การแก้ไขปัญหาความเป็นหมันของลูกผสมปทุมมาข้ามชนิดชั่วแรก

สุธามาศ ณ น่าน[1/] สุปัน ไม้ดัดจันทร์[1/]
นิพัฒน์ สุขวิบูลย์[2/] วิภาดา ทองทักษิณ

บทคัดย่อ

อุปสรรคสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ปทุมมา คือ ลูกผสมข้ามชนิด ข้ามสกุล มักเป็นหมันผสมไม่ติด ไม่สามารถใช้เป็นพ่อ-แม่ เพื่อปรับปรุงพันธุ์ในชั้นต่อไปได้ หรือผสมติดแต่เอ็มบริโออ่อนแอไม่พัฒนา การวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาพัฒนาเทคนิคต่างๆ เพื่อแก้ไขปัญหาอุปสรรคในการผสมข้ามของพืชสกุลนี้ ดำเนินการตั้งแต่ปี 2554-2556 แบ่งออกเป็น 3 การทดลองย่อย คือ 1. การใช้สารเสริมการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มความสมบูรณ์พันธุ์ พบว่า ความสำเร็จของการใช้สารเสริมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสมที่เป็นหมันขึ้นอยู่กับระดับความรุนแรงของการเป็นหมันของลูกผสมนั้นๆ สาร Brasinolide 4,000 ppm จัดเป็นสารเสริมการเจริญเติบโตที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการนำมาฉีดพ่นต้นลูกผสมที่เป็นหมันให้กลับคืนความสมบูรณ์พันธุ์ได้ พบการผสมติด 6.3-28.6 เปอร์เซ็นต์ 2. การเพิ่มชุดโครโมโซมเพื่อแก้ความเป็นหมัน พบว่าต้นดิพพลอยด์ (2x) ซึ่งเป็นลูกผสมข้ามชนิดที่เป็นหมัน ไม่สามารถติดเมล็ดได้ แต่สำหรับต้นที่มีการเพิ่มชุดโครโมโซมเป็น 4x หรือต้นเตตราพลอยด์ เมื่อนำมาผสมกับปทุมมาต้นพ่อแม่ พบการผสมติดสูงถึง 33.3-75.0 เปอร์เซ็นต์ 3. การช่วยชีวิตเอ็มบริโอ พบว่าการแยกเอ็มบริโอออกจากเมล็ดที่มีอายุผล 21 และ 28 วัน มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ สูตร MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถช่วยชีวิตเอ็มบริโอให้อยู่รอดจนพัฒนาเป็นต้นมียอดและรากสมบูรณ์ได้ในระดับหนึ่ง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอจากผลอ่อนอายุ 7-14 วัน ยังไม่ประสบผลสำเร็จ

ABSTRACT

Three experiments to overcome sterility in *Curcuma* interspecific hybrids were undertaken in 2011 to 2013. First, the study of plant growth substances on fertility of *Curcuma* sterile hybrids revealed that Brasinolide 4,000 ppm is the most effective hormone that could increase percentages of fruit set by 6.3-28.6% but no fruit set from control. Second, the hypothesis that an increase in chromosome number could overcome sterility of interspecific diploid hybrids was tested. Cross fertilization were performed on diploid plant(2x) which is sterile hybrid x parent plant (Patumma variety) and tetraploid plants(4x) from chromosome doubling x parent plant. The test crosses showed that between diploid plant(2x) x Patumma, the fertilization was failed. When the tetraploids were crossed with

---

รหัสการทดลอง 01 32 54 01 02 00 01 54

[1/] ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ต.รอบเวียง อ.เมือง จ.เชียงราย 57000 โทร.053-170-100

[2/] สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 ต. หนองหาร อ. สันทราย จ. เชียงใหม่ 50290

[3/] สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

Patumma, the fertilization success rate was high (33.3-75.0%). Third, the study on embryo rescue of inter-specific sterile hybrids found that 21 and 28 days old embryo cultured on MS medium containing 2 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA could regenerate into normal plantlets. However, the rescue of young embryos less than 14 days old was not successful, mostly only callus formation without shoot regeneration.

