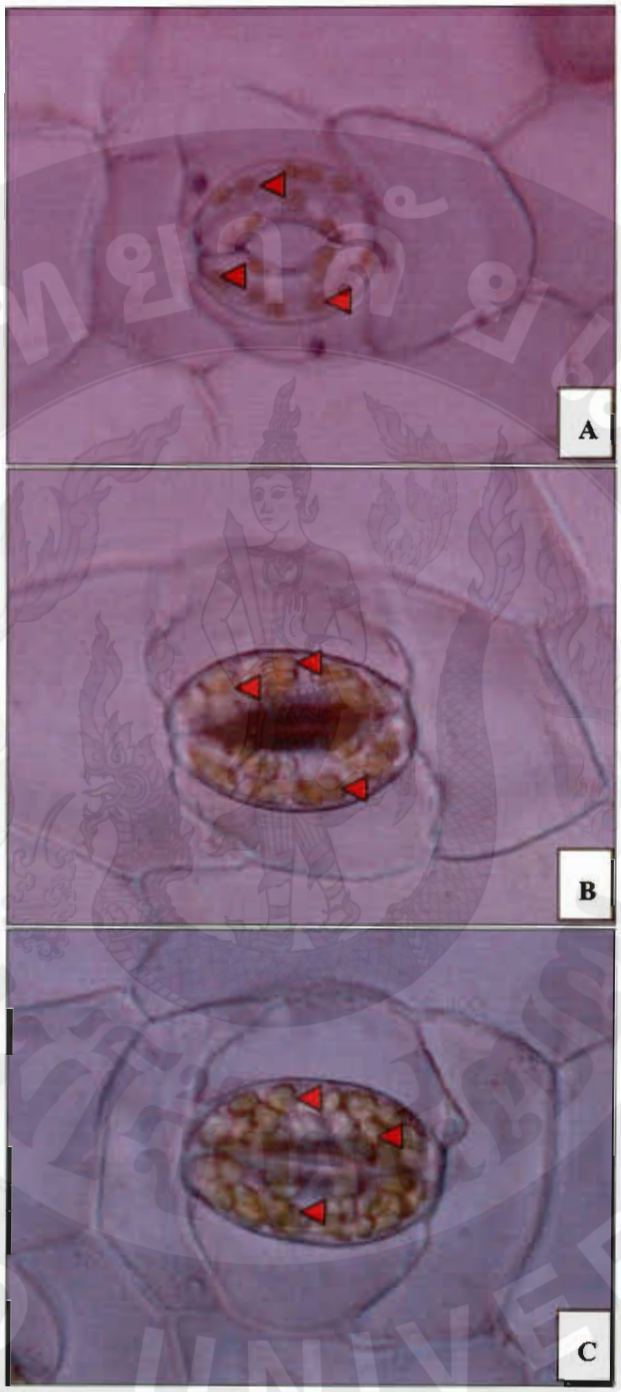
ภาพ 18 ปริมาณดีเอ็นเอจากการวัดด้วยเครื่อง Flow cytometer ของปทุมมาลูกผสมที่มีระดับชุดโครโมโซม 2n = 2x (A), 2n = 4x (B), และ 2n = 8x (C)



ภาพ 19 ลักษณะต้นปทุมมาลูกผสมที่มีระดับชุดโครโมโซม 2n = 2x (A), 2n = 4x (B), และ 2n = 8x (**C**)



ภาพ 20 จำนวนปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร ของปทุมมาลูกผสมที่มีระดับชุดโครโมโซม 2n = 2x (A), 2n = 4x (B), และ 2n = 8x (C)



ภาพ 21 จำนวนคลอโรพลาสต่อปากใบ ของปทุมมาลูกผสมที่มีระดับชุดโครโมโซม 2n = 2x (A), 2n = 4x (B), และ 2n = 8x (C)

ตาราง 6 จำนวนผลเฉลี่ยที่ผสมติด และเปอร์เซ็นต์การผสมติดของต้นพืชที่ได้รับการเพิ่มปริมาณโครโมโซมกับต้นพืชปกติ

คู่ผสม	จำนวนดอกที่ผสม (ดอก)	จำนวนผลเฉลี่ยที่ผสมติด (ผล)	เปอร์เซ็นต์การผสมติด (%)
(2n = 2x) X (2n = 4x)	9	2.33	77.78[a]
(2n = 2x) X (2n = 8x)	9	1.33	44.44[ab]
(2n = 4x) X (2n = 2x)	9	2.33	77.78[a]
(2n = 8x) X (2n = 2x)	9	0.33	11.11[b]
Sig	-	-	**
C.V. (%)	-	-	**36.46**

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %
ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ตามการเปรียบเทียบแบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาการผสมเกสรของปทุมมาและกระเจียว

การศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสรของพืชสกุล *Curcuma* จำนวน 8 ชนิด คือ *C. alismatifolia*, *C. parviflora*, *C. rhabdota*, *C. aurantiaca*, *C. angustifolia*, *C. cordata*, *C. roscoeana* และ*C. rubrobracteata* โดยการย้อมด้วยสี Acetone carmine เป็นเวลา 5 นาที พบว่า Curcuma ทั้ง 8 ชนิด มีความสามารถในการติดสีที่ต่างกันออกไป ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติแล้ว พบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยชนิดที่มีความมีชีวิตของละอองเกสรมากที่สุด คือ *C. parviflora*, *C. alismatifolia* และ *C. angustifolia* รองลงมาคือ *C. rhabdota*, *C. aurantiaca*, *C. cordata*, *C. rubrobracteata* และ *C. roscoeana*

จากการศึกษาความสามารถในการงอกหลอดเกสรในอาหารเลี้ยงละอองเกสรที่ประกอบด้วยน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที พบว่า *C. parviflora* มีความสามารถในการงอกหลอดเกสรมากที่สุด รองลงมาคือ *C. alismatifolia* และชนิดที่มีอัตราการงอกหลอดเกสรต่ำสุด คือ *C. rubrobracteata* และ *C. roscoeana*

