



## รายงานผลการวิจัย



เรื่อง

การพัฒนาตัวเรืองสายพันธุ์เพศผู้เป็นหมันโดยการเพาะเลี้ยงโอวูล

Improvement of Male Sterile Line (A-line) Marigold via Ovule Culture

โดย

เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

2557

รหัสโครงการวิจัย

มจ. 1-56-016



## รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การพัฒนาสายพันธุ์เพศผู้เป็นหมันโดยการเพาะเลี้ยงอวูล

Improvement of Male Sterile Line (A-line) Marigold via Ovule Culture

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2556

จำนวน 350,000.00 บาท

หัวหน้าโครงการ เฉลิมาศรี นนทสวัสดิ์ศรี

งานเสร็จสิ้นสมบูรณ์

21 กันยายน 2557

## สารบัญ

|                           | หน้า |
|---------------------------|------|
| สารบัญตาราง               | ข    |
| สารบัญภาพ                 | ค    |
| บทคัดย่อ                  | 1    |
| Abstract                  | 2    |
| คำนำ                      | 3    |
| วัตถุประสงค์ของการวิจัย   | 3    |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 3    |
| การตรวจเอกสาร             | 4    |
| อุปกรณ์และวิธีการ         | 7    |
| ผลการวิจัย                | 14   |
| วิจารณ์ผลการวิจัย         | 34   |
| สรุปผลการวิจัย            | 39   |
| เอกสารอ้างอิง             | 40   |



## สารบัญตาราง

| ตารางที่                                                                                                                                  | หน้า |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการเกิดแคลลัสของดาวเรืองอเมริกันแต่ละสายพันธุ์                                                                | 15   |
| ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากการศึกษาอิทธิพลร่วมระหว่างสายพันธุ์ สูตรอาหาร 2 สูตรและวงของชั้นกลีบดอก 4 วง               | 16   |
| ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นยอดเฉลี่ยของดาวเรือง 6 สายพันธุ์ในแต่ละชั้นของกลีบดอก (วง) จากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS | 17   |
| ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของยอดจากการหยุดโคลชิซินในความเข้มข้นต่างๆ                                                            | 27   |



## สารบัญภาพ

| ภาพที่    | หน้า                                                                                                                             |    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ภาพที่ 1  | ขนาดของดาวเรืองที่ใช้ในการศึกษา                                                                                                  | 8  |
| ภาพที่ 2  | ภาพขนาดแต่ละชั้นของกลีบดอกที่ศึกษา                                                                                               | 9  |
| ภาพที่ 3  | การเพาะเลี้ยงโอรุลดาวเรืองจนเกิดเป็นแคลลัสบนอาหารเพาะเลี้ยง                                                                      | 15 |
| ภาพที่ 4. | การพัฒนาเป็นยอดจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 mg/L และ NAA 0.1 mg/L                                    | 18 |
| ภาพที่ 5  | การพัฒนาของแคลลัสจากอาหารทั้งสองสูตรเมื่อย้ายลงอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต                                            | 18 |
| ภาพที่ 6  | A ดอกดาวเรืองขนาดต่างๆ B. ละอองเกสรดาวเรืองในระยะ tetrad (ลูกศรชี้)<br>C. ละอองเกสรดาวเรืองในระยะที่พัฒนาเป็นละอองเกสรที่สมบูรณ์ | 19 |
| ภาพที่ 7  | การเกิดแคลลัสและต้น(%) จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของดาวเรืองบนอาหารสูตรต่างๆ                                                   | 21 |
| ภาพที่ 8  | แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรบนอาหารสูตรต่างๆ                                                                        | 22 |
| ภาพที่ 9  | A. แคลลัสที่ย้ายปลูกลงสู่อาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต<br>B. จุดกำเนิดยอดพัฒนามบนแคลลัส C. ยอดใหม่ที่พัฒนามบนแคลลัส       | 23 |

## D-E ต้นที่พัฒนาจากแคลลัส

|           |                                                                                                                                                                                    |    |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ภาพที่ 10 | แสดงรูปแบบ RAPD ของต้นดาวเรืองเมื่อใช้ primer OPU 6 เลนส์                                                                                                                          | 24 |
| ภาพที่ 11 | ดอกดาวเรือง ต้นแม่ที่นำอับละอองเกสรมาเพาะเลี้ยงและต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร                                                                                            | 24 |
| ภาพที่ 12 | ดอกที่เกิดจากต้นที่ได้จากเมล็ดที่เกิดจากการผสมตัวเองของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร                                                                                       | 25 |
| ภาพที่ 13 | ภาพการตรวจนับจำนวนโครโมโซม                                                                                                                                                         | 26 |
| ภาพที่ 14 | ต้นดาวเรืองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโอวูล                                                                                                                                             | 28 |
| ภาพที่ 15 | การหยดโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆบนยอดของดาวเรือง                                                                                                                                     | 29 |
| ภาพที่ 16 | ลักษณะของต้น ดอก และจำนวนโครโมโซมของดาวเรืองที่เป็นดิพลอยด์ และแฮพลอยด์                                                                                                            | 30 |
| ภาพที่ 17 | ลักษณะของดอกดาวเรืองสายพันธุ์แท้ที่มีเกสรเพศผู้เป็นหมันได้จากการเพาะเลี้ยงโอวูล และทำการเพิ่มโครโมโซมด้วยสารโคลชิซิน                                                               | 31 |
| ภาพที่ 18 | ลักษณะลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้จากการผสมเกสรของต้นสายพันธุ์แท้สายพันธุ์แม่(เกสรเพศเป็นหมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโอวูล)กับต้นสายพันธุ์แท้สายพันธุ์พ่อ(ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร) | 33 |
| ภาพที่ 19 | (A.) ดาวเรืองที่มีลักษณะต้นใส<br>(B.) ลักษณะต้นดาวเรืองที่ย้ายลง media เป็นเวลา 4 สัปดาห์                                                                                          | 36 |



# การพัฒนาดาวเรืองสายพันธุ์เพศผู้เป็นหมันโดยการเพาะเลี้ยงโอวุล

## Improvement of Male Sterile Line (A-line) Marigold via Ovule Culture

เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี<sup>1</sup>

<sup>1</sup> สาขาพืชสวนประดับ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สันทรายเชียงใหม่

50290

### บทคัดย่อ

การศึกษาการเพาะเลี้ยงโอวุลบนสูตรอาหารที่มีผลต่อการเกิดแคลลัสในดาวเรืองพบว่าอาหารสูตร MS เหมาะสมต่อการนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดเป็นต้น และดาวเรืองสายพันธุ์OMAR 314 สามารถเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 mg/L และ NAA 0.1 mg/L (47.5%) และมีความสามารถในการเกิดยอดมากที่สุด (20.52%) ในอาหารที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและจากการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโอวุลพบว่าต้นที่เกิดยอดเป็นต้นแฮพลอยด์ 55.56% จากยอดที่พัฒนาได้ทั้งหมด การศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมของดาวเรืองเพื่อสร้างสายพันธุ์แท้พบว่าโคลชิซินที่ ความเข้มข้น 100 ppm สามารถเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในดาวเรืองที่เป็นแฮพลอยด์ให้เป็นต้น 2n ปกติที่เป็นสายพันธุ์แท้ A-line ได้ การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเพื่อสร้างสายพันธุ์ C-line พบว่า อับละอองเกสรของดาวเรืองขนาดดอกใหญ่ กลาง และเล็กที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA และอับละอองเกสรจากดอกขนาดเล็กและขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA สามารถเกิดแคลลัสได้สูง และเมื่อทำการย้ายแคลลัสลงสู่อาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดต้นพบว่าแคลลัสที่เกิดจากดอกขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B 5 ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA จะสามารถชักนำให้เกิดต้นได้สูงสุดเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ และต้นที่ได้ส่วนใหญ่เป็นต้น 2n ที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนของโครโมโซมขึ้นเองในระหว่างเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทำให้ได้ต้นสายพันธุ์แท้โดยไม่ต้องใช้สารโคลชิซิน และเมื่อทำการผสมข้ามระหว่างต้นสายพันธุ์แม่ที่เกสรเพศผู้เป็นหมัน(A-line) กับต้นเพศผู้ที่เป็นสายพันธุ์แท้(C-line) พบว่าได้ลูกผสมที่มีลักษณะดีจำนวน 3 สายพันธุ์

คำสำคัญ : ดาวเรือง การเพาะเลี้ยงอวัยวะ สายพันธุ์แท้ และ เกสรเพศผู้เป็นหมัน

### Abstract

A study on ovule culture of marigold for pure line production was found that MS medium was suitable for shoot induction. Marigold line OMAR314 produced highest calli when cultured on MS medium with 1 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA and produced highest shoots (20.52%) when subculture onto MS free medium. A study on chromosome numbers found that 55.56 % of regenerated shoots were haploid. The 100 ppm. colchicine was optimum concentration for increasing chromosome number from haploid to homozygous diploid (A-line). For anthers culture found that anther from big, medium and small size marigold inflorescent cultured on B5 medium containing 5 mg/LBA and 0.1 mg/L NAA and the anther from medium and small size inflorescent culture on MS medium containing 1 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA could produced high calli and when subculture onto MS Free found that calli from B5 medium with 1mg/L BA and 0.1 mg/L NAA produced high shoots(20%). Almost regenerated shoots were homozygous male line (C-line) could produced good 3 F1 hybrids.

**Keyword :** Marigold ovule culture pure-line and male sterile

## คำนิยม

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่สนับสนุนทุนในการทำการวิจัยนี้ และ คณะผลิตกรรมการเกษตร ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและสถานที่ในการทำการวิจัยในครั้งนี้

เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี

## คำนำ

ดาวเรืองเป็นไม้ดอกที่ได้รับความนิยมและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก ในปีหนึ่งๆเกษตรกรใช้เมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวนมากในแต่ละปี ซึ่งในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่หนึ่งนั้นสิ่งที่สำคัญคือการสร้างสายพันธุ์พ่อแม่ ซึ่งโดยปกติการสร้างสายพันธุ์พ่อแม่ซึ่งเป็นสายพันธุ์แท้นั้นทำได้ยากอยู่แล้ว สำหรับดาวเรืองซึ่งมีช่อดอกเป็นแบบ Head ซึ่งมีดอกจำนวนมากต่อหนึ่งช่อดอกและดอกมีขนาดเล็กยากต่อการตอนดอก การใช้ระบบเกษตรเพศผู้เป็นหมันมาช่วยทำให้สายพันธุ์แม่ที่ใช้สร้างลูกผสมชั่วที่ 1 นั้นมีลักษณะเพศผู้เป็นหมันจะช่วยทำให้การผสมเกสรเพื่อสร้างสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่หนึ่งง่ายและสะดวกมาก ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการค้า

## วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1 เพื่อพัฒนาสายพันธุ์เกษตรเพศผู้เป็นหมันในดาวเรือง

## 2 เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงโอวูลของดาวเรือง

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถทราบวิธีสกัดสายพันธุ์แท้และสร้างสายพันธุ์แท้ที่เพศผู้เป็นหมันเพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์และการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่1

### การตรวจเอกสาร

ในการสร้างสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่1นั้นสิ่งสำคัญคือการสร้างสายพันธุ์แท้ที่เป็นสายพันธุ์พ่อแม่ซึ่งการสร้างสายพันธุ์แท้จะใช้การผสมตัวเองหลายๆชั่วซึ่งต้องใช้เวลาและค่าใช้จ่ายมาก นอกจากนี้ดาวเรืองเป็นไม้ดอกที่มีช่อดอกแบบ Head ประกอบด้วยดอก 2 ประเภทคือ Ray floret และ Disc floret ใน1 ช่อดอกนั้นจะประกอบด้วยดอกย่อยจำนวน 200-500 ดอกซึ่งดอกย่อยจะมีขนาดเล็กทำให้การผสมเกสรทำได้ยาก จึงได้มีการพัฒนาสายพันธุ์แม่ที่เกสรเพศผู้เป็นหมันซึ่งช่วยให้ง่ายในการผสมแต่จะยากในการพัฒนาสายพันธุ์แม่ที่เกสรเพศผู้เป็นหมัน ระบบเกสรเพศผู้เป็นหมันมี3 แบบคือ ระบบเกสรเพศผู้เป็นหมันที่เกิดจากยีนในนิวเคลียส ระบบเกสรเพศผู้เป็นหมันที่เกิดจากยีนในไซโตพลาสซึม และ ระบบเกสรเพศผู้เป็นหมันที่เกิดจากยีนในนิวเคลียสร่วมกับยีนในไซโตพลาสซึม โดยระบบเกสรเพศผู้เป็นหมันแบบเกสรเพศผู้เป็นหมันที่เกิดจากยีนในนิวเคลียสร่วมกับยีนในไซโตพลาสซึม จะนิยมใช้มากที่สุดเพราะสะดวกในการใช้ผลิตสายพันธุ์ลูกผสม

ในการสร้างสายพันธุ์แท้ปัจจุบันจะนิยมใช้ วิธีการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรแต่ในการพัฒนาสายพันธุ์แม่ที่มีเกสรเพศผู้เป็นหมันไม่สามารถพัฒนาโดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรได้การใช้การเพาะเลี้ยงโอวูลจะสามารถแก้ปัญหานี้ได้ แม้ว่าการเพาะเลี้ยงโอวูลยังไม่นิยมแพร่หลายเท่าการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเนื่องจากการเพาะเลี้ยงโอวูลจะยุ่งยากและได้ผลน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรแต่นักวิจัยจำนวนมากก็ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงโอวูล เช่น Tosca และคณะ (1999) ได้รายงานถึงความแตกต่างของเยอร์บีร่า 4สายพันธุ์ ในการชักนำให้เกิดแคลลัสและความสามารถในการชักนำให้เกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงโอวูล (ovule) ใน

