การศึกษาการพัฒนาเทียนพื้นเมืองเพื่อใช้ประโยชน์เป็นไม้ดอกไม้ประดับ

ธนะภูมิ เหล่าจันตา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน

ชื่อเรื่อง

การศึกษาการพัฒนาเทียนพื้นเมืองเพื่อใช้ประโยชน์เป็นไม้ดอกไม้ประดับ

โดย

ธนะภูมิ เหล่าจันตา

พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี)

วันที่ 30 เดือน กค. พ.ศ. 2556

กรรมการที่ปรึกษา .....

(อาจารย์ ดร.ประนอม ยังคำมั่น)

วันที่ 30 เดือน กค. พ.ศ. 2556

กรรมการที่ปรึกษา .....

(ดร.ปิยเกษตร สุขสถาน)

วันที่ 30 เดือน กค. พ.ศ. 2556

ประธานกรรมการประจำหลักสูตร .....

(อาจารย์ ดร.พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์)

วันที่ 30 เดือน กค. พ.ศ. 2556

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จาตุพงศ์ วาฤทธิ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 30 เดือน กค. พ.ศ. 2556

ชื่อเรื่อง การศึกษาการพัฒนาเทียนพื้นเมืองเพื่อใช้ประโยชน์เป็นไม้ดอกไม้ประดับ

ชื่อผู้เขียน นายธนะภูมิ เหล่าจันตา

ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน

ประธานกรรมการหลักสูตร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี

บทคัดย่อ

การศึกษาการพัฒนาพันธุ์เทียนพื้นเมืองเพื่อใช้ประโยชน์เป็นไม้ดอกไม้ประดับโดยการผสมข้ามชนิด เริ่มจากการศึกษาจำนวนโครโมโซมของเทียนพื้นเมืองในประเทศไทย 17 ชนิดพบจำนวนโครโมโซมของเทียนตั้งแต่ 2n =10 ถึง 2n = 34 จากนั้นศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียนทั้ง 17 ชนิด โดยเทคนิค RAPD จัดกลุ่มโดย UPGMA สามารถแยกความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของ เทียนออกเป็น7 กลุ่มกลุ่มที่ 1 *Impatiens violaeflora I. psittacina I. garrettii* และ *I. spectabilis* กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *I. chinensis* กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *I. longiloba I. parishii* และ *I. daraneenae* กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย *I. duclouxii I. santisukii* และ*I. sirindhorniae* กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย *I. nalampoonii* กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย *I. mirabilis*และ *I. sp. nov.*'Thunbergioides' กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วย *I. namkatensis I. kamtilongensis* และ *I. mengtszeana* เมื่อศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสรโดยการย้อม Acetone carmine พบว่าความมีชีวิตของละอองเกสรของ *I. mirabilis I. longiloba I. sirindhorniae I. nalampoonii I. namkatensis* และ *I. spectabilis* มีมากที่สุดคือร้อยละ 99.77, 99.76, 99.62, 99.62, 99.54 และ 99.20 ตามลำดับเมื่อนำละอองเกสรมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเหมาะสมสำหรับการงอกของหลอดละอองเกสรในพืชสกุลเทียนพบว่า *I. mirabilis I. spectabilis* และ *I. santisukii* มีความสามารถในการงอกหลอดเกสรมากที่สุดคือร้อยละ 92.85, 92.85 และ 92.76 ตามลำดับแต่ไม่พบละอองเกสรที่มีชีวิตและการงอกของหลอดละอองเกสรใน *I. psittacina* การศึกษาความสามารถในการงอกของละอองเกสรบนยอดเกสรเพศเมียและการงอกหลอดเกสรลงในก้านชูเกสรเพศเมียนั้น พบว่าหลอดเกสรของ *I. santisukii* สามารถงอกบนยอดเกสรเพศเมียและสามารถงอกผ่านก้านชูเกสรเพศเมียของ *I. violaeflora* ได้ ละอองเกสรของ *I. spectabilis* ไม่สามารถงอกหลอดลงบนยอดเกสรเพศเมียของ *I. santisukii* ได้และละอองเกสรของ *I. daraneenae* สามารถงอกหลอดเกสรลงบนยอดเกสรเพศเมียแต่ไม่สามารถงอกหลอดลงในก้านชูเกสรเพศเมียของ *I. violaeflora* ได้ เมื่อทำการผสมเกสรจำนวน 110 คู่ผสม พบว่าคู่ผสมระหว่าง *I. santisukii* X *I. violaeflora* มีการผสมติดมากที่สุดคือร้อยละ 8.66 รองลงมาคือคู่ผสมระหว่าง

I. violaeflora X *I. santisukii* *I. duclouxii* X *I. violaeflora* *I. chinensis* X *I. violaeflora* และ *I. nalampoonii* X *I. spectabilis* มีร้อยละการผสมติด 8.44, 8.44, 0.05 และ 0.05 ตามลำดับส่วนคู่ผสมอื่น นั้นไม่สามารถผสมติด ทั้งนี้คู่ผสมระหว่าง *I. violaeflora* X *I. santisukii* มีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลมากที่สุดคือ 6.33 เมล็ดและมีเมล็ดสมบูรณ์มากที่สุด คือร้อยละ 93.33 การผสมข้ามชนิดระหว่างเทียนพื้นเมืองและเทียนพันธุ์การค้า จำนวน 12 คู่ผสม พบว่าคู่ผสมระหว่าง *I. balsamina* X *I. parishii* มีการผสมติดมากที่สุดคือร้อยละ 83.44 รองลงมาคือคู่ผสมระหว่าง *I . walleriana* X *I. spectabilis* *I. spectabilis* X *I. walleriana* และ *I. parishii* X *I. balsamina* มีการผสมติดร้อยละ 73.32, 72.21 และ 55.55 ตามลำดับส่วนคู่ผสมอื่นนั้นไม่สามารถดิดผลได้ เมื่อนำเมล็ดอ่อนของลูกผสมข้ามชนิดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร GA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เมล็ดจากคู่ผสมระหว่าง *I. santisukii* X *I. violaeflora* *I. violaeflora* X *I. santisukii* และ *I. balsamina* X *I. parishii* มีการพัฒนาเป็นต้นอ่อน ส่วนเมล็ดจากคู่ผสมระหว่าง *I. chinensis* X *I. violaeflora* และ *I. nalampoonii* X *I. spectabilis* ไม่มีการพัฒนา การเพิ่มชุดโครโมโซมของเทียนพื้นเมืองพบว่าความเข้มข้นของสารโคลชิซิน 800 ppm สามารถชักนำให้เกิดต้นเดตราพลอยด์ใน *I. violaeflora* สูงสุดคือร้อยละ 11.22 เมื่อนำมาผสมกับ *I. spectabilis* (2n) พบว่ามีการผสมติดมากที่สุดคือ 28.88 แต่ผลร่วงภายหลังการผสม 5 วัน คู่ผสมระหว่าง *I. parishii* (2n) X *I. violaeflora* (4n) พบว่ามีการผสมติดคือ ร้อยละ 17.77 แต่ผลร่วงภายหลังผสม 4 วัน คู่ผสมระหว่าง *I.namkatensis* (2n) X *I. violaeflora* (4n) มีการผสมติดร้อยละ 8.88 แต่ผลร่วงภายหลังการผสม 5 วันส่วนคู่ผสมอื่นนั้นไม่สามารถติดผลได้ จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่า ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมไม่มีความสัมพันธ์กับจำนวนโครโมโซม แต่จะสัมพันธ์กับลักษณะทางกายวิภาค วิสัย และนิเวศวิทยาของแต่ละชนิดพันธุ์ เมื่อนำข้อมูลของจำนวนโครโมโซม ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ความมีชีวิต และความสามารถในการงอกหลอดของละอองเกสรมาใช้เป็นข้อมูลในการเลือกคู่ผสมพบว่าการติดผลนั้นขึ้นกับจำนวนโครโมโซม โดยเทียนในบางคู่ผสมที่อยู่ต่างกลุ่มแต่มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันมักจะผสมดิด และเมื่อเพิ่มจำนวนโครโมโซมให้ใกล้เคียงกันพบว่าสามารถติดผลเพิ่มเติมได้ในบางคู่ผสม แต่ผลจะมีการพัฒนาเพียงระยะหนึ่งและหลุดร่วงไป เมื่อทำการผสมเทียนพื้นเมืองกับพันธุ์การค้าพบว่าบางชนิดสามารถผสมติดและได้ลูกผสมที่มีลักษณะของทั้งพ่อและแม่ แต่ลักษณะดอกของลูกผสมยังขาดความสวยงามโดดเด่นไม่สามารถใช้เป็นการค้าได้ ลูกผสมจากการใช้ต้นแม่พันธุ์ที่เป็นพืชหลายฤดูจะเป็นพืชหลายฤดู แต่หากใช้แม่พันธุ์เป็นพืชล้มลุก ลูกที่ได้จะเป็นพืชล้มลุกด้วยเช่นกัน ซึ่งข้อมูลทั้งหมดนี้จะสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์เทียนต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: โครโมโซม, ลูกผสมข้ามชนิด, RAPD, การช่วยชีวิตเอ็มบริโอ, โคลชิซิน, *Impatiens*, Balsaminaceae

Title A Study On Development Of Thai Native Impatiens For Ornamental Purpose

Author Mr. Tanapoom Laojunta

Degree of Master of Science in Horticulture

Advisory Committee Chairpersion Assistant Professor Dr. Chalermsri Nontaswatsri

ABSTRACT

A study on development of Thai native *Impatiens* for ornamental purpose via interspecific crosses started from an investigation on chromosome number in somatic cells of 17 *Impatiens* species, which found that the chromosomes number of each species varies from the lowest 2n = 10 to the highest 2n = 34. Genetic relationship among the 17 *Impatiens* species was evaluated based on the UPGMA cluster analysis. The result indicates seven clusters; Cluster 1 consists of *Impatiens violaeflora, I. psittacina, I. garrettii* and *I. spectabilis*; Cluster 2 contained only *I. chinensis*; Cluster 3 consists of 3 species, *I. longiloba*, *I. parishii* and *I. daraneenae*; Cluster 4 consist of 3 species, *I. duclouxii, I. santisukii* and *I. sirindhorniae*; Cluster 5 contained only *I. nalampoonii*; Cluster 6 consists of 2 species, *I. mirabilis* and *I. sp. nov.*'Thunbergioides'; Cluster 7 consists of 3 species, *I.namkatensis*, *I. kamtilongensis* and *I. mengtszeana.* Pollen viability was investigated by staining with acetone carmine. The result shows that *I. mirabilis*, *I. longiloba*, *I. sirindhorniae*, *I. nalampoonii*, *I. namkatensis* and *I. spectabilis* had the highest pollen viability percentage of 99.77%, 99.76%, 99.62%, 99.62%, 99.54% and 99.20% respectively. An investigation on pollen germination with the culture in media found that a medium containing 10% sucrose is suitablc for pollen germinations. Pollens of *I. mirabilis, I. spectabilis* and *I. santisukii* had the highest germination percentage 92.85%, 92.85% and 92.76% respectively but could not germinate in *I.psittacina.* A study of pollen germination on the stigma surface and growth of pollen tube into the style shows that *I. santisukii* pollens germinated well and pollen tubes grew normally into the style of *I. violaeflora*, whereas *I. spectabilis* pollens could not germinate on the stigma surface of *I. santisukii. Impatiens daraneenae* pollens germinated well on the stigma surface of *I. violaeflora* but the pollen tube could not penetrate into the style. A total of 110 interspecific hybridization crosses were done and results show that *I. santisukii* X *I. violaeflora* had the highest fruit setting percentage (8.66%), whereas

I. violaeflora X *I. santisukii*, *I. duclouxii* X *I. violaeflora*, *I. chinensis* X *I. violaeflora* and *I. nalampoonii* X *I. spectabilis* had a high fruit setting percentage of 8.44%, 8.44%, 0.05% and 0.05 % respectively. Other crosses could not produce any fruits. Crosses between *I. violaeflora* X *I. santisukii* gave the highest seed number per fruit (0.67-1.3) and also showed the highest vigorous seed percentages (93.33%). Interspecific hybridizations between 12 Thai native *Impatiens* and commercial varieties found that *I. balsamina* X *I. parishii* gave the highest fruit setting percentage (83.44%), whereas *I . walleriana* X *I. spectabilis*, *I. spectabilis* X *I. walleriana* and *I. parishii* X *I. balsamina* gavc a high fruit setting percentage of 73.32%, 72.21% and 55.55 % respectively. Other crosses could not produce any fruits. Immature seed 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. The result shows that all crosses between *I. santisukii* X *I. violaeflora, I. violaeflora* X *I. santisukii* and *I. balsamina* X *I. parishii* were succesfull in seedling regeneration. The resulting plantlets showed a high survival percentage (100%), whereas crosses between *I. chinensis* X *I. violaeflora* and *I. nalampoonii* X *I. spectabilis* did not succeed. For chromosome doubling, 800 mg L^{-1} colchieines was applied for *I. violaeflora* where a chromosome doubling percentage at 11.22% was detected. After crossing with *I. spectabilis*, the mother plant showed the highest fruit setting percentage at 28.88% but later dropped off 5 days afterwards. Crosses between *I. parishii* (2n) X *I. violaeflora* (4n) showed a high fruit setting percentage at 17.77% but fruit-drop occurred 4 days afterwards. *Impatiens namkatensis* (2n) X *I. violaeflora* (4n) showed a fruit setting pereentage at 8.88 % but fruit-drop occurred 5 days afterwards. Other crosses could not produce any fruits. From previous results can be concludcd that the genetic relationship seems not related to chromosome number but morphology and ecology. More percentage of fruit setting occurred in crossing between species which have same or nearly same chromosome number. Fruit setting could be found after chromosome doubling for some crosses but fruit-drop usually occurred afterwards. After crossing with commercial varieties, the hybrids adopted some characteristics from their parents but seem not so beautiful enough for commercial use. Some characteristics of the hybrids which were inherited from its mother are the habit, perennial or annual.

Keywords: Chromosome, Interspecific Hybrid, RAPD, Embryo rescue, Colchicines, *Impatiens*, Balsaminaceae

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางในการวางแผนการดำเนินงานทดลอง ตลอดจนสนับสนุน วัสดุ อุปกรณ์ ห้องทดลอง ในการดำเนินการทดลองทั้งหมดจนกระทั่งงานเสร็จสมบูรณ์ อีกทั้งยังให้คำแนะนำแนวทางการดำเนินชีวิตในทุกๆ ด้าน และยังกรุณาช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้ จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ประนอม ยังคำมั่น ดร.ปิยเกษตร สุขสถาน กรรมการที่ปรึกษาและผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรีสุลักษณ์ ธีรานุพัฒนา ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ พร้อมทั้งตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อวิเชียร คุณแม่อัญชนา เหล่าจันดา ผู้ให้กำเนิดและให้โอกาสทางการศึกษา สนับสนุนค่าใช้จ่ายในการศึกษาเล่าเรียน อีกทั้งคอยเป็นกำลังใจตลอดมา และขอบคุณ คุณศรีจันทร์ อำชำฤทธิ์ คุณกัญญา พี่ๆ น้องๆ นักศึกษาสาขาพืชสวนประดับ และอีกหลายๆ ท่านที่ไม่ได้เอ่ยนามในครั้งนี้ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ธนะภูมิ เหล่าจันตา

กรกฎาคม 2556

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
สารบัญตาราง	(10)
สารบัญภาพ	(11)
สารบัญตารางผนวก	(12)
สารบัญภาพผนวก	(13)
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเทียนพันธุ์ป่าในประเทศไทย	3
จำนวนโครโมโซมของพืชสกุลเทียน	8
การผสมเกสร	8
การงอกของหลอดละอองเกสร	9
การผสมข้ามชนิดและการแก้ปัญหาการผสมไม่ติดจากการผสมข้ามชนิด	10
การช่วยชีวิตลูกผสมด้วยการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ	11
การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม	11
การเพิ่มจำนวนโครโมโซม	12
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	14
วัสดุและอุปกรณ์	14
การทดลองที่ 1 ศึกษาจำนวนโครโมโซมในเทียนชนิดต่าง ๆ	14
การทดลองที่ 2 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียนพื้นเมือง โดยใช้เทคนิค RAPD (Random amplified polymorphic DNA)	17
การทดลองที่ 3 ศึกษาความมีชีวิตและความสามารถในการงอกของละอองเกสร	18

หน้า

การทดลองที่ 4 ศึกษาความสามารถในการผสมข้ามชนิดของเทียน 19
การทดลองที่ 5 ศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมของเทียนพื้นเมืองและการตรวจสอบ 20
วิธีการวิจัย 22
การทดลองที่ 1 ศึกษาจำนวนโครโมโซมในเทียนชนิดต่าง ๆ 21
การทดลองที่ 2 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียนพื้นเมือง
โดยใช้เทคนิค RAPD (Random amplified polymorphic DNA) 23
การทดลองที่ 3 ศึกษาความมีชีวิตและความสามารถในการงอกของละอองเกสร 24
การทดลองที่ 4 ศึกษาความสามารถในการผสมข้ามชนิดของเทียน 26
การทดลองที่ 5 ศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมของเทียนพื้นเมือง และการตรวจสอบ 28
บทที่ 4 ผลการทดลอง 31
การทดลองที่ 2 ศึกษาจำนวนโครโมโซมในเทียนชนิดต่าง ๆ 31
การทดลองที่ 2 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียนพื้นเมือง 32
การทดลองที่ 3 ศึกษาความมีชีวิดและความสามารถในการงอกของละอองเกสร 33
การทดลองที่ 4 ศึกษาความสามารถในการผสมข้ามชนิดของเทียน 39
การทดลองที่ 5 ศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมของเทียนพื้นเมืองและการตรวจสอบ 51
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง 55
การทดลองที่ 1 ศึกษาจำนวนโครโมโซมในเทียนชนิดต่าง ๆ 55
การทดลองที่ 2 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียนพื้นเมือง
โดยใช้เทคนิค RAPD (Random amplified polymorphic DNA) 56
การทดลองที่ 3 ศึกษาความมีชีวิตและความสามารถในการงอกของละอองเกสร 57
การทดลองที่ 4 ศึกษาความสามารถในการผสมข้ามชนิดของเทียน 58
การทดลองที่ 5 ศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมของเทียนพื้นเมืองและการตรวจสอบ 60
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง 62
บรรณานุกรม 64
ภาคผนวก 68
ภาคผนวก ก ภาพการทดลอง 69
ภาคผนวก ข ตารางผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ 79
ภาคผนวก ค ประวัติผู้วิจัย 86

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียน 24 ไพรเมอร์	18
2	สูตรอาหารของ Murashige and Skoog (1962)	20
3	จำนวนโครโมโซมของเทียนพื้นเมืองทั้ง 17 ในประเทศไทย	31
4	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการงอกหลอดละอองเกสรของเทียนพื้นเมือง 17 ชนิด	34
5	เปอร์เซ็นต์การผสมติด จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล และเปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์ของการผสมสลับพ่อสลับแม่ระหว่างเทียนพื้นเมือง 11 ชนิด	40
6	เปอร์เซ็นต์การผสมติด จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล และเปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์ของการผสมข้ามชนิดระหว่างเทียนพื้นเมืองและเทียนพันธุ์การค้า	45
7	จำนวนเมล็ดที่เพาะ เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่งอก เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่อยู่รอด และจำนวนวันที่เริ่มงอกของเมล็ดลูกผสมข้ามชนิดระหว่างเทียนจำนวน 8 คู่ผสม	47
8	เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่อยู่รอด เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น เตตราพลอยด์และจำนวนโครโมโซมของ *I. violaeflora* ภายหลังจากการหยดสารโคลชิซิน	51
9	เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่อยู่รอด เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น เตตราพลอยด์และจำนวนโครโมโซมของ *I. duclouxii* ภายหลังจากการหยดสารโคลชิซิน	52
10	เปอร์เซ็นต์การผสมติด ระยะเวลาในการร่วงของผลจากการผสมข้ามชนิดระหว่างเทียนต้นดิพลอยด์และเตตราพลอยด์	54

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	ลักษณะของดอกเทียนพื้นบ้านของไทย	14
2	ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียนพื้นเมือง 17 ชนิดในประเทศไทย	32
3	หลอดเกสร ของ *I. santisukii* สามารถงอกบนยอดเกสรเพศเมีย และสามารถงอกผ่านก้านชู เกสรเพศเมียของ *I. violaeflora* ได้	36
4	ละอองเกสร *I. spectabilis* ไม่สามารถงอกหลอดลงบนยอดเกสรเพศเมียของ *I. santisukii* ได้	37
5	ละอองเกสร (P) ของ *I. daraneenae* งอกหลอดลงบนยอดเกสรเพศเมีย ของ แต่ไม่สามารถงอกหลอดลงในก้านชูเกสรเพศเมียของ *I. violaeflora* ได้	38
6	ลักษณะดอกของลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *I. violaeflora* X *I. santisukii*	48
7	ลักษณะดอกของลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *I. balsamina* X *I. parishii*	49
8	ลักษณะดอกของลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *I. walleriana* X *I. spectabilis*	50
9	ลักษณะต้นเทียนที่มีระดับชุดโครโมโซม 2n = 2x (A), 2n = 4x (B)	53
10	ลักษณะดอก *I. violaeflora* มีระดับชุดโครโมโซม 2n = 2x (ขวา), 2n = 4x (ซ้าย)	53

สารบัญตารางผนวก

ตารางผนวก		หน้า
1	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตละอองเกสรของเทียน	80
2	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการงอกหลอดละอองเกสรของเทียน	80
3	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์การผสมติดของการผสมสลับพ่อสลับแม่ระหว่างเทียนพื้นเมือง 11 ชนิด	81
4	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลของการผสมสลับพ่อสลับแม่ระหว่างเทียนพื้นเมือง 11 ชนิด	81
5	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเมล็ดสมบูรณ์ของการผสมสลับพ่อสลับแม่ระหว่างเทียนพื้นเมือง 11 ชนิด	82
6	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์การผสมติดของการผสมข้ามชนิดระหว่างเทียนพื้นเมืองและเทียนพันธุ์การค้า	82
7	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของจำนวนเมล็ดเฉลี่ย ต่อผลของการผสมข้ามชนิดระหว่างเทียนพื้นเมืองและเทียนพันธุ์การค้า	83
8	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเมล็ดสมบูรณ์ของการผสมข้ามชนิดระหว่างเทียนพื้นเมืองและเทียนพันธุ์การค้า	83
9	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของการเกิดต้นเตตราพลอยด์ของ *I. violaeflora*	84
10	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของการเกิดต้นเตตราพลอยด์ของ *I. duclouxii*	84
11	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์การผสมติดโดยการผสมข้ามชนิดระหว่างต้นดิพลอยด์และเตตราพลอยด์	85

สารบัญภาพผนวก

ภาพผนวก		หน้า
1	โครโมโซม เทียนพื้นเมืองของไทย 17 ชนิด	70
2	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง PCR ร่วมกับการใช้ Primer S 33	72
3	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง PCR ร่วมกับการใช้ Primer S 33	72
4	ละอองเกสรที่มีมีชีวิตของเทียนสันติสุข	73
5	การงอกหลอดเกสรของเทียนดอย	73
6	ลักษณะของผลที่ได้จากการผสมข้ามชนิดของเทียน	74
7	ลักษณะของผลที่ฝ่อและหลุดร่วงจากการผสมข้ามชนิดของเทียน	74
8	ต้นอ่อนที่เริ่มพัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อน	75
9	ตาข้างที่เริ่มพัฒนาภายหลังจากการหยดสาร โคลชิซิน	75
10	โครโมโซมของเทียนดอย ติพพลอยด์ A (2n = 2x) และ เตตราพลอยด์ B (2n = 4x)	76
11	ละอองเกสรของเทียนสันติสุข	76
12	อับละอองเกสรที่หลุดร่วงก่อนเกสรตัวเมียพร้อมผสม	77
13	เกสรเพศเมียที่พร้อมผสม	77
14	ความสัมพันธ์พันธุกรรมของเทียนโดย Stevens *et al.* (2006)	78