จากการศึกษาความมีชีวิตและความสามารถในการงอกหลอดละอองเกสร ทั้ง 8 ชนิด พบว่า *C. alismatifolia* และ *C. angustifolia* มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูง แต่มีเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการงอกหลอดต่ำกว่า แต่ใน Curcuma ชนิดอื่นๆ มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการงอกหลอดละอองเกสรค่อนข้างสูง ซึ่งสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แต่มีเพียงชนิดเดียว คือ *C. roscoeana* ที่ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในการทดลองของอรอนงค์ (2535) พบว่า การงอกของละอองเกสรที่เก็บไว้ของ Curcuma ลดลงมาจาก 0-35 เปอร์เซ็นต์ เป็น 0-2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ซึ่งเติมซูโครสความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ สามารถเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการผสมเกสรได้ หากทราบว่าพืชชนิดไหนที่มีความมีชีวิต และมีอัตราการงอกหลอดที่ดี สามารถนำไปใช้เป็นต้นพ่อที่ดีได้ เนื่องจากมีการงอกหลอดที่ดี เมื่อทำการผสมเกสร จะได้ลูกผสมจากการผสมข้ามได้มากขึ้น เนื่องจากความสามารถในการงอกหลอดของละอองเกสรสูง นอกจากนี้ยังสามารถคัดเลือกได้เบื้องต้นว่า ต้นไหนสามารถผสมเกสรได้ดี ต้นไหนไม่สามารถผสมได้ และควรใช้แนวทางใดในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

เมื่อศึกษาความสามารถในการงอกของละอองเกสรบนยอดเกสรเพศเมียและการงอกหลอดเกสรลงในก้านชูเกสรเพศเมียนั้น พบว่า ละอองเกสรของพืชในกลุ่ม Eucurcuma สามารถงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมียของพืชในกลุ่ม Paracurcuma โดยเมื่อใช้ยอดเกสรเพศเมียของ *C. alismatifolia* และ *C. parviflora* เป็นต้นแม่ ละอองเกสรของ *C. angustifolia*, *C. aurantiaca*, *C. cordata*, *C. roscoeana* และ *C. rubrobracteata* สามารถงอกหลอดเกสรบนยอดเกสรเพศเมียของ *C. alismatifolia* และ *C. parviflora* ได้ และหลอดเกสรสามารถงอกผ่านก้านชูเกสรเพศเมียได้แบบปกติ แต่เมื่อใช้พืชที่อยู่ในกลุ่ม Eucurcuma เป็นต้นแม่ ละอองเกสรของพืชที่อยู่ในกลุ่มปทุมมาบางชนิดไม่สามารถงอกหลอดเกสรบนยอดเกสรเพสเมียของพืชกลุ่มกระเจียวได้ เช่น คู่ผสมระหว่าง *C. angustifolia* X *C. alismatifolia*, *C. rubrobracteata* X *C. alismatifolia* และ *C. rubrobracteata* X *C. parviflora* ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของหยกทิพย์ (2550) ที่ได้ทดสอบการงอกหลอดเกสรของเชียงใหม่เรด (*C. alismatifolia*) กับ Eucurcuma โดยใช้ Eucurcuma เป็นแม่ พบว่าละอองเกสรไม่สามารถงอกหลอดบนยอดเกสรตัวเมีย (stigma surface)ของว่านนางดำ (*C. angustifolia*) ว่านมหาจักรพรรดิ (*C. emperor*) ว่านงูเห่า (*C. rubrobracteata*) และบัวชั้น (*C. cordata*)ได้ แม้ว่าเชียงใหม่เรด *C. alismatifolia*) มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต เปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสร และความสามารถในการงอกหลอดของละอองเกสรดี ส่วนในคู่ผสมระหว่าง *C. angustifolia* X *C. parviflora* ละอองเกสรสามารถงอกบนยอดเกสรเพศเมียได้ แต่หลอดเกสรไม่สามารถงอกหลอดลงไปในก้านชูเกสรได้ ซึ่งสาเหตุของการที่ละอองเกสรไม่อาจงอกได้นี้อาจเกิดเนื่องจากอุปสรรคก่อนการผสม (Pre-fertilization barriers) โดยอาจเกิดได้หลายสาเหตุ เช่น บริเวณ stigma surface มีสารพิษที่ยับยั้งการงอกของละอองเกสร เกสรสามารถงอกได้แต่ไม่สามารถงอกลงไปถึงไข่ได้ หรืองอกผิดทิศทาง (เฉลิมศรี, 2549) เมื่อใช้ยอดเกสรเพศเมียของ *C. aurantiaca*, *C. cordata* และ *C. roscoeana* ละอองเกสรของ *C. alismatifolia* และ *C. parviflora* สามารถงอกบนยอดเกสรเพศเมียได้และมีการงอกหลอดลงไปในก้านชูเกสรเพศเมียได้ปกติ

การผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่มของปทุมมาระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. angustifolia* มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดมากที่สุดคือ 26.67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือคู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. cordata* มีเปอร์เซ็นต์การผสมติด 5.00 ส่วนในคู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. rubrobracteata*, *C. parviflora* X *C. angustifolia*, *C. parviflora* X *C. cordata*, *C. angustifolia* X *C. alismatifolia*, *C. angustifolia* X *C. parviflora*, *C. aurantiaca* X *C. alismatifolia*, *C. cordata* X *C. parviflora*, *C. roscoeana* X *C. alismatifolia*, *C. roscoeana* X *C. parviflora*, *C. rubrobracteata* X *C. alismatifolia* และ *C. rubrobracteata* X *C. parviflora* นั้นไม่มีการผสมติด จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลนั้นจะอยู่ในช่วง 0.67 - 1.33 เมล็ดต่อผลในคู่ผสมที่มีการผสมติด การที่มีจำนวนของโครโมโซมที่ต่างกันทำให้มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดต่ำ ซึ่งในการรายงานของ Leong-Skornickova *et al.* (2007) ได้กล่าวไว้ว่าจำนวน

โครโมโซมของ *C. angustifolia* 2n=42, *C. aurantiaca* 2n=42, *C. roscoeana* 2n=42, *C. alismatifolia* 2n=32 และ *C. parviflora* 2n=28, 34 และ 36 จะเห็นว่าพืชทั้งสองกลุ่มมีจำนวนโครโมโซมที่ต่างกันค่อนข้างมาก ซึ่งอาจเกิดการไม่สามารถเข้าคู่กันได้ ทำให้ไม่สามารถผสมติดได้ หรือมีอัตราการติดที่ต่ำมาก

เปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์จากการผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่มนั้น พบว่า คู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. roscoeana*, *C. parviflora* X *C. aurantiaca* และ *C. alismatifolia* X *C. angustifolia* มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์มากที่สุด คือ 66.67, 66.67 และ 60.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าในบางเมล็ดมีลักษณะฝ่อ ซึ่งมีการพัฒนาเฉพาะเปลือกหุ้มเมล็ด อาจเกิดจากรังไข่ได้รับการกระตุ้นแต่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ เนื่องจากความห่างไกลกันทางพันธุกรรม และอาจเป็นเพราะพืชจะมีระบบการป้องกันไม่ให้เกิดการปฏิสนธิ ถึงแม้ว่าละอองเกสรตัวผู้จะงอกผ่านเกสรตัวเมียลงไปก็ตาม แต่จะไม่มีการปฏิสนธิเกิดขึ้น (พีรเดช, 2537) หรืออาจเกิดจากไซโกตไม่สามารถพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอได้ เอ็มบริโอหยุดการเจริญ ซึ่งอาจจะเกิดจากพันธุกรรมของเอ็มบริโอ เช่น การมียีนที่ผลิตสารพิษอยู่ (lethal gene) การเป็นพิษของเอ็นโดสเปิร์มหรือเอ็มบริโอขาดสารที่จำเป็นต่อการเจริญ (เฉลิมศรี, 2549)

การทดลองที่ 2 ศึกษาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (embryo rescue)

การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของลูกผสมข้ามชนิดจำนวน 7 คู่ผสม คือ คู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. angustifolia*, C. *alismatifolia* X *C. aurantiaca*, *C. alismatifolia* X *C. cordata*, *C. alismatifolia* X *C. roscoeana*, *C. parviflora* X *C. aurantiaca*, *C. parviflora* X *C. roscoeana* และ *C. parviflora* X *C. rubrobracteata* มีเปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่งอกจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในทุกคู่ผสมเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่อยู่รอดจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอนั้นอยู่ที่ระดับ 83.33 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนวันที่เอ็มบริโอเริ่มมีการงอกคือ 7 วัน ในทุกคู่ผสม จะเห็นได้ว่าเมล็ดที่ได้รับการปฏิสนธิแล้ว เมื่อนำเอ็มบริโอมาเพาะเลี้ยงสามารถที่จะพัฒนาเป็นต้นได้มาก ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Takuo and Koji (2004) ได้รายงานเกี่ยวกับการเลี้ยงเอ็มบริโอของลิลลี่ พบว่า เมล็ดที่มีอายุมากจะมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงหลังจากนำมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ในปทุมมานั้นได้มีการรายงานไว้ว่า หากต้องการช่วยชีวิตเอ็มบริโอควรเลือกผลที่มีอายุ 28 วันมาทำการเพาะเลี้ยงจะทำให้ประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี (หยกทิพย์, 2550) ลักษณะการพัฒนาเอ็มบริโอของปทุมมาหลังการเพาะเลี้ยงจะเริ่มเกิดรากสีขาวและมีขนเล็กๆ บริเวณรากก่อน หลังจากนั้นจะเริ่มเกิดเป็นยอดสีเขียวอ่อน และเริ่มเกิดเป็นใบขึ้นมา หลังจากนั้นทำการย้ายไปยังอาหารใหม่ ต้นกล้าจะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมนภายในเดือน 1-2 เดือน หลังจากการย้ายอาหาร หลังจากนั้นสามารถนำปลูกในสภาพนอกห้องทดลองได้ จะเห็นได้ว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอที่พัฒนาโดยหยกทิพย์ (2550) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากเอ็มบริโอมีอัตราการรอดชีวิตสูง และต้นกล้ามีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและสมบูรณ์ ถึงแม้ว่าอัตราการติดเมล็ดจะมีไม่มาก แต่วิธีการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอที่มีประสิทธิภาพ ทำให้ประสบความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์และได้ต้นลูกผสมที่สมบูรณ์ และสามารถสร้างดอกได้ภายในระยะเวลาไม่นาน ซึ่งสามารถแก้ไขปัญหาการพักตัวที่ยาวนานของเมล็ดได้

การทดลองที่ 3 ศึกษาการตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการใช้เทคนิค RAPD

การศึกษาลักษณะลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูกผสม

ลูกผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่ม Paracurcuma และกลุ่ม Eucurcuma ทั้งหมดที่ทำการศึกษาลักษณะที่แสดงออกนั้น มีการแสดงอาการเป็นหมัน โดยพบการเป็นหมันที่ระดับต่างๆ คือ ระดับที่ไม่มีการสร้างอับละอองเกสร ระดับที่มีการสร้างอับละอองเกสรแต่ไม่สร้างละอองเกสร และระดับที่มีการสร้างละอองเกสร แต่ละอองเกสรไม่มีชีวิตและไม่สามารถงอกหลอดได้ ในลูกผสมข้ามชนิดนั้น พบว่าส่วนใหญ่จะทนต่อโรค กล่าวคือ ไม่แสดงอาการของโรคต่างๆ ซึ่งเป็นลักษณะที่ดีจากการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมข้ามชนิด สอดคล้องกับการทดลองของ Jack *et al.* (1996) ซึ่งได้ผสมข้ามระหว่าง *Sinapis alba* X *Brassica napus* พบว่าลูกผสมที่ได้มีน้ำมันมาก และมี glucosinolate ที่มีคุณภาพ และลักษณะที่ทนต่อโรคและแมลง ซึ่งโดยภาพรวมแล้ว ลูกผสมที่ได้นั้น จะมีลักษณะที่เป็นกึ่งกลางระหว่างแม่และพ่อ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการผสมข้ามชนิดของพืชชนิดอื่นๆที่มีการรายงาน เช่น Delphinium (Kazushige and Kiyoshi, 1997), Alstromeria (Buitendijk *et al*, 1995) และ Lily (Niimi *et al*, 1996) เป็นต้น ถึงแม้ว่าในบางคู่ผสมจะมีลักษณะที่คล้ายไปทางต้นแม่มากขึ้น แต่ก็ไม่มากนักทำให้ต้องมีการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป เพื่อให้ได้ลักษณะที่ดีเพิ่มขึ้น ซึ่งแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปนั้น อาจจำต้องมีการผสมกลับไปหาต้นแม่ เพื่อให้ได้ลักษณะก้านช่อที่ยาวเพิ่มขึ้น เพื่อประโยชน์ในทางการค้าเพิ่มขึ้น