ทานตะวัน Jonard และ Mazzarobba (1990) ได้รายงานถึงความสามารถในการชักนำให้เกิดแคลลัสและสามารถชักนำให้เกิดยอดในทานตะวันสายพันธุ์ป่าแต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ในสายพันธุ์ปลูก สำหรับการเพาะเลี้ยง ovule นั้นมักทำการเพาะเลี้ยง ovule ที่โตเต็มที่แต่ไม่ได้รับการผสม ในเยอร์บีรา Tosca และคณะ (1999) และ Miyoshi และ Asakura, (1996) สามารถชักนำการเกิดแคลลัสและยอดในการเลี้ยง ovule โตเต็มที่แต่ไม่ได้รับการผสม Musial และคณะ (2001) รายงานความสำเร็จในการเพาะเลี้ยง ovule ของหอมในระยะที่ดอกเจริญมากที่สุดแต่ยังไม่บานและสามารถผลิตต้นหอมที่มีโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่งได้ สภาพทางสรีรวิทยาของพืชที่นำเซลล์หรืออวัยวะมาทำการเพาะเลี้ยง Afele และคณะ 1992 กล่าวว่า การขาดธาตุอาหารในขณะที่พืชได้รับอุณหภูมิที่ต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตจะช่วยชักนำให้เกิดยอดในการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ Puddephat และคณะ (1999) ประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดต้นในการเพาะเลี้ยงโอดูลของหอมโดยนำต้นแม่ไปปลูกที่อุณหภูมิ 10-15 °C อาหารที่ทำการเพาะเลี้ยงองค์ประกอบของธาตุอาหารและฮอร์โมนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์และอวัยวะสืบพันธุ์ของพืชนั้นเป็นปัจจัยมีผลต่อความสำเร็จในการชักนำให้เกิดยอดในการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อเหล่านี้เป็นอย่างมาก Muren 1989 สามารถชักนำพืชที่มีโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่งจากการเลี้ยงโอดูลของหอมบนอาหาร B5 เป็นต้น

#### การสร้างพืชแฮพลอยด์จากการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย

Jana และ Borut ได้กล่าวว่าการสร้างพืชแฮพลอยด์จากเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียทำได้โดยการเลี้ยงในส่วนของดอกที่ยังไม่ได้รับการผสม เช่น โอดูล, รังไข่ หรือ ส่วนของตาดอกทั้งหมด พืชที่ทำสำเร็จจากการทดลองใช้ส่วนของดอกที่ยังไม่ได้รับการผสม เช่น หัวหอม แตงกวา ทานตะวัน ข้าว บาร์เลย์ เป็นต้น (Bohanec, 2009 และ Chen et al., 2011) การทดลองสร้างพืชแฮพลอยด์ของ Van และคณะ (1987) จากการเพาะเลี้ยงโอดูลของ sugarbeet ได้ผลการเกิดเป็นแคลลัสต้นอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย BAP 0.3 mg/L ควบคู่กับ NAA 0.1 mg/L และ 2, 4 D 0.05 mg/L การทดลองของ Norio และ Sumio (1993) สร้างพืชแฮพลอยด์ในยาสูบ จากการเพาะเลี้ยงโอดูล พบว่า หลังจากการเพาะเลี้ยง 3- 4 สัปดาห์ บนอาหารสูตร N6 ที่ประกอบด้วย KN 8 mg/L ควบคู่กับ IAA 0.5 mg/L และ น้ำตาล 5% มีการพัฒนาเป็นต้นอ่อนขนาดเล็กหรือเกิดเป็นแคลลัสได้

#### การเพิ่มโครโมโซม

นอกจากการเกิดโพลีพลอยดีในสภาพธรรมชาติแล้ว นักปรับปรุงพันธุ์พืชยังสามารถสร้างพืชโพลีพลอยด์ขึ้นได้โดยใช้สารโคลชิซิน (colchicine) ในการเพิ่มชุดโครโมโซม สารโคลชิซินนี้สกัดได้มาจากเมล็ดและหัวของต้นดองดึง (Climbing lily) ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Gloriosa superba* L. เมื่อนำสารนี้ในความเข้มข้นประมาณ 0.1 – 2% ไปใช้เพาะเมล็ดหรือใช้ในการจุ่มต้นกล้าของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ซึ่งโดยทั่วไปมีความทนทานต่อสารโคลชิซินได้เป็นอย่างดี (บุญหงษ์, 2548) หรือใช้ในความเข้มข้น 0.1 – 0.5 % ใส่ที่เนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโต เช่น เมล็ดที่กำลังงอก ต้นอ่อน และตา เป็นต้น ก็จะมีผลในการป้องกันการสร้างเส้นใยสปินเดิล (spindle fiber) ซึ่งมีส่วนสำคัญในการแยก โฮโมโลกัสโครโมโซม (homologous chromosome) ออกจากกันในการแบ่งตัวของเซลล์ (ธงชัย, 2536) ในขณะที่พืชแบ่งเซลล์ ทำให้ได้เซลล์พืชที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ในกรณีบางพืชใบเลี้ยงคู่ นั้น การใช้สารโคลชิซินอาจเป็นอันตรายต่อระบบราก จึงควรหลีกเลี่ยงการใช้กับรากโดยหยดน้ำยารวันละ 1 – 2 หยด ลงบนยอดของต้นกล้าใบเลี้ยงคู่หรืออาจใช้วิธีจุ่มยอดของต้นกล้างลงในน้ำยากี้ได้ นอกจากนั้นอาจใช้สารเคมีอื่นๆ แทนโคลชิซินได้ เช่น อีเทอร์ (ether), คลอโรฟอร์ม (chloroform), ไนตรัส ออกไซด์ (nitrous oxide) เป็นต้น แต่กฤษฎา (2527) กล่าวว่าโคลชิซินเป็นอันตรายน้อยกว่าพืชที่ใช้เกือบทุกชนิด โดยทั่วไปแล้วการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็น 2 เท่าสามารถทำในพืชที่มีจำนวนโครโมโซมต่ำได้ง่ายกว่าพืชที่มีจำนวนโครโมโซมสูงกว่า (บุญหงษ์, 2548)

### การผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม

ในพืชผสมข้ามถ้าบังคับให้พืชผสมตัวเองไปเรื่อยๆ พืชจะอ่อนแอ แต่ถ้ามีการคัดเลือกลักษณะดีไว้ในแต่ละชั่ว แล้วผสมตัวเองพืชจะคงลักษณะเด่นนั้นไว้ในสายพันธุ์บริสุทธิ์ (pure line หรือ homozygous line) การนำสายพันธุ์บริสุทธิ์ 2 สายพันธุ์ มาผสมกัน จะได้ลูกผสมที่เรียกว่า F1 hybrid (F ย่อมาจาก Filial แปลว่ารุ่นลูก) ซึ่งมีความแข็งแรงกว่าพ่อแม่ และแข็งแรงกว่ากลุ่มเดิมที่คัดต้นพ่อแม่ออกมาได้ การผลิต F1 hybrid ไม่ใช่ทำได้ง่ายๆ คือจากจำนวนเป็นพันสายพันธุ์ ให้เลือกพันธุ์ที่ต้องการมาเช่น สายพันธุ์ที่ต้านทานโรคมะสมกับอีกสายพันธุ์หนึ่งที่เคยใช้ผลิต F1 ได้ดี จะได้ลูกผสมชุดหนึ่งแล้วนำเมล็ดมาปลูก และประเมินผลจากแต่ละต้นของลูกผสมชุดนั้น คัดเลือกต้นที่ดีที่สุด แล้วผลิตเพิ่มเพื่อปลูกในสภาพแวดล้อมต่างๆ เปรียบเทียบกับพันธุ์ที่ปลูกกันอยู่เป็นการค้าเพื่อให้แน่ใจว่าดีกว่า ถ้าดีกว่าจริงจึงผลิตให้มากพอต่อการจำหน่าย

ข้อดีของเมล็ด F1 hybrid คือมีความสม่ำเสมอดีมาก ถ้าเป็นผักจะแก่พร้อมกันทำให้สะดวกแก่การเก็บเกี่ยว การคัดบรรจุหีบห่อทำได้ง่ายเพราะมีขนาดและรูปร่างเหมือนกัน ถ้าเป็นไม้ดอกจะได้ต้นที่มีความสูงสม่ำเสมอ มีรูปร่างเหมือนกัน ดอกบานพร้อมกันหมด ดอกมีสีสดสม่ำเสมอโดยตลอด บางครั้งออกดอกเร็วกว่าพันธุ์ทั่วๆ ไปด้วย

การผลิต F1 hybrid ทุกขั้นตอนต้องทำด้วยมือ จึงทำให้มีราคาแพงกว่าเมล็ดธรรมดาหลายเท่าตัว ผู้ที่เป็นเจ้าของพันธุ์แต่เพียงผู้เดียวคือนักผสมพันธุ์พืช ซึ่งทราบว่พ่อแม่คู่ใดผสมแล้วจะให้พันธุ์ F1 และโดยทั่วไปเมล็ดจากต้น F1 คือ F2 จะมีลักษณะไม่ดี เนื่องจากยีนส์กระจายตัวและจับคู่ใหม่จึงมีคำแนะนำว่าไม่ควรเก็บเมล็ดจาก F1 hybrid ไปปลูก เมล็ด F1 hybrid จึงต้องผลิตใหม่ทุกครั้งที่ต้องการ โดยสายพันธุ์บริสุทธิ์ 2 สายพันธุ์ ซึ่งนักผสมพันธุ์พืชเก็บรักษาไว้ในสภาพของเมล็ดหรือกิ่งชำ (นันทิยา, 2553)

#### อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่1 การเพาะเลี้ยงโอวูลของดาวเรืองเพื่อสร้างสายพันธุ์ต้นแม่ที่เกสรเพศผู้เป็นหมัน

#### อุปกรณ์

1. ดอกของดาวเรืองในระยะที่ดอกโตเต็มที่แต่กลีบดอกยังไม่บานของพันธุ์ดาวเรือง 6 ประชากร ได้แก่

สายพันธุ์ที่ 1 OMAR 052

สายพันธุ์ที่ 2 OMAR 302

สายพันธุ์ที่ 3 OMAR 311

สายพันธุ์ที่ 4 OMAR 312

สายพันธุ์ที่ 5 OMAR 313

สายพันธุ์ที่ 6 OMAR 314

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ปากคิบนานาขนาดต่างๆ ตะเกียง-แอลกอฮอล์ กระดาษหิซุที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการนึ่งแล้ว ผ้าทำความสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการนึ่งแล้ว มีดผ่าตัด จานแก้ว กล้องจุลทรรศน์

3. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหาร ได้แก่ ซอนตักสารเคมี หม้อนึ่งความดันไฟฟ้า (Autoclave) สำหรับนึ่งฆ่าเชื้ออาหาร เครื่องชั่งไฟฟ้า เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) เครื่องแม่เหล็กคนสาร (magnetic stirrer) และแท่งแก้วคนสาร

4. สารเคมีต่างๆ

- สารเคมีสำหรับฆ่าเชื้อ ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้น 1%  
น้ำยาล้างจาน เอทานอล 70% และ Tween 20

- สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ Thidiazuron (TDZ),

6- Benzylaminopurine (BA) และ Naphthaleneacetic acid (NAA)

- สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962) และสูตร Gamborg's B<sub>5</sub> (1970) ประกอบด้วย

## วิธีการ

เก็บดอกดาวเรืองในระยะที่ดอกใหญ่เต็มที่(พร้อมที่จะบานในวันถัดไป)แต่กลีบดอกยังไม่บานขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 – 2 เซนติเมตรล้างด้วยน้ำยาล้างจาน 1 รอบ จากนั้นนำไปจุ่มเอทานอล 70% ประมาณ 5-10 วินาทีแล้วนำมาแช่โซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้น 1% เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วอีก 3 ครั้ง จากนั้นผึ่งให้แห้งใช้กล้อง สเตอร์ไอส์องเพื่อผ่าเอาเฉพาะส่วนที่เป็นโอรุลไปวางบนอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ



ภาพที่ 1 ขนาดของดาวเรืองที่ใช้ในการศึกษา

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD มี 3 ปัจจัยคือ

ปัจจัยที่ 1 สูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต มี 2 ระดับ คือ

- 1.1 อาหารสังเคราะห์สูตร MS medium ที่ประกอบด้วย TDZ 1 mg/L และ NAA 0.1 mg/L
- 1.2 อาหารสังเคราะห์สูตร B5 medium ที่ประกอบด้วย BA 1 mg/L และ NAA 0.1 mg/L

ปัจจัยที่ 2 สายพันธุ์ดาวเรือง มี 6 ระดับ คือ

สายพันธุ์ที่ 1 OMAR 052

สายพันธุ์ที่ 2 OMAR 302

สายพันธุ์ที่ 3 OMAR 311

สายพันธุ์ที่ 4 OMAR 312

สายพันธุ์ที่ 5 OMAR 313

สายพันธุ์ที่ 6 OMAR 314

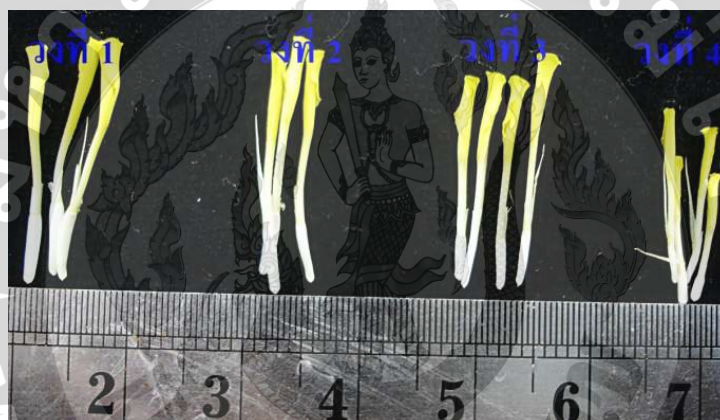
ปัจจัยที่ 3 วงของดาวเรือง มี 4 ระดับ คือ