บทที่ 1
บทนำ

เทียนจัดอยู่ในสกุล *Impatiens* วงศ์ Balsaminaceae เรียกทั่วไปว่า Touch Me Not, Garden Balsam หรือ Rose Bud Impatiens (Chadde, 2002)ในต่างประเทศเทียนพื้นเมืองหลายสายพันธุ์ถูกพัฒนาขึ้นเป็นพันธุ์การค้าเนื่องจากดอกมีสีสันที่หลากหลาย ปลูกเลี้ยงง่าย โตเร็ว ถึงแม้ดอกของเทียนพันธุ์การค้าจะมีหลากสีสัน แต่ รูปร่างของดอกยังไม่หลากหลายนัก ซึ่งในปัจจุบัน พบว่า เทียนพื้นเมืองที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทยมีลักษณะประจำพันธุ์ที่สวยงาม บางชนิดดอกมีรูปร่างคล้ายสัตว์ เช่น นกแก้ว นกยูง บางชนิดมีลำต้นเป็นลำสวยงาม จึงมีผู้พยายามสร้างลูกผสมข้ามชนิด แต่การผสมข้ามชนิดนั้น มีอุปสรรคต่างๆ มากมาย ตั้งแต่การผสมเกสรจนถึงการพัฒนาของผลและเมล็ด เฉลิมศรี (2549) ได้กล่าวว่า ในการผสมพันธุ์พืชข้ามชนิดกว่าการผสมพันธุ์ในพืชชนิดเดียวกัน เนื่องจากจะพบปัญหาและอุปสรรคต่างๆ ที่แตกต่างกันไปตามแต่กรณี เช่น การบานของดอกไม่พร้อมกัน เกสรไม่สามารถงอกได้ เกสรงอกได้แต่ไม่สามารถงอกลงไปถึงไข่ได้ หรืองอกผิดทิศทางจนไม่สามารถผสมกับไข่ได้ ผสมไม่ติด ผสมติดแต่เอ็มบริโอหยุดการเจริญเติบโตหรือตายก่อนจะสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ ซึ่งอาจจะเกิดจากความอ่อนแอของเอ็มบริโอเอง หรืออาจเกิดจากสารยับยั้งที่อยู่ในเอ็นโดสเปิร์ม เนื่องจากปัญหาดังกล่าวทำให้การปรับปรุงพันธุ์เทียนโดยการผสมข้ามชนิดในปัจจุบันจึงยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร

ในการศึกษานี้ ได้ทำการศึกษาข้อมูลที่เกี่ยวข้องในการผสมข้ามชนิด ได้แก่ จำนวนโครโมโซม ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียนพื้นเมือง ตลอดจนการผสมเกสรและอุปสรรคในการผสมข้ามชนิด การช่วยชีวิดลูกผสมโดยการเลี้ยงเมล็ดอ่อน การเพิ่มจำนวนโครโมโซมเพื่อช่วยในการผสม ตลอดจนการประเมินศักยภาพในการใช้เป็นไม้ดอกไม้ประดับเพื่อเป็นแนวทางในการสร้างลูกผสมและใช้ประโยชน์ในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการพัฒนาสายพันธุ์เทียน (Impatiens) พื้นเมืองโดย

1. ศึกษาจำนวนโครโมโซมของเทียนแต่ละชนิดเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการสร้างลูกผสม
2. ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียนแต่ละชนิดเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการสร้างลูกผสม
3. ศึกษาถึงความมีชีวิต ความสามารถในการงอกของละอองเกสร และการงอกของละอองเกสรบนเกสรเพศเมีย (pistil) เพื่อหาปัจจัยและข้อจำกัดของการผสมข้ามชนิด
4. ศึกษาการปรับปรุงพันธุ์เทียนโดยการผสมข้ามชนิดเพื่อสร้างลูกผสมใหม่โดยอาศัยพื้นฐานจากผลการศึกษาต่างๆข้างต้น

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาลักษณะและการเจริญเติบโตของเทียนแต่ละชนิด
2. ศึกษาจำนวนชุดโครโมโซมของเทียนแต่ละชนิด
3. ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียนแต่ละชนิด
4. ศึกษาความสามารถในการผสมข้ามชนิตของเทียนพื้นบ้านของไทย
5. ศึกษาวิธีการเพิ่มชุดโครโมโซมของเทียนพื้นบ้านของไทย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียนพื้นเมืองแต่ละชนิด
2. ทราบถึงความมีชีวิตและความสามารถในการงอกหลอดละอองเกสรของเทียนแต่ละชนิด
3. ทราบถึงอุปสรรคและสาเหตุของการผสมข้ามชนิด
4. ทราบถึงแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์พืชสกุลเทียน
5. ได้ลูกผสมที่มีลักษณะแปลกใหม่จากการผสมข้ามชนิด

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

พืชในวงศ์ Balsaminaceae มีมากกว่า 1,000 ชนิด แบ่งออกได้เป็น 2 สกุลใหญ่ ได้แก่ สกุลเทียนนา (*Hydrocera*) และสกุลเทียน (*Impatiens*) เทียนกระจายตัวในเขตร้อนและเขตร้อนชื้น มีบางชนิดที่มีถิ่นกำเนิดในแถบยุโรป เอเชียและอเมริกาเหนือ แต่จะไม่พบในแถบอเมริกาใต้และออสเตรเลีย เทียนนาเป็นพืชที่เจริญในสภาพพื้นที่ชุ่มน้ำหรือแหล่งน้ำตื้นๆ พืชชนิดนี้มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นพืชล้มลุก ลำต้นตั้งตรง สูงประมาณ 150 ซม. การเรียงใบแบบเวียน ไม่มีก้านใบ ใบแคบรูปใบหอก ปลายใบแหลม ขอบใบจักฟันเลื่อย ไม่มีหูใบ ช่อดอกแบบกระจุก ออกตรงซอกใบ ดอกสีชมพูเข้ม สกุลเทียนนามีลักษณะเฉพาะคือ กลีบดอกแยกจากกัน ผล เป็นแบบผลสดมีหลายเมล็ด ส่วนสกุลเทียนมีกลีบข้างที่เชื่อมติดกันดอกมีสีสันสวยงาม ความแตกต่างอย่างชัดเจนอีกประการหนึ่งของสองสกุลนี้คือ สกุลเทียนผลเมื่อแก่จะสามารถระเบิดออกทำให้เมล็ดกระจายเป็นบริเวณกว้างแต่ผลของสกุลเทียนนาเมื่อแก่จะแข็งไม่สามารถระเบิดออกได้ Stevens et al. (2006)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเทียนพันธุ์ป่าในประเทศไทย

***Impatiens chinensis* L.**

ชื่อไทย หญ้าเทียน เทียนจีน

วิสัย ไม้ล้มลุกอายุหลายปี โคนต้นทอดเลื้อยยอดตั้งตรง

ใบ ใบแคบออกตรงข้าม

ดอก ออกตามซอกใบใกล้ยอด ขนาดใหญ่สีชมพูสด เห็นได้เด่นชัด

นิเวศวิทยา กระจายตัวบริเวณความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 900 -1,000 เมตร ขึ้นในที่ชื้นแฉะ บางครั้งพบบริเวณที่น้ำขัง

***Impatiens daraneenae* Suksathan & Triboun**

ชื่อไทย เทียนดารณี

วิสัย ไม้ล้มลุกฤดูเดียว ต้นตั้งตรงแตกกิ่งเป็นพุ่มเล็ก ๆ

ใบ ใบเดี่ยวเรียงแบบสลับ สีเขียวอ่อน กระจายทั่วทรงพุ่ม

ดอก รูปร่างเป็นหลอด สีชมพู ออกดอกตามซอกใบใกล้ยอด

นิเวศวิทยา ขึ้นในที่ร่มรำไร กระจายตัวบริเวณความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 600 เมตร ต้องการความชื้นในอากาศสูง

***Impatiens garrettii* Craib**

ชื่อไทย เทียนการ์เร็ต

วิสัย ไม้ล้มลุกฤดูเดียว เติบโตเป็นพุ่มเล็ก ๆ เลื้อยออกไปด้านข้าง

ใบ ใบเดี่ยวเรียงสลับ

ดอก สีม่วงแดงสด

นิเวศวิทยา ต้องการแสงมาก กระจายตัวบริเวณความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 1,500 เมตร ชอบอากาศเย็น พบตามป่าดิบเขา ต้องการความชื้นสูง

***Impatiens psittacina* Hook. f.**

ชื่อไทย เทียนนกแก้ว

วิสัย ไม้ล้มลุกฤดูเดียว มีลำต้นหลักเป็นแท่งตั้งตรงแตกใบและกิ่งปลายยอด

ใบ ใบเดี่ยว ออกเรียงสลับเวียนรอบลำต้นเป็นเกลียว รูปใบหอก หรือรูปไข่ กว้าง กว้าง 2-4 ซม. ยาว 4-6 ซม. ปลายใบแหลม ขอบใบหยักเป็นหนามแหลมสั้น โคนใบมน ผิวใบเรียบ

ดอก ดอกเดี่ยวตามก้านใบและปลายยอด ดอกมีรูปร่างคล้ายนกแก้ว ขนาดดอก 2-3 ซม. ดอกสีม่วงแกมแดงและขาว หรือสีชมพูเข้มแกมแดงและขาว กลางดอกมีแต้มสีเหลือง ดอกเป็นรูปหลอดกว้าง

นิเวศวิทยา พบขึ้นตามใต้ร่มเงาไม้ใหญ่ในป่าดิบเขาหรือบริเวณโขดหินปูนที่อยู่สูงจากระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 1,500-1,800 เมตร

***Impatiens duclouxii* Hook. f.**

ชื่อไทย เทียนจาบ เทียนอ้ม

วิสัย ไม้ล้มลุกอายุหลายปี ลำต้นทอดเลื้อยและแตกพุ่มสูงได้ประมาณ 1 เมตร ต้นเปราะหักง่าย

ใบ ใบเดี่ยวเรียงสลับ ค่อนข้างทึบ

ดอก เป็นช่อสั้น ๆ 2-3 ดอก ออกตามซอกใบ สีเหลืองใสบางครั้งมีลายขีดสีแดงบนเดือย

นิเวศวิทยา มักขึ้นในที่ร่มรำไรใต้ต้นไม้ใหญ่ กระจายตัวบริเวณความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 1,300- 1,800 เมตร ชอบอากาศเย็น ต้องการความชื้นสูงในการเจริญเติบโต

***Impatiens longiloba* Craib**

ชื่อไทย เทียนคำ

วิสัย ไม้ล้มลุกฤดูเดียว ลำต้นทอดเลื้อยและแตกพุ่มสูงได้ประมาณ 60 ซม.

ใบ ใบเดี่ยวเรียงแบบสลับ

ดอก เป็นช่อใกล้ปลายยอด สีเหลืองอมส้ม เดือยมักมีสีส้มแดงและชี้

นิเวศวิทยา กระจายตัวบริเวณความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 2,000 เมตร ชอบอากาศเย็น ต้องการความชื้นสูงในการเจริญเติบโต

***Impatiens mengtszeana* Hook.f.**

ชื่อไทย เทียนธารา

วิสัย ไม้ล้มลุกอายุหลายปี ลำต้นทอดเลื้อยและแตกพุ่มสูงได้ประมาณ 1 เมตร

ใบ ใบเดี่ยวเรียงแบบสลับ ออกใบดกหนาแน่น

ดอก ออกตามซอกใบใกล้ปลายยอด มีขนาดใหญ่สีส้มอมชมพู เดือยมีสีเข้ม

นิเวศวิทยา ชอบแสงค่อนข้างมาก กระจายตัวบริเวณความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 400 -1,500 เมตร เจริญเติบโตในน้ำตื้น ๆ ลำธารหรือน้ำตกขนาดเล็ก จึงต้องการความชื้นสูง

***Impatiens mirabilis* Hook. f.**

ชื่อไทย ลิ้นกุรัม

วิสัย ไม้ล้มลุกอายุหลายปี ลำต้นอวบน้ำแตกกิ่งคล้ายชวนชมสูงได้ประมาณ 3 เมตร เปราะหักง่าย

ใบ ใบเดี่ยว แตกเป็นกระจุกตามปลายยอด

ดอก เป็นช่อห้อยเจริญต่อเนื่องยาวได้กว่า 1 เมตร สีเหลืองหรือสีขาวอมชมพู

นิเวศวิทยา ชอบแสงรำไร ในฤดูหนาวจะมีช่วงพักตัวทิ้งใบ เจริญเติบโตได้ดีบริเวณมีความชื้นในอากาศสูง แต่ไม่แฉะ

***Impatiens nalampoonii* T. Shimizu**

ชื่อไทย เทียนผาไท

วิสัย ไม้ล้มลุกฤดูเดียว ต้นตั้งตรงแตกกิ่งเป็นพุ่มเล็ก ๆ

ใบ ใบเดี่ยวเรียงแบบสลับ กระจายห่าง ๆ ทั่วทรงพุ่ม

ดอก รูปร่างอ้วนป้อม สีม่วงแดงออกตามซอกใบใกล้ยอด

นิเวศวิทยา ขึ้นในที่ร่มรำไร กระจายตัวบริเวณความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 400 เมตร ต้องการความชื้นในอากาศสูง เนื่องจากมักพบขึ้นอยู่ตามหุบเขา ไม่ชอบลมโกรก

***Impatiens namkatensis* T. Shimizu**

ชื่อไทย เทียนน้ำกัด

วิสัย ไม้ล้มลุกฤดูเดียว ต้นตั้งตรงแตกกิ่งเป็นพุ่มเล็ก ๆ

ใบ ใบเดี่ยวเรียงสลับ กระจายห่าง ๆ ทั่วทรงพุ่ม

ดอก ขนาดเล็ก สีขาวปากมีขีดสีแดงออกตามซอกใบใกล้ยอด

นิเวศวิทยา แสงรำไร กระจายตัวบริเวณความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 600 - 900 เมตร ต้องการความชื้นในอากาศสูง

***Impatiens parishii* Hook.f.**

ชื่อไทย เทียนดะนาวศรี

วิสัย ไม้ล้มลุกอายุหลายปี ต้นตั้งตรงแตกกิ่งเป็นพุ่มเล็ก ๆ

ใบ ใบเดี่ยวเรียงสลับ ออกหนาแน่นใกล้ปลายยอด

ดอก สีขาวอมชมพู ปากมีแต้มสีเหลือง ออกตามซอกใบใกล้ยอด

นิเวศวิทยา ชอบแสงมาก กระจายตัวบริเวณความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 400 - 1,000 เมตร

***Impatiens santisukii* T. Shimizu**

ชื่อไทย เทียนสันติสุข

วิสัย ไม้ล้มลุกฤดูเดียว ต้นตั้งตรงแตกกิ่งเป็นพุ่มเล็ก ๆ

ใบ ใบเดี่ยว เป็นกระจุกใกล้ปลายยอด

ดอก ขนาดเล็ก สีม่วงแดง ออกตามซอกใบใกล้ยอด

นิเวศวิทยา ชอบแสงมาก กระจายตัวบริเวณความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 900 - 1,800 เมตร ต้องการความชื้นในอากาศสูง

Impatiens sirindhorniae **Triboun & Suksathan**

ชื่อไทย ชมพูสิริน

วิสัย ไม้ล้มลุกอายุหลายปี ต้นห้อยย้อย

ใบ ใบเดี่ยวเรียงสลับ แข็งหนาอวบน้ำ

ดอก ขนาดใหญ่ สีชมพูหวานออกตามซอกใบใกล้ยอด

นิเวศวิทยา ชอบแสงต้องการความชื้นในอากาศสูงทนแล้งได้ดี

Impatiens spectabilis **Triboun & Suksathan**

ชื่อไทย เทียนแพงพวย

วิสัย ไม้ล้มลุกฤดูเดียว ต้นตั้งตรงแตกกิ่งเป็นพุ่มเล็ก ๆ

ใบ ใบเดี่ยว เป็นกระจุกใกล้ปลายยอด

ดอก ดอกดกและเด่น สีชมพูตามซอกใบใกล้ยอด

นิเวศวิทยา ชอบแสงมาก ต้องการความชื้นในอากาศสูง

Impatiens kamtilongensis **Toppin**

ชื่อไทย เทียนปางอุ๋ง

วิสัย ไม้ล้มลุกอายุหลายปี ลำต้นทอดเลื้อย

ใบ ใบเดี่ยวเรียงสลับ มีขนมาก

ดอก สีเหลืองออกเป็นคู่ตามซอกใบ

นิเวศวิทยา แสงรำไร กระจายตัวบริเวณความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 1,000 เมตร ต้องการความชื้นในอากาศสูง

Impatiens violaeflora **Hook.f.**

ชื่อไทย เทียนดอย

วิสัย ไม้ล้มลุกฤดูเดียว ต้นตั้งตรงแตกกิ่งเป็นพุ่มเล็ก ๆ

ใบ ใบเดี่ยว เป็นกระจุกใกล้ปลายยอด

ดอก สีชมพู ออกตามซอกใบใกล้ยอด

นิเวศวิทยา ชอบแสงมาก กระจายตัวบริเวณความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 400 เมตร ขึ้นไปต้องการความชื้นในอากาศสูง

***Impatiens sp. nov.* 'Thunbergioides'**

ชื่อไทย เทียนช้องนาง

วิสัย ไม้ล้มลุกฤดูเดียว ต้นตั้งตรงแตกกิ่งเป็นพุ่มเล็ก ๆ

ใบ ใบเดี่ยวเรียงสลับกระจายทั่วทรงพุ่ม

ดอก สีม่วงอมชมพูออกตามซอกใบใกล้ยอด

นิเวศวิทยา ชอบแสงมาก กระจายตัวบริเวณความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 400 เมตร ต้องการความชื้นในอากาศสูง

จำนวนโครโมโซมของพืชสกุลเทียน

พืชสกุลเทียนในประเทศไทยพบว่ามีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาตลอดจนขนาดของลำต้นและรูปร่างของดอก ซึ่งอาจเกิดจากจำนวนโครโมโซมที่มีความผันแปรตามวิวัฒนาการ ทั้งนี้การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับจำนวนโครโมโซมนั้นยังสามารถบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างเทียนแต่ละชนิดได้อีกด้วยซึ่ง Song et al. (2003) รวบรวมผลการศึกษาจำนวนโครโมโซมเทียนพื้นเมืองในประเทศไทยโดยศึกษาจากชิ้นส่วนดอกอ่อนพบว่า *I. chiangdaoensis* 2n = 12, *I. longiloba* 2n = 18, *I. mengtszeana* 2n = 16, *I. nalampoonii* 2n = 32, *I. psittacina* 2n = 34, *I. racemosa* 2n = 18 และ *I. violaeflora* 2n = 12

Larsen (1981) ศึกษาจำนวนโครโมโซมของเทียนในประเทศไทยพบว่า *I. chiangdaoensis* 2n = 12, *I. violaeflora* 2n = 10, 12 และ *I. mengtszeana* 2n = 16

การผสมเกสร

การปรับปรุงพันธุ์เทียนโดยการผสมเกสรนั้นสามารถผลิตลูกผสมที่มีลักษณะสวยงามและหลากหลาย ซึ่งช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการผสมเกสรอยู่ในช่วง 8.00 น. – 11.00 น. อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผสมเกสรอยู่ระหว่าง 15-20 องศาเซลเซียส (Loren, 1998) โดย Pieter et al. (2006) ศึกษาการพัฒนาของดอกในพืชสกุลเทียนพบว่า อับละอองเกสรของเทียนจะฉีกขาด

และหลุดออกจากดอกก่อนที่ยอดเกสรเพศเมียจะพร้อมผสมเพียง 1 วัน ส่งผลให้เทียนถูกจัดว่าเป็นพืชผสมข้าม

สัมฤทธิ์ (2537) กล่าวว่าชนิดของการถ่ายละอองเกสร จำแนกได้ เป็น 2 แบบ ตามความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของพืชนั้นๆ ดังนี้

1. Self – pollination หมายถึงการถ่ายละอองเกสรที่เกิดขึ้นโดยพืชมีพันธุกรรมเหมือนกันซึ่งทั้งเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย อาจจะอยู่บนต้นเดียวกันหรือต่างต้นกันก็ได้ การถ่ายละอองเกสรแบบนี้อาจจะเกิดขึ้นในดอกเดียวกัน คนละดอกแต่อยู่ในต้นเดียวกันหรือต่างดอกและต่างต้นกัน

2. Cross – pollination หมายถึงการถ่ายละอองเกสรที่เกิดขึ้นโดยละอองเกสรจากต้นพืชต้นหนึ่งไปยังเกสรตัวเมียของพืชอีกต้นหนึ่ง โดยพืชทั้งสองต้นมีพันธุกรรมต่างกัน อาจจะเป็นพันธุ์ variety เดียวกัน หรือ species เดียวกัน หรือ อาจจะต่าง species กันต่าง genus กัน ซึ่งหากเทียนเป็นพืชผสมข้ามนั่นแสดงว่ามีโอกาสสร้างลูกผสมที่มีลักษณะแปลกใหม่จากการผสมได้

การงอกของหลอดละอองเกสร

การงอกของหลอดละอองเกสรเกิดขึ้นภายหลังจากละอองเกสรตกและพัฒนาบนยอดเกสรตัวเมียโดยเริ่มจาก นิวเคลียสแบ่งตัวแบบไมโทซิสได้ เป็น 2 นิวเคลียส จากนั้น vegetative nucleus ทำหน้าที่งอกหลอดละอองเกสรเพื่อนำ generative nucleus ไปยังไข่ (Transeau et al., 1953) ซึ่งในปัจจุบันพบว่าการปรับปรุงพันธุ์พืชนั้นการศึกษาการงอกของหลอดละอองเกสรบนอาหารสังเคราะห์จะช่วยในการตรวจสอบความสามารถในการงอกของละอองเกสรได้ (สุทิน และ รดาพร, 2554)

จิรา (2541) กล่าวว่าปัจจัยที่มีผลต่อการงอกของละอองเกสรแบ่งออกเป็น 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยภายใน เช่น ชนิดของพืช ความเข้ากันได้ระหว่างเกสรตัวผู้และตัวเมีย สัดส่วนของเพศดอก และธาตุอาหารบางชนิดที่จำเป็นต่อการงอกของละอองเกสรตัวผู้บนแอ่งเกสรตัวเมียซึ่งละอองเกสรตัวผู้จะใช้อาหารนี้เพื่อช่วยในการงอกผ่านก้านเกสรตัวเมียลงไปผสมกับไข่
ปัจจัยภายนอก เช่น อุณหภูมิหากในระหว่างการผสมอุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไปมีผลทำให้การงอกของละอองเกสรตัวผู้ลดลง ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศหากในอากาศมีความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศน้อย จะทำให้ยอดเกสรตัวเมียระเหยน้ำมากและแห้งอย่างรวดเร็วส่งผลให้โอกาสที่เกสรตัวผู้จะงอกผ่านลงไปได้จึงมีน้อย (จิรา, 2541)

จากการศึกษาการงอกของหลอดละอองเกสรบนอาหารสังเคราะห์พบว่ามีหลายปัจจัยที่มีผลต่อการงอกของหลอดละอองเกสร เช่น ความเข้มข้นของน้ำตาลโดย Fei and Nelson (2003) ได้ศึกษาการเจริญของหลอดละอองเกสรของ Creeping bentgrass พบว่าอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาล 1 M จะยับยั้งการเจริญเติบโตของหลอดละอองเกสรส่งผลให้หลอดละอองเกสรหนาและสั้น แต่เมื่อใช้น้ำตาล 0.5 M พบว่าหลอดละอองเกสรสามารถเจริญได้เป็นปรกติไม่เพียงแต่ความเข้มข้นของน้ำตาลที่มีผลต่อการงอกของหลอดละอองเกสร Nurhan (2003) พบว่าระยะเวลาที่ใช้ทดสอบนั้นมีผลต่อความสามารถในการงอกของหลอดละอองเกสร จากการศึกษาการงอกของละอองเกสรและการเจริญของหลอดละอองเกสรใน Tetraploid Red Clover (*Trifolium pretense* L.) พบว่าละอองเกสรมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุดเมื่อระยะเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง และเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดละอองเกสรจะลดลงเมื่อระยะเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง

ลาวัลย์ (2539) กล่าวว่าธาตุโบรอนมีผลต่อการเจริญเติบโตของหลอดละอองเกสร ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของกรดบอริก 0.16 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการงอกของละอองเกสร

การผสมข้ามชนิดและการแก้ปัญหาการผสมไม่ติดจากการผสมข้ามชนิด

การผสมระหว่างพืชต่างชนิด (interspecific hybridization) มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างความผันแปรทางพันธุกรรมให้เพิ่มขึ้น จะทำให้ได้พืชที่มีลักษณะใหม่ๆแต่พบว่าทำได้ยากกว่าการผสมพันธุ์ในพืชชนิดเดียวกันเนื่องจากปัญหาและอุปสรรคทั้งก่อนและภายหลังการผสม เช่น ช่วงระยะการบานของดอกไม่พร้อมกัน ละอองเกสรไม่สามารถงอกได้ในแอ่งเกสรตัวเมียหรืองอกได้แต่ไม่สามารถงอกลงไปถึงไข่ได้ ในอีกกรณีสามารถงอกลงไปผสมกับไข่แต่เอ็มบริโอหยุดการเจริญเติบโตซึ่งอาจเกิดจากความอ่อนแอของเอ็มบริโอหรืออาจเกิดจากสารยับยั้งที่อยู่ในเอนโดสเปิร์ม (เฉลิมศรี, 2549)

อุปสรรคก่อนการผสมอาจเกิดจากหลายสาเหตุเช่น ส่วนของ Stigma ผลิตสารยับยั้งการงอกของหลอดละอองเกสรอาจแก้ไขโดยลอกผิว Stigma ออก (เฉลิมศรี, 2549)ในกรณีที่หลอดละอองเกสรไม่งอกการใช้ GA ช่วยจะทำให้การงอกหลอดละอองเกสรดีขึ้นหรือการตัดก้านชูเกสรตัวเมียให้สั้นเพื่อย่นระยะทางในการงอกของละอองเกสรเป็นอีกวิธีที่จะสามารถช่วยให้ละอองเกสรงอกลงไปถึงไข่ได้(Jie Wang et al., 2009) Fukai et al. (2002) ได้ศึกษาผลของความยาวของก้านชูเกสรตัวเมีย ต่อการผสมติดของ ลิลลี่พบว่า การตัดก้านชูเกสรเพศเมียให้สั้นลงเพื่อช่วยย่นระยะทางในการงอกของละอองเกสรจะช่วยให้ติดเมล็ดดีขึ้น แต่ในการผสมข้ามสกุลไซโกตอาจพัฒนาผิดปกติ เนื่องจาก incompatibility gene หรือเอ็มบริโอไม่สามารถใช้อาหารจาก

เอนโดสเปิร์มทำให้เอ็มบริโอไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้อย่างปกติดังนั้นการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในอาหารสังเคราะห์ที่มีส่วนประกอบคล้ายกับในเอนโดสเปิร์ม จึงเป็นวิธีการช่วยชีวิตเอ็มบริโอลูกผสม

การช่วยชีวิตลูกผสมด้วยการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ

การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเป็นวิธีที่สามารถแก้ปัญหาภายหลังการผสมได้ซึ่งเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น เอ็มบริโอหยุดการพัฒนาภายหลังการผสมอาจเกิดจากสารพิษที่เกิดขึ้นในเอนโดสเปิร์ม การดึงเอ็มบริโอมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เป็นอีกวิธีที่ใช้ช่วยเหลือเอ็มบริโอจากปัญหาที่เกิดขึ้นนี้ได้ (เฉลิมศรี, 2549) ไม่เพียงแต่การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอจะช่วยแก้ปัญหาเอ็มบริโอหยุดการพัฒนาหลังการผสมเท่านั้นแต่ยังพบว่าสามารถช่วยย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์อีกด้วย (Sharma *et al*., 1996) หยกทิพย์ (2550) รายงานว่าการตึงเฉพาะเอ็มบริโอปทุมมามาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร, NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำตาล 3% จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นมากที่สุด

Arisumi (1980) ได้ศึกษาระยะการพัฒนาของเอ็มบริโอจากการผสมเทียนที่มีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกัน พบว่า คู่ผสมระหว่าง *I. auricoma* 2n = 16 และ *I. congolensis* 2n = 48 เอ็มบริโอสามารถพัฒนาได้ถึงระยะ globular เท่านั้นแต่เมื่อทำการผสมสลับเอ็มบริโอสามารถพัฒนาถึงระยะ torpedo ได้ คู่ผสมระหว่าง *I. hookeriana* 2n = 36 และ *I. campanulata* 2n = 18 เอ็มบริโอสามารถพัฒนาได้ถึงระยะ mature embryo ได้ โดยทั่วไปแล้วลูกผสมที่ได้จากคู่ผสมที่มีความแตกต่างของโครโมโซมมากๆมักจะเป็นหมัน จากการศึกษานี้พบว่าการเพาะเลี้ยงเมล็ดเทียนจากการผสมข้ามสกุลบนอาหารสังเคราะห์ที่เติมน้ำมะพร้าวซึ่งเป็นเอนโดสเปิร์มเหลวนั้นสามารถช่วยในการเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อนได้

การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญในการศึกษาด้านชีววิทยา ทั้งชีววิทยาพื้นฐานและชีววิทยาประยุกต์ สิ่งมีชีวิตที่ถูกจัดอยู่ในตำแหน่งอนุกรมวิธานเดียวกันย่อมมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกันมากกว่าสิ่งมีชีวิตที่ถูกจัดอยู่คนละกลุ่ม (ดวงกมล และคณะ, 2548) จรัสศรี และคณะ (2552) กล่าวว่าการศึกษาความหลากหลายหรือความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืช สามารถทำได้หลายวิธีซึ่งในอดีตใช้ลักษณะสัณฐาน

เป็นตัวเปรียบเทียบ แต่เนื่องจากข้อจำกัดหลายประการ ทำให้การใช้ลักษณะสัณฐานมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอในการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืช การใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลจึงเข้ามามีบทบาทเป็นอย่างมาก มินดา (2547) กล่าวว่า เทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) เป็นหนึ่งในเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมพืชตลอดจนการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มพืช รวมไปถึงการใช้เป็นข้อมูลในการทำแผนที่ยีนในพืชหลายชนิด ซึ่งอาศัยลักษณะทางสัณฐานร่วมกับการใช้เทคนิค RAPD จะทำให้การประเมินลักษณะพันธุกรรมของพืชมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น Asavatreratanakul and Asavatreratanakul (2005) ได้หาความสัมพันธ์ของกล้วยไม้รองเท้านารี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ เหลืองตรัง และขาวสตูล โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่ากล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองตรังมีความใกล้ชิดกับกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลมากกว่ากล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในปัจจุบันเทคนิคทางชีวโมเลกุลได้ถูกพัฒนาขึ้นอย่างต่อเนื่องเพื่อใช้ในการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดย Stevens et al. (2006) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียน 78 ชนิดจากการใช้ Chloroplast *atpB-rbcL* Sequences พบว่าสามารถจัดเทียนออกเป็น 15 clade ตามความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม *Impatiens chinensis* L. ถูกจัดอยู่ใน clade 10, *I. kerriae* ถูกจัดอยู่ใน clade 2 และ *I. mengtszeana* ถูกจัดอยู่ใน clade 9

การเพิ่มจำนวนโครโมโซม

ในการผสมข้ามชนิดพบว่าการเพิ่มจำนวนโครโมโซมให้มีจำนวนโครโมโซมใกล้เคียงกันก่อนผสมจะประสบความสำเร็จมากกว่า การผสมระหว่างต้นที่มีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกันมาก ซึ่งการเพิ่มชุดโครโมโซมสามารถทำได้โดยการใช้สารเคมีหลายชนิดแต่พบว่าโคลชิซินเป็นสารที่มีการใช้มากที่สุด เพราะค่าเฉลี่ยในการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์มีความสม่ำเสมอ (อดิศร, 2539) สถาพร (2555) พบว่าโคลชิซินมีคุณสมบัติในการชักนำให้มะนาวน้ำหอมมีชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับไตรฟลาลินในความเข้มข้นที่เท่ากันซึ่งพืชส่วนใหญ่ที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นนั้นพบว่าจะมีลักษณะเปลี่ยนแปลงหรือแตกต่างไปจากเดิม ธีรนิติ (2555) พบว่าต้นปทุมมาที่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เตตราพลอยด์ (2n = 4x) และออคตาพลอยด์ (2n = 8x)ใบและ ลำต้นมีขนาดใหญ่กว่าต้น ดิพลอยด์ (2n = 2x) ดวงจันทร์ (2549) พบว่าโคลชิซินที่ระดับ 800 ppm เป็นความเข้มข้นที่ให้จำนวนต้นพอลิพลอยด์มากที่สุดสำหรับปทุมมาและพบว่าต้นปทุมมาเตตราพลอยด์ และออคตาพลอยด์ มีความหนาของใบ และความยาวเซลล์คุมปากใบมากกว่าต้นดิพลอยด์ แต่มีความสูงของต้นและจำนวนปากใบต่อพื้นที่น้อยกว่าต้นดิพลอยด์ อุษา และคณะ (2552) พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ

สารโคลชิซินสูงขึ้น ความหนาของใบมีแนวโน้มสูงขึ้น ขณะที่ความสูงของต้นและจำนวนใบต่อต้นมีแนวโน้มลดลง และต้นกล้าในสารละลายโคลชิซิน เจริญเติบโตช้ากว่าชุดควบคุม รัชนี (2553) ศึกษาผลของความเข้มข้นและระยะเวลาของการให้สารโคลชิซินต่อการเจริญและเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมพบว่าเมื่อนำโพรโตคอร์มของเอื้องเงินแช่โคลชิซินความเข้มข้น 0.10 % เป็นเวลา 4 วัน สามารถชักนำให้เกิดต้นเตตราพลอยด์ได้ คล้ายกับผลการทดลองของสุลาวัลย์ และ สุมนทิพย์ (2550) พบว่าโคลชิซินความเข้มข้น 0.50 % เป็นเวลา 72 ชั่วโมงสามารถชักนำให้เกิดต้นเตตราพลอยด์ในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งได้

จากผลการตรวจเอกสารพบว่าหากต้องการพัฒนาเทียนพื้นเมืองเพื่อเป็นไม้ประดับจากการผสมข้ามชนิด ต้องศึกษาข้อมูลพื้นฐาน เช่น จำนวนโครโมโซม ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียนแต่ละชนิด ความมีชีวิตและความสามารถในการงอกหลอดเกสรบนยอดเกสรตัวเมีย การเพิ่มจำนวนโครโมโซมเพื่อช่วยในการผสม ตลอดจนการช่วยชีวิตลูกผสมภายหลังการผสม ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะสามารถช่วยในการสร้างลูกผสมของเทียนได้

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

การทดลองที่ 1 ศึกษาจำนวนโครโมโซมในเทียนชนิดต่าง ๆ

เทียนธารา

I. mengtszeana Hook. f.

เทียนน้ำกัด

I. namkatensis T. Shimizu

เทียนผาไทย

I. nalampoonii T. Shimizu

เทียนแพงพวย

I. spectabilis Triboun &

Suksathan

เทียนดอย

I. violaeflora Hook. f

เทียนสันติสุข

I. santisukii T. Shimizu

ภาพ 1 ลักษณะของดอกเทียนพื้นเมืองของไทย

เทียนชมพูสิริน

I. sirindhorniae Triboun & Suksathan

เทียนดารนี

I. daraneenae Suksathan & Triboun

เทียนตะนาวศรี

I. parishii Hook. f.

เทียนจีน

I. chinensis L.

เทียนช้องนาง

I. sp. nov. 'Thunbergioides'

เทียนนกแก้ว

I. psittacina Hook. f.

เทียนปางอุ๋ง

I. kamtilongensis Toppin

เทียนอ้ม

I. duclouxii Hook. f.

เทียนคำ

I. longiloba Craib

ภาพ 1 (ต่อ)

เทียนกาเร็ต

I. garrettii Craib

ลิ้นกุรัม

I. mirabilis Hook. f.

ภาพ 1 (ต่อ)

2. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะปลูก

2.1 Peat moss : Perlite : แกลบเผา : ปุ๋ยคอก ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 : ½

2.2 กระถางพลาสติกขนาด 6 นิ้ว 8 นิ้ว และ12 นิ้ว

3. อุปกรณ์ในการศึกษาจำนวนโครโมโซมของเทียนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ชิ้นส่วนปลายราก, แผ่นสไลด์ (slide), จานแก้ว (petri-dish), หลอดหยด (dropper), แผ่นปิดสไลด์ (cover slip), ปากคีบปลายแหลม (forceps) และใบมีดผ่าตัด

4. สารเคมีต่างๆ

4.1 8-hydroxychinoline ความเข้มข้น 0.02 M

4.2 Acetic acid : Ethanol อัตราส่วน 3:1

4.3 Hydrochloric acid ความเข้มข้น 1 M

4.4 สีย้อม Acetone orcein ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

5. กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope)

การทดลองที่ 2 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียนพื้นเมืองโดยใช้เทคนิค RAPD (Random amplified polymorphic DNA)

1. เทียนพื้นเมืองของไทย 17 ชนิด

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 (eppendrof tube) ขนาด 0.2 มิลลิลิตร, ไมโครไปเปท (micro pipette), จานแก้ว (petri-dish),มีดผ่าตัด และปากคีบปลายแหลม (forceps)

3. เครื่องวิเคราะห์แถบ DNA (Gel Document)

4. สารเคมีต่างๆ ที่ใช้สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

4.1 Extraction buffer ประกอบด้วย

- 0.6 M NaCl
- 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5)
- 40 mM EDTA (pH 8.0)
- 1% SDS
- 5 M Urea
- 10 mM 2-Mercaptoethanol
- 10% Phenol
- น้ำกลั่นนึ่งสำหรับปรับปริมาตร

4.2 PCI อัตราส่วน 25 : 24 : 1 ประกอบด้วย

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

4.3 TE buffer ประกอบด้วย

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

ตาราง 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียน 24 ไพรเมอร์

Code	Sequence 5' to 3'	Code	Sequence 5' to 3'
OPU 03	CTCTGCCGAC	S 27	GAAACGGGTG
OPU 05	TTGGCGGCCT	S 28	GTGACGTAGG
OPU 06	ACCTTTGCGG	S 29	GGGTAACGCC
OPU 07	CCTGCTCATC	S 30	GTGATCGCAG
OPU 12	TCACCAGCCA	S 31	CAATCGCCGT
OPU 13	GGCTGGTTCC	S 32	TCGGCGATAG
S 21	CAGGCCCTTC	S 33	CAGCACCCAC
S 22	TGCCGAGCTG	S 34	TCTGTGCTGG
S 23	AGTCAGCCAC	S 35	TTCCGAACCC
S 24	AATCGGGCTG	S 36	AGCCAGCGAA
S 25	AGGGGTCTTG	S 38	AGGTGACCGT
S 26	GGTCCCTGAC	S 40	GTTGCGATCC

การทดลองที่ 3 ศึกษาความมีชีวิตและความสามารถในการงอกของละอองเกสร

1. ละอองเกสรของเทียนพื้นเมืองไทย 17 ชนิด

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

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

4. สารเคมีต่างๆ

4.1 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 4 N

4.2 สีย้อม Aniline blue ความเข้มข้น 0.01 M

4.3 สีย้อม Acetone carmine ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

4.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับเลี้ยงละอองเกสร (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

5. กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope) และ กล้องฟลูออเรสเซนต์ (Fluoresence microscope) (Nikon Eclipse 80i Epi-Fl Attachment)

การทดลองที่ 4 ศึกษาความสามารถในการผสมข้ามชนิดของเทียน

1. เทียนพื้นเมืองของไทย 11 ชนิด และเทียนพันธุ์การค้า 2 ชนิด คือ เทียนบ้าน (*I. balsamina*) และเทียนญี่ปุ่น (*I. walleriana*)

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

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

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

5. สารเคมีต่างๆ

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

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

5.3 สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962) ประกอบด้วย

ตาราง 2 สูตรอาหารของ Murashige and Skoog

สารเคมี	ปริมาณ (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 5 ศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมของเทียนพื้นเมืองและการตรวจสอบ

1. เทียนพื้นเมืองของไทย 4 ชนิด ได้แก่ เทียนสันติสุข เทียนดอย เทียนธารา และเทียนอ้ม

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. อุปกรณ์ในการตรวจสอบจำนวนโครโมโซม ได้แก่ ชิ้นส่วนปลายราก, แผ่นสไลด์ (slide), จานแก้ว (petri-dish), หลอดหยด (dropper), แผ่นปิดสไลด์ (cover slip), ปากคีบปลายแหลม (forceps)และใบมีดผ่าตัด

5. สารเคมีต่างๆ

5.1 สารโคลชิซิน (colchicine) ความเข้มข้น 800 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.2 8-hydroxychinoline ความเข้มข้น 0.02 M

5.3 Acetic acid : Ethanol อัตราส่วน 3:1

5.4 Hydrochloric acid ความเข้มข้น 1 M

5.5 สีย้อม Acetone orcein ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

5.6 สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962)

6. กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope)

วิธีการวิจัย

การทดลองที่ 1 ศึกษาจำนวนโครโมโซมในเทียนชนิดต่าง ๆ

ศึกษาจำนวนโครโมโซมของเทียนพื้นเมือง 17 ชนิดได้แก่ เทียนชมพูสิริน (*I. sirindhornine*), เทียนดอย(*I. violaeflora*), เทียนสันติสุข (*I. santisukii*), เทียนผาไทย (*I. nalampoonii*), เทียนตะนาวศรี (*I. parishii*), เทียนธารา (*I. mengtszena*), เทียนนกแก้ว (*I. psittacina*), เทียนน้ำกัด (*I. namkatensis*), เทียนจีน (*I. chinensis*), เทียนดารนี (*I. daraneenae*), เทียนแพงพวย (*I. spectabilis*), เทียนปางอุ๋ง (*I. kamtilongensis*), เทียนอ้ม (*I.duclouxii*), เทียนช้องนาง (*I. sp. nov.* 'Thunbergioides'), ลิ้นกุรัม (*I. mirabilis.*), เทียนคำ (*I. longiloba*), เทียนกาเร็ต (*I. garettii*)

พืชแต่ละชนิดทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำทำการสุ่มนับจำนวนโครโมโซม โดยตัดชิ้นส่วนปลายรากยาว 1 เซนติเมตร มาล้างทำความสะอาด แช่ใน 8-hydroxyquinoline ความเข้มข้น 0.02 M นาน 50 นาที จากนั้นนำไปแช่ Acetic acid: Ethanol (3:1) นาน 40 นาที ล้างชิ้นส่วนปลายรากด้วยน้ำกลั่นนำชิ้นส่วนปลายรากแช่ใน Hydrochloric ที่มีความเข้มข้น 1 M นาน 5 นาที จากนั้นซับ Hydrochloric ด้วยกระดาษทิชชู ก่อนย้อมเนื้อเยื่อปลายรากด้วยสีย้อม Acetone orcein นาน 10 นาที ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์แล้วกดนิ้วหัวแม่มือลงไปเพื่อให้เซลล์อยู่ในระนาบก่อนนำไปส่องดูได้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกภาพจำนวนโครโมโซมของเทียนในระยะเมทาเฟส

การบันทึกข้อมูล

1. จำนวนโครโมโซมเฉลี่ยของเทียนแต่ละชนิด โดยคำนวณจาก

$$\text{จำนวนโครโมโซม} = \frac{\text{ผลบวกจำนวนโครโมโซมต่อเซลล์ที่นับได้ทั้งหมด}}{\text{จำนวนเซลล์ที่ทำการนับทั้งหมด}}$$

การทดลองที่ 2 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียนพื้นเมืองโดยใช้เทคนิค RAPD (Random amplified polymorphic DNA)

ทำการศึกษาหาความสัมพันธุ์ทางพันธุกรรมของเทียนพื้นเมืองทั้ง 17 ชนิดโดยใช้เทคนิค RAPD (Random amplified polymorphic DNA)

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

1. นำใบอ่อนของพืชที่ต้องการตรวจสอบมาทำการบดร่วมกับ extraction buffer จนชิ้นส่วนใบอ่อนของพืชละเอียด

2. เติม Phenol : Chloroform : Iso-amyl alcohol (25: 24 : 1) 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 แล้วล้างดีเอ็นเอด้วย Ethanol 95% และ 70% อย่างละครั้ง

I0. 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 24 ไพรเมอร์ คือ OPU3, OPU5, OPU6, OPU7, OPUI2, OPUI3, S21, S22, S23, S24, S25, S26, S27, S28, S29, S30, S31, S32, S33, S34, S35, S36, S38 และ S40

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 เจลอิเล็คโครโฟเรซิส

การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอโดยการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยแสง UV

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Gene directory จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี UPGMA

การทดลองที่ 3 ศึกษาความมีชีวิตและความสามารถในการงอกของละอองเกสร

3.1 การศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสร

ทำการวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) มี 17 สิ่งทดลอง ในแต่ละสิ่งทดลองทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำในแต่ละซ้ำทำการสุ่มนับการติดสีของละอองเกสร จำนวน 5 ตำแหน่ง/สไลด์ โดยเขี่ยละอองเกสรดัวผู้ที่พร้อมจะผสมลงบนแผ่นสไลด์ จากนั้นทำการย้อมด้วยสีย้อม Acetone carmine ประมาณ 20 นาที นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูการติดสีของละอองเกสร 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 New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.2 ทดสอบความสามารถในการงอกของหลอดละอองเกสรบนอาหารสังเคราะห์

ทำการวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) มี 17 สิ่งทดลอง ในแต่ละสิ่งทดลองทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำในแต่ละซ้ำทำการสุ่มนับการงอกของละอองเกสรจำนวน 5 ตำแหน่ง/ สไลด์ โดยใช้อาหารสังเคราะห์ร่วมกับน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้น 10% ตามการทดลองของหยกทิพย์ (2550) มาหยดลงบนแผ่นสไลด์จากนั้นเขี่ยละอองเกสรลงบนแผ่นสไลด์ ทำ hanging drop technique ในกล่องพลาสติกใสใส่น้ำพอประมาณปิดฝากล่องเพื่อรักษาความชื้นให้กับละอองเกสรเป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วจึงนำแผ่นสไลด์ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูการงอกของละอองเกสร

การบันทึกข้อมูล

1. เปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดละอองเกสร โดยคำนวณจาก

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

การนับละอองเกสรที่งอกจะทำการนับละอองเกสรที่งอกยาวมากกว่า 2 เท่าของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของละอองเกสรเป็นเกณฑ์

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

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

3.3 ทดสอบความสามารถในการงอกของหลอดละอองเกสร (pollen tube) บนยอดเกสรเพศเมีย(stigma surface)จากการผสมสลับพ่อสลับแม่ระหว่างเทียน 11 ชนิด ได้แก่ เทียนชมพูสิริน, เทียนดอย, เทียนสันติสุข, เทียนตะนาวศรี, เทียนธารา, เทียนจีน, เทียนดารนี, เทียนแพงพวย, เทียนผาไทย, เทียนอ้ม และ ลิ้นกุรัม ในแต่ละสิ่งทดลองทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ดอก โดยนำเกสรเพศเมียในแต่ละคู่ผสม ที่ได้รับการผสมแล้ว เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแช่ในโซเดียมไฮดอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 4 N เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นทำการย้อมด้วยสี Aniline blue ความเข้มข้น 0.01 M เป็นเวลา 30 นาที และทำความสะอาดเซลล์ด้วยการล้างน้ำกลั่น หลังจากนั้นนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (Fluoresence microscope) (Nikon Eclipse 80i Epi-Fl Attachment)

การบันทึกข้อมูล

ตรวจสอบความสามารถในการงอกของหลอดละอองเกสรบนยอดเกสรเพศเมีย (stigma) และการงอกหลอดลงในก้านเกสรเพศเมีย (style) พร้อมบันทึกภาพ

การทดลองที่ 4 ศึกษาความสามารถในการผสมข้ามชนิดของเทียน

4.1 ทำการผสมสลับพ่อสลับแม่ระหว่างเทียนพื้นเมือง 11 ชนิด ช่วงเวลา 8.00 -10.00 น. ในแต่ละสิ่งทดลองทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำทำการผสมเกสรจำนวน 10 ดอก

4.2 ทำการผสมข้ามชนิดระหว่างเทียนพื้นเมืองและเทียนพันธุ์การค้า โดยวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) มี 12 สิ่งทดลอง (คู่ผสม) ในแต่ละสิ่งทดลองทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ๆละ 10 ดอก ดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 *I. violaeflora* X *I. balsamina*