การตรวจสอบลูกผสมด้วยเทคนิค RAPD

การตรวจสอบความเป็นลูกผสมโดยใช้เทคนิค RAPD ซึ่งทำการตรวจสอบในคู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. aurantiaca* และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มทั้งหมด 70 ไพรเมอร์ พบว่า มีจำนวน 1 ไพรเมอร์ คือ OPU 14 (5'-TGGGTCCCTC-3') สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นแม่และต้นพ่อได้ และสามารถบ่งบอกความเป็นลูกผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. aurantiaca* ได้ โดยที่แถบของพ่อและแถบของแม่ที่แสดงออกนั้น อยู่ในตำแหน่งที่ต่างกัน และแถบของลูกผสมมีการแสดงออกทั้งสองแถบที่ตำแหน่งเดียวกับแถบของแม่และแถบของพ่อ จึงสามารถแยกความแตกต่างของพ่อและแม่ได้ และยังสามารถตรวจสอบความเป็นลูกผสมได้ โดยสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบลูกผสมในคู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. aurantiaca* ได้ ซึ่งใน

รายงานที่ผ่านมา ได้มีการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการตรวจสอบลูกผสมในหลายๆพืช ได้แก่ การใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของ *Phalaenopsis* และนอกจากนี้ ยังสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของลูกผสมชั่วที่ 1 ซึ่งแสดงให้เห็นแถบดีเอ็นเอที่มาจากของพ่อและแม่อย่างละครึ่ง (Chen *et al*, 2001) และในการรายงานของ Tanaka and Taniguchi (2002) ได้ใช้เทคนิค RAPD ในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *Camellia sinensis* และลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้จากการผสมแบบสลับ (reciprocal cross) ระหว่างสายพันธุ์ Sayamakaori และ Kana-CK17 โดยใช้ไพรเมอร์ OPU06 ซึ่งแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างพ่อ แม่ และลูกผสม

การทดลองที่ 4 ศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมเพื่อแก้ไขความเป็นหมันและการตรวจสอบ

การศึกษาการแก้ไขความเป็นหมันโดยการเพิ่มปริมาณโครโมโซม โดยการหยดสารโคลชิซิน ความเข้มข้น 800 มิลลิกรัมต่อลิตร บริเวณส่วนที่มีการพัฒนาของยอดของปทุมมาลูกผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. roscoeana* พบว่า เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่อยู่รอดจากการให้สารโคลชิซินคือ 50 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนยอดที่ได้รับสารโคลชิซินทั้งหมด 60 ยอด โดยจากการวัดระดับของโครโมโซมด้วย Flow cytometer สามารถแยกได้เป็นต้นที่ไม่มีการเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซม (2n = 2x) ซึ่งใบจะมีสีเขียวอ่อนลักษณะใบเรียวยาว ต้นเตตราพลอยด์ (2n = 4x) มีใบสีเขียวเข้ม ใบหนาและสั้นกว่าต้นดิพลอยด์ และต้นออคตาพลอยด์ (2n = 8x) มีใบหนามาก และใบมีสีเขียวเข้ม ใบและลำต้นสั้น ใบม้วนไม่คลี่ออก การเจริญเติบโตค่อนข้างช้าซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของดวงจันทร์ (2549) ที่พบว่าต้นปทุมมาลูกผสมออคตาพลอยด์และเตตราพลอยด์ มีความหนาของใบ และความยาวเซลล์คุมปากใบมากกว่าต้นดิพลอยด์ แต่มีความสูงของต้นและจำนวนปากใบต่อพื้นที่น้อยกว่าต้นดิพลอยด์

การศึกษาเปรียบเทียบจำนวนเฉลี่ยของปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร พบว่า พืช 2n = 2x มีจำนวนปากใบต่อพื้นที่มากที่สุด รองลงมาคือต้น 2n = 4x และ 4n = 8x ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกบการทดลองของวิไลลักษณ์ และ สุขไผท (2551) ซึ่งได้ศึกษาการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้ดินหมูกลิ้ง (*Eulophia andamanensis* Reichb.f.) และพบว่าพืชที่เป็นเตตราพลอยด์มีจำนวนปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตรลดลงเมื่อเทียบกับต้นดิพลอยด์ และเมื่อศึกษาจำนวนคลอโรพลาสต่อปากใบ พบว่า พืชที่มีคลอโรพลาสต่อปากใบเฉลี่ยมากที่สุดคือต้น 2n = 8x รองลงมาคือต้น 2n = 4x และต้น 2n = 2x ตามลำดับ ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหล่านี้แตกต่างไปจากต้นที่เป็น ดิพลอยด์ ซึ่งลักษณะนี้สอดคล้องกับงานทดลองในพืชอื่นๆ ได้แก่ *Artemisia* (De Jesus-Gonzalez and Weathers, 2003), *Dioscorea* (Heping *et al*, 2008), *Lagerstroemia* (Ye *et al*, 2010) และในพืชอื่นๆ เมื่อศึกษาเปรียบเทียบระหว่างจำนวนของของปากใบต่อพื้นที่และจำนวนของคลอโรพลาสต่อปากใบแล้วพบว่า จำนวนปากใบต่อพื้นที่จะแปรผกผันกับจำนวนคลอโรพลาสต่อปากใบ คือ พืชที่มีระดับของชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้น จะมีจำนวนปากใบต่อพื้นที่ลดลง แต่จำนวนคลอโรพลาสต่อปากใบจะเพิ่มขึ้น (ภาพผนวก 3) ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถใช้เป็นดัชนีในการคัดเลือกปทุมมาที่เป็นพืช 2n = 2x, 2n = 4x และ 2n =8x ได้ เนื่องจากมีการวัดระดับของดีเอ็นเอของพืชแต่ละชนิดด้วยเครื่อง Flow cytometer ร่วมกับได้เปรียบเทียบกับการนับจำนวนปากใบต่อพื้นที่ และจำนวนคลอโรพลาสต่อปากใบแล้ว

ความสามารถในการผสมเกสร พบว่า ปทุมมาลูกผสมที่ได้รับการเพิ่มจำนวนโครโมโซมมีการสร้างละอองเกสรขึ้นมา เมื่อเปรียบเทียบกับลูกผสมที่ไม่มีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมซึ่งไม่มีการสร้างละอองเกสร และเมื่อทำการศึกษาความสามารถในการงอกหลอดเกสรของ