วงที่ 1 (กลีบดอกชั้นนอกสุด)

วงที่ 2 (กลีบดอกชั้นที่2 นับจากกลีบนอกสุด)

วงที่ 3 (กลีบดอกชั้นที่3 นับจากกลีบนอกสุด)

วงที่ 4 (กลีบดอกชั้นที่4นับจากกลีบนอกสุด)



ภาพที่ 2 ภาพขนาดแต่ละชั้นของกลีบดอกที่ศึกษา

กำหนดแผนการทดลองให้มี 48 กรรมวิธี ( $2 \times 6 \times 4$ ) แต่ละวิธีใช้โอรุสทั้ง 4 วง โดยใช้วงละ 5 โอรุสทดลองทั้งหมดจำนวน 4 ซ้ำ

### การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกเปอร์เซ็นต์เกิดแคลลัส

$$\text{โดยคำนวณจาก} \quad \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนทั้งหมด}} \times 100$$

2. บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด

โดยคำนวณจาก  $\frac{\text{จำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้น} \times 100}{\text{จำนวนชิ้นส่วนแคลลัสทั้งหมด}}$

## การวิเคราะห์ผลการทดลอง

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

## การทดลองที่2 การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของดาวเรืองเพื่อสร้างสายพันธุ์ต้นพ่อแม่ในการผลิตลูกผสม ขั้นที่1

### อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในการศึกษาพัฒนาการของดอกดาวเรือง โดยใช้ดอกดาวเรืองขนาดต่างๆ จากประชากรทั้ง 12 ประชากร (ในการศึกษาปีแรก 6 ประชากรและในปีที่2 6 ประชากร) กล้องจุลทรรศน์ สีย้อม Hematoxylin
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ปากคีบขนาดต่างๆ ตะเกียงแอลกอฮอล์ กระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการนึ่งแล้ว ผ้าทำความสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการนึ่งแล้ว มีดผ่าตัด จานแก้ว กล้องจุลทรรศน์
3. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหาร ได้แก่ ซ้อนตักสารเคมี หม้อนึ่งความดันไฟฟ้า (Autoclave) สำหรับนึ่งฆ่าเชื้ออาหาร เครื่องชั่งไฟฟ้า เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) เครื่องแม่เหล็กคนสาร (magnetic stirrer) และแท่งแก้วคนสาร
4. สารเคมีต่างๆ
  - สารเคมีสำหรับฆ่าเชื้อ ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้น 1% น้ำยาล้างจาน เอทานอล 70% และ Tween 20
  - สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ Thidiazuron (TDZ), 6-Benzylaminopurine (BA) และ Naphthaleneacetic acid (NAA)
  - สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ อาหารสังเคราะห์

สูตร Murashige and Skoog (1962) และสูตร Gamborg's B<sub>5</sub> (1970)

### วิธีการ

เก็บดอกดาวเรืองในระยะที่ขนาดต่างๆเพื่อหาดอกที่มีละอองเกสรอยู่ในระยะ tetrad กลับดอกยังไม่บานขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 – 2 เซนติเมตรล้างด้วยน้ำยาล้างจาน 1 รอบ จากนั้นนำไปจุ่มเอทานอล 70% ประมาณ 5-10 วินาทีแล้วนำมาแช่โซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้น 1% เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วอีก 3 ครั้ง จากนั้นผึ่งให้แห้งใช้กล้องสเตอริโอส่องเพื่อผ่าเอาเฉพาะส่วนที่เป็นโอดูลไปวางบนอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ

ทำการวางแผนทดลองแบบ Factorial in CRD มี 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 สูตรอาหารที่ใช้ มี 8 ระดับ คือ

- MS + 1 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA + น้ำตาล 30 g<sup>-1</sup> l
- MS + 5 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA + น้ำตาล 30 g<sup>-1</sup> l
- MS + 1 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA + น้ำตาล 30 g<sup>-1</sup> l
- MS + 5 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA + น้ำตาล 30 g<sup>-1</sup> l
- B<sub>5</sub> + 1 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA + น้ำตาล 30 g<sup>-1</sup> l
- B<sub>5</sub> + 5 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA + น้ำตาล 30 g<sup>-1</sup> l
- B<sub>5</sub> + 1 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA + น้ำตาล 30 g<sup>-1</sup> l
- B<sub>5</sub> + 5 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA + น้ำตาล 30 g<sup>-1</sup> l

ปัจจัยที่ 2 ขนาดดอกที่ใช้ แบ่งได้เป็น 3 ขนาดคือ

- ดอกขนาด 0.6 ซม.
- ดอกขนาด 0.75 ซม.
- ดอกขนาด 0.9 ซม.

กำหนดการทดลองให้มี 24 วิธีการ (8 × 3) ในแต่ละวิธีการจะมีอับละอองเรณู (anther) 10 อัน ทำการทดลองทั้งหมดจำนวน 5 ซ้ำ

### การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกขนาดของดอกที่พบละอองเกสรอยู่ในระยะ tetrad
2. บันทึกเปอร์เซ็นต์เกิดแคลลัส

$$\frac{\text{โดยคำนวณจาก} \quad \text{จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัส} \times 100}{\text{จำนวนชิ้นส่วนทั้งหมด}}$$

### 3. บันทึกร้อยเซ็นต์การเกิดยอด

$$\frac{\text{โดยคำนวณจาก} \quad \text{จำนวนแคลลัสที่เกิดเป็นต้น} \times 100}{\text{จำนวนชิ้นส่วนแคลลัสทั้งหมด}}$$

### การวิเคราะห์ผลการทดลอง

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

### การทดลองที่ 3 ศึกษาจำนวนโครโมโซมของต้นดาวเรือง

#### อุปกรณ์

ขั้นตอนการศึกษาจำนวนโครโมโซมของต้นดาวเรือง โดยการเตรียมปลายราก ตัดเฉพาะส่วนที่กำลังเจริญเติบโต โดยสังเกตจากรากที่มีสีขาวและปลายรากมีสีขาวชุ่นเล็กน้อยทำการหยุดการเจริญของเส้นใยสปินเดิล โดยการแช่รากในสารละลาย 8-Hydroxy-chinolin เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างปลายรากด้วยน้ำกลั่นเพื่อนำไปหยุดการทำงานของเซลล์ และรักษาสภาพเซลล์ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น และเอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 3:1 แยกเซลล์โดยการแช่ปลายรากลงในกรดไฮโดรคลอริก(HCl) เข้มข้น 1 N เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซียส แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นย้อมสีเนื้อเยื่อปลายรากด้วยสีย้อม Aceto-orcein โดยแช่นาน 10 นาทีปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์

ใช้กระดาษซับบริเวณแผ่นแก้วปิดสไลด์ กดนิ้วหัวแม่มือลงไปเพื่อให้เซลล์กระจาย และเป็นการซับสีที่มากเกินไปออกนำแผ่นสไลด์ไปศึกษาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟส โดยเลือกเซลล์ที่ไม่กระจายทับกัน นับจำนวนโครโมโซมแล้ว บันทึกภาพ

#### การบันทึกข้อมูล

##### 1.เปอร์เซ็นต์การเกิดแฮพลอยด์

$$\text{โดยคำนวณจาก} \frac{\text{จำนวนที่เป็นเกิดแฮพลอยด์}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$$

#### การทดลองที่ 4 การศึกษาการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของต้นดาวเรือง

##### อุปกรณ์

1. ต้นแฮพลอยด์ที่ได้จากการทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2
2. สารโคลชิซิน

##### วิธีการ

ต้นแฮพลอยด์ที่ได้จากการทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2 จะถูกนำมาทำการศึกษาการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยการหยดโคลชิซินที่ปลายยอดที่มีขนาดเท่ากันวันเว้นวันเป็นระยะเวลาประมาณ 1 สัปดาห์หรือจนกว่ายอดจะมีการพัฒนา จากนั้นนำยอดที่พัฒนาไปชำให้เกิดรากแล้วจึงนำไปตรวจสอบโครโมโซม วางแผนการทดลองแบบวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มี 5 กรรมวิธี ในแต่ละกรรมวิธีมี 4 ซ้ำ ซ้ำละ 1 กระถาง กระถางละ 5 ยอด ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ความเข้มข้นของโคลชิซิน 100 ppm

กรรมวิธีที่ 2 ความเข้มข้นของโคลชิซิน 200 ppm

กรรมวิธีที่ 3 ความเข้มข้นของโคลชิซิน 400 ppm

กรรมวิธีที่ 4 ความเข้มข้นของโคลชิซิน 600 ppm

กรรมวิธีที่ 5 ความเข้มข้นของโคลชิซิน 800 ppm

### การบันทึกข้อมูล

- 1.บันทึกความรอดชีวิตจากการหยุดโคลชิซิน
- 2.บันทึกความสามารถในการเพิ่มจำนวนโครโมโซม

การทดลองที่ 5 การศึกษาลักษณะลูกผสมชั่วที่1ที่ได้จากการผสมเกสรของต้นสายพันธุ์แท้สายพันธุ์แม่(เกสรเพศผู้เป็นหมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโอวุล)กับต้นสายพันธุ์แท้สายพันธุ์พ่อ(ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร)

### อุปกรณ์

1. เมล็ดลูกผสมชั่วที่1

### วิธีการ

นำลูกผสมชั่วที่1ที่ได้จากต้นสายพันธุ์แท้สายพันธุ์แม่(เกสรเพศผู้เป็นหมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโอวุล)กับต้นสายพันธุ์แท้สายพันธุ์พ่อ(ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร)มาทำการปลูกเลี้ยงโดยดูลักษณะของลูกผสมในคู่ต่างๆคัดเลือกกลุ่มที่มีลักษณะดีเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่ที่เหมาะสมเก็บไว้ใช้ต่อไป

## ผลการวิจัย

### การทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงโอรุสของดาวเรืองเพื่อสร้างสายพันธุ์ต้นแม่ที่เกสรเพศผู้เป็นหมัน

#### การเกิดแคลลัส

จากการทดลองนำเอาโอรุสดาวเรืองทั้ง 6 สายพันธุ์วางบนจานอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 2 สูตร นำไปไว้ในที่มีดประมาณ 2 – 3 สัปดาห์ โอรุสจะเริ่มพัฒนาเป็นแคลลัส เมื่อแคลลัสเจริญได้สักระยะ คือ เริ่มเป็นสีเขียวแล้วจึงนำออกมาเพื่อรับแสง พบว่าอาหารทั้ง 2 สูตรและการใช้โอรุสแต่ละชั้นกลีบดอกมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสไม่แตกต่างกัน แต่สายพันธุ์ทั้ง 6 สายพันธุ์ให้ผลการเกิดแคลลัสที่ต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย สายพันธุ์ดาวเรือง OMAR 314 ให้ผลการเกิดแคลลัสแตกต่างจาก สายพันธุ์ OMAR 052 และ 312 และสายพันธุ์ OMAR 052, 302, 311, 313 ให้ผลการเกิดแคลลัสไม่แตกต่างจากสายพันธุ์ OMAR 312 การศึกษาอิทธิพลร่วมระหว่างอาหารและสายพันธุ์พบว่าให้ผลการเกิดแคลลัสต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ส่วนอาหารและชั้นของกลีบดอกชั้นของกลีบดอกและสายพันธุ์ และอาหาร ชั้นของกลีบดอกและสายพันธุ์ พบว่าไม่มีผลต่อความแตกต่างของการเกิดแคลลัสในทางสถิติ



ภาพที่ 3 การเพาะเลี้ยงโอรุสดาวเรืองจนเกิดเป็นแคลลัสบนอาหารเพาะเลี้ยง

เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการเกิดแคลลัสของแต่ละสายพันธุ์ พบว่าดาวเรืองสายพันธุ์ตัวผู้เป็นหมันมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุด (26.094%) รองลงมาคือสายพันธุ์ OMAR 312, OMAR 052, OMAR 302, OMAR 311 และ OMAR 313 ตามลำดับ (15.625, 8.75, 6.25, 4.375 และ 3.125%)(ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการเกิดแคลลัสของดาวเรืองอเมริกันแต่ละสายพันธุ์

| สายพันธุ์        | การเกิดแคลลัส (%)    |
|------------------|----------------------|
| OMAR 052         | 8.75 <sup>bc</sup>   |
| OMAR 302         | 6.25 <sup>bc</sup>   |
| OMAR 311         | 4.375 <sup>c</sup>   |
| OMAR 312         | 15.625 <sup>ab</sup> |
| OMAR 313         | 3.125 <sup>c</sup>   |
| ดาวเรืองOMAR 314 | 26.094 <sup>a</sup>  |
| Sig.             | **                   |
| C.V (%)          | 48.383               |

หมายเหตุ

\*\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน

ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ตามการเปรียบเทียบแบบ

Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

C.V.หมายถึงสัมประสิทธิ์ความผันแปรที่ใช้วัดการกระจายของข้อมูล

จากการศึกษาอิทธิพลร่วมในการชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหารเพาะเลี้ยง