สิ่งทดลองที่ 2 *I. violaeflora* X *I. walleriana*

สิ่งทดลองที่ 3 *I. parishii* X *I. balsamina*

สิ่งทดลองที่ 4 *I. parishii* X *I. walleriana*

สิ่งทดลองที่ 5 *I. spectabilis* X *I. balsamina*

สิ่งทดลองที่ 6 *I. spectabilis* X *I. walleriana*

สิ่งทดลองที่ 7 *I. balsamina* X *I. violaeflora*

สิ่งทดลองที่ 8 *I. balsamina* X *I. parishii*

สิ่งทดลองที่ 9 *I. balsamina* X *I. spectabilis*

สิ่งทดลองที่ 10 *I. walleriana* X *I. violaeflora*

สิ่งทดลองที่ 11 *I. walleriana* X *I. parishii*

สิ่งทดลองที่ 12 *I. walleriana* X *I. spectabilis*

ขั้นตอนในการผสมเกสร

1. ห่อดอกอ่อนด้วยสำลี

2. ดึงเกสรตัวผู้ออกจากยอดเกสรตัวเมีย

3. ใช้ปากคีบปลายแหลม (forceps) เขี่ยเกสรตัวผู้จากดอกที่ต้องการมาแตะบริเวณบนยอดเกสรตัวเมีย (stigma surface)

4. แขวนป้ายระบุชื่อคู่ผสม วันที่ผสม และเวลาที่ทำการผสม

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 New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4.3 การเพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อน (immature seed rescue) โดยการนำผลของลูกผสมอายุ 10 - 15 วันหลังผสม ในแต่ละคู่ผสมทั้งหมด 8 คู่ผสม ได้แก่ คู่ผสมระหว่าง *I. chinensis* X *I. violaeflora*, *I. duclouxii* X *I. violaeflora*, *I. nalampoonii* X *I. spectabilis*, *I. santisukii* X *I. violaeflora*, *I. violaeflora* X *I. santisukii*, *I. spectabilis* X *I. walleriana*, *I. balsamina* X *I. parishii* และ *I. walleriana* X *I. spectabilis* มาทำความสะอาดโดยการฟอกด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (ที่มีความเข้มข้นของคลอรีน 1%) เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆ ละ10 นาที ในตู้ปลอดเชื้อ ผึ่งให้แห้งบนกระดาษที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นนำเมล็ดไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962) โดยเติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร, NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, GA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร, น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 7 กรัมต่อลิตร นำไปเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้หลอดฟลูออเรสเซ็นต์ที่มีความเข้มแสง 36 $\mu mol/m^2/s$

การบันทึกข้อมูล

1. เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่งอก โดยคำนวณจาก

$$\frac{\text{จำนวนเมล็ดที่งอก}}{\text{จำนวนเมล็ดที่ทำการเพาะทั้งหมด}} \times 100$$

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

4.4 ศึกษาการตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกโดยทำการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะดอกของลูกผสมกับสายพันธุ์แม่และสายพันธุ์พ่อ จำนวน 6 คู่ผสม ได้แก่ คู่ผสมระหว่าง *I. duclouxii* X *I. violaeflora*, *I. santisukii* X *I. violaeflora*, *I. violaeflora* X *I. santisukii*, *I. spectabilis* X *I. walleriana*, *I. balsamina* X *I. parishii* และ *I. walleriana* X *I. spectabilis*

การทดลองที่ 5 ศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมของเทียนพื้นเมืองและการตรวจสอบ

5.1 ในการศึกษานี้ ได้ใช้เทียนพื้นเมือง 4 ชนิดได้แก่ *I. santisukii* *I. violaeflora* *I. mengtszena* และ *I. duclouxii* มาทำการชักนำให้เกิดต้นในสภาพปลอดเชื้อ และทำให้เกิดยอดจำนวนมากโดยนำตาข้างมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 5.75 เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 16 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายชิ้นส่วนเทียนไปยังอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง 16 ชั่วโมง หลังจากนั้น ให้สารโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 800 มิลลิกรัมต่อลิตร, 600 มิลลิกรัมต่อลิตร, 400

มิลลิกรัมต่อลิตร, 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการหยดลงบริเวณส่วนที่มีการพัฒนาของตาอ่อนและ Control (ชิ้นส่วนที่ไม่ได้รับสารโคลชิซิน)

การบันทึกข้อมูล

1. เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่อยู่รอดหลังการให้สารโคลชิซิน โดยคำนวณจาก

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

2. วัดระดับการเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซม (ตามวิธีการดังการทดลองที่ 1)

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

5.2 การทดสอบความสามารถในการผสมเกสรของต้นที่ได้รับการเพิ่มปริมาณโครโมโซม โดยทำการวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) มี 5 สิ่งทดลอง (คู่ผสม) ในแต่ละสิ่งทดลองทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ๆละ 5 ดอก ดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1. *I. namkatensis* (2n = 2x) X *I. violaeflora* (2n = 4x)

สิ่งทดลองที่ 2. *I. mirabilis* (2n = 2x) X *I. violaeflora* (2n = 4x)

สิ่งทดลองที่ 3. *I. parishii* (2n = 2x) X *I. violaeflora* (2n = 4x)

สิ่งทดลองที่ 4. *I. spectabilis* (2n = 2x) X *I. violaeflora* (2n = 4x)

สิ่งทดลองที่ 5. *I. sirindhorniae* (2n = 2x) X *I. violaeflora* (2n = 4x)

โดยมีขั้นตอนในการผสมเกสรตามวิธีการดังการทดลองที่ 3

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 ศึกษาจำนวนโครโมโซมในเทียนชนิดต่าง ๆ

ผลการศึกษาจำนวนโครโมโซมของเทียนพบว่า เทียนพื้นเมืองของไทยมีจำนวนโครโมโซมที่ต่างกันตั้งแต่ 2n = 10 ถึง 2n = 34 (ตาราง 3) โดย *I. santisukii* 2n = 10, *I. violaeflora* 2n = 12, *I. garrettii* 2n =14, *I. chinensis* 2n = 16, *I. duclouxii* 2n = 16, *I. mengtzeana* 2n = 16, *I. kamtilongensis* 2n = 16, *I. longiloba* 2n = 18, *I. namkatensis* 2n = 20, *I. mirabilis* 2n = 30, *I. nalampoonii* 2n = 32, *I. sirindhorniae* 2n = 32, *I. spectabilis* 2n = 32, *I. sp. nov.* 'Thunbergioides' 2n = 32, *I. daraneenae* 2n = 34, *I. parishii* 2n = 34 และ *I. psittacina* 2n = 34

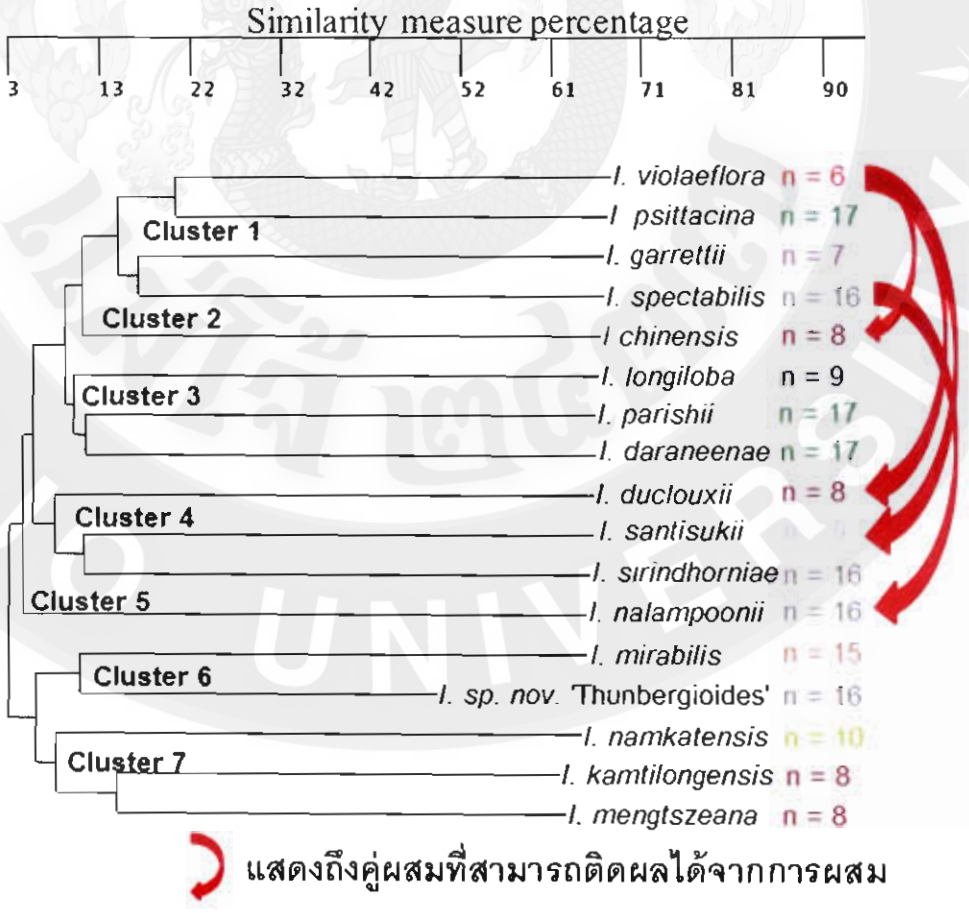
ตาราง 3 จำนวนโครโมโซมของเทียนพื้นเมือง 17 ชนิด ในประเทศไทย

Impatiens	Chromosome Number
I. santisukii T. Shimizu	2n = 10
I. violaeflora Hook.f	2n = 12
I. garrettii Craib	2n = 14
I. chinensis L.	2n = 16
I. duclouxii Hook. f.	2n = 16
I. mengtszeana Hook.f.	2n = 16
I. kamtilongensis Toppin	2n = 16
I. longiloba Craib	2n = 18
I. namkatensis T.Shimizu	2n = 20
I. mirabilis Hook. f.	2n = 30
I. nalampoonii T. Shimizu	2n = 32
I. sirindhorniae Triboun & Suksathan	2n = 32
I. spectabilis Triboun & Suksathan	2n = 32
I. sp. nov. 'Thunbergioides'	2n = 32
I. daraneenae Suksathan & Triboun	2n = 34
I. parishii Hook.f.	2n = 34
I. psittacina Hook. f.	2n = 34

การทดลองที่ 2 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียนพื้นเมือง

โดยใช้เทคนิค RAPD (Random amplified polymorphic DNA)

ผลการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียนพื้นเมืองทั้ง 17 ชนิด โดยใช้เทคนิค RAPD (Random amplified polymorphic DNA) ร่วมกับการใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 24 ไพรเมอร์ สามารถแยกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียนตามความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้ 7 Cluster ดังภาพ 2 Cluster 1 ประกอบด้วย *I. violaeflora*, *I. psittacina*, *I. garrettii* และ *I. spectabilis* Cluster 2 ประกอบด้วย *I. chinensis* Cluster 3 ประกอบด้วย *I. longiloba*, *I. parishii* และ *I. daraneenae* Cluster 4 ประกอบด้วย *I. duclouxii*, *I. santisukii* และ *I. sirindhorniae* Cluster 5 ประกอบด้วย *I. nalampoonii* Cluster 6 ประกอบด้วย *I. mirabilis* และ *I. sp. nov.* 'Thunbergioides' Cluster 7 ประกอบด้วย *I. namkatensis*, *I. kamtilongensis* และ *I. mengtzeana*



ภาพ 2 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียนพื้นเมือง 17 ชนิดในประเทศไทย

การทดลองที่ 3 ศึกษาความมีชีวิตและความสามารถในการงอกของละอองเกสร

3.1 ผลการทดสอบความมีชีวิตของละอองเกสร

จากการศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสรของเทียนพื้นเมือง 17 ชนิด พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยชนิดที่มีความมีชีวิตของละอองเกสรมากที่สุด คือ *I. mirabilis*, *I. longiloba*, *I. sirindhorniae*, *I. nalampoonii*, *I. namkatensis* และ *I. spectabilis* มีความมีชีวิตของละอองเกสร 99.77, 99.76, 99.62, 99.62, 99.54 และ 99.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ *I. parishii*, *I. violaeflora* , *I. santisukii* , *I. sp. nov.* 'Thunbergioides', *I. garrettii*, *I. mengtszeana* , *I. chinensis*, *I. duclouxii*, *I. daraneenae* และ *I. kamtilongensis* มีความมีชีวิตของละอองเกสรเท่ากับ 96.32, 94.57 , 93.63, 93.63, 91.00 , 90.60, 89.74, 89.74, 74.88 และ74.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และชนิดที่ไม่พบละอองเกสรที่มีชีวิตคือ *I. psittacina* (ตาราง 4)

3.2 ผลการทดสอบความสามารถในการงอกหลอดละอองเกสรบนอาหารสังเคราะห์

จากการศึกษาความสามารถในการงอกหลอดละอองเกสรของเทียนพื้นเมือง 17 ชนิด ในอาหารเลี้ยงละอองเกสรที่ประกอบด้วยน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 60 นาที พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย *I. mirabilis*, *I. spectabilis* และ *I. santisukii* มีความสามารถในการงอกหลอดเกสรมากที่สุดคือ 92.85, 92.85 และ 92.76 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ รองลงมาคือ *I. sp. nov.* 'Thunbergioides', *I. sirindhorniae*, *I. daraneenae*, *I. violaeflora*, *I. aff.toppinii*, *I. chinensis*, *I. mengtzeana*, *I. namkatensis*, *I. parishii*, *I. duclouxii*, *I. nalampoonii*, *I. garrettii* และ *I. longiloba* มีความสามารถในการงอกหลอดเกสร 89.88, 89.44, 78.61, 69.71, 69.71, 66.07, 65.57, 58.05, 48.69, 48.47, 48.34, 40.53 และ 28.72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และชนิดที่ไม่พบการงอกหลอดละอองเกสรคือ *I. psittacina* (ตาราง 4)

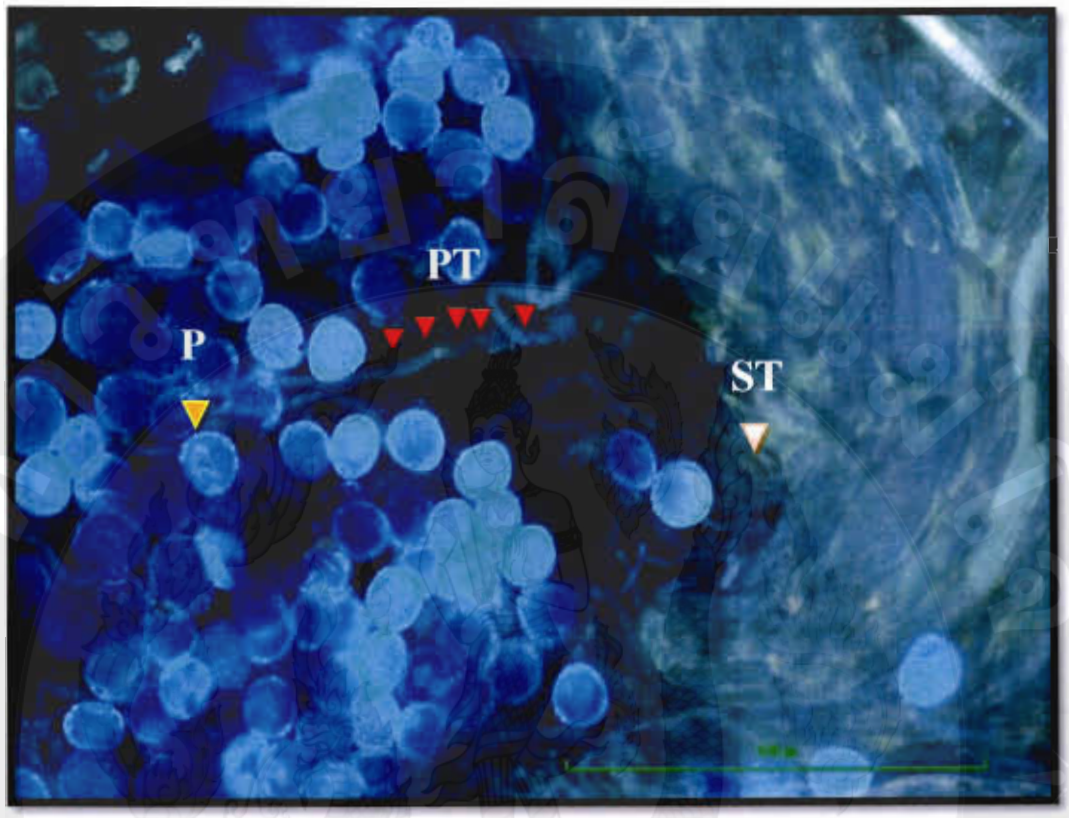
ตาราง 4 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการงอกหลอดของละอองเกสรของเทียนพื้นเมือง 17 ชนิด

ชนิด	ความมีชีวิตของละอองเกสร (%)	ความสามารถในการงอกหลอดของละอองเกสร (%)
I. kamtilongensis	74.88^{e}	69.71^{cd}
I. chinensis	89.74^{cd}	66.07^{d}
I. daraneenae	74.88^{e}	78.61^{ab}
I. duclouxii	89.74^{cd}	48.47^{ef}
I. garrettii	91.00^{cd}	40.53^{f}
I. longiloba	99.76^{a}	28.72^{g}
I. mengtszeana	90.60^{cd}	65.57^{d}
I. mirabilis	99.77^{a}	92.85^{a}
I. nalampoonii	99.62^{a}	48.34^{ef}
I. namkatensis	99.54^{a}	58.05^{de}
I. parishii	96.32^{b}	48.69^{ef}
I. psittacina	0.00^{f}	0.00^{h}
I. santisukii	93.63^{bc}	92.76^{a}
I. sirindhorniae	99.62^{a}	89.44^{ab}
I. spectabilis	99.20^{a}	92.85^{a}
I. sp. nov. 'Thunbergioides'	93.63^{bc}	89.88^{ab}
I. violaeflora	94.57^{b}	69.71^{cd}
Sig.	**	**
C.V. (%)	1.93	10.71

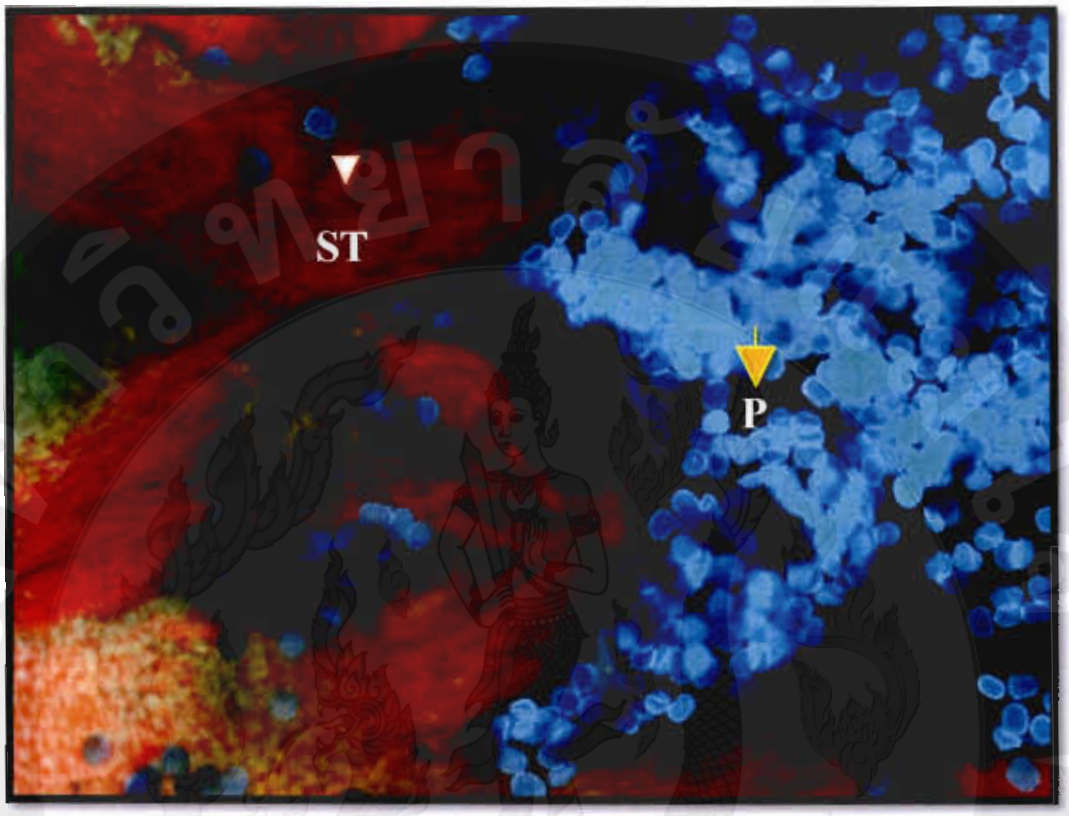
หมายเหตุ ** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %
ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % เมื่อทดสอบด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3.3 ผลการทดสอบความสามารถในการงอกของละอองเกสร (pollen) บนยอดเกสรเพศเมีย (stigma surface) และการงอกของหลอดละอองเกสรลงในก้านชูเกสรเพศเมีย

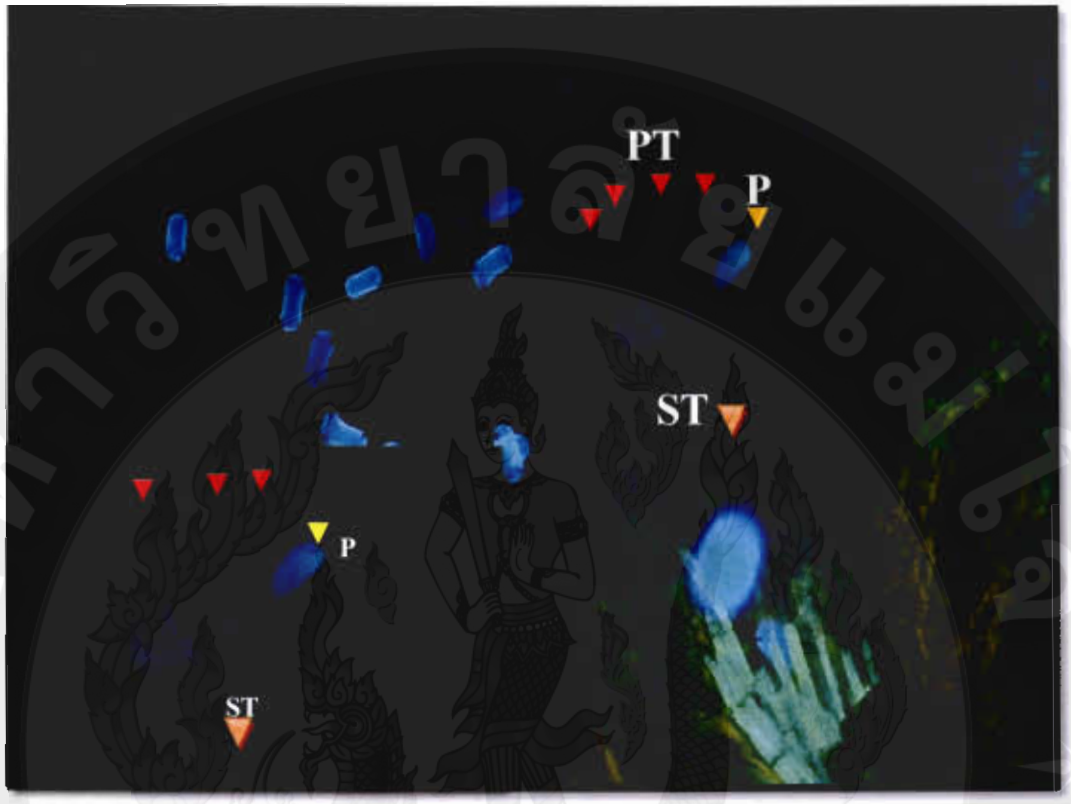
จากการศึกษาความสามารถในการงอกของละอองเกสรบนยอดเกสรเพศเมียและการงอกหลอดเกสรลงในก้านชูเกสรเพศเมียนั้น พบว่า ละอองเกสรของ *I. chinensis* สามารถงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมียของ *I. duclouxii*, *I. nalampoonii*, *I. santisukii* และ *I. violaeflora* ละอองเกสรของ *I. daraneenae* สามารถงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมียของ *I. chinensis*, *I. duclouxii*, *I. nalampoonii*, *I. parishii*, *I. santisukii*, *I. sirindhorniae* และ *I. violaeflora* ละอองเกสรของ *I. duclouxii* สามารถงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมียของ *I. chinensis* และ *I. nalampoonii* ละอองเกสรของ *I. mengtszeana* สามารถงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมียของ *I. chinensis* และ *I. nalampoonii* ละอองเกสรของ *I. mirabilis* สามารถงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมียของ *I. chinensis*, *I. daraneenae* และ *I. duclouxii* ละอองเกสรของ *I. nalampoonii* สามารถงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมียของ *I. santisukii*, *I. sirindhorniae*, *I. spectabilis* และ *I. violaeflora* ละอองเกสรของ *I. parishii* สามารถงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมียของ *I. chinensis*, *I. duclouxii* และ *I. mirabilis* ละอองเกสรของ *I. santisukii* สามารถงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมียของ *I. violaeflora* ละอองเกสรของ *I. sirindhorniae* สามารถงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมียของ *I. duclouxii* ละอองเกสรของ *I. spectabilis* สามารถงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมียของ *I. mirabilis* และ *I. nalampoonii* ละอองเกสรของ *I. violaeflora* สามารถงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมียของ *I. chinensis*, *I. duclouxii* และ *I. santisukii* ละอองเกสรของ *I. chinensis* สามารถงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมีย แต่ไม่สามารถงอกหลอดเกสรลงในก้านชูเกสรเพศเมียของ *I. spectabilis* ละอองเกสรของ *I. nalampoonii* สามารถงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมีย แต่ไม่สามารถงอกหลอดเกสรลงในก้านชูเกสรเพศเมียของ *I. spectabilis* และ *I. mirabilis* ละอองเกสรของ *I. parishii* สามารถงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมีย แต่ไม่สามารถงอกหลอดเกสรลงในก้านชูเกสรเพศเมียของ *I. nalampoonii* ละอองเกสรของ *I. santisukii* สามารถงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมีย แต่ไม่สามารถงอกหลอดเกสรลงในก้านชูเกสรเพศเมียของ *I. nalampoonii* ละอองเกสร *I. sirindhorniae* สามารถงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมีย แต่ไม่สามารถงอกหลอดเกสรลงในก้านชูเกสรเพศเมียของ *I. mirabilis* และ *I. nalampoonii* ละอองเกสร *I. spectabilis* สามารถงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมีย แต่ไม่สามารถงอกหลอดเกสรลงในก้านชูเกสรเพศเมียของ *I. duclouxii*