ต้นที่มีการเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซม โดยการเพาะเลี้ยงละอองเกสรบนอาหารสังเคราะห์ ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ละอองเกสรของปทุมมาลูกผสมที่มีการเพิ่มของระดับชุดโครโมโซมสามารถงอกหลอดได้ปกติ แต่ขนาดของละอองเกสรจะมีขนาดใหญ่กว่าพืช 2n = 2x เล็กน้อย และเมื่อทำการผสมเกสร พบว่า คู่ผสมระหว่าง (2n = 2x) X (2n = 4x) และ (2n = 4x) X (2n = 2x) มีอัตราการผสมติดมากที่สุด รองลงมาคือคู่ผสมระหว่าง (2n = 2x) X (2n = 8x) และคู่ผสมระหว่าง (2n = 8x) X (2n = 2x) มีอัตราการผสมติดน้อยที่สุด ซึ่งการที่มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดต่ำนั้น อาจเป็นสาเหตุจากพืชจะมีระบบการป้องกันไม่ให้เกิดการปฏิสนธิ ถึงแม้ว่าละอองเกสรตัวผู้จะงอกผ่านเกสรตัวเมียลงไปก็ตาม แต่จะไม่มีการปฏิสนธิเกิดขึ้น (พีรเดช, 2537) หรืออาจเกิดจากอุณหภูมิขณะทำการผสมเกสร ซึ่ง Shinichi (2001) พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสรของขิงที่เป็นเตตราพลอยด์มีแนวโน้มสูงที่สุดในอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และ หลอดละอองเกสรเจริญในก้านชูเกสรเพศเมียได้ดีมากขึ้นในอุณหภูมิ 17 องศาเซลเซียส ซึ่งการที่มีอุณหภูมิไม่คงที่ในการผสมเกสร อาจเป็นสาเหตุหนึ่งของการผสมไม่ติดหรือมีเปอร์เซ็นต์การติดผลต่ำ และเมื่อพบว่ามีการติดผลแล้ว การศึกษาต่อไปจำเป็นต้องศึกษาการพัฒนาของเมล็ด และการพัฒนาเป็นต้นกล้าต่อไป

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ปทุมมาโดยการผสมข้ามชนิดระหว่างพืชในกลุ่ม Eucurcuma และ Paracurcuma พบว่า

1. ความมีชีวิตของละอองเกสรของพืชสกุล *Curcuma* จำนวน 8 ชนิด มีความมีชีวิตค่อนข้างสูง และพบว่าทุกชนิดที่ได้ศึกษามีความสามารถในการงอกหลอดสูง และเมื่อทำการทดสอบความสามารถในการงอกของละอองเกสร (pollen) บนยอดเกสรเพศเมีย(stigma surface) และการงอกของหลอดละอองเกสรลงในก้านชูเกสรเพศเมีย พบว่าละอองเกสรของพืชในกลุ่ม Eucurcuma สามารถงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมียของพืชในกลุ่ม Paracurcuma แต่เมื่อใช้ Eucurcuma เป็นแม่ ละอองเกสรของ Paracurcuma บางชนิดไม่สามารถงอกหลอดเกสรบนยอดเกสรเพสเมียได้

2. เมื่อศึกษาการผสมเกสร พบว่า มีการผสมติดทั้งหมด 9 คู่ผสม ได้แก่ คู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* X *C. angustifolia*, *C. alismatifolia* X *C. aurantiaca*, *C. alismatifolia* X *C. cordata*, *C. alismatifolia* X *C. roscoeana*, *C. parviflora* X *C. aurant*, *C. parviflora* X *C. roscoeana*, *C. parviflora* X *C. rubrobracteata*, *C. aurantiaca* X *C. parviflora* และ*C. cordata* X *C. alismatifolia* โดยพบเมล็ดเฉลี่ยต่อผลอยู่ในช่วง 0.67 – 1.33 เมล็ดต่อผล แต่คู่ผสมระหว่าง *C. aurantiaca* X *C. parviflora* และ*C. cordata* X *C. alismatifolia* นั้นไม่พบการพัฒนาของเมล็ด

3. การศึกษาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของลูกผสมข้ามชนิดที่มีการผสมติดจำนวน 7 คู่ผสม พบว่าทุกเมล็ดที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอได้ จะสามารถงอกเป็นต้นได้ทั้งหมด และมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงมาก โดยเอ็มบริโอสามารถงอกได้ภายใน 7 วันในทุกคู่ผสม

4. การตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่า สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *C. alismatifolia* และ *C. aurantiaca* ได้ และบ่งชี้ความเป็นลูกผสมได้ด้วย ไพรเมอร์ OPU 14

5. ลูกผสมข้ามชนิดที่ได้มีลักษณะกึ่งกลางระหว่างพ่อและแม่ ลูกผสมมีลักษณะช่อดอกที่สวยงาม สีสันแปลกใหม่ แต่ก้านช่อดอกยังสั้นกว่าสายพันธุ์แม่ที่มีก้านช่อดอกยาว

6. การศึกษาการแก้ไขความเป็นหมันโดยการเพิ่มปริมาณโครโมโซม พบว่าโคลชิซินเข้มข้น 800 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ผลในการเพิ่มโครโมโซมดีที่สุด และจากการตรวจสอบด้วยเครื่อง Flow cytometer พบต้นปทุมมาที่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (เตตราพลอยด์ ; 2n = 4x) และออคตาพลอยด์ (2n = 8x) จึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบจำนวนเฉลี่ยของปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร

พบว่า ต้น 2n = 2x มีจำนวนปากใบต่อพื้นที่เฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคือต้น 2n = 4x และต้น 2n = 8x มีปากใบเฉลี่ยน้อยที่สุด และเมื่อศึกษาจำนวนคลอโรพลาสในเซลล์คุมปากใบ พบว่า พืชที่มีคลอโรพลาสต่อปากใบเฉลี่ยมากที่สุดคือต้น 2n = 8x รองลงมาคือ ต้น 2n = 4x และต้น 2n = 2x มีคลอโรพลาสเฉลี่ยน้อยที่สุด ซึ่งจำนวนปากใบต่อพื้นที่ และจำนวนคลอโรพลาสต่อปากใบ สามารถใช้เป็นดัชนีในการคัดเลือกพืช 2n = 2x, 2n = 4x และ 2n = 8x ได้

7. การศึกษาความสามารถในการงอกหลอดเกสรของลูกผสมที่มีการเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซม พบว่า ละอองเกสรของปทุมมาลูกผสมที่มีการเพิ่มของระดับชุดโครโมโซมสามารถงอกหลอดได้ และเมื่อทำการผสมเกสรโดย คู่ผสมระหว่าง (2n = 2x) X (2n = 4x), (2n = 4x) X (2n = 2x), (2n = 2x) X (2n = 8x) และ(2n = 8x) X (2n = 2x) สามารถผสมติด

บรรณานุกรม

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2519. **หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 353 น.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2548. **ข้อมูลการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมาปี 2547**. กรุงเทพฯ: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 131 น.

