

การแก้ไขปัญหาความเป็นหมันของลูกผสมปทุมมาข้ามชนิดชั่วแรก

นางสุรามาศ	ณ น่าน ^{๑/}	นางสาวสุปัน	ไม้ดัดจันทร์ ^{๑/}
นายนิพนธ์	สุขวิบูลย์ ^{๒/}	นางสาววิภาดา	ทองทักษิณ

บทคัดย่อ

อุปสรรคสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ปทุมมา คือ ลูกผสมข้ามชนิด ข้ามสกุล มักเป็นหมันผสมไม่ติด ไม่สามารถใช้เป็นพ่อแม่ เพื่อปรับปรุงพันธุ์ในขั้นต่อไปได้ หรือผสมติดแต่เอ็มบริโออ่อนแอไม่พัฒนา การวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาพัฒนาเทคนิคต่างๆ เพื่อแก้ไขปัญหาอุปสรรคในการผสมข้ามของพืชสกุลนี้ ดำเนินการตั้งแต่ปี ๒๕๕๔-๒๕๕๖ แบ่งออกเป็น ๓ การทดลองย่อย คือ ๑. การใช้สารเสริมการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มความสมบูรณ์พันธุ์ พบว่า ความสำเร็จของการใช้สารเสริมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสมที่เป็นหมันขึ้นอยู่กับระดับความรุนแรงของการเป็นหมันของลูกผสมนั้นๆ สาร Brasinolide ๔,๐๐๐ ppm จัดเป็นสารเสริมการเจริญเติบโตที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการนำมาฉีดพ่นต้นลูกผสมที่เป็นหมันให้กลับคืนความสมบูรณ์พันธุ์ได้ พบการผสมติด ๖.๓-๒๘.๖ เปอร์เซ็นต์ ๒. การเพิ่มชุดโครโมโซมเพื่อแก้ความเป็นหมัน พบว่าต้นดิพลอยด์ (๒x) ซึ่งเป็นลูกผสมข้ามชนิดที่เป็นหมัน ไม่สามารถติดเมล็ดได้ แต่สำหรับต้นที่มีการเพิ่มชุดโครโมโซมเป็น ๔x หรือต้นเตตราพลอยด์ เมื่อนำมาผสมกับปทุมมาต้นพ่อแม่ พบการผสมติดสูงถึง ๓๓.๓-๗๕.๐ เปอร์เซ็นต์ ๓. การช่วยชีวิตเอ็มบริโอ พบว่าการแยกเอ็มบริโอออกจากเมล็ดที่มีอายุผล ๒๑ และ ๒๘ วัน มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ สูตร MS + BA ๒ มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA ๐.๑ มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถช่วยชีวิตเอ็มบริโอให้อยู่รอดจนพัฒนาเป็นต้นมียอดและรากสมบูรณ์ได้ในระดับหนึ่ง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอจากผลอ่อนอายุ ๗-๑๔ วัน ยังไม่ประสบผลสำเร็จ

รหัสการทดลอง ๐๑ ๓๒ ๕๔ ๐๑ ๐๒ ๐๐ ๐๑ ๕๔

^{๑/} ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ต.รอบเวียง อ.เมือง จ.เชียงราย ๕๗๐๐๐ โทร.๐๕๓-๑๗๐-๑๐๐

^{๒/} สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ ๑ ต.หนองหาร อ. สันทราย จ. เชียงใหม่ ๕๐๒๙๐

คำสำคัญ : ปทุมมาลูกผสม เทคนิคการแก้ความเป็นหมัน การเพิ่มชุดโครโมโซม การช่วยชีวิตคัพภะ
สารควบคุมการเจริญเติบโต

Keywords : *Curcuma* hybrids, sterility, chromosome doubling, embryo rescue,
Plant growth regulators

คำนำ

การปรับปรุงพันธุ์พืชสกุล *Curcuma* ทั้งในกลุ่มปทุมมาและกระเจียว เพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีลักษณะที่พึงประสงค์ มีความใหม่และหลากหลาย มักประสบผลสำเร็จจากการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ต่างๆ ในชนิดเดียวกัน หรือการผสมข้ามระหว่างชนิดที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน (วิภาดา, ๒๕๔๓) ทั้งนี้จากการศึกษาการผสมข้ามชนิดและข้ามกลุ่มย่อยนั้นสามารถทำให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะแปลกใหม่ มีการกระจายตัวของลักษณะต่างๆ ที่มากกว่าการผสมในชนิดเดียวกัน แต่มักประสบปัญหาที่ทำให้การผสมข้ามสายพันธุ์ไม่ประสบผลสำเร็จจากสาเหตุต่างๆ ทั้งในช่วง Pre- และ Post-fertilization เช่น ผสมไม่ติดจากพื้นฐานโครโมโซมที่แตกต่างกัน หรือมีอัตราการผสมติดต่ำ มีการบวมของรังไข่ แต่รังไข่จะหยุดพัฒนาหลังจากการผสมเกสร ๒ สัปดาห์ ทำให้ผลและเมล็ดฝ่อไปในที่สุด บางคู่ได้เมล็ดลูกผสม แต่เมล็ดไม่งอกหรือออกช้าจากปัญหาการพักตัวของเมล็ดที่ยาวนานข้ามปี แต่ปัญหาที่สำคัญที่สุดซึ่งเป็นอุปสรรคที่ทำให้การพัฒนาพันธุ์ปทุมมา/กระเจียว ถึงทางตัน คือต้นลูกผสมข้ามชนิดข้ามสกุลชั่วที่ ๑ เป็นหมัน ไม่สามารถใช้เป็นพ่อ-แม่พันธุ์ เพื่อสร้างลูกผสมในชั่วต่อๆ ไปได้

การวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาพัฒนาวิธีการต่างๆ ที่มีการใช้ในพืชสกุลอื่นๆ ทั้งการใช้ฮอร์โมนและสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มความสมบูรณ์ของส่วนสืบพันธุ์ การเพิ่มชุดโครโมโซม หรือการช่วยชีวิตคัพภะและเมล็ดอ่อนเพื่อแก้ไขปัญหอุปสรรคในการผสมข้าม (crossing barriers) ของพืชสกุล *Curcuma* ซึ่งเทคโนโลยีที่ได้จะช่วยต่อยอดการปรับปรุงพันธุ์ปทุมมาให้มีความก้าวหน้าและรวดเร็วยิ่งขึ้น