ภาพ 3 หลอดเกสร (PT) ของ *I. santisukii* สามารถงอกบนยอดเกสรเพศเมีย (ST) และสามารถงอกผ่านก้านชูเกสรเพศเมียของ *I. violaeflora* ; P = ละอองเกสร



ภาพ 4 ละอองเกสร (P ของ) *I. spectabilis* ไม่สามารถงอกหลอดลงบนยอดเกสรเพศเมีย (ST) ของ *I. santisukii* ได้



ภาพ 5 ละอองเกสร (P) ของ *I. daraneenae* งอกหลอดลงบนยอดเกสรเพศเมีย (ST) แต่ไม่สามารถงอกหลอดลงในก้านชูเกสรเพศเมียของ *I. violaeflora* ได้ ; PT = หลอดเกสร

การทดลองที่ 4 ศึกษาความสามารถในการผสมข้ามชนิดของเทียน

4.1 ผลการผสมสลับพ่อสลับแม่ระหว่างเทียนพื้นเมือง 11 ชนิด

เปอร์เซ็นต์การผสมติดจากการศึกษาการผสมเกสรโดยการผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่มของเทียนจำนวน 110 คู่ผสม (ตาราง 4) พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยคู่ผสมระหว่าง *I. santisukii* X *I. violaeflora* มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดมากที่สุดคือ 8.66 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือคู่ผสมระหว่าง *I. violaeflora* X *I. santisukii*, *I. duclouxii* X *I. violaeflora*, *I. chinensis* X *I. violaeflora* และ *I. nalampoonii* X *I. spectabilis* มีเปอร์เซ็นต์การผสมติด 8.44, 8.44, 0.05 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนคู่ผสมอื่น นั้นไม่สามารถผสมติด

จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลจากการผสมข้ามชนิดพบว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยคู่ผสมระหว่าง *I. violaeflora* X *I. santisukii* มีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลมากที่สุดคือ 6.33 เมล็ดต่อผล รองลงมาคือคู่ผสมระหว่าง *I. santisukii* X *I. violaeflora*, *I. nalampoonii* X *I. spectabilis*, *I. chinensis* X *I. violaeflora* และ *I. duclouxii* X *I. violaeflora* มีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล 4.66, 2.66, 2.33 และ 1.33 เมล็ดต่อผล ตามลำดับ

เปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์จากการผสมข้ามชนิดนั้น ได้จากจำนวนเมล็ดของผลจากคู่ผสมที่มีการผสมติด พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยคู่ผสมระหว่าง *I. santisukii* X *I. violaeflora* มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์มากที่สุด คือ 93.33 เปอร์เซ็นต์ คู่ผสมระหว่าง *I. chinensis* X *I. violaeflora*, *I. violaeflora* X *I. santisukii*, *I. duclouxii* X *I. violaeflora* และ *I. nalampoonii* X *I. spectabilis* มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์รองลงมา คือ 88.88, 84.91, 83.33 และ 66.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตาราง 5 เปอร์เซ็นต์การผสมติด จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล และเปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์ของการผสมสลับพ่อสลับแม่ระหว่างเทียนพื้นเมือง 11 ชนิด

สายพันธุ์คู่ผสม	เปอร์เซ็นต์การผสมติด (%)	จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล (เมล็ด)	เปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์ (%)
I. chinensis X *I. daraneenae*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00^{d}
I. chinensis X *I. duclouxii*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00^{d}
I. chinensis X *I. mengtzeana*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00^{d}
I. chinensis X *I. mirabilis*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00^{d}
I. chinensis X *I. nalampoonii*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00^{d}
I. chinensis X *I. parishii*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00^{d}
I. chinensis X *I. santisukii*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00^{d}
I. chinensis X *I. sirindhorniae*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00^{d}
I. chinensis X *I. spectabilis*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00^{d}
I. chinensis* X *I. violaeflora	**0.55^{c}**	**2.33^{d}**	**88.88^{ab}**
I. daraneenae X *I. chinensis*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00^{d}
I. daraneenae X *I. duclouxii*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00^{d}
I. daraneenae X *I. mengtzeana*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00^{d}
I. daraneenae X *I. mirabilis*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00^{d}
I. daraneenae X *I. nalampoonii*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00^{d}
I. daraneenae X *I. parishii*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00^{d}
I. daraneenae X *I. santisukii*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00^{d}
I. daraneenae X *I. sirindhorniae*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00^{d}
I. daraneenae X *I. spectabilis*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00^{d}
I. daraneenae X *I. violaeflora*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00^{d}
I. duclouxii X *I. daraneenae*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00^{d}
I. duclouxii X *I. chinensis*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00^{d}
I. duclouxii X *I. mengtzeana*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00^{d}
I. duclouxii X *I. mirabilis*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00^{d}
I. duclouxii X *I. nalampoonii*	0.00^{d}	0.00^{f}	0.00

ตาราง 5 (ต่อ)

สายพันธุ์คู่ผสม	เปอร์เซ็นต์การผสมติด (%)	จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล (เมล็ด)	เปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์ (%)
I. duclouxii X *I. parishii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. duclouxii X *I. santisukii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. duclouxii X *I. sirindhorniae*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. duclouxii X *I. spectabilis*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. duclouxii* X *I. violaeflora	**8.44[b]**	**1.33[e]**	**83.33[b]**
I. mengtzeana X *I. daraneenae*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. mengtzeana X *I. duclouxii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. mengtzeana X *I. chinensis*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. mengtzeana X *I. mirabilis*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. mengtzeana X *I. nalampoonii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. mengtzeana X *I. parishii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. mengtzeana X *I. santisukii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. mengtzeana X *I. sirindhorniae*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. mengtzeana X *I. spectabilis*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. mengtzeana X *I. violaeflora*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. mirabilis X *I. daraneenae*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. mirabilis X *I. duclouxii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. mirabilis X *I. mengtzeana*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. mirabilis X *I. chinensis*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. mirabilis X *I. nalampoonii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. mirabilis X *I. parishii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. mirabilis X *I. santisukii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. mirabilis X *I. sirindhorniae*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. mirabilis X *I. spectabilis*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. mirabilis X *I. violaeflora*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. nalampoonii X *I. daraneenae*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]

ตาราง 5 (ต่อ)

สายพันธุ์คู่ผสม	เปอร์เซ็นต์การผสมติด (%)	จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล (เมล็ด)	เปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์ (%)
I. nalampoonii X *I. duclouxii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. nalampoonii X *I. mengtzeana*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. nalampoonii X *I. mirabilis*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. nalampoonii X *I. chinensis*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. nalampoonii X *I. parishii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. nalampoonii X *I. santisukii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. nalampoonii X *I. sirindhorniae*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. nalampoonii* X *I. spectabilis	**0.55[c]**	**2.66[c]**	**66.66[c]**
I. nalampoonii X *I. violaeflora*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. parishii X *I. daraneenae*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. parishii X *I. duclouxii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. parishii X *I. mengtzeana*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. parishii X *I. mirabilis*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. parishii X *I. chinensis*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. parishii X *I. nalampoonii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. parishii X *I. santisukii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. parishii X *I. sirindhorniae*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. parishii X *I. spectabilis*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. parishii X *I. violaeflora*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. santisukii X *I. daraneenae*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. santisukii X *I. duclouxii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. santisukii X *I. mengtzeana*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. santisukii X *I. mirabilis*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. santisukii X *I. chinensis*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. santisukii X *I. nalampoonii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]

ตาราง 5 (ต่อ)

สายพันธุ์คู่ผสม	เปอร์เซ็นต์การผสมติด (%)	จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล (เมล็ด)	เปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์ (%)
I. santisukii X *I. parishii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. santisukii X *I. sirindhorniae*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. santisukii X *I. spectabilis*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. santisukii* X *I. violaeflora	**8.66[a]**	**4.66[b]**	**93.33[a]**
I. sirindhorniae X *I. daraneenae*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. sirindhorniae X *I. duclouxii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. sirindhorniae X *I. mengtzeana*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. sirindhorniae X *I. mirabilis*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. sirindhorniae X *I. chinensis*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. sirindhorniae X *I. nalampoonii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. sirindhorniae X *I. parishii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. sirindhorniae X *I. santisukii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. sirindhorniae X *I. spectabilis*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. sirindhorniae X *I. violaeflora*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. spectabilis X *I. daraneenae*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. spectabilis X *I. duclouxii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. spectabilis X *I. mengtzeana*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. spectabilis X *I. mirabilis*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. spectabilis X *I. chinensis*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. spectabilis X *I. nalampoonii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. spectabilis X *I. parishii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. spectabilis X *I. santisukii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. spectabilis X *I. sirindhorniae*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. spectabilis X *I. violaeflora*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. violaeflora X *I. daraneenae*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. violaeflora X *I. duclouxii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]

ตาราง 5 (ต่อ)

สายพันธุ์คู่ผสม	เปอร์เซ็นต์การผสมติด (%)	จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล (เมล็ด)	เปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์ (%)
I. violaeflora X *I. mengtzeana*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. violaeflora X *I. mirabilis*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. violaeflora X *I. chinensis*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. violaeflora X *I. nalampoonii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. violaeflora X *I. parishii*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. violaeflora* X *I. santisukii	**8.44[b]**	**6.33[a]**	**84.91[ab]**
I. violaeflora X *I. sirindhorniae*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
I. violaeflora X *I. spectabilis*	0.00[d]	0.00[f]	0.00[d]
Sig	**	**	**
C.V. (%)	1.07	2.99	21.23

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

4.2 ผลการผสมข้ามชนิดระหว่างเทียนพื้นเมืองและเทียนพันธุ์การค้า

เปอร์เซ็นต์การผสมติดจากการศึกษาการผสมเกสรโดยการผสมข้ามชนิดระหว่างกลุ่มของเทียนจำนวน 12 คู่ผสม (ตาราง 6) พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยคู่ผสมระหว่าง *I. balsamina* X *I. parishii* มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดมากที่สุดคือ 83.44 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือคู่ผสมระหว่าง *I . walleriana* X *I. spectabilis*, *I. spectabilis* X *I. walleriana* และ *I. parishii* X *I. balsamina* มีเปอร์เซ็นต์การผสมติด 73.32, 72.21 และ 55.55 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับส่วนคู่ผสมอื่นนั้นไม่สามารถติดผลได้

จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลจากการผสมข้ามชนิดพบว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยคู่ผสมระหว่าง *I. walleriana* X *I. spectabilis* มีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลมากที่สุดคือ 10 เมล็ดต่อผล รองลงมาคือคู่ผสมระหว่าง *I. balsamina* X *I. parishii* และ *I. spectabilis* X *I. walleriana* มีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล 4 และ 2.6 เมล็ดต่อผล ตามลำดับ

เปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์จากการผสมข้ามชนิดนั้น ได้จากจำนวนเมล็ดของผลจากคู่ผสมที่มีการผสมติด พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยคู่ผสมระหว่าง *I. balsamina* X *I. parishii* มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์มากที่สุด คือ 100 เปอร์เซ็นต์ คู่ผสมระหว่าง *I. spectabilis* X *I. walleriana* และ *I. walleriana* X *I. spectabilis* มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์รองลงมา คือ 88.88 และ 86.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตาราง 6 เปอร์เซ็นต์การผสมติด จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล และเปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์ของการผสมข้ามชนิดระหว่างเทียนพื้นเมืองและเทียนพันธุ์การค้า

สายพันธุ์คู่ผสม	เปอร์เซ็นต์การผสมติด (%)	จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล (เมล็ด)	เปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์ (%)
I. violaeflora X *I. balsamina*	0.00^{d}	0.00^{c}	0.00^{c}
I. violaeflora X *I. walleriana*	0.00^{d}	0.00^{c}	0.00^{c}
I. parishii X *I. balsamina*	55.55^{c}	0.00^{c}	0.00^{c}
I. parishii X *I. walleriana*	0.00^{d}	0.00^{c}	0.00^{c}
I. spectabilis X *I. balsamina*	0.00^{d}	0.00^{c}	0.00^{c}
I. spectabilis X *I. walleriana*	72.21^{b}	2.60^{b}	88.88^{b}
I. balsamina X *I. violaeflora*	0.00^{d}	0.00^{c}	0.00^{c}
I. balsamina X *I. parishii*	83.44^{a}	4.00^{b}	100^{a}
I. balsamina X *I. spectabilis*	0.00^{d}	0.00^{c}	0.00^{c}
I. walleriana X *I. violaeflora*	0.00^{d}	0.00^{c}	0.00^{c}
I. walleriana X *I. parishii*	0.00^{d}	0.00^{c}	0.00^{c}
I. walleriana X *I. spectabilis*	73.32^{b}	10.00^{a}	86.94^{b}
Sig	**	**	**
C.V. (%)	**2.73**	**23.16**	**9.75**

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

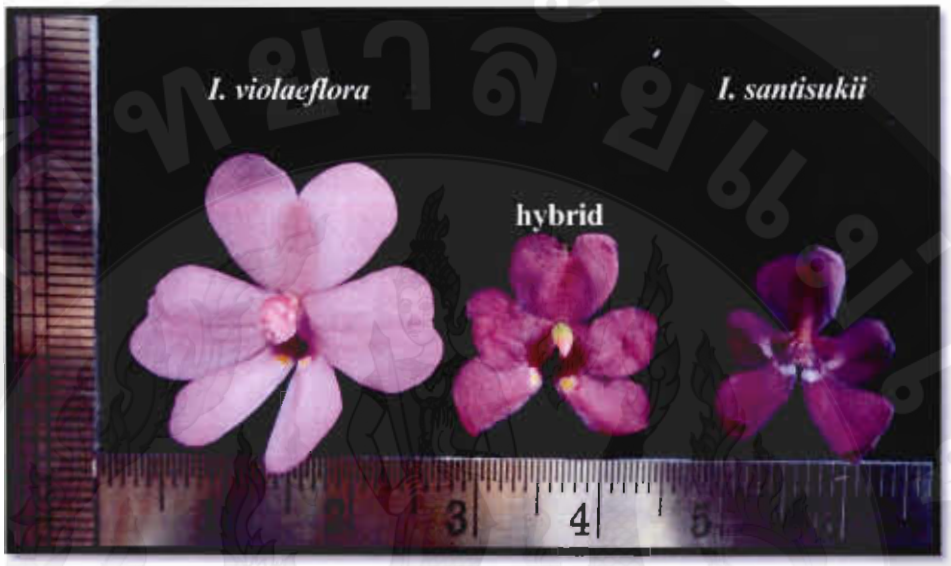
4.3 ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อน (immature seed rescue)

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อนของลูกผสมข้ามชนิดที่มีการผสมติดจำนวน 8 คู่ผสมพบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อน จากจำนวนเมล็ดของคู่ผสมระหว่าง *I. chinensis* X *I. violaeflora* จำนวน 3 เมล็ด, *I. duclouxii* X *I. violaeflora* จำนวน 2 เมล็ด, *I. nalampoonii* X *I. spectabilis* จำนวน 4 เมล็ด, *I. santisukii* X *I. violaeflora* จำนวน 10 เมล็ด, *I. santisukii* X *I. violaeflora* จำนวน 10 เมล็ด, *I. spectabilis* X *I. walleriana* จำนวน 10 เมล็ด, *I. balsamina* X *I. parishii* จำนวน 15 เมล็ด, *I. walleriana* X *I. spectabilis* จำนวน 20 เมล็ด เปอร์เซ็นต์ต้นที่อยู่รอดจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อนนั้นในคู่ผสมระหว่าง *I. santisukii* X *I. violaeflora*, *I. violaeflora* X *I. santisukii* และ *I. balsamina* X *I. parishii* เมล็ดทั้งหมดมีการพัฒนาเป็นต้นอ่อน คู่ผสมระหว่าง *I. walleriana* X *I. spectabilis* เมล็ดมีการพัฒนาเป็นต้นอ่อน 90 เปอร์เซ็นต์ คู่ผสมระหว่าง *I. spectabilis* X *I. walleriana* เมล็ดมีการพัฒนาเป็นต้นอ่อน 80 เปอร์เซ็นต์ และคู่ผสมระหว่าง *I. duclouxii* X *I. violaeflora* เมล็ดมีการพัฒนาเป็นต้นอ่อน 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนคู่ผสมระหว่าง *I. chinensis* X *I. violaeflora* และ *I. nalampoonii* X *I. spectabilis* เมล็ดไม่มีการพัฒนา เมล็ดอ่อนภายหลังจากการเพาะเลี้ยงจะงอกภายใน 15 วัน โดยจะเริ่มเกิดรากสีขาวและมีขนเล็กๆ บริเวณรากก่อน หลังจากนั้นจะเริ่มเกิดเป็นยอดสีเขียวอ่อน และพัฒนาเป็นใบขึ้นมา จากนั้นทำการย้ายไปยังอาหารใหม่ เมื่อต้นกล้ามีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน ภายใน 1-2 เดือนหลังจากการย้ายอาหาร จะนำต้นกล้าออกปรับสภาพให้คุ้นชินกับสภาพแวดล้อม และย้ายลงปลูกในกระถางขนาด 6 นิ้ว และปลูกเลี้ยงในโรงเรือนพลาสติกพบว่าลูกผสมสามารถเกิดดอกและดอกมีลักษณะของทั้งพ่อและแม่

ตาราง 7 จำนวนเมล็ดที่เพาะ เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่งอก เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่อยู่รอด และจำนวนวันที่เริ่มงอกของเมล็ดลูกผสมข้ามชนิดระหว่างเทียนจำนวน 8 คู่ผสม

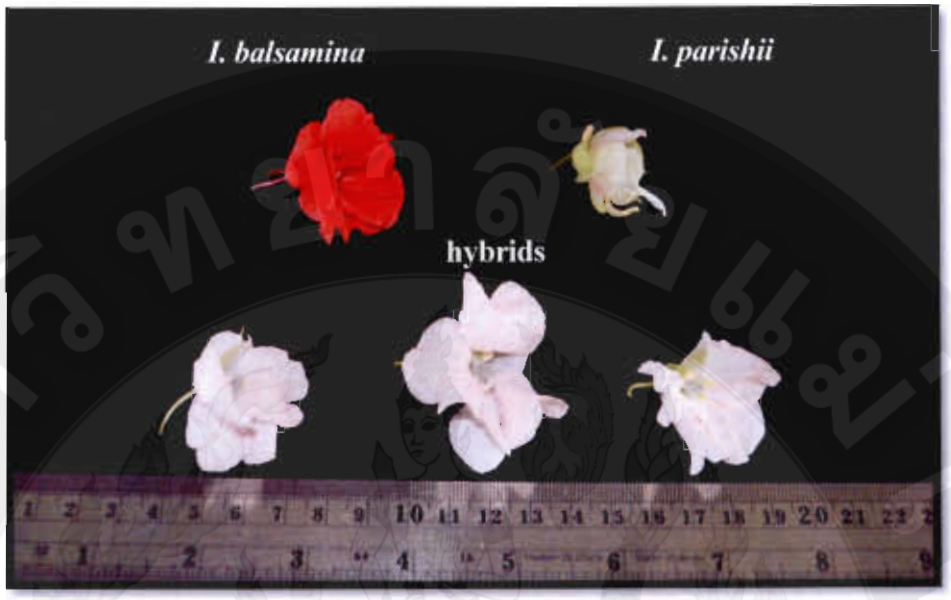
คู่ผสม	จำนวนเมล็ดที่เพาะ (เมล็ด)	เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่งอก (%)	เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่อยู่รอด (%)	จำนวนวันที่เริ่มงอก (วัน)
I. chinensis X *I. violaeflora*	3	0	-	-
I. duclouxii X *I. violaeflora*	2	50	100	15
I. nalampoonii X *I. spectabilis*	4	0	-	-
I. santisukii X *I. violaeflora*	10	100	100	10
I. violaeflora X *I. santisukii*	10	100	100	10
I. spectabilis X *I. walleriana*	10	80	100	13
I. balsamina X *I. parishii*	15	100	100	15
I. walleriana X *I. spectabilis*	20	90	100	13

4.4 ผลการตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอก



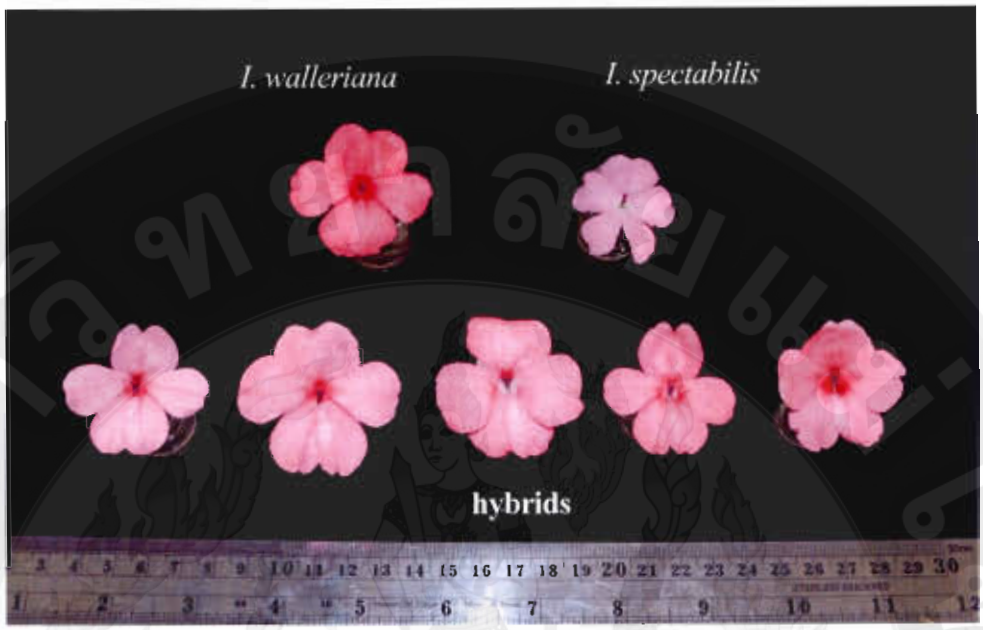
ภาพ 6 ลักษณะดอกของลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *I. violaeflora* X *I. santisukii*

ดอกของลูกผสมข้ามระหว่าง *I. violaeflora* และ *I. santisukii* พบว่า ขนาดของดอกมีขนาดใกล้เคียงกับพ่อแต่มีจุดสีเหลืองบริเวณโคนกลีบด้านล่างถ่ายทอดมาจากแม่ สีดอกลูกผสมจะมีสีเข้มกว่าแม่