จุไรรัตน์ อินทะนิน. 2544. **การผลิตและจำหน่ายปทุมมาของเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 84 น.

เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี. 2549. **เอกสารประกอบการสอน วิชาพส. 522 การปรับปรุงพันธุ์พืชสวนขั้นสูง 2.** เชียงใหม่: คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 134 น.

ดวงจันทร์ เกษบุตร. 2549. **การเพิ่มจำนวนยอดและการชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมในปทุมมาลูกผสม.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 117 น.

เดชา ศิริภัทร. 2550. ปทุมมา ไม้ดอกไทยในตลาดโลก. **หมอชาวบ้าน**. 338 : น. 78-79.

นิทยา อักษรเนียม. 2548. ปทุมมาพันธุ์ใหม่ แบบฉบับการเพิ่มมูลค่าพืชสวน. **เคหการเกษตร**. 96 (10) : น. 77-87.

นพดล จรัสสัมฤทธิ์. 2537. **ฮอร์โมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช**.กรุงเทพฯ: รั้วขียว. 124 น.

บุญยืน กิจวิจารณ์. 2544. **เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. กรุงเทพฯ: คลังนานาวิทยา. 207 น.

พิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์, ถกลวรรณ ศรีสวัสดิ์ และฉันทนา สุวรรณธาดา. 2539. การศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืชกลุ่มกระเจียวไทย 17 ชนิด. น. 86-93. **ใน รายงานการประชุมวิชาการไม้ดอกไม้ประดับแห่งชาติ ครั้งที่ 2**. กรุงเทพฯ: สำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

พรพรรณ ทองสุทธิ. 2551. **การศึกษาการผสมเกสร การพัฒนาของเมล็ดและและการทำลายการพักตัวของเมล็ดปทุมมา (*Curcuma*)**. รายงานผลการปฏิบัติงานการเรียนรู้อิสระ. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 41 น.

พีรเดช ทองอำไพ. 2537. **ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์**. แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 196 น.

พวงพรรณ บัวทอง. 2549. **การเจริญเติบโตของว่านมหาโชคและบัวดินสีขาว**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 100 น.

รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2545. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 239 น.

รัฐศักดิ์ พลสิงห์. 2553. ปทุมมา จากป่าสู่เมือง สร้างรายได้สู่ชุมชน. **กสิกร**. 83 (5) : น.25-36.

ลาวัลย์ รักสัตย์. 2539. **ละอองเกสร**. กรุงเทพฯ:โอเดียนสโตร์. 145 น.

วิไลลักษณ์ ชินะจิตร และ สุขไผท ศรีเมือง. 2551. ผลของโคลชิซินที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ ploidy ในกล้วยไม้ดินหมูกลิ้ง (*Eulophia andamanensis* Reichb.f.). **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร**. 39(3) (พิเศษ) : 275-277.

ศิริพร หาญนันทวิวัฒน์. 2541. **ชีววิทยาของดอกว่านมหาลาภ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 152 น.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2539. **ปทุมมาและกระเจียวไม้ดอกไม้ประดับ**. กรุงเทพฯ: บ้านและสวน. 128 น.

_____. 2540. **ปทุมมาและกระเจียวไม้ดอกไม้ประดับ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: บ้านและสวน. 128 น.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.116 น.

หยกทิพย์ สุดารีย์. 2550. **การศึกษาการผสมเกสร การติดเมล็ด และการงอกของเมล็ดพืชในกลุ่มขมิ้น (*Curcuma*) ที่ผสมภายในชนิดเดียวกันและต่างชนิดกัน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 127 น.

อัญชลี ทัศนาจร. 2546. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. **วารสารวิทยาศาสตร์**. 57(2) : 83-85.

อดิศร กระแสชัย. 2539. **บทปฏิบัติการวิชา Cytogenetics in Agriculture (359704)**. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 89 น.

อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์. 2550. **การกลายพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช**. กรุงเทพฯ :สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 279 น.

อรอนงค์ บุญญะวิตร. 2535. **การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการเก็บรักษาละอองเกสรของพืชสกุล Curcuma**. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 14 น.

อุษา เพชรบ้านนา, อนุชิต ชิราจริยวงศ์ และพจมาลย์ สุรนิลพงศ์. 2552. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อของกล้วยไม้ดินใบหมากโดยใช้สารโคลชิซิน. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร**. 40(3) (พิเศษ) : 111-114.

Adaniya, S. and D. Shirai. 2001. *In vitro* induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. **Scientia Horticulture**. 88 : 277-287.

Baloch, M.J., A.R. Lakho and M.Y. Solangi. 2001. Impact of Sucrose Concentration on *in vitro*

Pollen Germination of Okra. *Hibiscuc esculentus*. **Journal of Biological Science** 4: 402-403.

Buitendijk, J.H., N. Pinsonneaux and A.A.M. van Lammeren. 1995. Embryo rescue by half-ovule culture for the production of interspecific hybrids in Alstromeria. **Scientia Horticulture**. 64: 65-75.

Chen, J.S., S., E. Jack, Y. Tashiro, S. lsshiki, and S. Miyazaki. 1997. Successful interspecific hybridization between *Cucumis satvus* L. and *C. hystrix* Chakr. **Euphytica**. 96 : 413-419.

Chen, W.H., Y.M. Fu, W.T. Tsai, M.S. Chyou, R.M. Hsieh, C.C. Wu and W.S. Lin. 2001. Identification and phylogenetic relationship of *Phalaenopsis* species via molecular analysis. **Taiwan Sugar Research**. 48:23-39.

Dahlgren, R.M.T., H.T. Clifford and P.F Yeo. 1985. **The families of the Monocotyledons.** New York: Springer Verlag . 520 p.

De Jesus-Gonzalez, L. and P.J. Weathers. 2003. Tetraploid *Artemisia Annua* Hairy Roots Produce more Artemisinin than Diploids. **Plant Cell Reports**. 21: 809-813.

Delin, W., and K. Larsen. 2000. Zingiberaceae. **Flora of China**. 24 : 322-377.

Frank, J., J. B. M. Custers and R. J. Bino. 1988. Effect of temperature on pollen tube growth and fruit set in reciprocal crosses between *Curcumis sativa* and *C. metuliferus*. **Plant Breeding**. 100: 150-153.