พบว่า ดาวเรืองสายพันธุ์OMAR 314มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการเกิดแคลลัสในชั้นกลีบดอกวงที่ 3 ดีที่สุด คือ 60% บนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 mg/L และ NAA 0.1 mg/L สายพันธุ์ OMAR 052 เกิดแคลลัสได้ดีในชั้นกลีบดอกวงที่ 3บนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย BA 1 mg/L และ NAA 0.1 mg/L (20%) สายพันธุ์ OMAR 302 เกิดแคลลัสได้ดีในชั้นกลีบดอกวงที่ 1 และ 2 บนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 mg/L และ NAA 0.1 mg/L และชั้นกลีบดอกวงที่ 1 และ 3 บนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย BA 1 mg/L และ NAA 0.1 mg/L (10%) สายพันธุ์ OMAR 311 เกิดแคลลัสได้ดีในชั้นกลีบดอกวงที่ 4บนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 mg/L และ NAA 0.1 mg/Lและในชั้นกลีบดอกวงที่ 2 บนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย BA 1 mg/L และ NAA 0.1 mg/L (10%) สายพันธุ์ OMAR 312 เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดในชั้นกลีบดอกวงที่ 1 บนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย BA 1 mg/L และ NAA 0.1 mg/L (40%) และสายพันธุ์ OMAR 313 เกิดแคลลัสได้ดีในชั้นกลีบดอกวงที่ 1และ2บนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 mg/L และ NAA 0.1

mg/L และในชั้นกลีบดอกวงที่ 1, 2 และ 3 บนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย BA 1 mg/L และ NAA 0.1 mg/L (5%) (ตารางที่ 2)

**ตารางที่ 2** ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากการศึกษาอิทธิพลร่วมระหว่างสายพันธุ์ดาวเรือง 6 สายพันธุ์ สูตรอาหาร 2 สูตรและวงของชั้นกลีบดอก 4 วง

| สายพันธุ์                               | การเกิดแคลลัส (%)  |                     |                     |                    | V-Mean |
|-----------------------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------|
|                                         | วงที่ 1            | วงที่ 2             | วงที่ 3             | วงที่ 4            |        |
| สูตรอาหาร MS+ TDZ 1 mg/L + NAA 0.1 mg/L |                    |                     |                     |                    |        |
| OMAR 052                                | 0 <sup>f</sup>     | 10 <sup>def</sup>   | 5 <sup>ef</sup>     | 10 <sup>cdef</sup> | 6.25   |
| OMAR 302                                | 10 <sup>cdef</sup> | 10 <sup>def</sup>   | 0 <sup>f</sup>      | 0 <sup>f</sup>     | 5      |
| OMAR 311                                | 5 <sup>ef</sup>    | 0 <sup>f</sup>      | 0 <sup>f</sup>      | 10 <sup>cdef</sup> | 3.75   |
| OMAR 312                                | 5 <sup>ef</sup>    | 10 <sup>ef</sup>    | 20 <sup>bcdef</sup> | 5 <sup>ef</sup>    | 10     |
| OMAR 313                                | 5 <sup>ef</sup>    | 5 <sup>ef</sup>     | 0 <sup>f</sup>      | 0 <sup>f</sup>     | 2.5    |
| OMAR 314                                | 55 <sup>a</sup>    | 40 <sup>ab</sup>    | 60 <sup>a</sup>     | 35 <sup>abcd</sup> | 47.5   |
| สูตรอาหาร B5 + BA 1 mg/L + NAA 0.1 mg/L |                    |                     |                     |                    |        |
| OMAR 052                                | 10 <sup>cdef</sup> | 10 <sup>ef</sup>    | 20 <sup>bcdef</sup> | 5 <sup>ef</sup>    | 11.25  |
| OMAR 302                                | 10 <sup>cdef</sup> | 5 <sup>f</sup>      | 10 <sup>def</sup>   | 5 <sup>ef</sup>    | 7.5    |
| OMAR 311                                | 5 <sup>ef</sup>    | 10 <sup>ef</sup>    | 5 <sup>ef</sup>     | 0 <sup>f</sup>     | 5      |
| OMAR 312                                | 40 <sup>abc</sup>  | 25 <sup>abcde</sup> | 15 <sup>cdef</sup>  | 5 <sup>ef</sup>    | 21.25  |
| OMAR 313                                | 5 <sup>ef</sup>    | 5 <sup>ef</sup>     | 5 <sup>ef</sup>     | 0 <sup>f</sup>     | 3.75   |
| OMAR 314                                | 6.25 <sup>ef</sup> | 6.25 <sup>ef</sup>  | 6.25 <sup>ef</sup>  | 0 <sup>f</sup>     | 4.69   |
| L-Mean                                  | 13.021             | 11.345              | 12.188              | 6.25               |        |

**หมายเหตุ** ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ตามการเปรียบเทียบแบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

#### การเกิดยอด

เมื่อแคลลัสเจริญได้ประมาณ 2-3 สัปดาห์ จะถูกย้ายลงบนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตใดๆ เป็นเวลาประมาณ 4 สัปดาห์แคลลัสจะสามารถเจริญเป็นยอดบันทึกการเกิดยอดของดาวเรืองจากแคลลัสที่ได้ พบว่า ในอาหารสูตร B5 แคลลัสทั้งหมดไม่สามารถเจริญเป็นยอดได้แต่มีการเจริญเป็นราก

บนอาหารสูตร MS จากการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการเกิดยอดจากแคลลัสที่

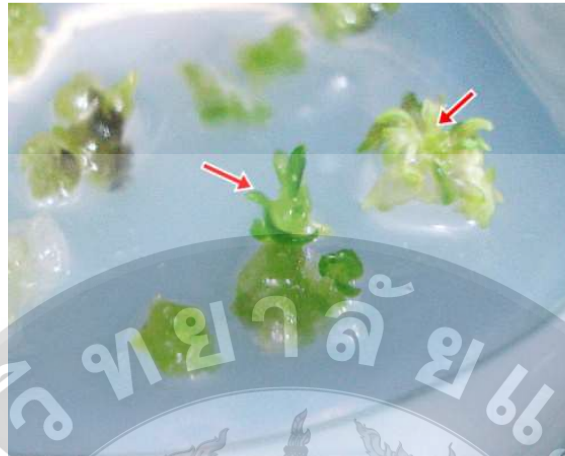
ได้พบว่าแคลลัสที่ได้จากแต่ละชั้นของกลีบดอกไม่มีผลต่อการเกิดยอด แต่สายพันธุ์ของดาวเรืองมีผลต่อการเกิดยอดอย่างมีนัยสำคัญ รวมถึงอิทธิพลร่วมระหว่างสายพันธุ์และชั้นของกลีบดอกมีผลต่อการเกิดยอดอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ (ตารางภาคผนวก 3) จากค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเฉลี่ยของแต่ละสายพันธุ์ พบว่า ดาวเรืองสายพันธุ์OMAR 314มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเฉลี่ยสูงที่สุด (20.52%) รองลงมาคือสายพันธุ์ OMAR 052, OMAR 311 และ OMAR 313 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเฉลี่ยเท่ากัน (6.25%) สายพันธุ์ OMAR 302 และ OMAR 312 แคลลัสไม่เกิดเป็นยอด (0%) (ตารางที่ 3)

อิทธิพลร่วมระหว่างสายพันธุ์และชั้นของกลีบดอกต่อเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการเกิดยอด พบว่า แคลลัสของดาวเรืองสายพันธุ์ OMAR 052 สามารถเกิดยอดได้ในกลีบดอกชั้นที่ 4 สายพันธุ์ OMAR 311 และ OMAR 313 เกิดยอดได้ในกลีบดอกชั้นที่ 1 และดาวเรืองสายพันธุ์OMAR 314สามารถเกิดยอดได้ทั้งกลีบดอกชั้นที่ 1, 2 และ 3 โดยเกิดยอดได้ดีที่สุดในชั้นที่ 2 ส่วนดาวเรืองสายพันธุ์ OMAR 302 และ OMAR 312 แคลลัสไม่มีการเจริญเป็นยอดในทุกชั้นกลีบดอก(ตารางที่ 3)

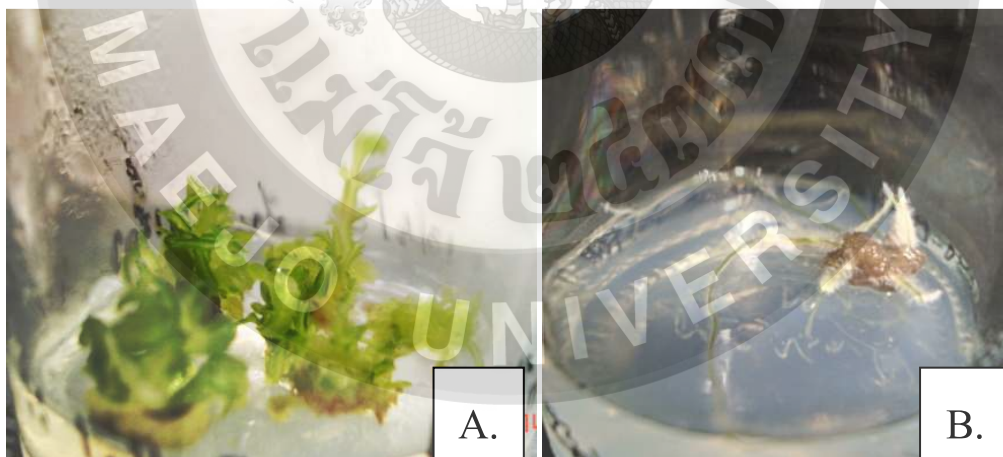
ตารางที่ 3 เปอร์เซนต์การเกิดเป็นยอดเฉลี่ยของดาวเรือง 6 สายพันธุ์ในแต่ละชั้นของกลีบดอก (วง) จากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS

| สายพันธุ์ | การเกิดยอด (%)  |                    |                    |                 | V-Mean             |
|-----------|-----------------|--------------------|--------------------|-----------------|--------------------|
|           | วงที่ 1         | วงที่ 2            | วงที่ 3            | วงที่ 4         |                    |
| OMAR 052  | 0 <sup>b</sup>  | 0 <sup>b</sup>     | 0 <sup>b</sup>     | 25 <sup>b</sup> | 6.25 <sup>b</sup>  |
| OMAR 302  | 0 <sup>b</sup>  | 0 <sup>b</sup>     | 0 <sup>b</sup>     | 0 <sup>b</sup>  | 0 <sup>b</sup>     |
| OMAR 311  | 25 <sup>b</sup> | 0 <sup>b</sup>     | 0 <sup>b</sup>     | 0 <sup>b</sup>  | 6.25 <sup>b</sup>  |
| OMAR 312  | 0 <sup>b</sup>  | 0 <sup>b</sup>     | 0 <sup>b</sup>     | 0 <sup>b</sup>  | 0 <sup>b</sup>     |
| OMAR 313  | 25 <sup>b</sup> | 0 <sup>b</sup>     | 0 <sup>b</sup>     | 0 <sup>b</sup>  | 6.25 <sup>b</sup>  |
| OMAR 314  | 5 <sup>b</sup>  | 56.25 <sup>a</sup> | 20.83 <sup>b</sup> | 0 <sup>b</sup>  | 20.52 <sup>a</sup> |
| L-Mean    | 9.167           | 9.375              | 3.472              | 4.167           |                    |

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ตามการเปรียบเทียบแบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)



ภาพที่ 4 การพัฒนาเป็นยอดจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 mg/L และ NAA 0.1 mg/L



ภาพที่ 5 การพัฒนาของแคลลัสจากอาหารทั้งสองสูตรเมื่อย้ายลงอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

(A.) ต้นที่พัฒนามาจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโอรุลบนอาหารสังเคราะห์

MS + TDZ 1 mg/L + NAA 0.1 mg/L

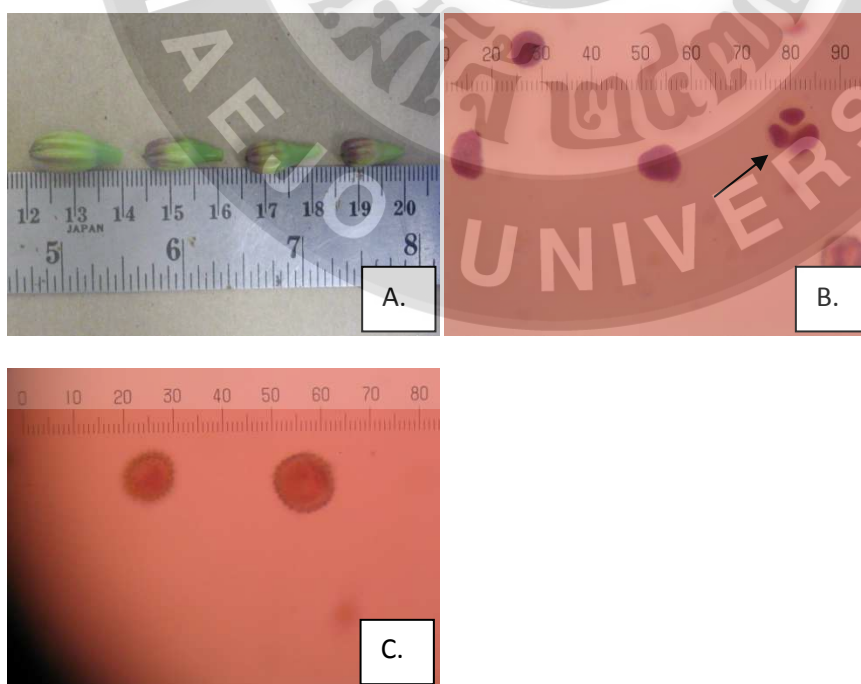
(B.) แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโอรุลบนอาหารสังเคราะห์สูตร