ภาพ 7 ลักษณะดอกของลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *I. balsamina* X *I. parishii*

ดอกของลูกผสมข้ามระหว่าง *I. balsamina* และ *I. parishii* พบว่า ขนาดของดอกมีขนาดใกล้เคียงกับแม่แต่ลูกผสมทั้งหมดจะมีดอกสีขาวซึ่งถูกถ่ายทอดมาจากต้นพ่อ



ภาพ 8 ลักษณะดอกของลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *I. walleriana* X *I. spectabilis*

ดอกของลูกผสมข้ามระหว่าง *I. walleriana* และ *I. spectabilis* พบว่า ขนาดของดอกมีขนาดใกล้เคียงกับแม่แต่ลูกผสมทั้งหมดมีสีอ่อนใกล้เคียงกับพ่อ บริเวณโคนกลีบล่างดอกลูกผสมต้นที่ 3 มีสีขาวคล้ายพ่อส่วนต้นอื่นมีชมพูแดงคล้ายแม่

ลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *I. spectabilis* X *I. walleriana, I. santisukii* X *I. violaeflora* และ *I. duclouxii* X *I. violaeflora* ยังไม่สามารถปลูกเลี้ยงในสภาพธรรมชาติได้

การทดลองที่ 5 ผลการศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมของเทียนพื้นเมืองและการตรวจสอบ

5.1 ผลการศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมของเทียนพื้นเมือง

การศึกษาการเพิ่มปริมาณโครโมโซม โดยการหยดสารโคลชิซิน ความเข้มข้น 800, 600, 400, 200 มิลลิกรัมต่อลิตร บริเวณส่วนที่มีการพัฒนาของยอดเทียนพื้นเมืองทั้ง 4 ชนิด พบว่าความเข้มข้นของสารโคลชิซินทั้ง 4 ระดับ ไม่มีผลต่อการชักนำให้เกิดต้น เตตราพลอยด์ใน *I. santisukii* และ *I. mengtszeana* แต่ความเข้มข้นของสารโคลชิซิน 800 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดต้นเตตราพลอยด์ใน *I. violaeflora* สูงสุดคือ 11.22 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ สารโคลชิซิน 600 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดต้น เตตราพลอยด์ 3.33 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 8) และความเข้มข้นของสารโคลชิซิน 800 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดต้น เตตราพลอยด์ใน *I. duclouxii* สูงสุดคือ 8.32 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 9) รองลงมา ได้แก่ สารโคลชิซิน 600 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดต้น เตตราพลอยด์ 3.33 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 8 เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่อยู่รอด เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น เตตราพลอยด์และ จำนวนโครโมโซม ของ *I. violaeflora* ภายหลังจากการหยดสารโคลชิซิน

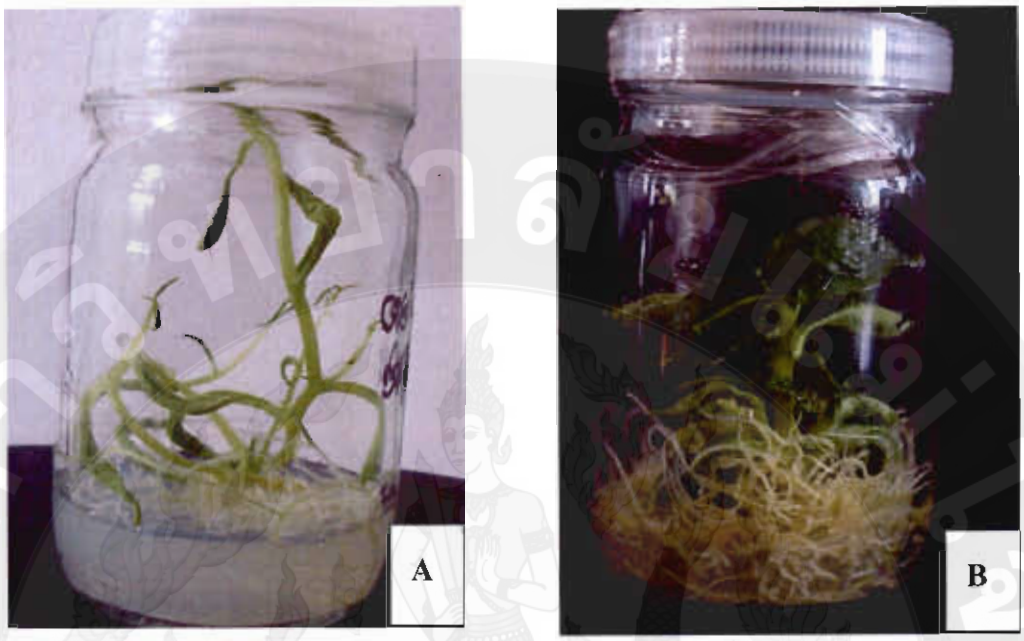
ความเข้มข้นสารโคลชิซิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่อยู่รอด (%)	เปอร์เซ็นต์ การเกิดต้นเตตราพลอยด์ (%)	จำนวนโครโมโซม (2n)
Control	100	0.00^{c}	12
200	100	0.00^{c}	12
400	100	0.00^{c}	12
600	100	3.33^{b}	24
800	100	11.22^{a}	24
Sig	-	**	-
C.V. (%)	-	30.24	-

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

ตาราง 9 เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่อยู่รอด เปอร์เซ็นต์ การเกิดต้น เตตราพลอยด์และ จำนวนโครโมโซม ของ *I. duclouxii* ภายหลังจากการหยดสารโคลชิซิน

ความเข้มข้นสารโคลชิซิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์จำนวนต้นที่อยู่รอด (%)	เปอร์เซ็นต์ การเกิดต้นเตตราพลอยด์ (%)	จำนวนโครโมโซม (2n)
Control	100	0.00[c]	16
200	100	0.00[c]	16
400	100	0.00[c]	16
600	100	3.33[b]	32
800	100	8.32[a]	32
Sig	-	**	-
C.V. (%)	-	32.2	-

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



ภาพ 9 ลักษณะต้นเทียนที่มีระดับชุดโครโมโซม A ; 2n = 2x, B ; 2n = 4x

ภาพ 10 ลักษณะดอก *I. violaeflora* มีระดับชุดโครโมโซม 2n = 2x (ขวา), 2n = 4x (ซ้าย)

5.2 ผลการทดสอบความสามารถในการผสมเกสรของต้นที่ได้รับการเพิ่มปริมาณโครโมโซม

เปอร์เซ็นต์การผสมติดจากการศึกษาการผสมเกสร โดยการผสมข้ามชนิดระหว่างต้นดิพลอยด์และเตตราพลอยด์ จำนวน 5 คู่ผสม (ตาราง 10) พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยคู่ผสมระหว่าง *I. spectabilis* (2n) X *I. violaeflora* (4n) มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดมากที่สุดคือ 28.88 เปอร์เซ็นต์ แต่ผลร่วงภายหลังผสม 5 วัน รองลงมาคือคู่ผสม *I. parishii* (2n) X *I. violaeflora* (4n) มีเปอร์เซ็นต์การผสมติด 17.77 เปอร์เซ็นต์แต่ผลร่วงภายหลังผสม 4 วัน คู่ผสม *I. namkatensis* (2n) X *I. violaeflora* (4n) มีเปอร์เซ็นต์การผสมติด 8.88 เปอร์เซ็นต์แต่ผลร่วงภายหลังผสม 5 วัน ส่วนคู่ผสมอื่นนั้นไม่สามารถติดผลได้

ตาราง 10 เปอร์เซ็นต์การผสมติด ระยะเวลาในการร่วงของผลจากการผสมข้ามชนิดระหว่างเทียนต้นดิพลอยด์และเตตราพลอยด์

สายพันธุ์คู่ผสม		เปอร์เซ็นต์การผสมติด (%)	ระยะเวลาในการร่วงของผลเฉลี่ย (วัน)
I. namkatensis	(2n) X *I. violaeflora* (4n)	8.88^{c}	5
I. mirabilis	(2n) X *I. violaeflora* (4n)	0.00^{d}	-
I. parishii	(2n) X *I. violaeflora* (4n)	17.77^{b}	4
I. spectabilis	(2n) X *I. violaeflora* (4n)	28.88^{a}	5
I. sirindhorniae	(2n) X *I. violaeflora* (4n)	0.00^{d}	-
	Sig	**	-
	C.V. (%)	**14.65**	-

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

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาจำนวนโครโมโซมในเทียนชนิดต่าง ๆ

การศึกษาจำนวนโครโมโซมของเทียนพบว่า เทียนพื้นเมืองของไทยมีจำนวนโครโมโซมที่ต่างกันตั้งแต่ 2n = 10 ถึง 2n = 34 (ตาราง 3) คือ

I. santisukii 2n = 10, *I. violaeflora* 2n = 12, *I. garrettii* 2n =14, *I.chinensis* 2n = 16, *I. duclouxii* 2n = 16, *I. mengtszeana* 2n = 16, *I. kamtilongensis* 2n = 16 เทียนกลุ่มนี้ ดอกและใบมีขนาดเล็ก ออกดอกเป็นกระจุกกลุ่มๆละ 2-3 ดอก จุดกำเนิด ดอกอยู่ตรงบริเวณข้อใบหรือซอกใบ และบริเวณปลายยอด ผลมีลักษณะเป็นรูปรี (elliptic) สีเขียวอ่อน

I. longiloba 2n = 18, *I. namkatensis* 2n = 20, *I. mirabilis* 2n = 30, *I. nalampoonii* 2n = 32 , *I. sp. nov.* 'Thunbergioides' 2n = 32, *I. daraneenae* 2n = 34, *I. parishii* 2n = 34 และ *I. psittacina* 2n = 34 เทียนกลุ่มนี้ การจัดเรียงกลีบดอกจะแบ่งวงกลีบออกเป็น วงกลีบรองดอกข้าง 2 กลีบรูปเรียวยาว กลีบรองดอกล่าง 1 กลีบโคนกลีบปลายโค้งงอพับ คล้ายจงอยปากนก และวงกลีบดอกบน 1 กลีบ กลีบดอกข้าง 2 กลีบ กลีบดอกล่าง 2 กลีบ เชื่อมติดกัน (concentric) เป็นรูปหยดน้ำด้านละ 1 กลีบผลมีลักษณะเป็นรูปแถบ (linear) สีเขียวอ่อน

I. sirindhorniae 2n = 32 และ *I. spectabilis* 2n = 32 ดอกจะเป็นกระจุกออกดอกเป็นกลุ่มๆละ 2-3 ดอก จุดกำเนิด ดอกอยู่ตรงบริเวณข้อใบหรือซอกใบ และบริเวณปลายยอด ผลมีลักษณะเป็นรูปรี (elliptic) สีเขียวอ่อน โดย ธงไชย (2536) กล่าวว่าพืชที่มีจำนวนโครโมโซมมากเมล็ดจะมีขนาดใหญ่กว่าเมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่มีจำนวนโครโมโซมน้อยในกลุ่มเดียวกัน แต่จำนวนเมล็ดต่อผลจะน้อยกว่า Senawong (2003) ได้ศึกษาจำนวนเมล็ดต่อผลของ เทียนพันธุ์หมายเลข IN-SP1 มีจำนวนโครโมโซม 2n = 12 พบว่ามีจำนวนเมล็ดต่อผลมากกว่า เทียนพันธุ์หมายเลข CD-HL3 ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 32 จำนวนวันที่ปลูกถึงเกิดดอกพบว่าเทียนที่มีจำนวนโครโมโซมน้อยจะใช้เวลาน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเทียนที่มีจำนวนโครโมโซมมาก เทียนพันธุ์หมายเลข IN-SP1 ใช้เวลาในการเกิดดอกหลังจากการปลูกเพียง 70 วัน เทียนพันธุ์หมายเลข CD-HL3 ใช้เวลาในการเกิดดอกหลังจากการปลูก 135 วัน อายุการบานของดอกพบว่าเทียนที่มีจำนวนโครโมโซมมาก เช่น CD-HL3 จะสามารถบานได้นานกว่าโดยมีอายุการบานเฉลี่ย 13 วัน

ในปัจจุบันการศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืชนั้นถูกนำมาช่วยวางแผนในการเลือกคู่ผสมโดยพบว่าพืชที่มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันหรือใกล้เคียงกันสามารถประสบผลสำเร็จในการ

ผสมมากกว่าพืชที่มีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกัน นพพร (2546) กล่าวว่า พืชในจีนัส *Sesamum* แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกมีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 กลุ่มที่สองมีจำนวนโครโมโซม 2n = 64 ผลจากการผสม พบว่าไม่สามารถประสบความสำเร็จจากการผสมข้ามกลุ่มแต่การผสมในกลุ่มทำได้ง่าย นิตย์ศรี(2542) กล่าวว่า ในการผสมการเข้าคู่ของโครโมโซมจะต้องเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ โครโมโซมจากผู้ให้และผู้รับจะต้องเข้าคู่กัน และเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนซึ่งกันและกันได้

การทดลองที่ 2 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียนพื้นเมือง โดยใช้เทคนิค RAPD (Random amplified polymorphic DNA)

การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียนพื้นเมืองทั้ง 17 ชนิด สามารถแยกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียนตามความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้ 7 Cluster ดัง (ภาพ 2)

Cluster 1 ประกอบด้วย *I. violaeflora* 2n = 12, *I. garrettii* 2n = 14, *I. spectabilis* 2n = 32 และ *I. psittacina* 2n = 34 เทียนกลุ่มนี้ ใบรูปไข่ถึงรูปใบหอก ปลายใบแหลมหรือแหลมยาว โคนใบรูปลิ่มหรือมน ขอบใบหยักฟันเลื่อยห่างๆ ดอกออกเดี่ยวๆ ตามซอกใบ ผลมีลักษณะเป็นรูปรี (elliptic) สีเขียวอ่อน พบเพียงเทียนนกแก้วที่มีลักษณะผลเป็นรูปแถบ

Cluster 2 ประกอบด้วย *I. chinensis* 2n = 16 เพียงชนิดเดียวเทียนชนิดนี้มีลำต้นและใบแตกต่างจากเทียนชนิดอื่น ด้นเกลี้ยง เปราะหักง่าย ใบเดี่ยว รูปหอก กว้าง ขอบใบหยัก ปลายใบเรียวแหลม

Cluster 3 ประกอบด้วย *I. longiloba* 2n = 18, *I. parishii* 2n = 34 และ *I. daraneenae* 2n = 34 เทียนกลุ่มนี้ลำต้นเจริญเป็นพุ่ม พบเพียงเทียนดะนาวศรีที่เป็นต้นเดี่ยว ผลมีลักษณะเป็นรูปแถบ (linear) สีเขียวอ่อน

Cluster 4 ประกอบด้วย *I. duclouxii* 2n = 16, *I. santisukii* 2n = 12 และ *I. sirindhorniae* 2n = 32 ผลมีลักษณะเป็นรูปรี (elliptic) สีเขียวอ่อน

Cluster 5 ประกอบด้วย *I. nalampoonii* เพียงชนิดเดียว

Cluster 6 ประกอบด้วย *I. mirabilis* 2n = 30 และ *I. sp. nov.* 'Thunbergioides' 2n = 32

Cluster 7 ประกอบด้วย *I. namkatensis* 2n = 20, *I. aff. toppinii* 2n = 16 และ *I. mengtzeana* 2n = 16 เทียนกลุ่มนี้มีขนาดของลำต้นใบ และ ดอกที่แตกต่างกันโดย Senawong (2003) รายงานว่าเทียนพื้นเมืองของไทยถูกแบ่งออกเป็นหลายกลุ่มตามลักษณะ สัณฐานวิทยา เช่น ใบ ดอก ลำต้น ผลและอายุการเจริญเติบโต จากฐานข้อมูลของสวนพฤกษศาสตร์พบว่าเทียนป่าของไทยหลาย

ชนิดเป็นพืชถิ่นเดียว มีเขตการกระจายพันธุ์แคบ สัณฐานวิทยามีความต่างกันมากความแตกต่างเหล่านี้อาจเป็นผลมาจากความห่างไกลทางพันธุกรรมซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Stevens et al. (2006)ได้ หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียนจากการใช้ Chloroplast *atpB-rbcL* Sequences พบว่า *I. chinensis* และ *I. mengtszeana* ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน แต่พบว่ามีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ห่างกันโดย *I. chinensis* ถูกจัดอยู่ใน clade 10 ในขณะที่ *I. mengtszeana* ถูกจัดอยู่ใน clade 9 (ภาพผนวก 14)

จากผลการแบ่งกลุ่มตามความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเมื่อเปรียบเทียบกับผลของจำนวนโครโมโซม อาจสรุปได้ว่าปัญหาของการผสมไม่ติดของเทียนพื้นเมืองเกิดจากทั้งสองกรณี คือ เทียนทั้ง 17 ชนิดมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน และ เทียนแต่ละชนิดมีจำนวนโครโมโซมที่ไม่เท่ากัน ถึงแม้ว่าเทียนหลายชนิดถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่จำนวนโครโมโซมของเทียนในกลุ่มย่อยนั้นยังมีความแตกต่างกัน ทำให้การผสมข้ามชนิดทำได้ยากในพืชสกุลนี้ หากเราสามารถทำให้จำนวนโครโมโซมของเทียนในกลุ่มเดียวกัน มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันอาจช่วยให้เราสามารถประสบความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์พืชสกุลนี้

การทดลองที่ 3 ศึกษาความมีชีวิตและความสามารถในการงอกของหลอดละอองเกสร

จากการศึกษาความมีชีวิตและความสามารถในการงอกหลอดละอองเกสร ทั้ง 17 ชนิด พบว่า *I. kamtilongensis*, *I. chinensis, I. daraneenae, I. mengtszeana, I. mirabilis, I. spectabilis, I. garrettii, I.santisukii, I. sirindhorniae, I. sp. nov.* 'Thunbergioides' และ *I. violaeflora* มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของละอองเกสร และเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการงอกของหลอดละอองสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองเราสามารถใช้เทียนทั้ง 11 ชนิดมาเป็นต้นพ่อในการผสม เนื่องจากสามารถงอกหลอดละอองเกสรได้สูงกว่า *I. duclouxii*, *I. namkatensis*, *I. longiloba, I. nalampoonii* และ *I. parishii* ที่มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของละอองเกสรสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แต่พบว่าเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการงอกหลอดละอองเกสรต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในปัจจุบันพบว่าการปรับปรุงพันธุ์พืชนั้นการศึกษาการงอกของหลอดละอองเกสรบนอาหารสังเคราะห์จะช่วยในการตรวจสอบความสามารถในการงอกของละอองเกสรเบื้องต้นเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการผสม หากทราบว่าพืชชนิดไหนที่มีความมีชีวิต และมีอัตราการงอกหลอดที่ดี จะสามารถนำไปใช้เป็นต้นพ่อที่ดีได้ (สุทิน และ รดาพร, 2554) ในกรณีของ *I. psittacina* ที่ละอองเกสรไม่มีชีวิตและไม่สามารถงอกหลอดละอองเกสร อาจเกิดจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อมเนื่องจากเทียนชนิดนี้ พบตามเขาหินปูน ที่ความสูง 1,500-1,800 เมตร จากระดับน้ำทะเล เมื่อนำมาปลูกที่มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จึงไม่สามารถปรับตัวได้ดอกมี

ลักษณะไม่สมบูรณ์ซึ่งตรงกับ Tian et al. (2004) ได้ ศึกษาเกี่ยวกับ ความมีชีวิตของละอองเรณูในเทียน พบว่า นิเวศวิทยาเป็นปัจจัยสำคัญ มีผลต่อการถ่ายละอองเกสรของพืชสกุลเทียน โดยเทียนบางชนิดมีข้อจำกัดด้านถิ่นกำเนิด ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสรที่ต่ำ

เมื่อศึกษาความสามารถในการงอกของละอองเกสรบนยอดเกสรเพศเมียและการงอกหลอดเกสรลงในก้านชูเกสรเพศเมียจากการผสมข้ามชนิดของเทียน สามารถแบ่งการพัฒนาของละอองเกสรบนยอดเกสรตัวเมียออกเป็น 3 กรณี ย่อยๆดังนี้

กรณีแรกคือละอองเกสรสามารถงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมียและสามารถงอกหลอดเกสรลงในก้านชูเกสรเพศเมียได้ (ภาพ 3) ซึ่ง นพพร (2546) กล่าวว่า พืชบางชนิด ovule จะสร้างสารผ่าน micropyle สารนี้จะเป็นตัวกระตุ้นให้ละอองเกสรสร้าง pollen tube ไปยังทิศทางที่ ovule อยู่และสามารถงอกลงไปผสมได้อย่างปรกติ

กรณีที่สองคือละอองเกสรสามารถงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมียแต่ไม่สามารถงอกหลอดเกสรลงในก้านชูเกสรเพศเมียได้ (ภาพ 4)

กรณีที่สามคือละอองเกสรไม่สามารถงอกได้บนยอดเกสรตัวเมีย (ภาพ 5) ซึ่ง ธีรนิดิ(2555) ทำการศึกษาการผสมข้ามชนิดระหว่างพืชในกลุ่ม Eucurcuma และพืชในกลุ่ม Paracurcuma พบว่าละอองเกสร ของ *C. angustifolia* งอกหลอดลงบนยอดเกสรเพศเมียของ *C. parviflora* แต่พบว่าการงอกของหลอดละอองเกสรผิดทิศทางไม่สามารถงอกหลอดลงในก้านชูเกสรเพศเมียได้ และ ละอองเกสรของ *C. angustifolia* ไม่สามารถงอกหลอดลงบนยอดเกสรเพศเมียของ *C. alismatifolia* ได้ ซึ่งอุปสรรคภายหลังการถ่ายละอองเกสรสามารถเกิดได้หลายสาเหตุ เช่น บริเวณ stigma surface มีสารพิษที่ยับยั้งการงอกของละอองเกสรส่งผลให้ละอองเกสรไม่งอกหรือ เกสรสามารถงอกได้แต่งอกผิดทิศทาง ไม่สามารถงอกลงไปถึงไข่ได้ (เฉลิมศรี, 2549)

การทดลองที่ 4 ศึกษาความสามารถในการผสมข้ามชนิดของเทียน

การผสมสลับพ่อสลับแม่ระหว่างเทียนพื้นเมือง 11 ชนิด พบว่าคู่ผสมระหว่าง *I. santisukii* X *I. violaeflora* มีเปอร์เซ็นต์การผสมติด 8.66 เปอร์เซ็นต์ อาจเกิดจากเทียนทั้งสองมีจำนวนโครโมโซมใกล้เคียงกัน คือ *I. santisukii* 2n = 10 และ *I. violaeflora* 2n = 12 ส่วนคู่อื่นนั้นไม่สามารถผสมติด จากการทดลองที่ 1 เห็นได้ว่าเทียนแต่ละชนิดมีจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างกันค่อนข้างมาก เมื่อผสมอาจส่งผลให้เกิดการไม่สามารถเข้าคู่กันได้ ทำให้ไม่สามารถผสมติดได้ หรือมีอัตราการติดที่ต่ำมาก Senawong (2003) ทำการผสมข้ามชนิดระหว่างเทียนป่าที่มีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกันจำนวน 6 คู่ผสมพบว่าไม่สามารถติดผลได้จากการผสม แต่จากผลการทดลองพบว่าจำนวน

เมล็ดเฉลี่ยต่อผลเนื่องจากเป็นการผสมข้ามชนิดส่งผลให้มีจำนวนเมล็ดต่อผลน้อยกว่าปรกติ นงนุช (2555) พบว่าการนำเอ็มบริโอของพริกที่ได้จากการผสมข้ามชนิดไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์จะช่วยให้ลูกผสมนั้นเจริญเป็นต้นที่แข็งแรงได้ หยกทิพย์ (2550) กล่าวว่าลักษณะการพัฒนาเอ็มบริโอของปทุมมาหลังการเพาะเลี้ยงจะเริ่มเกิดรากสีขาวและมีขนเล็กๆ บริเวณรากก่อน หลังจากนั้นจะเริ่มเกิดเป็นยอดสีเขียวอ่อน และเริ่มพัฒนาเป็นใบ ถึงแม้ว่าการนำวิธีของหยกทิพย์มาประยุกต์ใช้จะทำให้ได้ลูกผสมจากการผสมข้ามชนิดของเทียนป่าทำให้ได้ลูกผสมใหม่ขึ้น แต่พบว่า ลูกผสมที่ได้ยังไม่มีคุณสมบัติที่จะนำมาใช้เป็นไม้ประดับได้เนื่องจากดอกมีขนาดเล็ก สีสันไม่สดใส ระบบรากและลำต้นอ่อนแอ ซึ่ง สุรวิช (2552) กล่าวว่า พืชใหม่ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ในการคัดเลือกต้องมีการประเมินทั้งลักษณะเชิงคุณภาพและลักษณะเชิงปริมาณ เช่น สีสัน และความดกของดอก ขนาด ทรงพุ่ม เปรียบเทียบกับพันธุ์มาตรฐาน และพบว่าดีกว่าจึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้