วิธีดำเนินการ

การทดลองย่อยที่ ๑ การใช้สารเสริมการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มความสมบูรณ์พันธุ์

อุปกรณ์ ๑. ปทุมมาลูกผสมชั่วที่ ๑ ๓ พันธุ์ คือ F_1 (AP x PP) , F_1 (TH x PP) และ F_1 (AP x BL) และต้น

พ่อแม่ ๓ พันธุ์ คือ ปทุมมาเชียงใหม่ บัวขาว และบัวลายลาว

๒. สารเสริมการเจริญเติบโต ๕ ชนิด คือ Brasinolide, Amino acid (น้ำ) , Amino acid (ผง)

,
NAA และ O_2 flavonin

๓. อุปกรณ์ในการผสมเกสร ได้แก่ ปากคีบ แอลกอฮอล์ ๗๐% สำลี ป้าย ดินสอ ถุงตาข่าย

วิธีการ ๑. ปลุกปทุมมาลูกผสมชั่วที่ ๑ ที่เกสรเพศผู้เป็นหมัน ๓ พันธุ์ และต้นพ่อ-แม่ ๓ พันธุ์

๒. เมื่อพืชทดลองอยู่ในช่วงการเจริญเติบโต เริ่มแทงช่อดอก พ่นสารเสริมการเจริญเติบโต ทั้งต้นพ่อและต้นแม่ที่จะใช้ผสม โดยสารเสริมการเจริญเติบโตที่ใช้ได้แก่ Brasinolide ๔,๐๐๐ ppm, NAA ๐.๒ g/L, O_2 flavonin ๐.๐๕ cc/L, Amino acid น้ำ ๒๐ cc/๒๐ L และ Amino acid ผง ๗ g/L โดยมีกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่าเป็น control วิธีการพ่นเช่นเดียวกับการให้ปุ๋ยทางใบโดยพ่นทั่วทั้งต้น โดยเฉพาะส่วนของช่อดอกในอ่างกลีบบระดับส่วนล่างที่มีช่อดอกจริงอยู่ โดยฉีดในช่วงเช้า ตั้งแต่ต้นปทุมมาเริ่มแทงช่อดอกทั้งต้นพ่อและต้นแม่และฉีดซ้ำทุกวันเว้นวันจนกระทั่งเก็บเกี่ยวผล

๓. ทำการผสมเกสรต้นทดลองระหว่างปทุมมาลูกผสมชั่วที่ ๑ และต้นพ่อพันธุ์ ประเมินเปอร์เซ็นต์การผสมติด พัฒนาการของผล และจำนวนเมล็ดสมบูรณ์ต่อผล

การทดลองย่อยที่ ๒ การเพิ่มชุดโครโมโซมเพื่อแก้ความเป็นหมันของปทุมมาลูกผสมชั่วที่ ๑

อุปกรณ์ ๑. ปทุมมาลูกผสมชั่วที่ ๑ ๓ พันธุ์ ๒. สารโคลชิซิน ๓. สารเคมีและอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

วิธีการ ๑. เตรียมเนื้อเยื่อปทุมมาปลอดโรค สายพันธุ์ปทุมมาลูกผสมที่ใช้คือ ปทุมมา x บัวลายลาว, ปทุมมา x บัวขาว และปทุมมา x ปทุมรัตน์ นำ apical meristem เข้าเพาะเลี้ยงเพื่อสร้าง adventitious bud และชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากในสภาพปลอดเชื้อ

๒. ชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซม โดยการใช้สารโคลชิซิน โดยตัดแยกชิ้นส่วนหน่ออ่อนใส่ขวดละ ๕ ยอด แช่ชิ้นส่วนในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น ๑,๐๐๐ และ ๒,๐๐๐ ppm เป็นเวลา ๒ และ ๔ วัน (นิพนธ์และคณะ ๒๕๕๓)

๓. เพิ่มจำนวนต้นพันธุ์ที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซิน เพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา ๓ เดือน

๔. นำต้นเนื้อเยื่อออกเพาะเลี้ยงในโรงเรือนอนุบาล ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ที่เปลี่ยนแปลง คัดเลือกต้นที่มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาอย่างเด่นชัดเปรียบเทียบกับต้นปกติมาตรวจนับจำนวนโครโมโซม โดยวิธี Flow Cytometry

๕. ทดสอบการผสมพันธุ์ต้นที่มีการเพิ่มชุดโครโมโซม เพื่อยืนยันความสามารถในการใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการสร้างลูกผสมในรุ่นต่อไป

หมายเหตุ เนื่องจากการเกิดมหาอุทกภัยน้ำท่วมใหญ่ในช่วงปลายปี ๒๕๕๔ ถึงต้นปี ๒๕๕๕ ห้องปฏิบัติการทดลองและอาคารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของสถาบันวิจัยพืชสวนได้รับความเสียหายจากน้ำท่วมขัง การทดลองและต้นทดลองซึ่งดำเนินการมาถึงขั้นตอนที่ ๓ ถูกน้ำท่วมหมด การฟื้นฟูห้องปฏิบัติการให้กลับมาใช้งาน ใช้เวลานานราวกลางปี ๒๕๕๕ รวมทั้งเครื่องมือตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ก็เสียหายใช้การไม่ได้ จึงจำเป็นต้องยุติการทดลองนี้ แต่ได้ปรับเปลี่ยนวิธีดำเนินงานวิจัยใหม่ดังนี้คือ

นำต้นลูกผสมจากงานทดลองของนิพนธ์และคณะ (๒๕๕๓) ซึ่งเป็นต้นลูกผสมข้ามชนิดระหว่างปทุมมา(*Curcuma alismatifolia*) x บัวลายลาว(*C. rhabdota*) ที่มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซม โดยใช้สารโคลชิซินและมีการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการตรวจปริมาณ DNA ว่าเป็นต้นเตตราพลอยด์ จำนวน ๓ ต้น คือต้นเตตราพลอยด์เบอร์ ๓ เบอร์ ๗ และเบอร์ ๙ มาทดสอบความสมบูรณ์พันธุ์ว่า จะสามารถใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการสร้างลูกผสมชั่วที่ ๒ ต่อไปได้หรือไม่ โดยการผสมกลับกับต้นพ่อ-แม่ และประเมินเปอร์เซ็นต์การผสมติดจากจำนวนดอกที่ผสมทั้งหมด