B5 + BA 1mg/L + NAA 0.1 mg/L ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้

## การทดลองที่2 การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของดาวเรืองเพื่อสร้างสายพันธุ์ต้นพ่อแม่ในการผลิต ลูกผสม ข้าวที่1

ในการศึกษาหาขนาดดอกที่เหมาะสมในการนำอับละอองเกสรไปทำการเพาะเลี้ยงที่พบการพัฒนาของละอองเกสรอยู่ในระยะTetrad คือ ช่อดอกตูม ดอกย่อยชั้นนอก (ray flowers) ยังไม่เปิดขนาดของช่อดอกดอกที่พบระยะดอกที่มีละอองเกสรในระยะ tetrad คือ ช่อดอกที่มีขนาด 0.6-1.0 ซม. โดยแต่ละขนาดของดอกจะพบอับละอองเกสรที่มีละอองเกสรอยู่ในระยะ Tetrad เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดต้นแอฟพลอยด์ โดยพบว่าชั้นของดอกย่อยที่พบระยะ tetrad ในดอกขนาดต่างๆ(ภาพที่ 6) มีดังนี้คือ

- 1.ดอกขนาด 0.6 ซม.พบใน ดอกย่อย (disc flowers) ชั้นในสุดที่อยู่กลางดอก
- 2.ดอกขนาด 0.75 ซม.พบใน ดอกย่อย (disc flowers) ชั้นในสุดที่อยู่กลางดอก ,ชั้นที่ 2 และ 3 จากกลางดอก
- 3.ดอกขนาด 0.9 ซม.พบใน ดอกย่อย (disc flowers) ชั้นในสุดที่อยู่กลางดอก
4. ดอกขนาด 1.0 ซม.พบใน ดอกย่อย (disc flowers) ชั้นที่ 3 จากกลางดอก



ภาพที่ 6. A ดอกดาวเรืองขนาดต่างๆ B. ละอองเกสรดาวเรืองในระยะ tetrad (ลูกครี) C. ละอองเกสรดาวเรืองในระยะ tetrad (ลูกครี)

### C. ละอองเกสรดาวเรืองในระยะที่พัฒนาเป็นละอองเกสรที่สมบูรณ์

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของดาวเรืองพบว่าอับละอองเกสรสามารถตอบสนองต่อ อาหารสูตร MS และ B5 ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ BA โดยได้ทำการศึกษานานดอก 3 กลุ่มดอกคือ ขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่ ได้ผลการทดลองดังนี้

#### การเกิดของแคลลัส

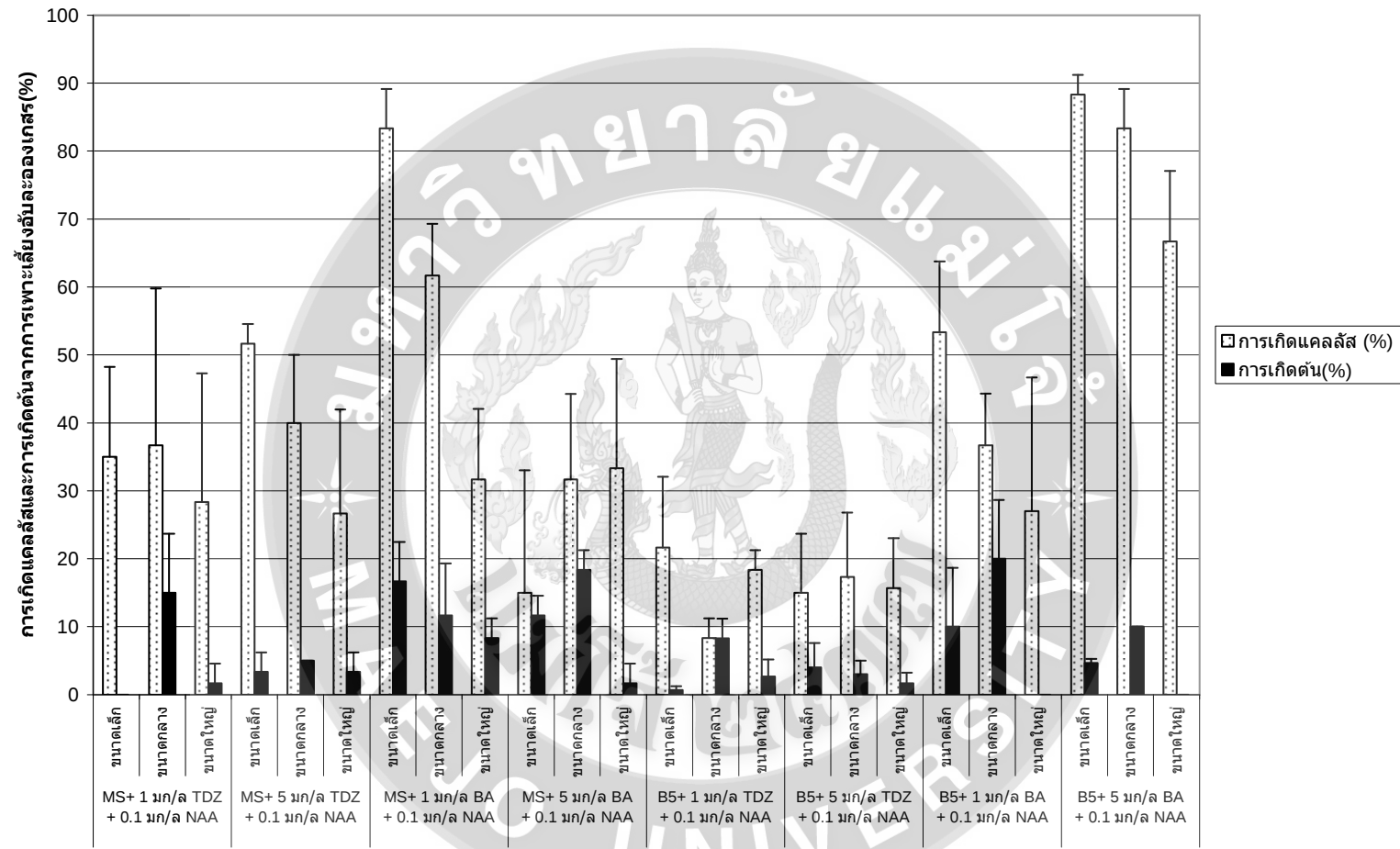
จากการทดลองการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของดาวเรืองเพื่อศึกษาการเกิดแคลลัสพบว่า อับละอองเกสรของดาวเรืองขนาดดอกใหญ่ กลาง และเล็กที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA และอับละอองเกสรจากดอกขนาดเล็กและขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA สามารถเกิดแคลลัสได้สูง ซึ่งมีการเกิดแคลลัสเท่ากับ 88.33 83.33 66.67 83.33 และ 61.65 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ อับละอองเกสรดาวเรืองจะมีการเกิดแคลลัสได้ค่อนข้างดีเมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่น เมื่อพิจารณาขนาดดอกต่อการเกิดแคลลัสพบว่าดอกขนาดเล็กและขนาดกลางสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าดอกขนาดใหญ่ (ภาพที่ 7 และ ภาพที่ 8 )

#### การเกิดต้น

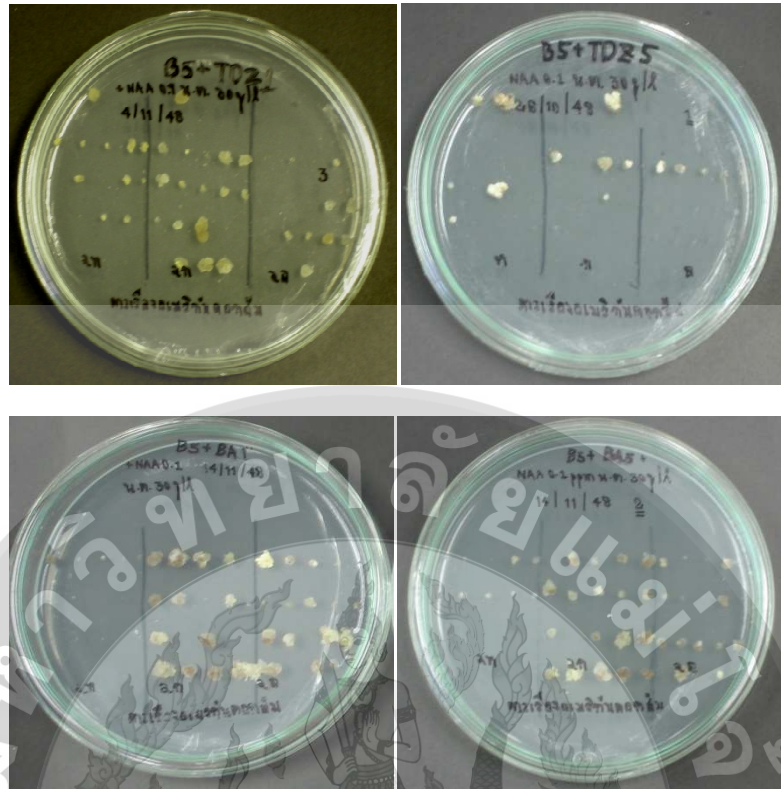
เมื่อทำการย้ายแคลลัสลงสู่อาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดต้นพบว่าแคลลัสที่เกิดจากดอกขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B 5 ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA แคลลัสจากอับละอองเกสรของดอกขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA และดอกขนาดเล็กและขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA และแคลลัสจากอับละอองเกสรของดอกขนาดเล็ก และกลางที่เพาะเลี้ยงบน อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA จะสามารถชักนำให้เกิดต้นได้สูง ซึ่งเท่ากับ 20 15 17 12 และ 18 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แคลลัสจากดอกขนาดเล็กและขนาดกลางสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ดี ส่วนแคลลัสจากดอกขนาดใหญ่จะเกิดต้นได้น้อยหรือไม่เกิดเลย จะเห็นได้ว่าความสามารถในการเกิด

แคลลัสไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดต้นโดยแม้ว่าอับละองเกอร์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B 5 จะเกิดแคลลัสได้สูงกว่าอาหารสูตร MS แต่พบว่าแคลลัสจากอับละองเกอร์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เกิดต้นได้ดีกว่า (ภาพที่ 7)





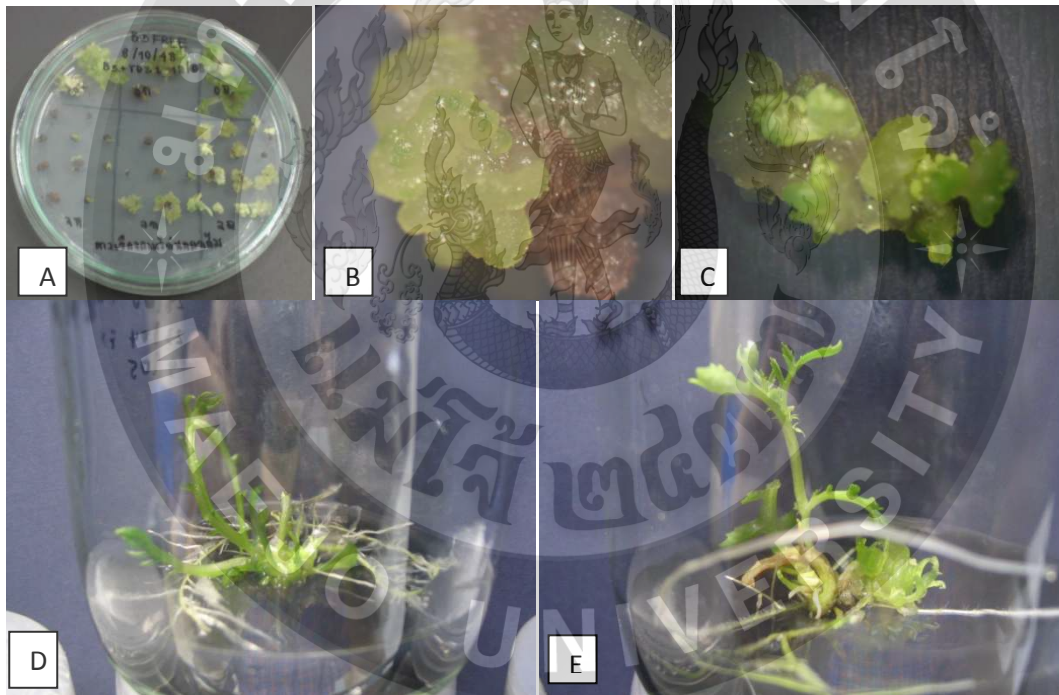
ภาพที่ 7 การเกิดแคลลัสและต้น (%) จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของดาวเรืองบนอาหารสูตรต่างๆ



ภาพที่ 8 แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละองเกสรบนอาหารสูตรต่างๆ