Gao, J.Y., L.Z. Hang and Q.J. Li. 2004. The Floral Biology of Curcumorpha longiflora (Zingiberaceae) ; A: Ginger with two-day flower. **American Journal of Botany.** 9 (2): 289-293.

Grzebelus, D., R. Baranski, B. Michalik and P.W. Simon. 2001. Comparison of RAPD and AFLP techniqucs used for the evolution of genetic diversity of carrot breeding materials. **Acta Horticulture**. 546: 413-416.

Heping, H., G. Shanlin, C. Lanlan, and J. Xiaoke. 2008. ***In Vitro*** in Duction and Identification of Autotetraploids of *Dioscorea Zingiberensis*. ***In Vitro*** **Cellular & Developmental Biology**. 44: 448-455.

Hussain, Z., R.K. Tyagi, R. Sharma and A. Agrawal. 2008. Genetic diversity in *in vitro*-conserved germplasm of *curcuma* L. as revealed by RAPD marker. **Biologia Plantarum**. 52(4): 627-633.

Jack, B., P.B. Angela., B.D. Jim and E. Donna. 1996. Intergeneric hybridization between *Sinapis alba* and *Brassica napus*. **Euphytica**. 1: 1-6.

Kazushige, H. and T. Kiyoshi. 1997. Production of interspecific hybrids in the genus Delphinium via ovule culture. **Euphytica**. 96 (3): 331-337.

Larsen, K. and S.S. Larsen. 2006. **Ginger of Thailand**. Chiang Mai: The Botanical Garden Organization. 148 p.

Leong-skornickova, J., O. Sida, D. Jarolimova, M. Sabu, T. Fer, P. Travnicek and J. Suda. 2007. Chromosome Numbers and Genome Size Variation in Indian Species of Curcuma (Zingiberaceae). **Annals of Botany** 100: 505 –526.

Lu, C. and M. Bbridgen. 1997. Chromosome Doubling and Fertility Study of *Alstroemeria aurea* x *A. caryophyllaea*. **Euphytica**. 94: 75-81.

Maknoi, C. 2006. **Taxonomy and Phylogeny of the *Genus Curcuma* L. (Zingiberaceae) with Particular Reference to Its Occurrence in Thailand.** Ph.D. Thesis. Prince of Songkla University. Thailand. 179 p.

Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with Tobacco tissue culture. **Physiology Plant** 15 : 473-474.

Nazeem, P.A., L. Joseph, T.G. Rani, P.A. Valsala, P. Shaii and G.S. Nair. 1996. Tissue culture system for *in vitro* pollination and regeneration of plantlets from *in vitro* raised seeds of Ginger - *Zingiber officinale* Rosc. **Acta Horticulture**. 426: 467-472.

Niimi, Y., M. Nakano and K.I. Maki. 1996. Production of interspecific hybrids between *Lilium regale* and *L. rebellum* via ovule culture. **Plant Breeding Abstract.** 66 (6) : 913.

Rhee, H.K., J.H. Lim and Y.J. Kim. 2005. Improvement of Breeding Efficiency for Interspecific Hybridization of Lilies in Korea. **National Horticultural Research Institute**. 440-310.

Sato, S., N. Katoh, H. Yoshida, S. Iwai and M. Hagimori. 2000. Production of doubled haploid plants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by psudofertilized ovule culture. **Scientia Horticulture**. 83: 301-310.

Schumann, K. 1904. **Zingiberaceae**. Berlin. *In:* Engler, Das Pflanzenreich. 458 p.

Shinichi, A. 2001. Optimal pollination enveronment of tetraploid Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) evaluated by in vitro pollen germination and pollen tube growth in styles. **Scientia Horticulture**. 90: 219-226.

Tanaka, J. and F. Taniguchi. 2002. Emphasized-RAPD(e-RAPD):a Simple and Efficient Technigue to Make RAPD Bands Clearer. **Breeding Science**. 52: 225-229.

Takuo, F., and N. Koji. 2004. Rapid production of *Lilium auratum* Bukbs from zygotic embryos. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**. 12(1-2): 39-42.

Valeton, Th. 1918. New note on the *Zingiberaceae* of Java and Malaya. Bull. Jard. **Buitenzorg**. Ser. 2. 27: 1-163.

Wood, T., Presanter. (2008). **Taxonomy and Anatomy of Curcuma in Cambodia Laos and Vietnam**. [Oral presentation]. Cambodia: 1st Symposium Flora of Indochina 8-14 December 2008.

Wu, H., S. Zheng, Y. He, G. Yan, Y. Bi and Y. Zhu. 2007. Diploid female gametes induced by colchicines in Oriental lilies. **Scientia Horticulture**. 117 : 50-53.

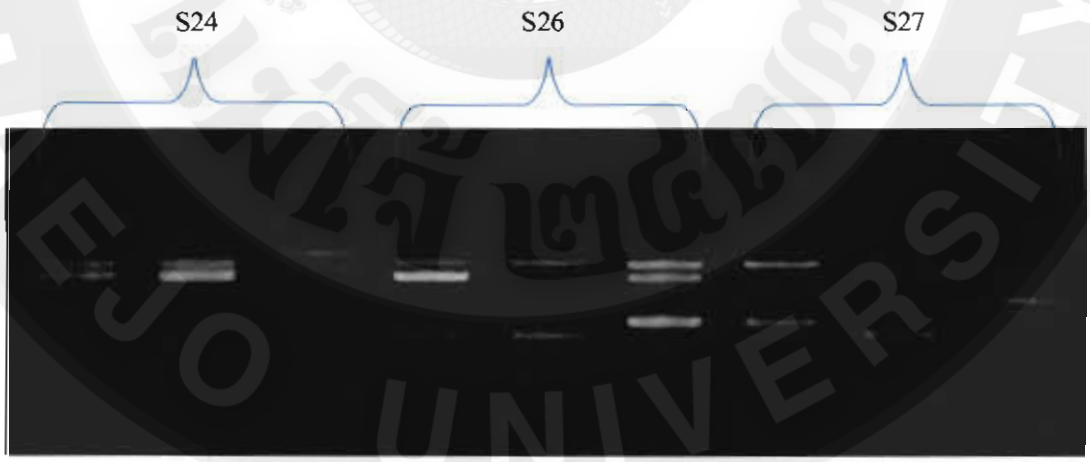
Ye, Y.M., J. Tong, X.P. Shi, W. Yuan and G.R. Li. 2010. Morphological and Cytological Studies of Diploid and Colchicine Induced Tetraploid Lines of Crape Myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). **Scientia Horticulture**. 124: 95-101.