การทดลองย่อยที่ ๓ ศึกษาการช่วยชีวิตเอ็มบริโอ (Embryo rescue)

อุปกรณ์ ๑. ปทุมมาลูกผสมข้ามชนิด ๑ คู่ผสม ระหว่างปทุมมา (*C. alismatifolia*) x บัวลายลาว (*C. rhabdota*) และปทุมมาลูกผสมชั่วที่ ๑ ที่เป็นหมัน x พ่อแม่ชนิดแท้ ๓ คู่ผสม คือ $F_1 \times$ ปทุมมา, $F_1 \times$ บัวขาว และ $F_1 \times$ ปทุมรัตน์

๒. ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: อุปกรณ์เตรียมอาหาร เครื่องมือผ่าตัด กล้องจุลทรรศน์ สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ และสารเคมีที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

๓. รังไข่ (ovary) ภายหลังที่ได้รับการผสม

วิธีการ ๓.๑ การศึกษาการพัฒนาของผล เมล็ด และเอ็มบริโอหรือคัพพะของคู่ผสมปทุมมา x บัวลายลาว

ทำการผสมเกสรระหว่างคู่ผสมปทุมมา x บัวลายลาว นำผลที่มีอายุ ๗, ๑๔, ๒๑ และ ๒๘ วัน ภายหลังการผสมเกสร มาทำการช่วยชีวิตคัพพะ โดยนำรังไข่แต่ละระยะมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอริกซ์ ๒๐ เปอร์เซ็นต์ นาน ๒๐ นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ๓ ครั้ง นำรังไข่มาผ่า เพื่อนำเมล็ดที่อยู่ภายในมาแกะเอาเอ็มบริโอออกมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ๒ มิลลิกรัมต่อลิตร

และ NAA ๐.๑ มิลลิกรัมต่อลิตร (เฉลิมศรีและคณะ, ๒๕๕๑) บันทึกพัฒนาการของเอ็มบริโอ ภายหลังการเพาะเลี้ยง เพอร์เซ็นต์เอ็มบริโอที่ตาย (เอ็มบริโอเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล) เพอร์เซ็นต์ เอ็มบริโอที่พัฒนาเป็นต้น และเอ็มบริโอที่ไม่พัฒนา

๓.๒ การศึกษาการช่วยชีวิตเอ็มบริโอ (embryo rescue) ในคู่ผสมปทุมมาลูกผสมชั่วที่ ๑ x พ่อแม่พันธุ์

ทำการผสมเกสรระหว่างคู่ผสมปทุมมาลูกผสมชั่วที่ ๑ (F_1) ที่มีระดับความเป็นหมันของเกสรเพศ ผู้และพ่อแม่พันธุ์ ๓ คู่ผสม คือ F_1 (AL x BL) x ปทุมมา, F_1 (LPS x PP) x บัวขาว และ F_1 (AL x PP) x ปทุมรัตน์ นำผลอ่อนอายุที่เหมาะสมในการช่วยชีวิตที่ได้ผลจากการทดลองที่ ๓.๑ มาทำการแยกเอาเอ็มบริโอออกและเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองที่ ๓.๑ ประเมินผลการช่วยชีวิตลูกผสม

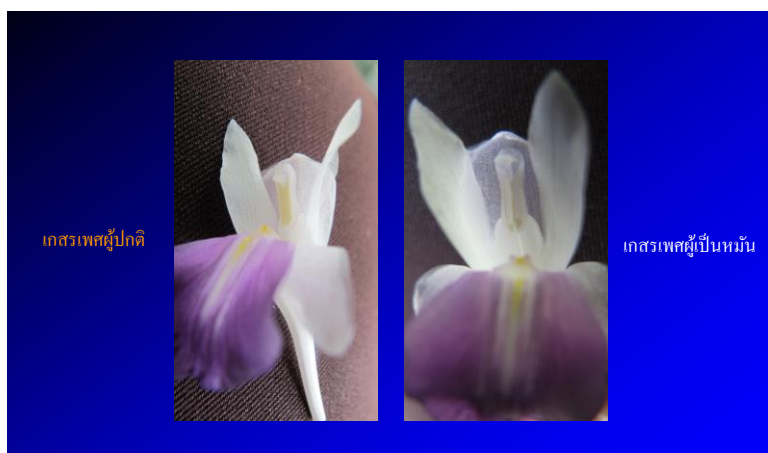
ระยะเวลา ๓ ปี (๒๕๕๔ – ๒๕๕๖)

สถานที่ดำเนินการ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย
สถาบันวิจัยพืชสวน

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดลองย่อยที่ ๑ การใช้สารเสริมการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มความสมบูรณ์พันธุ์