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแคลลัส พบว่าในระยะแรกอับละองเกสรจะเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 3-4 สัปดาห์จะเห็นแคลลัสสีขาวอมเหลืองเกิดขึ้นและพัฒนาจนมีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อย้ายละองเกสรลงเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตในสภาพมีแสงจะพบว่าแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีเขียวและบางแคลลัสมียอดพัฒนาขึ้น (ภาพที่ 9 A-C) เมื่อยอดเจริญเติบโตและทำการตรวจสอบระดับโครโมโซม พบว่าพืชส่วนใหญ่มีระดับโครโมโซมเป็น 2n แต่จะพบบางต้นซึ่งแสดงระดับโครโมโซมเป็น 8n แต่แสดงลักษณะผิดปกติและตายหลังจากเจริญในสภาพการเพาะเลี้ยงปลอดเชื้อได้ไม่นานนัก เมื่อนำต้นที่เกิดจากอับละองเกสรมาปลูกพบว่า เมื่อปลูกและดูความแตกต่างระหว่างต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละองเกสรและต้นที่ให้อับละองเกสรมาเพาะเลี้ยงพบว่าลักษณะของต้นไม่แตกต่างกันแต่พบความแตกต่างในลักษณะดอก โดยดอกจะมีความแตกต่างในเรื่องของความซ้อนของกลีบดอก ลักษณะดอก และขนาดของดอกดังภาพ 11 และเมื่อตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างต้นที่ให้อับละองเกสรกับต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละองเกสรโดยเทคนิคทาง RAPD พบว่ามีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 10) และเมื่อทำการผสมตัวเองของเกสรต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละองเกสรพบว่าต้นที่ได้จากการผสมตัวเองจะมีความเหมือนกันของลักษณะดอกและไม่มีการกระจายตัวของลักษณะภายในเมล็ดจากต้นที่ได้จาก

การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรต้นเดียวกันแต่พบความแตกต่างระหว่างต้นที่ได้จากเมล็ดที่ผสมตัวเองคนละต้นกัน (ภาพที่ 12) ซึ่งแสดงว่าต้นเหล่านั้นเป็นสายพันธุ์แท้ อาจกล่าวได้ว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเกิดจากการเพิ่มขึ้นของโครโมโซมภายในเซลล์พืชเองระหว่างทำการเพาะเลี้ยงทำให้พืชที่เจริญจากเซลล์ที่มีโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่งมีโครโมโซมเป็น 2n ปกติซึ่งเป็นประโยชน์ในการสร้างสายพันธุ์แท้ได้โดยไม่ต้องเลี้ยงต้นที่มีโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่งที่อ่อนแอก่อนนำมาเพิ่มโครโมโซมโดยใช้สารเคมีชักนำ ซึ่งหลังจากการตรวจสอบโดยการผสมตัวเองลูกผสม 2n สามารถเลือกต้นที่เป็นสายแท้โดยการคัดเลือกต้นที่เมื่อผสมตัวเองแล้วได้ลูกจากต้นแม่ที่ไม่มีการกระจายตัวของลักษณะมาเป็นสายพันธุ์พอในการทดสอบการสร้างลูกผสมได้จำนวน 5 สายพันธุ์



ภาพที่ 9 A. แคลลัสที่ย้ายปลูกลงสู่อาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต B. จุดกำเนิดยอดพัฒนามบนแคลลัส C. ยอดใหม่ที่พัฒนามบนแคลลัส D-E ต้นที่พัฒนาจากแคลลัส



ภาพที่ 10 แสดงรูปแบบRAPD ของต้นดาวเรืองเมื่อใช้ primer OPU 6 เลนส์ จากซ้ายไปขวาคือ 100bp size marker ต้นเบญจมาศที่ให้อัลลอลองเกอร์ และต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอัลลอลองเกอร์



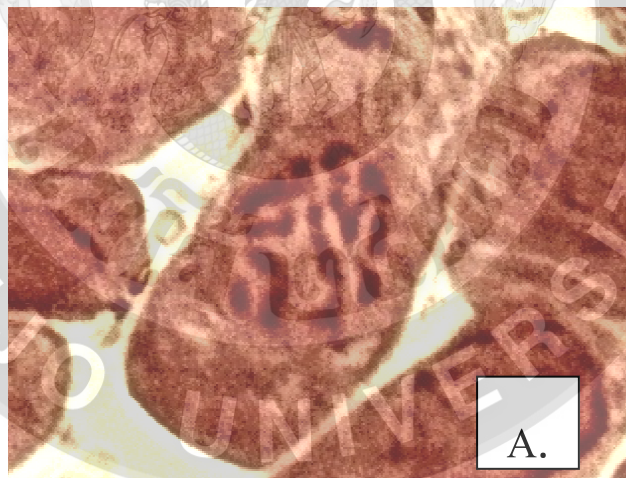
ภาพที่ 11 ดอกดาวเรือง ดอกแรกจากด้านซ้ายคือดอกดาวเรืองจากต้นแม่ที่นำอับละอองเกสรมาเพาะเลี้ยง ดอกอื่นๆคือดอกจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร



ภาพที่ 12 ดอกที่เกิดจากต้นที่ได้จากเมล็ดที่เกิดจากการผสมตัวเองของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร ดอกในคอลัมน์เดียวกันคือดอกที่ได้จากเมล็ดจากการผสมตัวเองของต้นที่ได้จากเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรต้นเดียวกัน

### การทดลองที่ 3 ศึกษาจำนวนโครโมโซมของต้นดาวเรือง

จากการเพาะเลี้ยงโอรุลดาวเรืองในการทดลองที่ 1 จะได้ต้นดาวเรืองที่มีจำนวนโครโมโซมปกติและจำนวนโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่ง จึงต้องนำต้นที่ได้นั้นมาทำการนับจำนวนโครโมโซมและคำนวณเปอร์เซ็นต์ของความสามารถในการเกิดเป็นต้นแฮพลอยด์จากจำนวนต้นที่ได้ทั้งหมด พบว่า จากจำนวนต้นที่ได้ทั้งหมด 9 ต้น ตรวจโครโมโซมพบต้นที่มีจำนวนโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่งจำนวน 5 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ 55.56%



### ภาพที่ 13 ภาพการตรวจนับจำนวนโครโมโซม

A.) แสดงจำนวนโครโมโซมในสภาพแฮพลอยด์ของต้นดาวเรืองที่ได้

B.) แสดงจำนวนโครโมโซมของต้นดาวเรืองดิพลอยด์ปกติ

### การทดลองที่ 4 ศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมเพื่อสร้างสายพันธุ์แท้

ดาวเรืองที่มีจำนวนโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่งที่ได้จากการตรวจโครโมโซมจากการทดลองที่ 1.2 โดยการหยดโคลชิซินในความเข้มข้นต่างๆ เวลาประมาณ 1 สัปดาห์ ยอดเริ่มเกิดการเปลี่ยนแปลง มีลักษณะ ใบเริ่มหนาและบวมขึ้น จากนั้นทำการบันทึกยอดที่มีการเปลี่ยนแปลง ยอดที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ และยอดที่ตาย พบว่าที่ความเข้มข้นของโคลชิซิน 100 ppm, 400 ppm และ 800 ppm สามารถทำให้ยอดเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ (75%) รองลงมาคือ 200 ppm (50%) และที่ความเข้มข้น 600 ppm ทำให้ยอดเกิดการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด (37.5%) จากนั้นทำการปักชำยอดที่เกิดการเปลี่ยนแปลง ให้เกิดรากเป็นต้นใหม่คัดเลือกต้นที่มีจำนวนโครโมโซม 2n โดยการตรวจสอบโครโมโซมเหมือนการทดลองที่ 3 จากนั้นคัดเลือกต้นที่มีโครโมโซม 2 เท่าและมีเกสรเพศผู้เป็นหมันนำมาทำการผสมเกสรสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 ต่อไปจากการทดลองนี้พบว่าในปีที่ 1 ของการวิจัยได้ต้นที่มีเกสรเพศเมียเป็นหมัน 1 สายพันธุ์และในปีที่ 2 ได้ต้นที่มีสายพันธุ์เพศผู้เป็นหมัน 1 สายพันธุ์ มาใช้เป็นสายพันธุ์แม่ต่อไป

### ตารางที่ 4 เปอร์เซนต์การเปลี่ยนแปลงของยอดจากการหยดโคลชิซินในความเข้มข้นต่างๆ

| ความเข้มข้นโคลชิซิน<br>(ppm) | ยอดที่เกิดการ<br>เปลี่ยนแปลง (%) | ยอดที่ไม่เกิดการ<br>เปลี่ยนแปลง (%) | ยอดตาย<br>(%) |
|------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|---------------|
| 100                          | 75                               | 25                                  | 0             |
| 200                          | 50                               | 50                                  | 0             |
| 400                          | 75                               | 12.5                                | 12.5          |
| 600                          | 37.5                             | 12.5                                | 50            |
| 800                          | 75                               | 0                                   | 25            |



ภาพที่ 14 ต้นดาวเรืองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไฮวูล

(A.) ต้นดาวเรือง  $2n$  ปกติ

(B.) ต้นดาวเรืองที่มีจำนวนโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่ง ( $n$ )



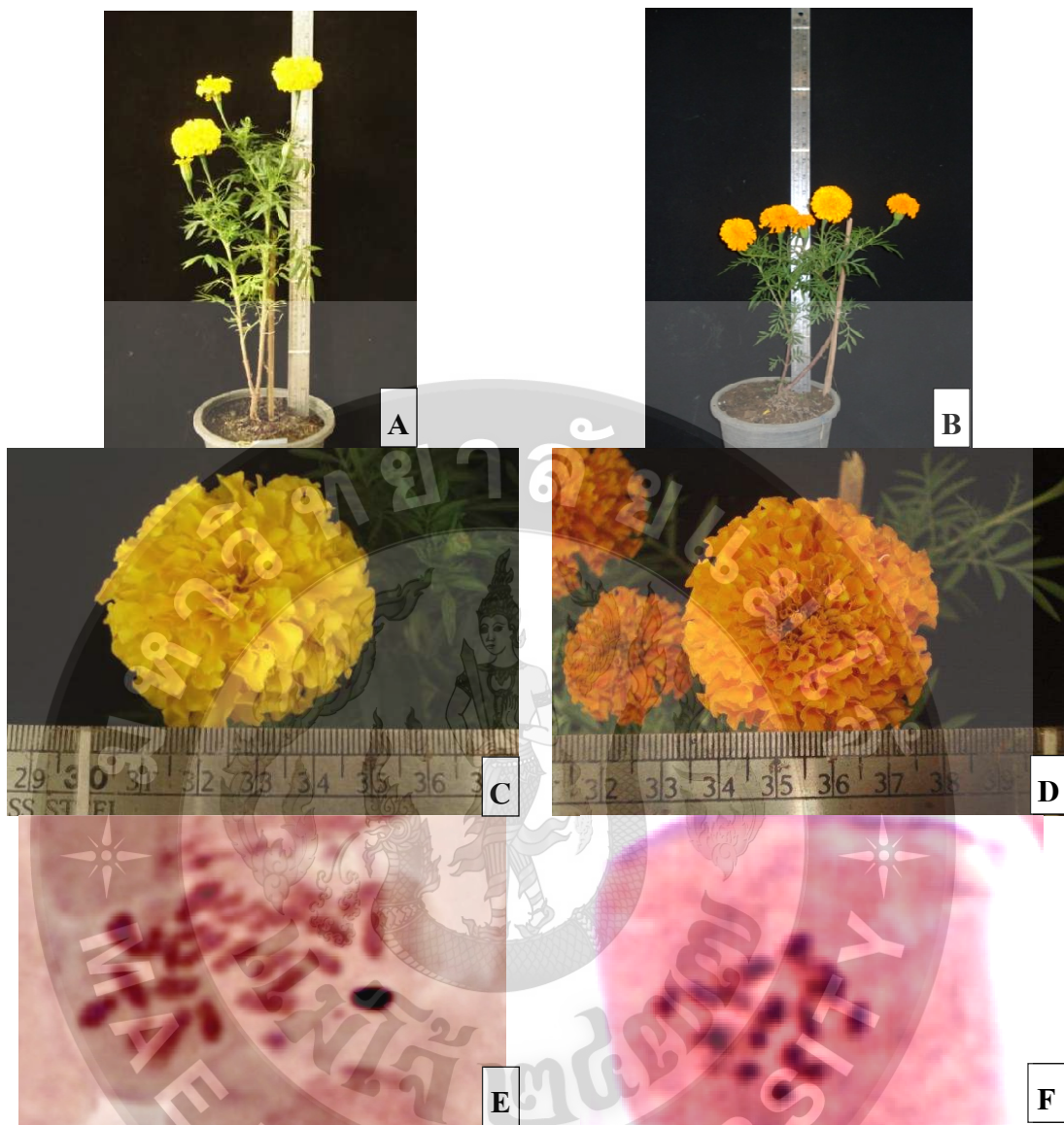
ภาพที่ 15 การหยดโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆบนยอดของดาวเรือง

(A.)การหยดโคลชิซินปริมาณ 2  $\mu\text{L}$  ลงบนยอดดาวเรือง

(B.- C.)ลักษณะยอดดาวเรืองปกติ

(D.- E.)ลักษณะยอดดาวเรืองหลังจากหยดโคลชิซิน

(F.)เปรียบเทียบลักษณะใบก่อนและหลังได้รับสารโคลชิซิน โดย ลูกศรสีแดงแสดงลักษณะใบที่ไม่ได้รับสารและลูกศรสีเหลืองแสดงลักษณะที่ใบเปลี่ยนแปลงหลังได้รับสารโคลชิซิน



ภาพที่ 16 ลักษณะของต้น ดอก และจำนวนโครโมโซมของดาวเรืองที่เป็นดิพลอยด์ และแฮพลอยด์

- (A) ลักษณะของต้นดาวเรือง ที่มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ  $2n = 24$
- (B) ลักษณะของต้นดาวเรือง ที่มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ  $2n = 12$
- (C) ลักษณะของดอกดาวเรือง ที่มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ  $2n = 24$
- (D) ลักษณะของดอกดาวเรืองที่มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ  $2n = 12$
- (E) จำนวนโครโมโซมดาวเรือง (ดิพลอยด์)  $2n = 24$
- (F) จำนวนโครโมโซมดาวเรือง (แฮพลอยด์)  $2n = 12$