คำนำ

การปรับปรุงพันธุ์พืชสกุล *Curcuma* ทั้งในกลุ่มปทุมมาและกระเจียว เพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีลักษณะที่พึงประสงค์ มีความใหม่และหลากหลาย มักประสบผลสำเร็จจากการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ต่างๆ ในชนิดเดียวกัน หรือการผสมข้ามระหว่างชนิดที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน (วิภาดา, 2543) ทั้งนี้จากการศึกษาการผสมข้ามชนิดและข้ามกลุ่มย่อยนั้นสามารถทำให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะแปลกใหม่ มีการกระจายตัวของลักษณะต่างๆ ที่มากกว่าการผสมในชนิดเดียวกัน แต่มักประสบปัญหาที่ทำให้การผสมข้ามสายพันธุ์ไม่ประสบผลสำเร็จจากสาเหตุต่างๆ ทั้งในช่วง Pre- และ Post-fertilization เช่น ผสมไม่ติดจากพื้นฐานโครโมโซมที่แตกต่างกัน หรือมีอัตราการผสมติดต่ำ มีการบวมของรังไข่ แต่รังไข่จะหยุดพัฒนาหลังจากการผสมเกสร 2 สัปดาห์ ทำให้ผลและเมล็ดฝ่อไปในที่สุด บางคู่ได้เมล็ดลูกผสม แต่เมล็ดไม่งอก หรืองอกช้าจากปัญหาการพักตัวของเมล็ดที่ยาวนานข้ามปี แต่ปัญหาที่สำคัญที่สุดซึ่งเป็นอุปสรรคที่ทำให้การพัฒนาพันธุ์ปทุมมา/กระเจียว ถึงทางตัน คือต้นลูกผสมข้ามชนิดข้ามสกุลชั่วที่ 1 เป็นหมัน ไม่สามารถใช้เป็นพ่อ-แม่พันธุ์ เพื่อสร้างลูกผสมในชั่วต่อๆ ไปได้

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

วิธีการดำเนินการ

การทดลองย่อยที่ 1 การใช้สารเสริมการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มความสมบูรณ์พันธุ์

อุปกรณ์ 1. ปทุมมาลูกผสมชั่วที่ 1 3 พันธุ์ คือ F_1 (AP x PP) , F_1 (TH x PP) และ F_1 (AP x BL) และต้นพ่อแม่ 3 พันธุ์ คือ ปทุมมาเชียงใหม่ บัวขาว และบัวลายลาว

2. สารเสริมการเจริญเติบโต 5 ชนิด คือ Brasinolide, Amino acid (น้ำ), Amino acid (ผง), NAA และ O_2 flavonin

3. อุปกรณ์ในการผสมเกสร ได้แก่ ปากคีบ แอลกอฮอล์70% สำลี ป้าย ดินสอ ถุงตาข่าย

วิธีการ 1. ปลูกปทุมมาลูกผสมชั่วที่ 1 ที่เกสรเพศผู้เป็นหมัน 3 พันธุ์ และต้นพ่อ-แม่ 3 พันธุ์

2. เมื่อพืชทดลองอยู่ในช่วงการเจริญเติบโต เริ่มแทงช่อดอก พ่นสารเสริมการเจริญเติบโต ทั้งต้นพ่อและต้นแม่ที่จะใช้ผสม โดยสารเสริมการเจริญเติบโตที่ใช้ได้แก่ Brasinolide 4,000 ppm, NAA 0.2 g/L, O_2 flavonin 0.05 cc/L, Amino acid น้ำ 20 cc/20 L และ Amino acid ผง 7 g/L โดยมีกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่าเป็น control วิธีการพ่นเช่นเดียวกับการให้ปุ๋ยทางใบโดยพ่นทั่วทั้งต้น โดยเฉพาะส่วนของช่อดอกในแอ่งกลีบประดับส่วนล่างที่มีช่อดอกจริงอยู่ โดยฉีด

ในช่วงเช้า ตั้งแต่ต้นปทุมมาเริ่มแทงช่อดอกทั้งต้นพ่อและต้นแม่และฉีดซ้ำทุกวันเว้นวัน จนกระทั่งเก็บเกี่ยวผล

3. ทำการผสมเกสรต้นทดลองระหว่างปทุมมาลูกผสมชั่วที่ 1 และต้นพ่อพันธุ์ ประเมินเปอร์เซ็นต์การผสมติด พัฒนาการของผล และจำนวนเมล็ดสมบูรณ์ต่อผล

การทดลองย่อยที่ 2 การเพิ่มชุดโครโมโซมเพื่อแก้ความเป็นหมันของปทุมมาลูกผสมชั่วที่ 1

อุปกรณ์ 1. ปทุมมาลูกผสมชั่วที่ 1 3 พันธุ์ 2. สารโคลชิซิน 3. สารเคมีและอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