ผลการทดลองการใช้สารเคมี/ฮอร์โมน เพื่อเพิ่มความสมบูรณ์ของเซลล์สืบพันธุ์ พบว่า ระดับความสำเร็จของการใช้สารเสริมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสมข้ามชนิดที่จะสามารถนำมาใช้เป็นต้นพ่อแม่เพื่อใช้ผลิตลูกผสมในรุ่นต่อไปได้นั้นขึ้นอยู่กับระดับความรุนแรงของการเป็นหมันของพันธุ์ลูกผสมนั้นๆ ในคู่ผสมปกติ ไม่เป็นหมัน จะพบละอองเรณูสีขาวนวลเต็มอับเรณู แต่บางคู่ผสมที่เป็นหมันจะผลิตละอองเรณูเพียงเล็กน้อย หรือบางคู่ผสมจะไม่มีละอองเรณูเลย (ภาพที่ ๑) ในลูกผสม F_1 (APxBL) x บัวลายลาว ซึ่งมีระดับความเป็นหมันไม่รุนแรงประเมินจากต้นลูกผสมผลิตละอองเรณูบ้าง แต่มีจำนวนน้อยประมาณ ๑๐-๒๐% การพ่น Brasinolide ๔,๐๐๐ ppm, O_2 Flavonin ๐.๐๕cc/L, NAA ๐.๒ g/L หรือ Amino acid น้ำ ๒๐cc/๒๐L อย่างใดอย่างหนึ่ง สามารถเพิ่มโอกาสในการติดผลและเมล็ดได้ ๒๘.๖ ๒๕.๐ ๑๒.๕ และ ๑๒.๕ เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ ๑) แต่ในลูกผสมอีก ๒ คู่ คือ F_1 (APxPP) x ปทุมมา และ F_1 (THxPP) x บัวขาว ที่มีระดับความเป็นหมันรุนแรง (ต้นลูกผสมผลิตละอองเรณูน้อยมาก < ๕%) มีสารเสริมการเจริญเติบโตเพียงชนิดเดียวคือ Brasinolide ๔,๐๐๐ ppm ที่ใช้ได้ผลโดยมีเปอร์เซ็นต์การติดผล ๖.๓ เปอร์เซ็นต์ ในคู่ผสม F_1 (THxPP) x บัวขาว และ ๒๐.๐ เปอร์เซ็นต์ ในคู่ผสม F_1 (APxPP) x ปทุมมา ซึ่งบราสิโนลาอิด (Brasinolide) เป็นกลุ่มสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มใหม่ที่สกัดมาจากละอองเรณูของ rape พืชสกุล Brassica สารสกัดที่ได้มีชื่อว่า บราสซิน (brassin) ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชที่มีส่วนสำคัญในการส่งสัญญาณเพื่อให้พืชเจริญเติบโตเป็นไปอย่างปกติ (อุบลวรรณ และคณะ, ๒๕๕๕) แม้ว่าบทบาทที่ชัดเจนของฮอร์โมนชนิดนี้ต่อฟังก์ชันในละอองเรณูพืชยังไม่ระบุชัด แต่น่าจะมีส่วนสำคัญต่อความสมบูรณ์แข็งแรงของละอองเรณูเพราะเป็นสารสำคัญที่สกัดมาจากละอองเรณูของเรพซีด มีรายงานการใช้บราสิโนลาอิดในการฉีดพ่นไม้ผลในช่วงก่อนการออกดอก สามารถป้องกันการพักตัวของดอก ลดการเป็นหมันของดอกและการร่วงของผล กระตุ้นการเจริญเติบโตของผล และปรับปรุงลักษณะติดปกติของผล (<http://www.hos.ufl.edu/mooreweb/tissue> Culture)



ภาพที่ ๑ ละอองเรณูของต้นปกติเปรียบเทียบกับต้นที่เป็นหมัน (male sterile)

ตารางที่ ๑ การใช้สารเสริมการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มโอกาสในการติดเมล็ดของปทุมมาลูกผสมชั่วที่ ๑

กลุ่ม	ชนิดสาร	จำนวนดอกที่ผสม	จำนวนฝักที่ติด	เปอร์เซ็นต์การผสมติด
F _๑ (APxPP) x ปทุมมา	Brasinolide ๔,๐๐๐ ppm	๑๐	๒	๒๐.๐
	NAA ๐.๒ g/L	๗	๐	๐
	O _๒ Flvonin ๐.๐๕ cc/L	๒	๐	๐
	Amino acid น้ำ ๒๐cc/๒๐L	๘	๐	๐
	Amino acid ผง ๗ g/L	๑๐	๐	๐
	Control	๓	๐	๐

กลุ่ม	ชนิดสาร	จำนวนดอกที่ผสม	จำนวนฝักที่ติด	เปอร์เซ็นต์การผสมติด
F _๑ (THxPP) x บัวขาว	Brasinolide ๔,๐๐๐ ppm	๑๖	๑	๖.๓
	NAA ๐.๒ g/L	๑๐	๐	๐
	O _๒ Flvonin ๐.๐๕ cc/L	๙	๐	๐
	Amino acid น้ำ ๒๐cc/๒๐L	๑๔	๐	๐
	Amino acid ผง ๗ g/L	๖	๐	๐
	Control	๓	๐	๐

กลุ่ม	ชนิดสาร	จำนวนดอกที่ผสม	จำนวนฝักที่ติด	เปอร์เซ็นต์การผสมติด
F _๑ (APxBL) x บัวลายลาว	Brasinolide ๔,๐๐๐ ppm	๗	๒	๒๘.๖
	NAA ๐.๒ g/L	๘	๑	๑๒.๕
	O _๒ Flvonin ๐.๐๕ cc/L	๔	๑	๒๕.๐
	Amino acid น้ำ	๑๖	๒	๑๒.๕

	๒๐cc/๒๐L			
	Amino acid ผง ๗ g/L	๕	๐	๐
	Control	๘	๐	๐

การทดลองย่อยที่ ๒ การเพิ่มชุดโครโมโซมเพื่อแก้ความเป็นหมันของปทุมมาลูกผสมชั่วที่ ๑

ในการผสมข้ามชนิด (interspecific hybrid) ลูกผสมที่เกิดขึ้นซึ่งเป็น diploid hybrid มักจะเป็นหมัน เนื่องจากยีนอม (genome) ทั้งสองมีความแตกต่างกันจะมากหรือน้อยแล้วแต่ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดทั้งสอง การเพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นเป็นสองเท่า จะทำให้เกิดเป็นสี่ยีนอม ดังนั้นจากสองยีนอมที่ต่างกันอยู่เดิม จึงมีคู่จับที่เหมือนกันเรียกว่า allotetraploid หรือมีชื่อเรียกอีกอย่างว่า amphidiploid ซึ่งพืช amphidiploid นี้จะมีพฤติกรรมในเรื่องการสืบพันธุ์เช่นเดียวกับ diploid ทั้งนี้เพราะโครโมโซมทุกตัวมีคู่จับ ทำให้เซลล์สืบพันธุ์ทุกเซลล์ทำหน้าที่ในการผสมพันธุ์ได้ตามปกติ จึงไม่เป็นหมัน (ณรงค์และอุทัย, ๒๕๑๙)

จากการเปรียบเทียบลักษณะของต้นดิพลอยด์ (๒x) และต้นเตตราพลอยด์ (๔x) พบว่า ต้นเตตราพลอยด์มีลักษณะของส่วนต่างๆ ที่ใหญ่โตขึ้นกว่าต้นดิพลอยด์ ทั้งความสูงต้น ขนาดใบ ความหนาใบ ขนาดช่อดอกและขนาดก้านช่อดอกที่ใหญ่กว่าเดิม และมีสีของดอกที่มีความเข้มขึ้นกว่าต้นเดิม (ภาพที่ ๒)