ภาพที่ 17 ลักษณะของดอกดาวเรืองสายพันธุ์แท้ที่มีเกสรเพศผู้เป็นหมันได้จากการเพาะเลี้ยงโอวูลและทำการ  
เพิ่มโครโมโซมด้วยสารโคลชิซิน

**การทดลองที่ 5 การศึกษาลักษณะลูกผสมชั่วที่1ที่ได้จากการผสมเกสรของต้นสายพันธุ์แท้สายพันธุ์แม่ (เกสรเพศผู้เป็นหมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโอวูล)กับต้นสายพันธุ์แท้สายพันธุ์พ่อ(ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร)**

จากการผสมพันธุ์แบบพบกันหมดของสายพันธุ์แม่ซึ่งมีเกสรเพศผู้เป็นหมันจำนวน 2 สายพันธุ์และสายพันธุ์พ่อ 5 สายพันธุ์รวมเป็น 10 คู่ผสมพบว่า ลูกผสมจากสายพันธุ์แม่ FMS 01 ให้ลูกผสมที่มีลักษณะดีเมื่อผสมกับสายพันธุ์เพศผู้สายพันธุ์พ่อ M 01, M03 และ M04 ซึ่งได้ลูกผสมที่มีกลีบซ้อนและลักษณะดอกกลม โดยลูกผสมระหว่างFMS01 และ M03 ลูกผสมได้เป็นสีส้มเนื่องจากสายพันธุ์M03 มีลักษณะดอกสีส้มที่ข้มลักษณะดอกสีเหลืองของแม่ (ภาพที่ 18 ) ส่วนในลูกผสมคู่อื่นพบว่าลูกผสมยังมีลักษณะไม่สวยงามเช่นกลีบดอกน้อย ขนาดดอกเล็ก กลีบดอกเรียงไม่เป็นระเบียบ





ภาพที่ 18 ลักษณะลูกผสมชั่วที่1ที่ได้จากการผสมเกสรของต้นสายพันธุ์แท้สายพันธุ์แม่(เกสรเพศเป็นหมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโอรุล)กับต้นสายพันธุ์แท้สายพันธุ์พ่อ(ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร)

## วิจารณ์ผลการทดลอง

### การทดลองที่ 1 ศึกษาสูตรอาหารและปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเจริญเป็นแคลลัสของดาวเรือง

จากการศึกษาสูตรอาหารที่มีผลต่อการเจริญเป็นแคลลัสของดาวเรือง พบว่า อาหารทั้งสองสูตรโดยรวมให้ผลการเกิดแคลลัสดีไม่แตกต่างกัน เมื่อศึกษาปัจจัยร่วมระหว่างสูตรอาหารและสายพันธุ์มีผลต่อความสามารถในการเกิดเป็นแคลลัสพบว่าดาวเรืองสายพันธุ์OMAR 314ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 mg/L และ NAA 0.1 mg/L มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุด (47.5%)

จากการศึกษาความสามารถในการเกิดเป็นยอดของดาวเรืองจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโอรุสในอาหารทั้งสองสูตร พบว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 mg/L และ NAA 0.1 mg/L เกิดการพัฒนาไปเป็นยอดได้ดีกว่าอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย BA 1 mg/L และ NAA 0.1 mg/L เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่า แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย BA 1 mg/L และ NAA 0.1 mg/L มีการพัฒนาไปเป็นรากเพียงอย่างเดียวและแคลลัสของดาวเรืองสายพันธุ์OMAR 314ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรMS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 mg/L และ NAA 0.1 mg/Lมีความสามารถในการเกิดเป็นยอดได้ดีที่สุด (20.52%) จะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงโอรุสของแม้วจะมี% การเกิดแคลลัสค่อนข้างสูงแต่จะเห็นได้ว่ามี% การเกิดเป็นยอดต่ำกว่าการเกิดแคลลัส

### การทดลองที่2 การเพาะเลี้ยงอับละองเรณูของดาวเรืองเพื่อสร้างสายพันธุ์ต้นพ่อแม่ในการผลิตลูกผสม

#### ขั้นที่1

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละองเรณูของดาวเรืองเพื่อศึกษาการเกิดแคลลัส พบว่า อับละองเรณูของดาวเรืองขนาดดอกใหญ่ กลาง และเล็กที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA และอับละองเรณูจากดอกขนาดเล็กและขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA สามารถเกิดแคลลัสได้สูง ซึ่งมีการเกิดแคลลัสเท่ากับ 88.33 83.33 66.67 83.33 และ 61.65 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อศึกษาการเกิดยอดพบว่าเมื่อทำการย้ายแคลลัสลงสู่อาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดต้นพบว่าแคลลัสที่เกิดจากดอกขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B 5 ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA แคลลัสจากอับละองเรณูของดอกขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA และดอกขนาดเล็กและขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA และแคลลัสจากอับละองเรณูของดอกขนาดเล็ก และกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA จะสามารถชักนำให้เกิดต้นได้สูง ซึ่ง

เท่ากับ 20 15 17 12 และ 18 เปอร์เซ็นตามลำดับ จะเห็นได้ว่า%การเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรไม่สูงมากนักและเมื่อศึกษาจำนวนโครโมโซมพบว่ามียีนที่เป็น 2n สูงกว่าต้น แอสเพลอยด์แต่เมื่อศึกษาทางด้านพันธุกรรมพบว่าต้น 2n ที่เกิดจากอับละอองเกสรมีพันธุกรรมต่างจากต้นแม่นั้นแสดงว่าลูกที่ได้ไม่ได้เกิดจากร่างกายของต้นแม่ และเมื่อศึกษาการกระจายตัวของลูกที่เกิดจากการผสมตัวเองของต้นแม่พบว่าไม่มีการกระจายตัวนั้นแสดงว่าต้นดาวเรืองที่ได้เหล่านี้เป็นสายพันธุ์แท้เนื่องจากในระหว่างการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรนั้นเกิดขบวนการเพิ่มของโครโมโซมในระหว่างการเพาะเลี้ยง(spontaneous chromosome double) ทำให้ได้ต้นสายพันธุ์แท้ในระหว่างการเพาะเลี้ยงโดยไม่จำเป็นต้องเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยสารโคลชิซิน

### การทดลองที่3 ศึกษาจำนวนโครโมโซมของดาวเรือง

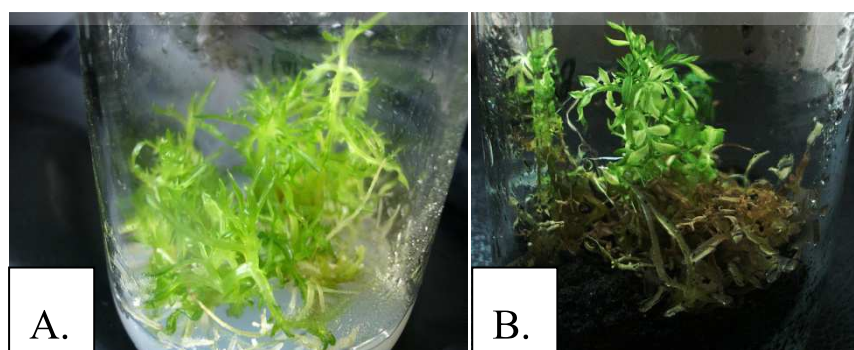
จากการศึกษาจำนวนโครโมโซมของต้นดาวเรืองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโอรุสทำให้ทราบได้ว่าการเพาะเลี้ยงโอรุสสามารถทำให้ได้ต้นที่มีจำนวนโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่งได้ โดยการตรวจสอบโครโมโซมจากปลายรากแล้วพบว่ามีจำนวนน้อยลงกว่าปกติของดาวเรืองอเมริกันที่ปกติจะมีโครโมโซมเป็น  $2n = 24$  พบว่าสามารถเกิดเป็นต้นแอสเพลอยด์คิดเป็นเปอร์เซ็นต์จากการคำนวณได้ 55.56%แสดงว่าการเพาะเลี้ยงโอรุสของดาวเรืองสามารถสร้างต้นดาวเรืองที่มีโครโมโซม $2n$  ปกติและ ต้นดาวเรืองที่มีโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่งได้ซึ่งการลดลงของโครโมโซมนั้นKeller และ Korzun(1996) ได้อธิบายไว้ว่า พืชแอสเพลอยด์สามารถพัฒนาได้โดยตรงจากการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย อันได้แก่ โอรุส, รังไข่ หรือ ส่วนของตาดอกทั้งหมด (Jana and Borut[online], 2013) หรือทางอ้อมโดยการผ่านแคลลัส ซึ่งเริ่มแรกแคลลัสที่เจริญขึ้นนั้นมาจากเซลล์ไซโนเนอรจิหรือแอนติโพดอล ซึ่งต้นที่ได้จะมีทั้ง แอสเพลอยด์ดิพลอยด์ หรือมิโกพโลอยด์ (Sandra, 2013) ต้นแอสเพลอยด์ที่ได้สามารถนำไปดัดแปลงจำนวนโครโมโซมเพื่อให้ได้สายพันธุ์แท้ในการใช้เป็น พ่อพันธุ์แม่พันธุ์ในการผลิตเมล็ดเมล็ด  $F_1$  hybrid ซึ่งมีข้อดีในการให้ผลผลิตสำหรับไม้ดอก คือ ได้ความสูงต้นสม่ำเสมอ มีรูปร่างเหมือนกัน ดอกบานพร้อมกันหมด ดอกมีสีสดสม่ำเสมอโดยตลอด บางครั้งสามารถออกดอกได้เร็วกว่าพันธุ์ทั่วไป (นันทิยา, 2553) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเกิดต้นแอสเพลอยด์ได้ 55.56%ของยอดที่เกิดขึ้น นั้นแสดงว่าต้นดาวเรืองที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงโอรุสมีโอกาสที่จะได้ต้นแอสเพลอยด์ถึงครึ่งหนึ่ง

### การทดลองที่ 4. ศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมเพื่อสร้างสายพันธุ์แท้

จากการศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมโดยการหยดโคลชิซิน พบว่าเมื่อหยดโคลชิซิน ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปบนยอดของดาวเรืองประมาณ 4 ครั้งเป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ พบว่า ที่ความเข้มข้น 100, 400 และ 800 ppm ยอดมีการเปลี่ยนแปลงได้มากที่สุด (75%) ยอดของดาวเรืองมีลักษณะบวมและใบมีลักษณะหนาขึ้น

ใหญ่ขึ้น สีใบเป็นสีเขียวเข้มซึ่งคล้ายกับการทดลองของกัญญา(ม.ป.ป.) ในการหาค่าโคลชิซินลงบนยอดของบัวหลวง แล้วพบว่ายอดเดิมมีการขยายใหญ่ขึ้นและเมื่อนำมาศึกษาจำนวนโครโมโซมพบว่าต้นที่ได้จากยอดที่ได้รับสารโคลชิซินส่วนใหญ่มีโครโมโซม  $2n$  แต่บางยอดเป็น  $4n$  และ  $6n$  โดยในการทดลองนี้จะคัดเลือกเฉพาะต้น ที่มีโครโมโซม  $2n$  เท่านั้น การทดลองใช้สารโคลชิซินในการชักนำให้เกิดพอลิพลอยดีในกล้วยไม้มาวี่งของวชิรพัฒน์ (2552) จะมีแผ่นใบหนาเมื่อได้รับสารโคลชิซินในปริมาณที่เพิ่มขึ้น แต่เนื่องจากเวลาจำกัดจึงยังไม่สามารถตรวจสอบจำนวนโครโมโซมของดาวเรืองที่ได้รับสารโคลชิซินได้ แต่ในเบื้องต้นพบว่ายอดที่ได้รับสารมีการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัดเจนนั่นได้ทำการคัดเลือกต้นที่มีจำนวนโครโมโซมที่เป็น  $2n$  และมีลักษณะดอกเพศผู้เป็นหมันเพื่อใช้เป็นสายพันธุ์ต้นแม่ซึ่งจากการศึกษาพบว่าถึงแม้ว่าจากการเพาะเลี้ยงโอรุสสามารถสร้างต้นแฮพพลอยดีได้แต่ต้นที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมทุกต้นไม่ได้เป็นต้นที่มีเกสรเพศผู้เป็นหมันทั้งหมดมีเพียงจำนวนน้อยที่ได้ต้นเกสรเพศผู้เป็นหมันโดยในปีแรกของการศึกษาได้ต้นเพศเมียที่มีละอองเกสรเพศผู้เป็นหมันเพียง 1 ต้นและในปีที่ 2 ได้ต้นเพศเมียที่มีละอองเกสรเพศผู้เป็นหมันอีก 1 ต้น การที่ได้ต้นเพศเมียที่เป็นหมันจำนวนน้อยเนื่องจากในประชากรที่นำมาทำการเพาะเลี้ยงโอรุสนั้นอาจจะมีการพัฒนาสายพันธุ์จากพ่อแม่ที่ไม่ใช้ระบบเกสรเพศผู้เป็นหมันทำให้บางประชากรที่นำมารวมประชากรไม่มียีนเกสรเพศผู้เป็นหมันทำให้เมื่อสร้างต้นสายพันธุ์แท้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโอรุสไม่ได้มีเกสรเพศผู้เป็นหมันทั้งหมดมีเพียงต้นที่มียีนควบคุมลักษณะเพศผู้เป็นหมันเท่านั้นที่แสดงลักษณะเพศผู้เป็นหมัน