วิธีการ 1. เตรียมเนื้อเยื่อปทุมมาปลอดโรค สายพันธุ์ปทุมมาลูกผสมที่ใช้คือ ปทุมมา x บัวลายลาว, ปทุมมา x บัวขาว และปทุมมา x ปทุมรัตน์ นำ apical meristem เข้าเพาะเลี้ยงเพื่อสร้าง adventitious bud และชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากในสภาพปลอดเชื้อ

2. ชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซม โดยการใช้สารโคลชิซิน โดยตัดแยกชิ้นส่วนหน่ออ่อนใส่ขวดๆละ 5 ยอด แช่ชิ้นส่วนในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 1,000 และ 2,000 ppm เป็นเวลา 2 และ 4 วัน (นิพัฒน์และคณะ 2553)

3. เพิ่มจำนวนต้นพันธุ์ที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซิน เพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 3 เดือน

4. นำต้นเนื้อเยื่อออกเพาะเลี้ยงในโรงเรือนอนุบาล ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ที่เปลี่ยนแปลง คัดเลือกต้นที่มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาอย่างเด่นชัดเปรียบเทียบกับต้นปกติมาตรวจนับจำนวนโครโมโซม โดยวิธี Flow Cytometry

5. ทดสอบการผสมพันธุ์ต้นที่มีการเพิ่มชุดโครโมโซม เพื่อยืนยันความสามารถในการใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการสร้างลูกผสมในรุ่นต่อไป

<u>หมายเหตุ</u> เนื่องจากการเกิดมหาอุทกภัยน้ำท่วมใหญ่ในช่วงปลายปี 2554 ถึงต้นปี 2555 ห้องปฏิบัติการทดลองและอาคารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของสถาบันวิจัยพืชสวนได้รับความเสียหายจากน้ำท่วมขัง การทดลองและต้นทดลองซึ่งดำเนินการมาถึงขั้นตอนที่ 3 ถูกน้ำท่วมหมด การฟื้นฟูห้องปฏิบัติการให้กลับมาใช้งาน ใช้เวลานานราวกลางปี 2555 รวมทั้งเครื่องมือตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ก็เสียหายใช้การไม่ได้ จึงจำเป็นต้องยุติการทดลองนี้ แต่ได้ปรับเปลี่ยนวิธีดำเนินงานวิจัยใหม่ดังนี้คือ

นำต้นลูกผสมจากงานทดลองของนิพัฒน์และคณะ (2553) ซึ่งเป็นต้นลูกผสมข้ามชนิดระหว่างปทุมมา (*Curcuma alismatifolia*) x บัวลายลาว(*C. rhabdota*) ที่มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซม โดยใช้สารโคลชิซินและมีการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการตรวจปริมาณ DNA ว่าเป็นต้นเตตราพลอยด์จำนวน 3 ต้น คือต้นเตตราพลอยด์เบอร์ 3 เบอร์ 7 และเบอร์ 9 มาทดสอบความสมบูรณ์พันธุ์ว่าจะสามารถใช้เป็นพ่อหรือแม่พันธุ์ในการสร้างลูกผสมชั่วที่ 2 ต่อไปได้หรือไม่ โดยการผสมกลับกับต้นพ่อ-แม่ และประเมินเปอร์เซ็นต์การผสมติดจากจำนวนดอกที่ผสมทั้งหมด

การทดลองย่อยที่ 3 ศึกษาการช่วยชีวิตเอ็มบริโอ (Embryo rescue)

อุปกรณ์ 1. ปทุมมาลูกผสมข้ามชนิด 1 คู่ผสม ระหว่างปทุมมา (*C. alismatifolia*) x บัวลายลาว (*C. rhabdota*) และปทุมมาลูกผสมชั่วที่ 1 ที่เป็นหมัน x พ่อแม่ชนิดแท้ 3 คู่ผสม คือ F_1 x ปทุมมา, F_1 x บัวขาว และ F_1 x ปทุมรัตน์

2. ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: อุปกรณ์เตรียมอาหาร เครื่องมือผ่าตัด กล้องจุลทรรศน์ สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ และสารเคมีที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3. รังไข่ (ovary) ภายหลังที่ได้รับการผสม

วิธีการ 3.1 การศึกษาการพัฒนาของผล เมล็ด และเอ็มบริโอหรือคัพภะของคู่ผสมปทุมมาxบัวลายลาว