จากการทดสอบการผสมข้ามระหว่างต้นดิพลอยด์ ซึ่งเป็นลูกผสมข้ามชนิดชั่วที่ ๑ ของปทุมมา x บัวลายลาว ซึ่งเป็นหมันกับปทุมมาต้นพ่อแม่ พบว่าการผสมไม่ประสบผลสำเร็จ (ตารางที่ ๒) แต่สำหรับต้นเตตราพลอยด์ ทั้ง ๓ เบอร์ เมื่อทำการผสมข้ามกับต้นพ่อแม่ปทุมมา พบการผสมติดสูงถึง ๓๓.๓-๗๕.๐ เปอร์เซ็นต์ โดยต้นเตตราพลอยด์เบอร์ ๗ มีความสมบูรณ์พันธุ์กลับคืนมาสูงที่สุด ๕๐.๐-๗๕.๐ เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือเบอร์ ๓ ผสมติด ๓๓.๓-๕๘.๓ เปอร์เซ็นต์ และเบอร์ ๙ ผสมติด ๓๓.๓-๔๘.๙ เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ ๒ ลักษณะช่อดอกของปทุมมาลูกผสมต้นแอมฟิดิพลอยด์หรือเตตราพลอยด์ (๔x) และต้นดิพลอยด์ (๒x)

ตารางที่ ๒ เปอร์เซ็นต์การติดผลของต้นเตตราพลอยด์ เปรียบเทียบกับต้นดิพลอยด์

คู่ผสม	จำนวนดอกที่ผสม	จำนวนผลที่ติด	เปอร์เซ็นต์การติดผล
--------	----------------	---------------	---------------------

การทดลอง ปี ๒๕๕๕			
F _๑ เตตราพลอยด์#๓ x ปทุมมา	๑๒	๗	๕๘.๓
F _๑ เตตราพลอยด์#๗ x ปทุมมา	๒๔	๑๘	๗๕.๐
F _๑ เตตราพลอยด์#๙ x ปทุมมา	๔๗	๒๓	๔๘.๙
F _๑ ดิพลอยด์ x ปทุมมา	๒๐	๐	๐
การทดลองปี ๒๕๕๖			
F _๑ เตตราพลอยด์#๓ x ปทุมมา	๖	๒	๓๓.๓
F _๑ เตตราพลอยด์#๗ x ปทุมมา	๖	๓	๕๐.๐
F _๑ เตตราพลอยด์#๙ x ปทุมมา	๙	๓	๓๓.๓
F _๑ ดิพลอยด์ x ปทุมมา	๙	๐	๐

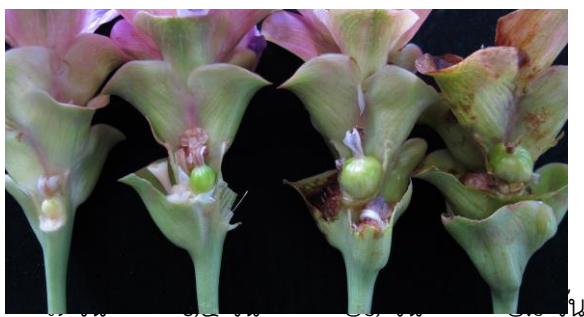
การทดลองย่อยที่ ๓ ศึกษาการช่วยชีวิตเอ็มบริโอหรือคัพพะ (Embryo rescue)

ในลูกผสมข้ามชนิดที่สามารถติดเมล็ดได้ในระยะแรกของการผสมเกสร แต่เมล็ดอ่อนแอและฝ่อตายไปในที่สุด ไม่สามารถอยู่รอดได้จนถึงเมล็ดสุกแก่ตามสภาพธรรมชาติได้ การแยกเอ็มบริโอออกมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสม สามารถแก้ปัญหาเอ็มบริโอไม่พัฒนาหรือพัฒนาแต่อ่อนแอได้ในระดับหนึ่ง ผลการทดลองมีดังนี้

๓.๑. การศึกษาการพัฒนาของผล เมล็ด และเอ็มบริโอ(คัพพะ)ของคู่ผสมปทุมมา x บัวลายลาว
พบว่าหลังการผสมเกสร ๗-๑๔ วัน เมล็ดอ่อนยังมีขนาดเล็กมาก มีลักษณะใสและนิ่มมาก เมื่อผ่าเมล็ดภายใต้กล้อง พบว่าที่ระยะเวลา ๗ วัน หลังการผสมเกสรภายในเมล็ดมีของเหลวใสยังไม่พบเอ็มบริโอ ส่วนเมล็ดอ่อนอายุ ๑๔ วัน เอ็มบริโอมีการยึดตัวแต่ยังมีขนาดเล็กมาก มีลักษณะนิ่มและเป็นเส้นบางๆ ยังไม่สามารถแยกเอ็มบริโอออกจากเมล็ดได้ เมื่อเมล็ดมีอายุ ๒๑ วัน เมล็ดมีความแข็งมากขึ้น มีการพัฒนาของเอ็นโดสเปิร์มภายในเมล็ด เมื่อผ่าเมล็ดพบเอ็มบริโอที่มีการขยายขนาดขึ้น แต่มีขนาดไม่ใหญ่มากนัก ขนาดคัพพะประมาณ ๐.๕ มิลลิเมตร สามารถแยกเอ็มบริโอออกจากเมล็ดได้ง่าย และเมื่อเมล็ดอายุ ๒๘ วัน หลังผสมเกสร เมล็ดจะมีลักษณะคล้ายเมล็ดอู่นเปลือกและเนื้อเมล็ดแข็งขึ้นและผิวเมล็ดเป็นมัน การผ่าเมล็ดเริ่มทำได้ยากขึ้น แต่เมื่อผ่าเมล็ดออกพบเอ็มบริโอมีขนาดใหญ่กว่าเมล็ดอายุ ๒๑ วัน โดยมีขนาดคัพพะประมาณ ๑ มิลลิเมตร และสามารถแยกเอ็มบริโอออกจากเมล็ดได้ง่าย (ภาพที่ ๓-๕) โดยคู่ผสมปทุมมา x บัวลายลาวนี้จะมีอายุผลสุกแก่ตามธรรมชาติ ประมาณ ๓๕-๔๐ วัน และเมล็ดหลังอายุ ๓๐ วัน จะไม่สามารถแยกเอ็มบริโอออกจากเมล็ดได้ เพราะเมล็ดมีความแข็งมาก เปลือกเมล็ดหนาเป็นมัน ผิวลื่น ไม่สามารถผ่าเมล็ดได้