นอกจากนี้ ปัญหาที่พบในการเพาะเลี้ยงต้นที่ได้จากการเลี้ยงโอรุสของดาวเรืองคือ เมื่อย้ายยอดลงบนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตไปช่วงระยะหนึ่ง พบว่า ดาวเรืองบางสายพันธุ์เกิดลักษณะลำต้นใสและเป็นสาเหตุที่ทำให้ต้นอ่อนแอและไม่สามารถนำมาทำการปรับสภาพให้คุ้นชินกับสภาพภายนอกเวลานำออกจากขวดแล้ว วิธีการแก้ปัญหาที่ได้ผล คือ ย้ายอาหารจากอาหารรุ่นมาใช้เป็น media แทนโดยการเติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย แล้วนำต้นกล้าที่ใสมาใส่ในขวดที่มี media ซึ่งในทุกขั้นตอนต้องอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปไว้ในแสงธรรมชาติและมีฟอยล์เพื่อป้องกันอากาศร้อนเกินไป ประมาณ 1 – 2 สัปดาห์ จะพบว่าลำต้นและใบเริ่มเขียวขึ้น หายจากอาการใสของลำต้นและใบได้



ภาพที่ 19 (A.) ดาวเรืองที่มีลักษณะต้นใส

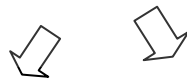
(B.) ลักษณะต้นดาวเรืองที่ย้ายลง media เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การทดลองที่ 5 การศึกษาลักษณะลูกผสมชั่วที่1ที่ได้จากการผสมเกสรของต้นสายพันธุ์แท้สายพันธุ์แม่ (เกสรเพศผู้เป็นหมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโอวุล)กับต้นสายพันธุ์แท้สายพันธุ์พ่อ(ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร)

จากการผสมพันธุ์แบบพบกันหมดของสายพันธุ์แม่ซึ่งมีเกสรเพศผู้เป็นหมันจำนวน 2 สายพันธุ์และสายพันธุ์พ่อ 5 สายพันธุ์รวมเป็น 10 คู่ผสมพบว่า ลูกผสมจากสายพันธุ์แม่ FMS 01 ให้ลูกผสมที่มีลักษณะดีเมื่อผสมกับสายพันธุ์เพศผู้สายพันธุ์พ่อ M 01, M03 และ M04 ซึ่งได้ลูกผสมที่มีกลีบซ้อนและลักษณะดอกกลม ซึ่งจะเห็นได้ว่าแม้ว่าจะได้สายพันธุ์แม่จำนวนไม่มากนักเมื่อผสมกับสายพันธุ์พ่อพบว่ามีโอกาสได้ลูกผสมที่มีลักษณะดีเนื่องจากในการพัฒนาสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่1 นั้นแต่ละบริษัทได้พัฒนาสายพันธุ์พ่อแม่โดยคัดเลือกลักษณะต่างๆจนดีแล้วทำให้ลูกผสมจากสายพันธุ์แท้ที่สกัดได้จึงมีลักษณะดี ซึ่งเป็นข้อดีคือหากเราสารณพัฒนาสายพันธุ์เพศผู้เป็นหมันได้โอกาสที่เราจะพัฒนาสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 ที่มีลักษณะดีก็ทำได้ไม่ยากและเป็นประโยชน์คือจะทำให้การผลิตเมล็ดลูกผสมชั่วที่1 ได้ง่ายไม่เหมือนวิธีการปัจจุบันที่ทำอยู่ในประเทศไทย จากการศึกษาสามารถพบแนวทางในการพัฒนาสายพันธุ์แม่ A-line และสายพันธุ์พ่อ C-line ได้รวดเร็วและสามารถรักษาสายพันธุ์พ่อแม่ดังกล่าวด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากการศึกษาทั้ง 5 การทดลองทำให้สามารถทราบแนวทางที่จะสกัดสายพันธุ์พ่อแม่ในการ  
ผลิตลูกผสมชั่วที่1 ดังนี้คือ

ประชากรของลูกผสมชั่วที่1 ที่มีลักษณะ  
ดีจากแหล่งต่างๆ



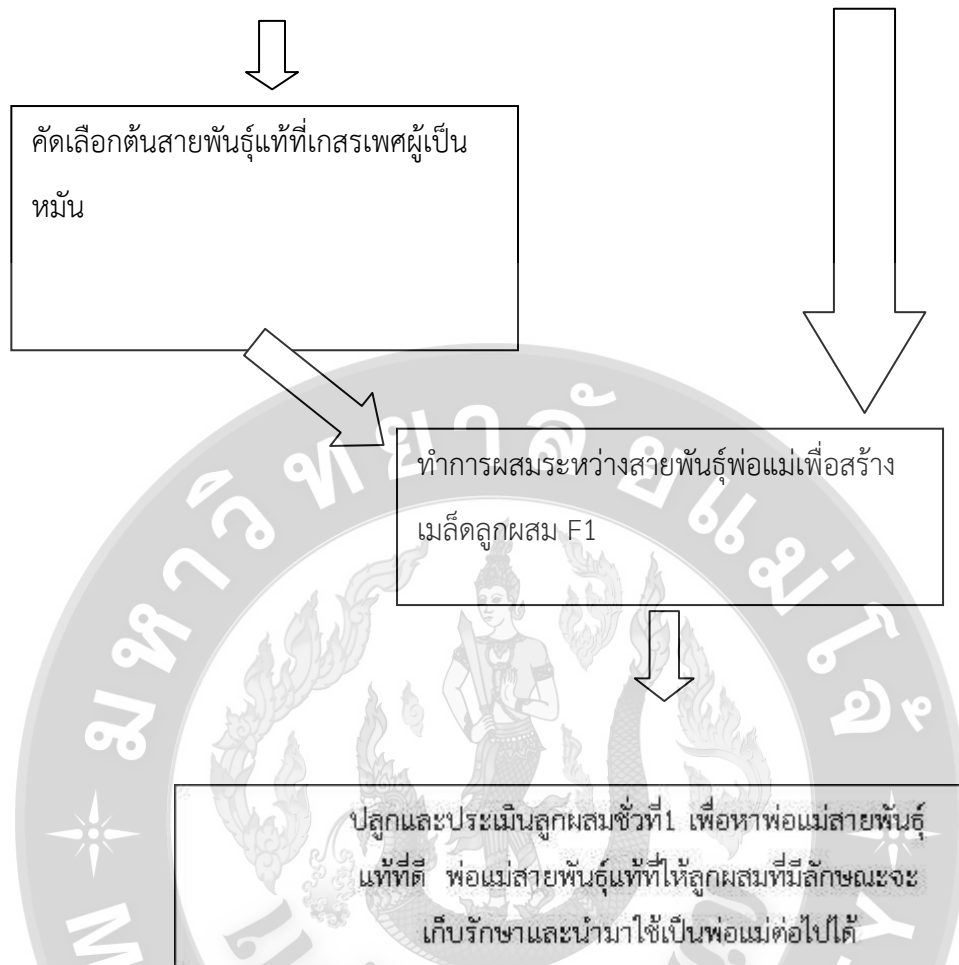
ทำการเพาะเลี้ยงโอรุล

ทำการเพาะเลี้ยงอับละองเกอร์



คัดเลือกต้นแฮพพลอยด์และเพิ่มจำนวน  
โครโมโซมเป็น สองเท่าเพื่อสร้างสายพันธุ์แท้

คัดเลือกต้นแฮพพลอยด์และเพิ่มจำนวน  
โครโมโซมเป็น สองเท่าเพื่อสร้างสายพันธุ์แท้



### สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการเพาะเลี้ยงโวลบนสูตรอาหารที่มีผลต่อการเกิดแคลลัสในดาวเรืองพบว่า อาหารสูตร MS เหมาะสมต่อการนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดเป็นต้น และดาวเรืองสายพันธุ์ OMAR 314 สามารถเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 mg/L และ NAA 0.1 mg/L (47.5%) และมีความสามารถในการเกิดยอดมากที่สุด (20.52%) ในอาหารที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและจากการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโวลพบว่าต้นที่เกิดยอดเป็นต้นแฮพลอยด์ 55.56% จากยอดที่พัฒนาได้ทั้งหมด การศึกษาการเพิ่มชุดโครโมโซมของดาวเรืองเพื่อสร้างสายพันธุ์แท้พบว่าโคลชิซินที่ ความเข้มข้น 100 ppm สามารถเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในดาวเรืองที่เป็นแฮพลอยด์ให้เป็นต้น 2n ปกติที่เป็นสายพันธุ์แท้ A-line ได้ การเพาะเลี้ยงอับละองเกสรเพื่อสร้างสายพันธุ์ C-line พบว่า อับละองเกสรของดาวเรืองขนาดดอกใหญ่ กลาง และเล็กที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA และอับละองเกสรจากดอกขนาดเล็กและขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่

ประกอบด้วย 1 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA สามารถเกิดแคลลัสได้สูง และเมื่อทำการย้ายแคลลัสลงสู่อาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดต้นพบว่าแคลลัสที่เกิดจากดอกขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B 5 ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA จะสามารถชักนำให้เกิดต้นได้สูงสุดเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ และต้นที่ได้ส่วนใหญ่เป็นต้น 2n ที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนของโครโมโซมขึ้นเองในระหว่างเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทำให้ได้ต้นสายพันธุ์แท้โดยไม่ต้องใช้สารโคลชิซิน และเมื่อทำการผสมข้ามระหว่างต้นสายพันธุ์แม่ที่เกสรเพศผู้เป็นหมัน(A-line) กับต้นเพศผู้ที่เป็นสายพันธุ์แท้(C-line) พบว่าได้ลูกผสมที่มีลักษณะดีจำนวน 3 สายพันธุ์



เอกสารอ้างอิง

กัญจนาแซ่เตียว สุเม อรัญนารถและปรางทิพย์ มณีแสง (ม.ป.ป.). การใช้สารโคลชิซินชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในบัวหลวง. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 28:1. หน้า 49 – 59.

ธงชัย ทองอุทัยศรี. 2536. หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้, เชียงใหม่. 113 หน้า

นันทิยา วรธนะภูติ.2553.การขยายพันธุ์พืช. พิมพ์ครั้งที่ 4.โอเดียนสโตร์:กรุงเทพฯ.  
460 หน้า.

บุญหงษ์ จงคิด, 2548, หลักการและเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัย. ธรรมศาสตร์,  
กรุงเทพฯ, 187 หน้า.

วชิรพัฒน์ จิวาณิช. 2552. ผลของโคลชิซินต่อการชักนำกล้วยไม้มาสร้างให้เกิดพอลิพลอยดีในสภาพ  
ปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 78 หน้า.

Afele J.C., L.W. Kannenberg, R. Keats, S. Sohota, and E. B. Swanson, 1992. Increased  
induction of microspore embryos following manipulation of donor plant  
environment and culture temperature in corn (*Zea mays* L.). *Plant Cell Tissue and  
Organ Culture*. 28: 87-90.

Bhat, J.G. and H.N. Murthy. 2007. Haploid Plant Regeneration from Unpollinated Ovule  
Cultures of Niger (*Guizotia abyssinica* (L.f.) Cass.). *Plant Physiology*. 55: 241-245

Bohanec, B. 2009.Doubled Haploids via Gynogenesis.Doubled Haploid Production in Higher  
Plants, Touraev, A., Forster, B.P., & Jain, S.M., pp. 35 – 46, Springer Science + Business  
Media B. V.

Chen, J. F.; Cui, L.; Malik, A. A. &Mbira, K. G. 2011.*In vitro* haploid and dihaploid  
production via unfertilized ovule culture. *Plant Cell and Tissue Culture*, Vol. 104(3),  
pp. 311 – 319.

Jana Murovec and BorutBohanec 2013. Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding.  
Plant Breeding, University of Liubljana, Biotechnical Faculty. Slovenia. pp. 87 –  
106.[online]. <http://www.interchopen.com> (13 Febuary 2013).

Jonard, R. and A. Mezzarobba. 1990. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) : Anther culture and  
field studies on hapliod, pp. 486-501. In Y.P.S. Bajaj (ed.) *Biotechnology in Agriculture  
and Forestry*, Vol. 10. Springer-Verlag Press, Berlin.

- Keller, E.R.J. and L. Korzun. 1996. Ovary and ovule culture for haploid production. In: *In Vitro Haploid Production in Higher Plants, Vol. 1: Fundamental Aspects and Methods*. Ed. S.M. Jain, S.K. Sopory, and R.E. Veilleux. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. 217–235.
- Miyoshi K. and N. Asakura, 1996. Callus induction, regeneration of haploid plants and chromosome doubling in ovule cultures of pot gerbera (*Gerbera jamesonii*), Plant Cell Report 16: 1-5.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with Tobacco tissue culture. *Physiology Plant* 15 : 473-474.
- Muren R.C. 1989. Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion. *Hortscience*: 24(5) 833-834.
- Musial K., B. Bohanec and L. Prywara, 2001. Embryological study on gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.) *Sex Plant Reproduction* 13:335-341.
- Norio Kato and Sumio Iwai. 1993. Induction of Haploid Plants from Unpollinated Ovules in *Nicotiana rustica*. *Plant Tissue Culture Letters*, 10(2), pp. 123 – 129.
- Puddephat I.J., H.T. Robinson, B.M. Smith and J. Lynn, 1999. Influence of stock plant pretreatment on gynogenic embryo induction from flower buds of onion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57: 145-148.
- Sandra M. Reed. Haploid Culture : *Plant Development and Biotechnology* [online] : <http://naldc.nal.usda.gov/download/42088/PDF>. pp 225 - 234. 22 February 2013.
- Tosca A. L. Arcara and P. Frangi, 1999. Effect of genotype and season on gynogenesis efficiency in Gerbera. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59:77-80.

Van Geyt, G. J. Speckmann Jr., K. D'Halluin, M. Jacobs. 1987. In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovules and ovaries of the sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). Theoretical and Applied Genetics. April 1987, Volume 73, Issue 6, pp. 920-925.