ทำการผสมเกสรระหว่างคู่ผสมปทุมมา x บัวลายลาว นำผลที่มีอายุ 7, 14, 21 และ28 วัน ภายหลังการผสมเกสร มาทำการช่วยชีวิตคัพภะ โดยนำรังไข่แต่ละระยะมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร๊อกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำรังไข่มาผ่า เพื่อนำเมล็ดที่อยู่ภายในมาแกะเอาเอ็มบริโอออกมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (เฉลิมศรีและคณะ, 2551) บันทึกพัฒนาการของเอ็มบริโอภายหลังการเพาะเลี้ยง เปอร์เซ็นต์เอ็มบริโอที่ตาย (เอ็มบริโอเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล) เปอร์เซ็นต์เอ็มบริโอที่พัฒนาเป็นต้น และเอ็มบริโอที่ไม่พัฒนา

3.2 การศึกษาการช่วยชีวิตเอ็มบริโอ (embryo rescue) ในคู่ผสมปทุมมาลูกผสมชั่วที่1 x พ่อแม่พันธุ์

ทำการผสมเกสรระหว่างคู่ผสมปทุมมาลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ที่มีระดับความเป็นหมันของเกสรเพศผู้และพ่อแม่พันธุ์ 3 คู่ผสม คือ F_1(AL x BL) x ปทุมมา, F_1(LPS x PP) x บัวขาว และ F_1(ALxPP)xปทุมรัตน์ นำผลอ่อนอายุที่เหมาะสมในการช่วยชีวิตที่ได้ผลจากการทดลองที่ 3.1 มาทำการแยกเอาเอ็มบริโอออกและเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.1 ประเมินผลการช่วยชีวิตลูกผสม

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา 3 ปี (2554 – 2556)

สถานที่ดำเนินการ 1. ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย
2. สถาบันวิจัยพืชสวน

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองย่อยที่ 1 การใช้สารเสริมการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มความสมบูรณ์พันธุ์

ผลการทดลองการใช้สารเคมี/ฮอร์โมน เพื่อเพิ่มความสมบูรณ์ของเซลล์สืบพันธุ์ พบว่า ระดับความสำเร็จของการใช้สารเสริมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสมข้ามชนิดที่จะสามารถนำมาใช้เป็นต้นพ่อแม่เพื่อใช้ผลิตลูกผสมในรุ่นต่อไปได้นั้นขึ้นอยู่กับระดับความรุนแรงของการเป็นหมันของพันธุ์ลูกผสมนั้นๆ ในคู่ผสมปกติ ไม่เป็นหมัน จะพบละอองเรณูสีขาวนวลเต็มอับเรณู แต่บางคู่ผสมที่เป็นหมันจะผลิตละอองเรณูเพียงเล็กน้อย หรือบางคู่ผสมจะไม่มีละอองเรณูเลย (ภาพที่ 1) ในลูกผสม F_1(APxBL) x บัวลายลาว ซึ่งมีระดับความเป็นหมันไม่รุนแรงประเมินจากต้นลูกผสมผลิตละอองเรณูบ้าง แต่มีจำนวนน้อยประมาณ 10-20% การพ่น Brasinolide 4,000 ppm, O_2 Flavonin 0.05cc/L, NAA 0.2 g/L หรือ Amino acid น้ำ 20cc/20L อย่างใดอย่างหนึ่ง สามารถเพิ่มโอกาสในการติดผลและเมล็ดได้ 28.6 25.0 12.5 และ12.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 1) แต่ในลูกผสมอีก 2 คู่ คือ F_1(APxPP) x ปทุมมา และ F_1(THxPP) x บัวขาว ที่มีระดับความเป็นหมันรุนแรง (ต้นลูกผสมผลิตละอองเรณูน้อยมาก < 5%) มีสารเสริมการเจริญเติบโตเพียงชนิดเดียวคือ Brasinolide 4,000 ppm ที่ใช้ได้ผลโดยมีเปอร์เซ็นต์การติดผล 6.3 เปอร์เซ็นต์ ในคู่ผสม F_1(THxPP) x บัวขาว และ 20.0 เปอร์เซ็นต์ ในคู่ผสม F_1(APxPP) x ปทุมมา ซึ่งบราสิโนลายด์ (Brasinolide) เป็นกลุ่มสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มใหม่ที่สกัดมาจากละอองเรณูของ rape พืชสกุล Brassica สารสกัดที่ได้มีชื่อว่าบราสซิน (brassin) ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชที่มีส่วนสำคัญในการส่งสัญญาณเพื่อให้พืชเจริญเติบโตเป็นไปอย่างปกติ (อุบลวรรณ และธนะชัย, 2555) แม้ว่าบทบาทที่ชัดเจนของฮอร์โมนชนิดนี้ต่อฟังก์ชั่นในละอองเรณูพืชยังไม่ระบุ