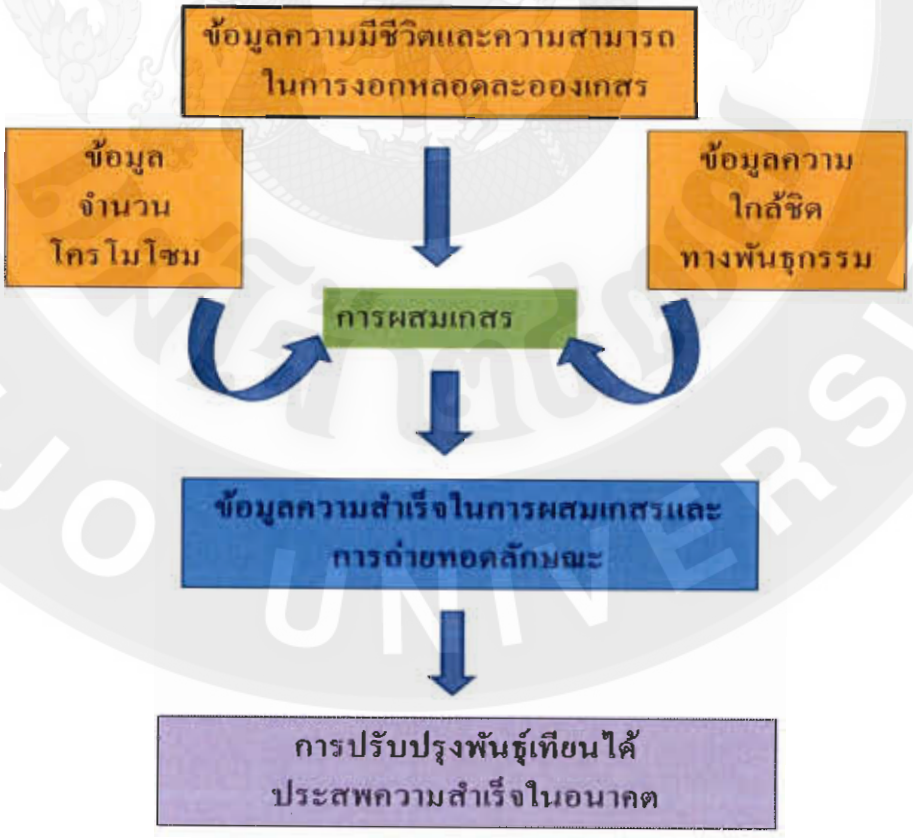
การผสมข้ามชนิดระหว่างเทียนพื้นเมืองและเทียนพันธุ์การค้า จำนวน 12 คู่ผสม พบเพียง 4 คู่ผสมที่สามารถผสมติดได้แก่คู่ผสมระหว่าง *I. balsamina* X *I. parishii*, *I. walleriana* X *I. spectabilis*, *I. spectabilis* X *I. walleriana* และ *I. parishii* X *I. balsamina* โดย Senawong (2003) ได้จำแนกลักษณะทางสัณฐานของดอกเทียนออกเป็นสามกลุ่มคือ กลุ่มแรก ดอกแบบปากเปิด รูปคล้ายนก ดอกมีสมมาตรด้านข้าง กลุ่มที่สอง ดอกรูปลิ้น กลุ่มที่สาม รูปดอกเป็นแบบกงล้อ ที่มีดอกสมมาตรตามรัศมี ซึ่งพบว่าคู่ผสมระหว่าง *I. balsamina* และ *I. parishii* เทียนทั้งสอง มีลักษณะดอกเป็นแบบปากเปิดรูปคล้ายนก ดอกมีสมมาตรด้านข้าง ลำต้นเดี่ยวตั้งตรง ส่วนคู่ผสมระหว่าง *I. walleriana* X *I. spectabilis* เทียนทั้งสอง มีลักษณะดอกเป็นแบบกงล้อ ดอกสมมาตรตามรัศมี ลำต้นเป็นพุ่ม ลักษณะที่คล้ายคลึงกันนี้อาจเป็นเหตุผลให้เทียนทั้ง 4 คู่ผสมติดผลจากการผสม เนตรวิไล (2548) แบ่งกลุ่มของหงส์เหินตามลักษณะของช่อดอกออกเป็น 3 แบบ คือ ช่อตั้ง ช่อห้อยย้อย และช่อตั้งฉากกับลำต้น ซึ่ง สุจิตราและคณะ (2554) ได้นำหงส์เหินที่มีลักษณะช่อตั้งผสมกับกลุ่มที่มีช่อดอกห้อยย้อยพบว่าเปอร์เซ็นต์การผสมติดน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับการผสมในกลุ่มที่มีดอกประเภทเดียวกัน จากการผสมข้ามชนิดระหว่างเทียนพบว่าจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล อยู่ระหว่าง 2 - 10 เมล็ดต่อผล เมื่อนำเมล็ดที่ได้จากการผสมมาทำการเลี้ยงพบว่าเมล็ดมีการพัฒนาเกิน 50 เปอร์เซ็นต์ ใน 6 คู่ผสม ส่วนคู่ผสมระหว่าง *I. chinensis* X *I. violaeflora* และ *I. nalampoonii* X *I. spectabilis* เมล็ดไม่มีการพัฒนา ซึ่งอาจจะเกิดจากไซโกตไม่สามารถพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอได้หรือเอ็มบริโอขาดสารที่จำเป็นต่อการพัฒนา เอ็มบริโอหยุดการเจริญ ซึ่งเกิดจาก พันธุกรรมของเอ็มบริโอและเอ็นโดสเปิร์มที่เป็นพิษ (เฉลิมศรี, 2549)

การทดลองที่ 5 ศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมของเทียนพื้นเมืองและการตรวจสอบ

การศึกษาการเพิ่มปริมาณโครโมโซม โดยการหยดสารโคลชิซิน ความเข้มข้น 800, 600, 400, 200 ppm บริเวณส่วนที่มีการพัฒนาของยอดเทียนพื้นเมืองทั้ง 4 ชนิด พบว่าความเข้มข้นของสารโคลชิซินทั้ง 4 ระดับ ไม่มีผลต่อการชักนำให้เกิดด้น เตตราพลอยด์ใน *I. santisukii* และ *I. mengtzeana* อาจเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของโคลชิซินยังไม่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้นเตตราพลอยด์ในเทียนทั้งสองชนิดนี้ อัญญาณี และสมปอง (2553) กล่าวในการชักนำให้เกิดต้นเตตราพลอยด์ในพืช จะประสบผลสำเร็จเมื่อพืชมีอัตราการรอดชีวิตต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอัตราการรอดชีวิตจะแปรผกผันกับความเข้มข้นของสารโคลชิซิน ในการทดลองนี้ความเข้มข้นของสารโคลชิซิน 800 ppm และ 600 ppm สามารถชักนำให้เกิดต้นเตตราพลอยด์ใน *I. violaeflora* และ *I. duclouxii* โดยลักษณะของต้นเตตราพลอยด์ ในพืชสกุลเทียนพบว่า ใบจะมีสีเขียวเข้ม หนา ลำต้นสั้นซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง ธีรนิติ (2555) พบว่า โคลชิซินที่มีความเข้มข้น 800 ppm สามารถชักนำให้ปทุมมาเกิดต้น เตตราพลอยด์ (2n = 4x) และ ต้นออคตาพลอยด์ (2n = 8x) ซึ่งมีลักษณะใบหนา สีเขียวเข้ม ลำต้นสั้น การเจริญเติบโตค่อนข้างช้า

ในการผสมเกสรของเทียนโดยการผสมข้ามชนิดระหว่างด้นดิพลอยด์และเตตราพลอยด์ จำนวน 5 คู่ผสม พบเพียง 3 คู่ผสมที่สามารถติดผลได้จากการผสมได้แก่ *I. spectabilis* (2n = 2x) X *I. violaeflora* (2n = 4x), *I. parishii* (2n = 2x) X *I. violaeflora* (2n = 4x) และ *I. namkatensis* (2n = 2x) X *I. violaeflora* (2n = 4x) แต่ผลร่วงภายหลังผสมในทุกคู่ผสม การหลุดร่วงของผลก่อนกำหนดนี้ อาจเกิดจากเอ็มบริโอหยุดการพัฒนา ซึ่ง Arisumi (1980) ได้ศึกษาระยะการพัฒนาของเอ็มบริโอจากการผสมเทียนที่มีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกัน พบว่า คู่ผสมระหว่าง *I. auricoma* 2n = 16 และ *I. congolensis* 2n = 48 เอ็มบริโอสามารถพัฒนาได้ถึงระยะ globular เท่านั้น นิตย์ศรี (2541) กล่าวว่า การหลุดร่วงของผลเกิดจากไซโกตไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอดไปจนถึงเอ็มบริโอเนื่องจาก โครโมโซมไม่สามารถเข้าคู่กันได้ การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมไม่เสถียรหรือ เอ็มบริโอไม่สามารถใช้อาหารจากเนื้อเยื่อที่อยู่รอบๆถุงเอ็มบริโอได้ ซึ่ง หยกทิพย์ (2550) กล่าวว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ทำให้ประสบความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ ได้ต้นลูกผสมที่สมบูรณ์ จึงได้ทดลองนำผลที่ร่วงหลังการผสมไปเลี้ยงตามวิธีของหยกทิพย์ แต่พบว่าเมล็ดอ่อนกลายเป็นสีน้ำตาลไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้

จากการศึกษาในทุกการทดลอง (ดังแผนภาพที่ 1) สามารถสรุปได้ว่าปัจจัยที่มีผลต่อการผสมข้ามชนิดของเทียนคือจำนวนโครโมโซม ซึ่งพบว่าคู่ผสมที่มีจำนวนโครโมโซมใกล้เคียงกันจะสามารถติดผลได้ ส่วนความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนั้นไม่มีผลต่อการผสมข้ามชนิดของเทียน สภาพแวดล้อมในการปลูกเลี้ยงนั้นมีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและการงอกของหลอดละอองเกสร โดยพบว่าเทียนพื้นเมืองที่มีการกระจายตัวบนเทือกเขาสูงเมื่อนำมาปลูกบนพื้นราบจะมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและการงอกของหลอดละอองเกสรที่ต่ำไม่สามารถใช้เป็นพ่อได้ ลักษณะสีตอกของลูกผสมส่วนใหญ่จะมีสีคล้ายพ่อและเมื่อนำเทียนกลุ่มที่เป็นเทียนล้มลุกข้ามปีเป็นแม่ผสมกับเทียนกลุ่มที่เป็นเทียนล้มลุกลูกผสมที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นเทียนล้มลุกข้ามปี ในอนาคตหากจะปรับปรุงพันธุ์เทียน การเพิ่มจำนวนโครโมโซมให้ใกล้เคียงกันและการปรับสภาพแวดล้อมในการปลูกเลี้ยงให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเทียนจะสามารถช่วยให้การปรับปรุงพันธุ์เทียนประสบความสำเร็จมากยิ่งขึ้น



แผนภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ของการศึกษาข้อมูลต่างๆเพื่อนำไปสู่
การปรับปรุงพันธุ์เทียน

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาจำนวนโครโมโซมของเทียนพบว่า เทียนพื้นเมืองของไทยมีจำนวนโครโมโซมที่ต่างกันตั้งแต่ 2n = 10 ถึง 2n = 34 (ตาราง 2) โดย *I. santisukii* 2n = 10, *I. violaeflora* 2n = 12, *I. garrettii* 2n =14, *I.chinensis* 2n = 16, *I. duclouxii* 2n = 16, *I. mengtszeana* 2n = 16, *I. kamtilongensis* 2n = 16, *I. longiloba* 2n = 18, *I. namkatensis* 2n = 20, *I. nalampoonii* 2n = 32, *I. sirindhorniae* 2n = 32, *I. spectabilis* 2n = 32, *I. sp. nov.* 'Thunbergioides' 2n = 32, *I. daraneenae* 2n = 34, *I. parishii* 2n = 34 และ *I. psittacina* 2n = 34

2. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเทียนพื้นเมืองทั้ง 17 ชนิด สามารถแยกตามความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้ 7 Cluster (ภาพ 1) Cluster 1 ประกอบด้วย *I. violaeflora, I. psittacina, I. garrettii* และ *I. spectabilis* Cluster 2 ประกอบด้วย *I. chinensis* Cluster 3 ประกอบด้วย *I. longiloba, I. parishii* และ *I. daraneenae* Cluster 4 ประกอบด้วย *I. duclouxii, I. santisukii* และ *I. sirindhorniae* Cluster 5 ประกอบด้วย *I. nalampoonii* Cluster 6 ประกอบด้วย *I. mirabilis* และ *I. sp. nov.* 'Thunbergioides' Cluster 7 ประกอบด้วย *I. namkatensis, I. kamtilongensis* และ *I. mengtszeana* โดยมีพันธุกรรมใกล้ชิดกันแต่ไม่จำเป็นต้องมีจำนวนโครโมโซมเท่ากันซึ่งสอดคล้องกับ Stevens et al. (2006)

3. ความมีชีวิตและความสามารถในการงอกของละอองเกสรบนอาหารสังเคราะห์ของเทียนพื้นเมืองจำนวน 17 ชนิด พบว่ามีความมีชีวิตค่อนข้างสูง แต่เมื่อศึกษาความสามารถในการงอกหลอดละอองเกสร พบว่า *I. parishii, I. duclouxii, I. nalampoonii, I. garrettii* และ *I. longiloba* มีความสามารถในการงอกหลอดละอองเกสรบนอาหารสังเคราะห์ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ *I. psittacina* ไม่พบละอองเกสรที่มีชีวิตและละอองเกสรไม่สามารถงอกบนอาหารสังเคราะห์ได้ เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการงอกของละอองเกสร (pollen) บนยอดเกสรเพศเมีย (stigma surface) และการงอกของหลอดละอองเกสรลงในก้านชูเกสรเพศเมีย พบว่า การงอกของหลอดละอองเกสรแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ 1. ละอองเกสรสามารถงอกบนยอดเกสรเพศเมียและสามารถงอกผ่านก้านชูเกสรเพศเมียได้ 2. ละอองเกสรไม่สามารถงอกบนยอดเกสรเพศเมียได้ 3. ละอองเกสรสามารถงอกหลอดลงบนยอดเกสรเพศเมียแต่ไม่สามารถงอกหลอดลงในก้านชูเกสรเพศเมียได้

4. ทำการผสมสลับพ่อสลับแม่ระหว่างเทียนพื้นเมือง 11 ชนิดพบว่าคู่ผสมระหว่าง *I. santisukii* X *I. violaeflora* มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดมากที่สุดคือ 8.66 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือคู่ผสมระหว่าง *I. violaeflora* X *I. santisukii*, *I. duclouxii* X *I. violaeflora*, *I. chinensis* X

I. violaeflora และ *I. nalampoonii* X *I. spectabilis* มีเปอร์เซ็นต์การผสมติด 8.44, 8.44, 0.05 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนคู่ผสมอื่นนั้นไม่สามารถผสมติด จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลมากที่สุดคือ 6.33 เมล็ดต่อผล และมีเปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์มากที่สุด คือ 93.33 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการผสมข้ามชนิดระหว่างเทียนพื้นเมืองและเทียนพันธุ์การค้าจำนวน 12 คู่ผสม คู่ผสมระหว่าง *I. balsamina* X *I. parishii* มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดมากที่สุดคือ 83.44 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือคู่ผสมระหว่าง *I. walleriana* X *I. spectabilis*, *I. spectabilis* X *I. walleriana* และ *I. parishii* X *I. balsamina* มีเปอร์เซ็นต์การผสมติด 73.32, 72.21 และ 55.55 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับส่วนคู่ผสมอื่นนั้นไม่สามารถติดผลได้ คู่ผสมระหว่าง *I. walleriana* X *I. spectabilis* มีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลมากที่สุดคือ 10 เมล็ดต่อผลและคู่ผสมระหว่าง *I. balsamina* X *I. parishii* มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์มากที่สุด คือ 100 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อนของลูกผสมข้ามชนิดที่มีการผสมติดจำนวน 8 คู่ผสม พบว่าคู่ ผสมระหว่าง *I. santisukii* X *I. violaeflora*, *I. violaeflora* X *I. santisukii* และ *I. balsamina* X *I. parishii* เมล็ดทั้งหมดมีการพัฒนาเป็นต้นอ่อนส่วนคู่ผสมระหว่าง *I. chinensis* X *I. violaeflora* และ *I. nalampoonii* X *I. spectabilis* เมล็ดไม่มีการพัฒนา การตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอก พบว่าดอกของลูกผสมจะปรากฏลักษณะที่ถูกถ่ายทอดมาจากทั้งพ่อและแม่

5. ศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมของเทียนพื้นเมือง พบว่าความเข้มข้นของสารโคลชิซิน 800 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดต้นเตตราพลอยด์ใน *I. violaeflora* สูงสุดคือ 11.22 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์การผสมติด จากการศึกษาการผสมเกสรโดยการผสมข้ามชนิดระหว่างต้นดิพลอยด์และเตตราพลอยด์พบว่าผลของเทียนหลุดร่วงภายหลังการผสม

ดังนั้นในการผสมเทียนข้ามชนิดของเทียนจะประสบความสำเร็จก็ต่อเมื่อ เทียนทั้งสองมีจำนวนโครโมโซมที่ใกล้เคียงกัน ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกัน เช่น คู่ผสมระหว่าง *I. violaeflora* 2n = 12 ถูกจัดอยู่ใน Cluster 1 สามารถผสมกับ *I. chinensis* 2n = 16 ซึ่งถูกจัดอยู่ใน Cluster 2 และสามารถผสมกับ *I. duclouxii* 2n = 16, *I. santisukii* 2n = 10 ซึ่งถูกจัดอยู่ใน Cluster 3 ได้ *I. spectabilis* 2n = 32 ถูกจัดอยู่ใน Cluster 1 สามารถผสมกับ *I. nalampoonii* 2n = 32 ซึ่งถูกจัดอยู่ใน Cluster 6 ได้

บรรณานุกรม

จรัสศรี นวลศรี, กุลยา สุวรรณรัตน์ และ อมรรัตน์ บัวคล้าย. 2552. การใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Artocarpus* 6 ชนิด ในภาคใต้ของประเทศไทย. **วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร** 40(3) (พิเศษ) : 371-374.

จิรา ณ หนองคาย. 2541. **หลักและเทคโนโลยีการขยายพันธุ์พืชในประเทศไทย : การขยายพันธุ์แบบใช้เพศ.** กรุงเทพฯ: นายสุขจำกัด. 184 น.

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

ดวงกมล ทองอร่าม, วุฒิพงษ์ มหาคำ และ คทาวุธ นามดี. 2548. การจำแนกพืชสกุล Caulokaempferia K. Larsen โดยการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากข้อมูลทางชีววิทยาระดับโมเลกุล. **วารสารวิจัย มข.** 10(1): 5-11.

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

ธงไชย ทองอุทัยศรี. 2536. **เอกสารประกอบการสอนหลักการปรับปรุงพันธุ์พืช**. เชียงใหม่: คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 113 น.

ธีรนิดิ พวงกฤษ. 2555. **การศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ปทุมมาโดยการผสมข้ามชนิดระหว่างพืชในกลุ่ม Eucurcuma และ Paracurcuma.**วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 91 น.

นิตย์ศรี แสงเดือน. 2541. **พันธุศาสตร์พืช.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 295 น.

เนตรวิไล โชติรัตน์. 2548. **สัณฐานวิทยา กายวิภาควิทยา เซลล์วิทยา และการเจริญของดอกหงส์เหินที่รวบรวมจากเขตอำเภอดอยสะเก็ด และกิ่งอำเภอแม่ออน จังหวัดเชียงใหม่**.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 149 น.

นงนุช คูสันเทียะ. 2555. **การศึกษาความสามารถในการผสมและความสามารถในการต้านทานโรคแอนแทรคโนสของลูกผสมข้ามชนิดของพริก**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 88 น.

นพพร คล้ายพงษ์พันธุ์. 2546. **เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 261 น.

มินดา ชัยประสงค์สุข. 2547. **ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปรงในสกุล Encephalartos (*Zamiaceae*)** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 90 น.

รัชณี เพ็ชร์ชาง. 2553. ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการให้โคลชิซินต่อการเจริญและจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้เอื้องเงิน. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.** 29(4): 413-419.

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

สถาพร มณี. 2555. **การเพิ่มชุดโครโมโซม และการผลิตต้นกล้าที่มีโครโมโซม 3 ชุดของมะนาวน้ำหอม มะนาวแป้นทะวายและคัมควอทโดยการใช้สารโคลชิซีนและสารไดรฟลูราลิน.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 130 น.

สัมฤทธิ์ เฟื่องจันทร์. 2537. **สรีรวิทยาพืชสวน.** กรุงเทพฯ: ศิริภัณฑ์ออฟเซ้ท. 227 น.

สุจิตรา ยั่วยวน, เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี, ประสิทธิ์ โนรี และ ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์. 2554. การศึกษาความมีชีวิต ความสามารถในการงอกของเรณูและการติดผลของการผสมข้ามชนิดหงส์เหิน.**วารสารการประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ "แม่โจ้–แพร่ วิจัย ครั้งที่ 2"** :11- 17.

สุทิน พรหมโชติ และ รดาพร พยัฆทา. 2554. ความมีชีวิตและการงอกของหลอดละอองเกสรส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี** 13(3):1-7 .

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2552. **การปรับปรุงพันธุ์ไม้ประดับเอกสารประกอบการสอนหลักการปรับปรุงพันธุ์พืช**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 47 น.

สุลาวัลย์ มหาหิงส์ และ สุมนทิพย์ บุนนาค. 2550. การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.) ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น** 4(3) :13- 18.

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

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

อุษา เพชรบ้านนา, อนุชิต ชิราจริยวงศ์ และ พจมาลย์ สุรนิลพงศ์. 2552. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อของกล้วยไม้ดินใบหมากโดยใช้สาร โคลชิซิน. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร** 40(3) (พิเศษ): 111-114.

Arisumi ,T.1980. Cytology and morphology of ovule culture-derived interspecific *Impatiens hybrids*. **Journal of American Society for Horticulture Science** 112 (6): 1,026-1,031.

Asawatreratanakul, P. and Asawatreratanakul, K. (2005). "Genetic studies of slipper orchid from Southern Thailand using RAPD". pp. 165-169. In **31st Congress on Science and Tecnology of Thailand Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima.** Nakhon Ratchasima : Suranaree University of Technology.

Chadde, M . 2002. **Identifying Characteristic.** [Online]. Available http:// www. botanical .com /*impatiens*.html (15 March 2011).

Fei, S. and E. Nelson. 2003. Estimation of pollen viability, shedding pattern, and longevity of creeping bentgrass on artificial media. **Crop Science Society of America** 43(6): 2177-2181.

Fukai, S., N. Okubo and M. Goi. 2002. Effect of style condition on seed production in *Lilium*. **Hort. Abstr.** 72(4): 380.

Jie Wang, Li Huang, Man-zhu Baoand Guo-feng Liu. 2009. Production of interspecific hybrids between *Lilium longiflorum* and *L. lophophorum* var. *linearifolium* via ovuleculture at early stage. **Euphytica** 167(1): 45–55.

Larsen, K. 1981. Chromosome numbers in Impatiens from Thailand. **Nordic Journal of Botany** 1(1): 43– 44.

Loren C. 1998. Pollen fertility among BC2 offspring of Impatiens interspecific hybrids of New Guinea and Indonesian ancestry. **Euphytica**103(2): 219-222.

Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with Tobacco tissue culture. **Physiology Plant.** 47(4): 473-474.

Nurhan, H. 2003. In vitro pollen germination and pollen tube characteristics in Tetraploid Red. Clover (*Trifolium pretense* L.). **Turk J. Bot.** 27 (1):57-61.

Pieter, L. Caris, Koen P. Geuten, Steven B. Janssens and Eric F. Smets. 2006. Floral development in three species of impatiens (Balsaminaceae). **American Journal of botany** 93(1): 1-14.