จากนั้นศึกษาการเพาะเมล็ดอ่อนและเอ็มบริโอ บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการเนื่องจากอายุผล ๗ วัน และ ๑๔ วันหลังการผสมพันธุ์ เมล็ดยังมีลักษณะอ่อนนิ่ม ภายในใสเป็นวุ้น เอ็มบริโอมีลักษณะนิ่มเป็นเส้นบางๆ ไม่สามารถแยกเอ็มบริโอออกจากเมล็ดได้ จึงทำการผ่าเมล็ดและนำเมล็ดอ่อนที่มีเอ็มบริโออยู่ภายในไปวางบนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเพื่อดูพัฒนาการของชิ้นส่วน ในขณะที่เมล็ดอายุ ๒๑ และ ๒๘ วัน สามารถแยกเอ็มบริโอออกจากเมล็ดมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นได้ ผลการช่วยชีวิตเอ็มบริโอ พบว่าเมื่อนำเมล็ดอ่อนอายุผล ๗ วัน และ ๑๔ วัน มาเพาะเลี้ยงใช้เวลาเพาะ ๖ เดือน ไม่พบการพัฒนาของเนื้อเยื่อและเมล็ดเปลี่ยนเป็นสีดำตายในที่สุด ส่วนอายุผล ๒๑ วัน แยกเอ็มบริโอขนาด ๐.๕ มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา ๖ เดือน พบ ๗๐% เนื้อเยื่อเอ็มบริโอเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่น ไม่ตายแต่ไม่มีการพัฒนา ส่วนที่เหลืออีก ๓๐% เอ็มบริโอพัฒนาเป็นแคลลัสสีขาวเป็นส่วนใหญ่ ต่อมาเมื่อแคลลัสสีเขียวขึ้น

ปะปน ไม่มีการพัฒนาเป็นต้นเลย และเมื่อนำอายุผล ๒๘ วัน มาแยกเอ็มบริโอจากเมล็ด เอ็มบริโอมีขนาดใหญ่ขึ้นประมาณ ๑ มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหาร ๖ เดือน พบพัฒนาการของเอ็มบริโอในหลายรูปแบบ (ตารางที่ ๓, ภาพที่ ๖) ส่วนใหญ่มีการพัฒนาเป็นแคลลัส มีเพียง ๑.๘% เท่านั้นที่เอ็มบริโอพัฒนาไปเป็นต้น ที่มียอดและรากสมบูรณ์ ๑ ต้น/๑ เอ็มบริโอ โดยไม่พบเนื้อเยื่อแคลลัส และ ๑๒.๓% เกิดเป็นกลุ่มยอด (multiple shoot) ซึ่งต่อมาพัฒนาเป็นต้น จำนวน ๕-๖ ต้น/๑ ชิ้นส่วนเอ็มบริโอ เมื่อ subculture กลุ่มยอดออกเป็นต้นเดี่ยวๆ และย้ายลงสูตรอาหารใหม่ สามารถพัฒนาเป็นต้นและออกรากสมบูรณ์ ซึ่งได้ย้ายต้นเหล่านี้ปลูกเพื่อประเมินว่าต้นลูกผสมที่ได้เป็นต้นที่ได้จากการผสมพันธุ์ที่เกิดจากเอ็มบริโอโดยตรงหรือเกิดมาจากเนื้อเยื่อส่วนอื่น