ภาคผนวก

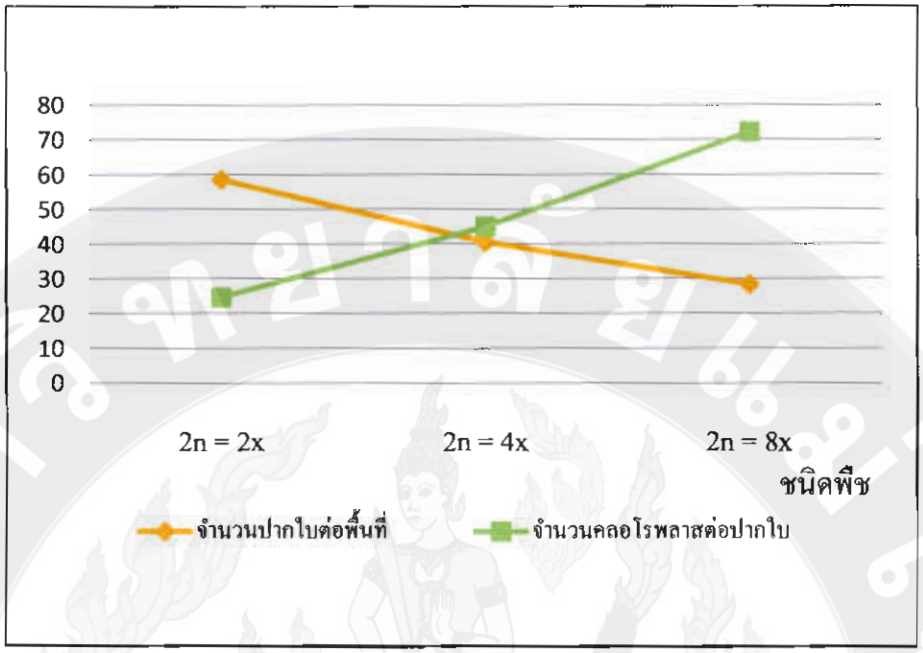
ภาคผนวก ก

ภาพการทดลอง

ภาพผนวก 1 เครื่อง Flow cytometer (Ploidy Analyzer PA; Partech International SA, Münster, Germany)



ภาพผนวก 2 แถบดีเอ็นเอที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *C. alismatifolia* และ *C. aurantiaca* และไม่สามารถบ่งชี้ความเป็นลูกผสมได้



ภาพผนวก 3 ความสัมพันธ์ของจำนวนปากใบต่อพื้นที่ และจำนวนคลอโรพลาสต่อปากใบของปทุมมาลูกผสมที่ได้รับการเพิ่มปริมาณโครโมโซม

ภาพผนวก 4 การงอกหลอดเกสรของพืชเตตราพลอยด์ (2n = 4x)

ภาพผนวก 5 การงอกหลอดเกสรของพืชออคตาพลอยด์ (2n = 8x)

ภาคผนวก ข

ตารางผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ

ตารางผนวก 1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของละอองเกสรของพืชในสกุล *Curcuma*

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	7	8338.16	1191.16	21.08**	2.66	4.03
Error	16	903.95	56.50			
Total	23	9242.11				
C.V. (%)	10.61					
หมายเหตุ	** หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %					

ตารางผนวก 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการงอกหลอดของพืชในสกุล *Curcuma*

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	7	5065.56	723.65	22.51**	2.66	4.03
Error	16	514.42	32.15			
Total	23	5579.98				
C.V. (%)	8.80					
หมายเหตุ	** หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %					

ตารางผนวก 3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์การติดผลของการผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่ม paracurcuma และ eucurcuma

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	19	1991.25	104.80	22.87**	1.84	2.37
Error	40	183.33	4.58			
Total	59	2174.58				
C.V. (%)	88.59					
หมายเหตุ	** หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %					

ตารางผนวก 4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลของการผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่ม paracurcuma และ eucurcuma

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	19	12.48	0.66	1.26^{ns}	1.84	2.37
Error	40	20.86	0.52			
Total	59	33.34				
C.V. (%)	204.05					
หมายเหตุ	ns หมายถึง ไม่แตกต่างกันทางสถิติ					

ตารางผนวก 5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์ของการผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่ม paracurcuma และ eucurcuma

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	19	36460.00	1918.95	2.15*	1.84	2.37
Error	40	35733.33	893.33			
Total	59	72193.33				
C.V. (%)	182.99					
หมายเหตุ	* หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %					

ตารางผนวก 6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์ต้นที่อยู่รอดของการผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่ม paracurcuma และ eucurcuma

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	6	625.00	104.17	0.31^{ns}	4.95	10.67
Error	5	1666.67	333.33			
Total	11	2291.67				
C.V. (%)	**19.05**					
หมายเหตุ	^{ns} หมายถึง ไม่แตกต่างกันทางสถิติ					

ตารางผนวก 7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของจำนวนปากใบเฉลี่ยต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตรของปทุมมาลูกผสมที่มีการเพิ่มขึ้นของระดับโครโมโซม

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	2	4644.60	2322.30	4208.19**	3.35	5.49
Error	27	14.90	0.55			
Total	29	4659.50				
C.V. (%)	1.75					

หมายเหตุ ** หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ตารางผนวก 8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของจำนวนคลอโรพลาสเฉลี่ยต่อปากใบของปทุมมาลูกผสมที่มีการเพิ่มขึ้นของระดับโครโมโซม

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	2	11405.87	5702.93	5922.28**	3.40	5.61
Error	24	26.00	0.96			
Total	29	11431.87				
C.V. (%)	2.07					

หมายเหตุ ** หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ตารางผนวก 9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์การผสมติดของต้นพืชที่ได้รับการเพิ่มปริมาณโครโมโซมกับต้นพืชปกติ

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	3	9167.67	3055.89	8.25**	4.07	7.59
Error	8	2962.81	370.35			
Total	11	12130.48				
C.V. (%)	36.46					

หมายเหตุ ** หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ภาคผนวก ค

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – สกุล	นายธีรนิติ พวงกฤษ	
เกิดเมื่อ	24 กันยายน 2529	
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2545	มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนเบญจมราชูทิศ จังหวัดราชบุรี
	พ.ศ. 2548	มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนเบญจมราชูทิศ จังหวัดราชบุรี
	พ.ศ. 2552	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชศาสตร์) พืชสวนประดับ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่