Senawong K. 2003. **Characterization of Wild Impatiens**. M.Sc. thesis. Chiang Mai University. 125 p.

Song Y., P. Kupfer and Y. Y. Ming . 2003. Chromosomal evolution in Balsaminaceae ,with cytological observation on 45 species from Southeast Asia. **Caryologia** 56(4): 463 – 483.

Stevens, Koen,Yong-ming, Yi Song, Philippe and Erik. 2006. Phylogenetics of Impatiens and Hydrocera (Balsaminaceae) Using Chloroplast atpB-rbcl Sequences. **American Society of Plant Taxonomists** 31(1): 171-180.

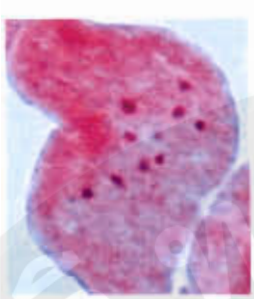
Tian, J. K. Liu and G. Hu .2004. Pollination Ecology and Pollination System of *Impatiens reptans* (Balsaminaceae) Endermic to China. **Annals of Botany** 93(2): 167-175.

Transeau, E.N., Sampson H.C. and Tiffany L.H. 1953. **Textbook of botany** . 2nd ed. New York : Harper brother. 817 p.

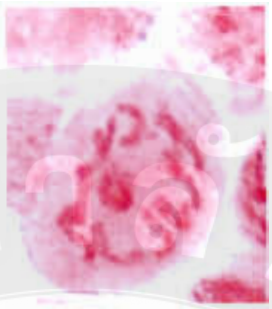
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ภาพการทดลอง

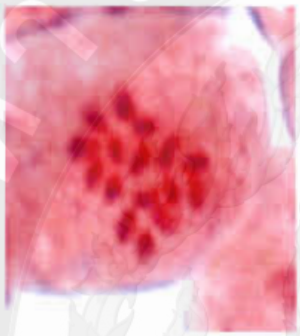


I. santisukii 2n = 10

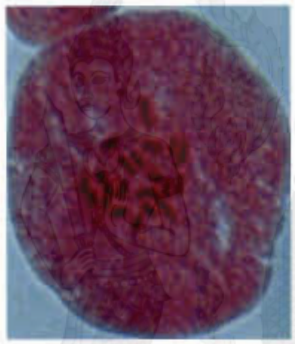


I. violaeflora 2n = 12

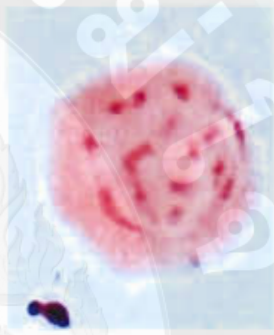
I. garrettii 2n = 14



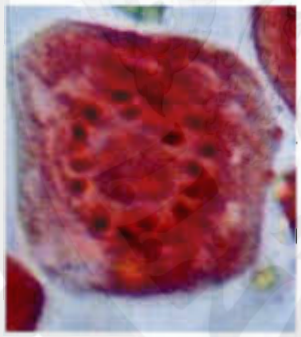
I.chinensis 2n = 16



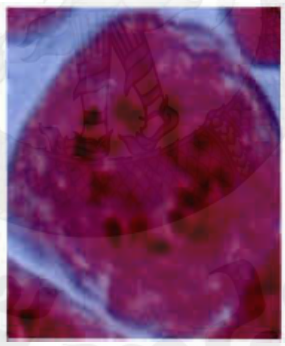
I. duclouxii 2n = 16



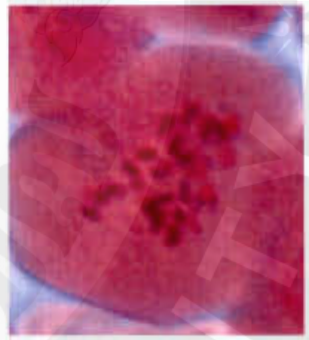
I. mengtszeana 2n = 16



I. kamtilongensis 2n = 16



I. longiloba 2n = 18



I. namkatensis 2n = 20

I. mirabilis 2n = 30

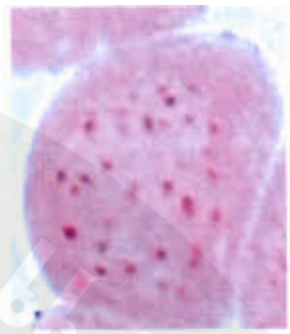
I. nalampoonii 2n = 32

I. sirindhorniae 2n = 32

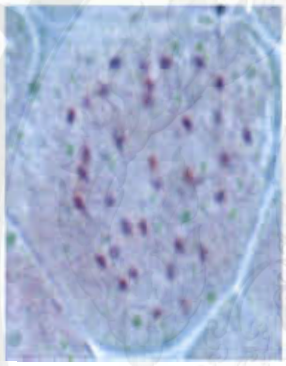
ภาพผนวก 1 โครโมโซม เทียนพื้นเมืองของไทย 17 ชนิด

I. spectabilis 2n = 32

I. sp. nov. 'Thunbergioides'
2n = 32



I. daraneenae 2n = 34



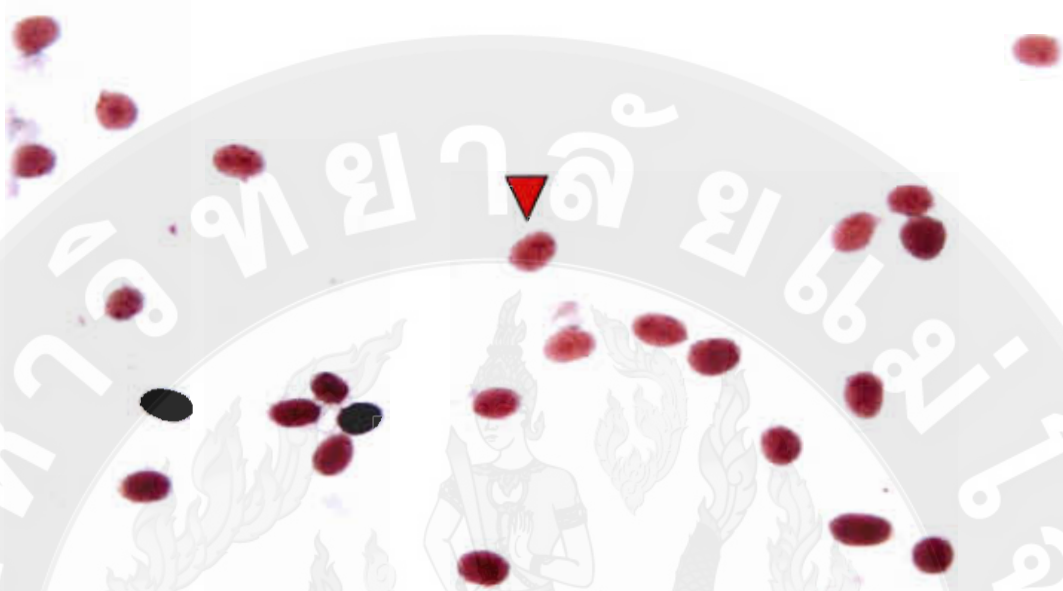
I. parishii 2n = 34

I. psittacina 2n = 34

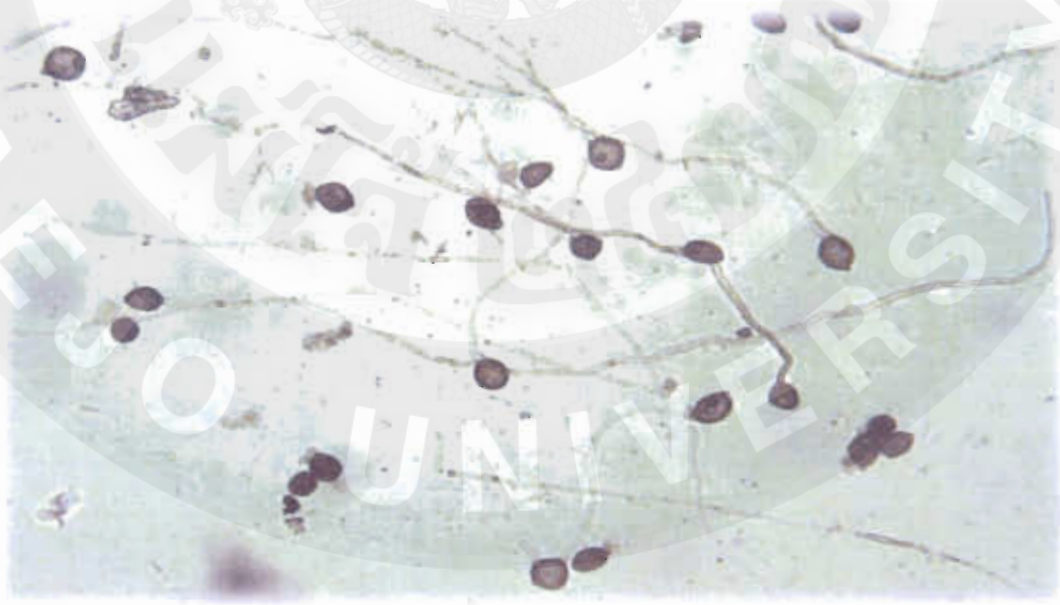
ภาพผนวก 1 (ต่อ)

ภาพผนวก 2 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง PCR ร่วมกับการใช้ Primer S 33 1; *I. nalampoonii*, 2; *I. sirindhorniae*, 3;*I. longiloba*, 4; *I. santisukii*, 5; *I. daraneenae*, 6; *I.chinensis*, 7; *I. psittacina*, 8; *I. violaeflora*, 9; *I. parishii*, 10; *I. garrettii*, 11; *I. duclouxii*, 12; *I. spectabilis*,13; *I. namkatensis*, 14; *I. sp. nov.* 'Thunbergioides', 15; *I. mirabilis*, 16; *I. mengtszeana* และ 17; *I. kamtilongensis*

ภาพผนวก 3 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง PCR ร่วมกับการใช้ Primer S 40 1; *I. nalampoonii*, 2; *I. sirindhorniae*, 3;*I. longiloba*, 4; *I. santisukii*, 5; *I. daraneenae*, 6; *I.chinensis*, 7; *I. psittacina*, 8; *I. violaeflora*, 9; *I. parishii*, 10; *I. garrettii*, 11; *I. duclouxii*, 12; *I. spectabilis*,13; *I. namkatensis*, 14; *I. sp. nov.* 'Thunbergioides', 15; *I. mirabilis*, 16; *I. mengtszeana* และ 17; *I. kamtilongensi*



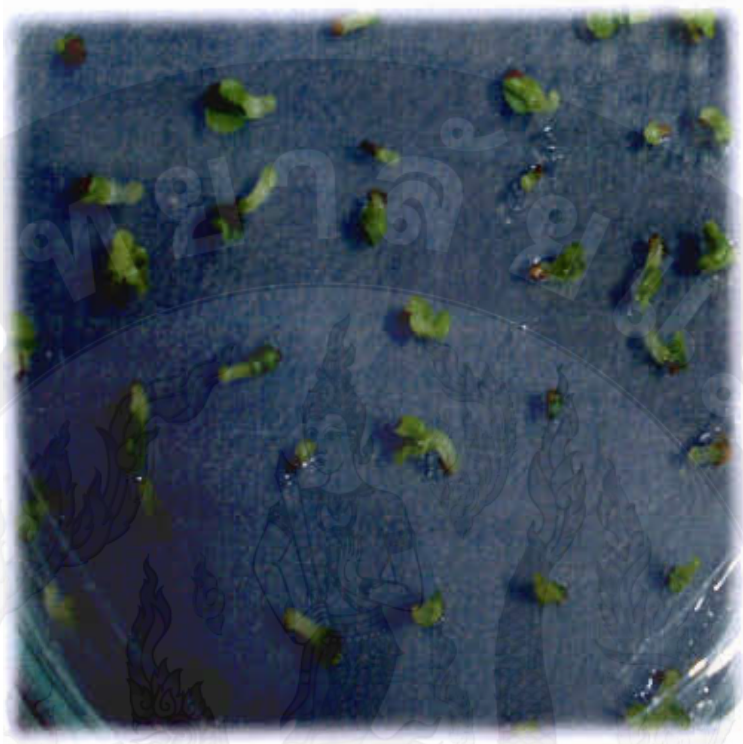
ภาพผนวก 4 ละอองเกสรที่มีมีชีวิตของเทียนสันติสุข



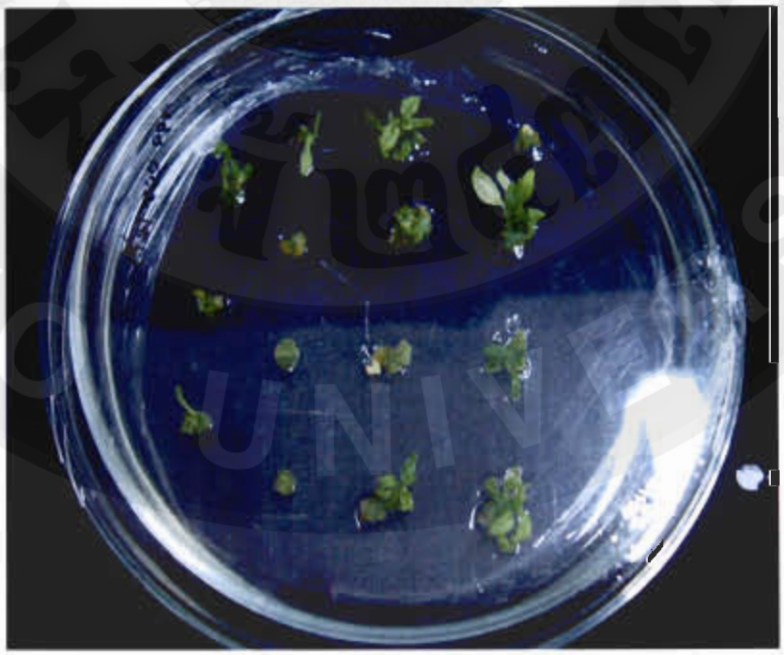
ภาพผนวก 5 การงอกหลอดเกสรของเทียนดอย

ภาพผนวก 6 ลักษณะของผลที่ได้จากการผสมข้ามชนิดของเทียน

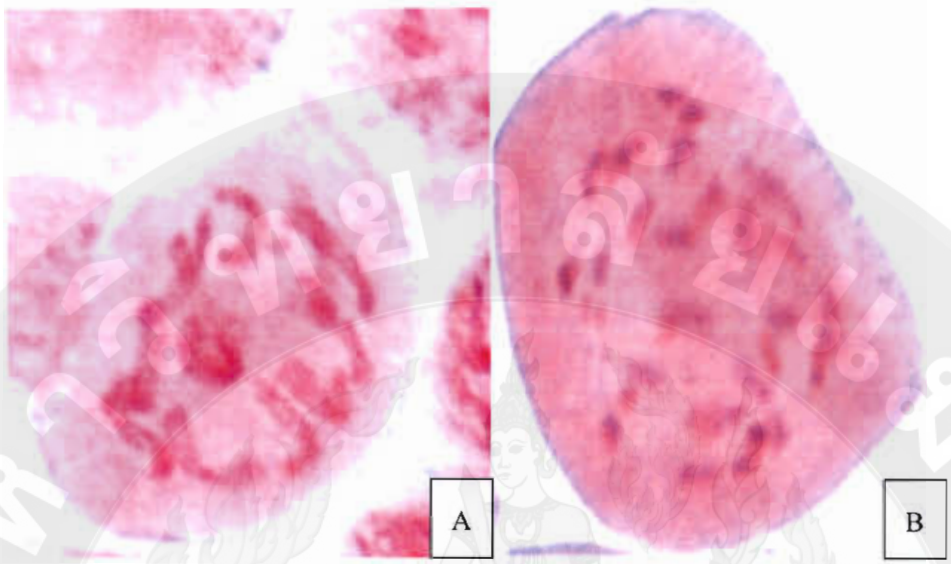
ภาพผนวก 7 ลักษณะของผลที่ฝ่อและหลุดร่วงจากการผสมข้ามชนิดของเทียน



ภาพผนวก 8 ต้นอ่อนที่เริ่มพัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อน



ภาพผนวก 9 ตาข้างที่เริ่มพัฒนาภายหลังจากการหยดสาร โคลชิซิน

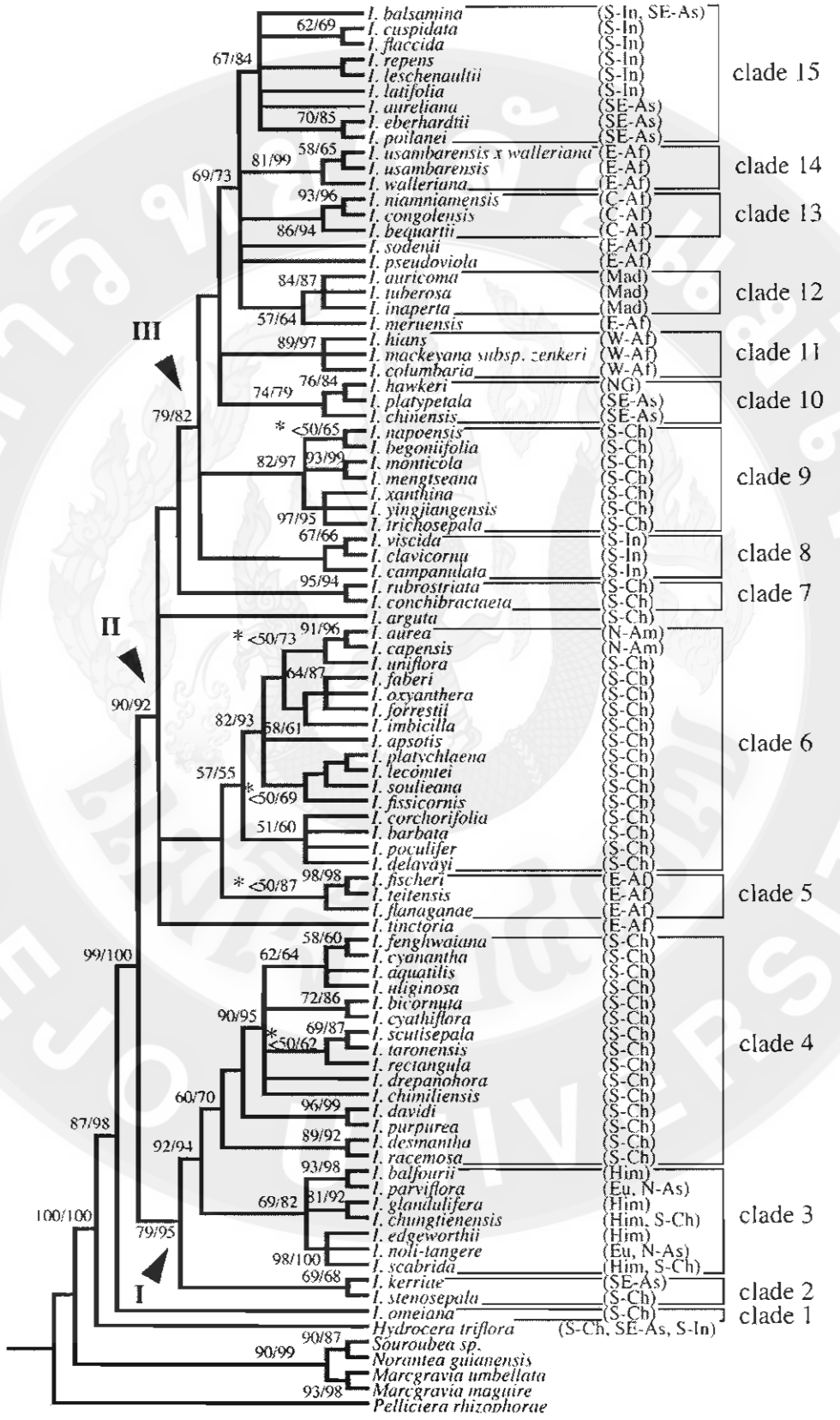


ภาพผนวก 10 โครโมโซมของเทียนดอย ดิพพลอยด์ A (2n = 2x) และ เตตราพลอยด์ B (2n = 4x)

ภาพผนวก 11 ละอองเกสรของเทียนสันติสุข

ภาพผนวก 12 อับละอองเกสรที่หลุดร่วงก่อนเกสรตัวเมียพร้อมผสม

ภาพผนวก 13 เกสรเพศเมียที่พร้อมผสม



ภาพผนวก 14 ความสัมพันธ์พันธุกรรมของเทียน โดย Stevens *et al.* (2006)

ภาคผนวก ข

ตารางผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ

ตารางผนวก 1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของละอองเกสรของเทียน

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	16	27258.76	1703.67255	593.41 **	1.95	2.58
Error	34	97.61	2.87097			
Total	50	27356.37				
C.V. (%)	1.93					

หมายเหตุ ** หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ตารางผนวก 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการงอกหลอดเกสรของเทียน

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	16	32214.02	2013.37	43.44**	1.95	2.58
Error	34	1575.81	46.34			
Total	50	33789.84				
C.V. (%)	10.71					

หมายเหตุ ** หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ตารางผนวก 3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์การผสมติดของการผสมสลับพ่อสลับแม่ระหว่างเทียนพื้นเมือง 11 ชนิด

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	109	25.76	0.23	2300**	1.32	1.48
Error	220	0.03	0.0001			
Total	329	25.78				
C.V. (%)	1.078869					
หมายเหตุ	** หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %					

ตารางผนวก 4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลของการผสมสลับพ่อสลับแม่ระหว่างเทียนพื้นเมือง 11 ชนิด

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	109	18.83	0.17	188.88 **	1.32	1.48
Error	220	0.21	0.0009			
Total	329	19.04				
C.V. (%)	2.99					
หมายเหตุ	** หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %					

ตารางผนวก 5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์ของการผสมสลับพ่อสลับแม่ระหว่างเทียนพื้นเมือง 11 ชนิด

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	109	943.17	8.65	108.12**	1.32	1.48
Error	220	18.55	0.08			
Total	329	961.73				
C.V. (%)	21.23					
หมายเหตุ	** หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %					

ตารางผนวก 6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์การผสมติดของการผสมข้ามชนิดระหว่างเทียนพื้นเมืองและเทียนพันธุ์การค้า

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	11	27.37	2.48	1305.26 **	2.22	3.09
Error	24	0.04	0.0019			
Total	35	27.41				
C.V. (%)	2.73					
หมายเหตุ	** หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %					

ตารางผนวก 7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลของการผสมข้ามชนิดระหว่างเทียนพื้นเมืองและเทียนพันธุ์การค้า

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	11	13.50	1.22	12.87**	2.22	3.09
Error	24	2.28	0.09			
Total	35	15.79				
C.V. (%)	23.16					
หมายเหตุ	** หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %					

ตารางผนวก 8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์เมล็ดสมบูรณ์ของการผสมข้ามชนิดระหว่างเทียนพื้นเมืองและเทียนพันธุ์การค้า

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	11	501.72	45.61	482.05**	2.22	3.09
Error	24	2.27	0.09			
Total	35	504.00				
C.V. (%)	9.75					
หมายเหตุ	** หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %					

ตารางผนวก 9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเตตราพลอยด์ของ *I. violaeflora*

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	4	19.32	4.83	18.69**	3.06	4.89
Error	15	3.87	0.25			
Total	19	23.20				
C.V. (%)	30.24					
หมายเหตุ	** หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %					

ตารางผนวก 10 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเตตราพลอยด์ของ *I. duclouxii*

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	4	12.63	3.15	12.22**	3.06	4.89
Error	15	3.87	0.25			
Total	19	16.51				
C.V. (%)	32.20					
หมายเหตุ	** หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %					

ตารางผนวก 11 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์การผสมติดโดยการผสมข้ามชนิดระหว่างต้นดิพลอยด์และเตตราพลอยด์

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	4	46.90	11.72	61.88**	3.48	5.99
Error	10	1.89	0.18			
Total	14	48.80				
C.V. (%)	14.65					

หมายเหตุ ** หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ภาคผนวก ค

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – สกุล	นายธนะภูมิ เหล่าจันตา	
เกิดเมื่อ	19 มีนาคม 2531	
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2544	มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนบุญวาทย์วิทยาลัย จังหวัดลำปาง
	พ.ศ. 2547	มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนบุญวาทย์วิทยาลัย จังหวัดลำปาง
	พ.ศ. 2553	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชศาสตร์) พืชสวนประดับ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่