วัน



ภาพที่ ๓ ผลลูกผสมปทุมมาอายุ ๗ ๑๔ ๒๑ และ ๒๘ วัน หลังการผสมเกสร



อายุ 7 วัน



อายุ 14 วัน



อายุ 21 วัน



อายุ 28 วัน

ภาพที่ ๔ ผลและเมล็ดปทุมมาอายุ ๗ ๑๔ ๒๑ และ ๒๘ วัน

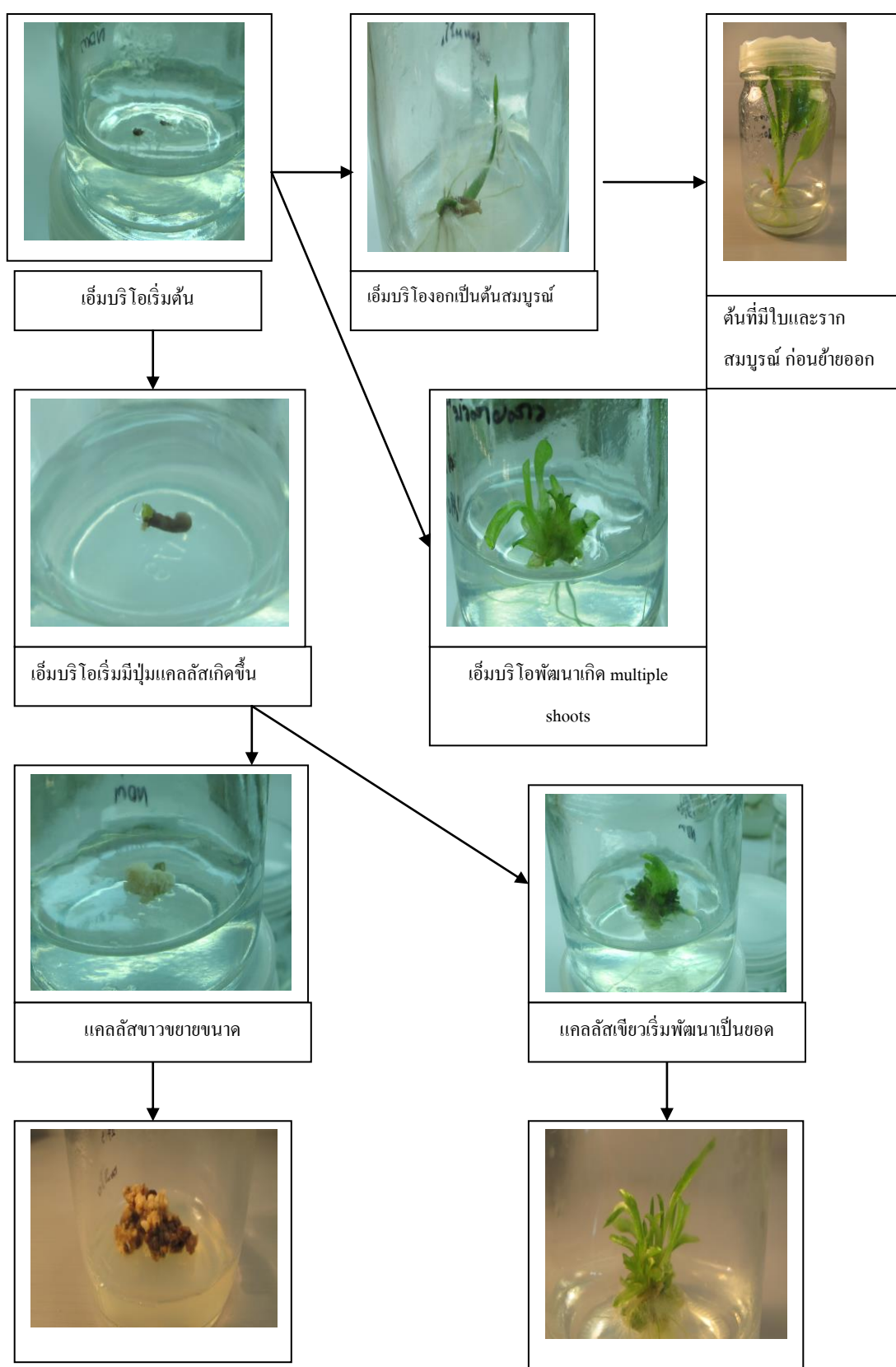
ผ่าเมล็ดอายุ
อายุ ๒๘ วัน

เอ็มบริโอ

ภาพที่ ๕ การพัฒนาของเอ็มบริโอของเมล็ดอายุต่างๆ กัน

ตารางที่ ๓ พัฒนาการของเอ็มบริโอคู่ผสมปทุมมา x บัวลายลาว จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอในช่วงอายุ
ผลต่างๆ กันของเมล็ดลูกผสม

ชิ้นส่วน	อายุผล (วัน)	วันที่เพาะ	วันที่เช็คผล	พัฒนาการของเมล็ดอ่อน/เอ็มบริโอ
เมล็ดอ่อน	๗	ต.ค.๕๕	มี.ค.๕๖	ไม่มีการพัฒนาของเนื้อเยื่อ เมล็ดเปลี่ยนเป็นสีดำ
เมล็ดอ่อน	๑๔	ต.ค.๕๕	มี.ค.๕๖	ไม่มีการพัฒนาของเนื้อเยื่อ เมล็ดเปลี่ยนเป็นสีดำ
เอ็มบริโอ	๒๑	ต.ค.๕๕	มี.ค.๕๖	๗๐.๐ % ไม่มีการพัฒนา ๓๐.๐ % เนื้อเยื่อพัฒนาเป็นกลุ่มแคลลัสสีขาว
เอ็มบริโอ	๒๘	ต.ค.๕๕	มี.ค.๕๖	๑๕.๘% ไม่มีการพัฒนา ๖๒.๒% เกิดกลุ่มแคลลัสสีขาว ๗.๘% เกิดกลุ่มแคลลัสสีเขียวและเริ่มพัฒนาเป็นต้น ๑๒.๓% เกิด adventitious bud และพัฒนาเป็นต้น ๕-๖ ต้น/๑ เอ็มบริโอ ๑.๘% เอ็มบริโอออกเป็นต้นสมบูรณ์ โดยไม่พบเนื้อเยื่อ แคลลัส



เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
(browning) จากการ subculture

กลุ่มต้นอ่อนสมบูรณ์

ภาพที่ 6 การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอที่อายุผล 28 วัน และพัฒนาการต่างๆของเนื้อเยื่อ

๓.๒ การศึกษาการช่วยชีวิตเอ็มบริโอ(embryo rescue)ในคู่ผสม $F_1 \times$ พันธุ์พ่อแม่

จากการทดลองใช้ลูกผสมข้ามชนิดรุ่นที่ ๑ ที่มีระดับความเป็นหมันของเกสรเพศผู้ มาผสมพันธุ์ชั้นที่ ๒ กับต้นพ่อแม่ ๓ คู่ผสม พบว่าทั้ง ๓ คู่ สามารถผสมติดได้โดยรังไข่จะบวมโตขึ้นหลังจากได้รับการ fertilization แต่หลังจาก ๒ สัปดาห์หลังการผสม รังไข่จะเริ่มเหลือง ฝ่อ และตายไปในที่สุด ยกเว้นคู่ผสม $F_1 \times$ บัวขาว ซึ่งมีบางชุดที่รังไข่พัฒนาได้เกิน ๓ สัปดาห์ ทำการช่วยชีวิตเมล็ดลูกผสมโดยการแยกออกมา เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ โดยชุดที่มีอายุผลที่พัฒนาได้เพียง ๑๔ วัน ไม่สามารถแยกเอ็มบริโอออกจากเมล็ดได้ จึงต้องเพาะเมล็ดอ่อนโดยการผ่าเมล็ดเพื่อเปิดให้เอ็มบริโอสัมผัสอาหาร ส่วนชุด $F_1 \times$ บัวขาว ที่สามารถเก็บเกี่ยวผลที่อายุ ๒๑ วัน สามารถแยกเอ็มบริโอออกมาเลี้ยงได้ จากการทดลองพบว่า การช่วยชีวิตลูกผสมปทุมมา ซึ่งยังไม่พัฒนาเต็มที่ จะประสบผลสำเร็จแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของลูกผสม และอายุและความแข็งแรงของเอ็มบริโอที่ได้จากการผสมพันธุ์ (ตารางที่ ๔) โดยคู่ผสมระหว่าง $F_1 \times$ บัวขาว เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอที่อายุ ๒๑ วัน เอ็มบริโอสามารถเกิดเป็นต้นได้ ๑๐๐ เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเพาะเมล็ดอ่อนอายุ ๑๔ วัน ในทุกคู่ผสมยังไม่ประสบผลสำเร็จในการช่วยชีวิตเท่าที่ควร ส่วนใหญ่ขึ้นส่วนไม่พัฒนา มีบางส่วนที่มีการพัฒนาเป็นแคลลัสสีขาว และมีเพียงคู่ผสม $F_1 \times$ ปทุมรัตน์ ที่มีขึ้นส่วนเพียง ๒.๙% พัฒนาเป็นยอดสีเขียว ซึ่งจากการทดลองที่ ๓.๑ และ ๓.๒ จะพบว่าการเพาะเมล็ดอ่อนอายุ ๑๔ วัน เนื้อเยื่อพัฒนาเป็นแคลลัสมากกว่าให้กำเนิดเป็นต้น จึงจำเป็นต้องมีการปรับสูตรอาหารให้เหมาะสมสำหรับการช่วยชีวิตเอ็มบริโออ่อนต่อไป โดยเฉพาะการปรับสัดส่วนของฮอร์โมน BA ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มักกระตุ้นให้เกิดเนื้อเยื่อแคลลัส

ตารางที่ ๔ การช่วยชีวิตเมล็ดอ่อนและเอ็มบริโอเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ๒ มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ๐.๑ มิลลิกรัมต่อลิตร

คู่ผสม	อายุผล (วัน)	ขึ้นส่วน	จำนวนขึ้นส่วนที่เลี้ยง	จำนวนขึ้นส่วนที่พัฒนาเป็นต้น (%การพัฒนาเป็นต้น)	จำนวนขึ้นส่วนที่พัฒนาเป็นแคลลัส	จำนวนขึ้นส่วนที่ไม่พัฒนา	จำนวนขึ้นส่วนที่ตาย
$F_1 \times$ ปทุมมา (AL $\times$ BL) $\times$ AL	๑๔	เมล็ดอ่อน	๑๐	๐ (๐%)	๑	๖	๓
$F_1 \times$ ปทุมรัตน์ (AL $\times$ PP) $\times$ PP	๑๔	เมล็ดอ่อน	๓๕	๑ (๒.๙%)	๖	๒๘	๐
$F_1 \times$ บัวขาว (LPS $\times$ PP) $\times$ LPS	๑๔	เมล็ดอ่อน	๖	๐ (๐%)	๒	๔	๐
	๒๑	เอ็มบริโอ	๙	๙ (๑๐๐%)	๐	๐	๐

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การทดลองย่อยที่ ๑ การใช้สารเสริมการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มความสมบูรณ์พันธุ์

ผลสำเร็จของการใช้สารเสริมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มความสมบูรณ์พันธุ์ของต้นลูกผสมที่เป็นหมันขึ้นอยู่กับระดับความรุนแรงของการเป็นหมันของลูกผสมนั้นๆ ผลการทดลองพบว่า สาร Brasinolide ๔,๐๐๐ ppm จัดเป็นสารเสริมการเจริญเติบโตที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการนำมาฉีดพ่นต้นลูกผสมปทุมมาข้ามชนิดที่เป็นหมันให้กลับคืนความสมบูรณ์พันธุ์ได้ พบการผสมติด ๖.๓-๒๘.๖%

การทดลองย่อยที่ ๒ การเพิ่มชุดโครโมโซมเพื่อแก้ความเป็นหมันของปทุมมาลูกผสมชั่วที่ ๑

การชักนำให้ปทุมมาลูกผสมข้ามชนิด (interspecific hybrid) เพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม จาก ๒x เป็น ๔x เป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยแก้ไขปัญหาค้นหาต้นลูกผสมที่เป็นหมันกลับคืนความสมบูรณ์พันธุ์และสามารถนำลูกผสมนั้นๆ มาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์เพื่อสร้างลูกผสมในขั้นต่อไปได้ โดยการผสมข้ามระหว่างต้นดิพลอยด์ (๒x) ที่เป็นหมันกับปทุมมาซึ่งเป็นพ่อแม่ของต้นดิพลอยด์ พบว่าผสมไม่ติด ไม่สามารถสร้างเมล็ดลูกผสมได้ ในขณะที่การผสมระหว่างต้นเตตราพลอยด์ (๔x) กับปทุมมาต้นพ่อแม่ พบการผสมติดสูงถึง ๓๓.๓-๗๕.๐ เปอร์เซ็นต์

การทดลองย่อยที่ ๓ ศึกษาการช่วยชีวิตเอ็มบริโอ (Embryo rescue)

ในลูกผสมข้ามชนิดที่สามารถติดเมล็ดได้ในระยะแรกของการผสมเกสรแต่เมล็ดอ่อนแอและฝ่อตายในที่สุด ไม่สามารถอยู่รอดได้จนถึงเมล็ดสุกแก่ตามธรรมชาติได้ การช่วยชีวิตโดยการแยกเอ็มบริโอที่อายุผล ๒๑ และ ๒๘ วัน มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสม สามารถช่วยชีวิตเอ็มบริโอให้มีชีวิตอยู่รอดจนพัฒนาเป็นต้น มียอดและรากสมบูรณ์ได้ในระดับหนึ่ง แต่ถ้าผลมีอายุอ่อน ๑-๒ สัปดาห์หลังการผสมเกสร การพัฒนาของเอ็มบริโอยังไม่สมบูรณ์ การช่วยชีวิตยังไม่ประสบผลสำเร็จ ส่วนใหญ่มีการพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อแคลลัสโดยไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ จำเป็นต้องพัฒนาเทคนิคและสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับช่วยชีวิตเมล็ดอ่อนต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- ณรงค์ โฉมเฉลา และอุทัย จารณศรี. ๒๕๑๙. บทบาทของ Amphidiploid ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้. วิทยาสารสโมสรกล้วยไม้บางเขน ๔ : ๑๘๑-๑๙๕.
- นิพัทธ์ สุขวัญกุล, วิภาดา ทองทักษิณ และสุบิน ไม้ดัดจันทร์. ๒๕๓๓. การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของลูกผสมกระเจียวโดยใช้สารโคลชิซิน ๙ หน้า ใน: รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร.
- วิภาดา ทองทักษิณ. ๒๕๔๓. การปรับปรุงพันธุ์ปทุมมา. ใน: ไม้ตัดดอกเศรษฐกิจและการปรับปรุงพันธุ์. หน้า ๗๙-๘๔. เอกสารวิชาการที่ ๒๔ สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร
- อุบลวรรณ รัตนทิพยาภรณ์ และธนะชัย พันธุ์เกษมสุข. ๒๕๕๕. ผลของสารคล้ายบราสซิโนต่อคุณภาพผลของลำไยพันธุ์ดอ. วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร ๒๙(๒) : ๘-๑๔

เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี, ัญญะ เตชะศิลป์พัฒน์ และธรรร ที่รฐิติ. ๒๕๕๑. การปรับปรุงพันธุ์ของพืชในสกุล *Curcuma* และพืชสกุลใกล้เคียง. ในเอกสารการประชุมเรื่อง การพัฒนาศักยภาพการผลิตไม้ดอกไม้ประดับไทยเพื่อการส่งออก: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. วันที่ ๑๕ กรกฎาคม ๒๕๕๑ โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ

[http:// www.hos.ufl.edu/mooreweb/Tissue](http://www.hos.ufl.edu/mooreweb/Tissue) Culture