ชัด แต่น่าจะมีส่วนสำคัญต่อความสมบูรณ์แข็งแรงของละอองเรณูเพราะเป็นสารสำคัญที่สกัดมาจากละอองเรณูของเรพซีด มีรายงานการใช้บราสิโนลายด์ในการฉีดพ่นไม้ผลในช่วงก่อนการออกดอก สามารถป้องกันการพักตัวของดอก ลดการเป็นหมันของดอกและการร่วงของผล กระตุ้นการเจริญเติบโตของผล และปรับปรุงลักษณะผิดปกติของผล (http://www.hos.ufl.edu/mooreweb/tissue Culture)

เกสรเพศผู้ปกติ

เกสรเพศผู้เป็นหมัน

ภาพที่ 1 ละอองเรณูของต้นปกติเปรียบเทียบกับต้นที่เป็นหมัน (male sterile)

ตารางที่ 1 การใช้สารเสริมการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มโอกาสในการติดเมล็ดของปทุมมาลูกผสมชั่วที่ 1

คู่ผสม	ชนิดสาร	จำนวนดอกที่ผสม	จำนวนฝักที่ติด	เปอร์เซ็นต์การผสมติด
F_1 (APxPP) xปทุมมา	Brasinolide 4,000 ppm	10	2	20.0
	NAA 0.2 g/L	7	0	0
	O_2 Flvonin 0.05 cc/L	2	0	0
	Amino acid น้ำ 20cc/20L	8	0	0
	Amino acid ผง 7 g/L	10	0	0
	Control	3	0	0
F_1 (THxPP) x บัวขาว	Brasinolide 4,000 ppm	16	1	6.3
	NAA 0.2 g/L	10	0	0
	O_2 Flvonin 0.05 cc/L	9	0	0
	Amino acid น้ำ 20cc/20L	14	0	0
	Amino acid ผง 7 g/L	6	0	0
	Control	3	0	0
F_1 (APxBL) x บัวลายลาว	Brasinolide 4,000 ppm	7	2	28.6
	NAA 0.2 g/L	8	1	12.5
	O_2 Flvonin 0.05 cc/L	4	1	25.0
	Amino acid น้ำ 20cc/20L	16	2	12.5
	Amino acid ผง 7 g/L	5	0	0
	Control	8	0	0

การทดลองย่อยที่ 2 การเพิ่มชุดโครโมโซมเพื่อแก้ความเป็นหมันของปทุมมาลูกผสมชั่วที่ 1

ในการผสมข้ามชนิด (interspecific hybrid) ลูกผสมที่เกิดขึ้นซึ่งเป็น diploid hybrid มักจะเป็นหมัน เนื่องจากยีโนม (genome) ทั้งสองมีความแตกต่างกันจะมากหรือน้อยแล้วแต่ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดทั้งสอง การเพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นเป็นสองเท่า จะทำให้เกิดเป็นสี่ยีโนม ดังนั้นจากสองยีโนมที่ต่างกันอยู่เดิมจึงมีคู่จับที่เหมือนกันเรียกว่า allotetraploid หรือมีชื่อเรียกอีกอย่างว่า amphidiploid ซึ่งพืช amphidiploid นี้จะมีพฤติกรรมในเรื่องการสืบพันธุ์เช่นเดียวกับ diploid ทั้งนี้เพราะโครโมโซมทุกตัวมีคู่จับ ทำให้เซลล์สืบพันธุ์ทุกเซลล์ทำหน้าที่ในการผสมพันธุ์ได้ตามปกติ จึงไม่เป็นหมัน (ณรงค์และอุทัย, 2519)

จากการเปรียบเทียบลักษณะของต้นดิพพลอยด์ (2x) และต้นเตตราพลอยด์ (4x) พบว่า ต้นเตตราพลอยด์มีลักษณะของส่วนต่างๆ ที่ใหญ่โตขึ้นกว่าต้นดิพพลอยด์ ทั้งความสูงต้น ขนาดใบ ความหนาใบ ขนาดช่อดอกและขนาดก้านช่อดอกที่ใหญ่กว่าเดิม และมีสีของดอกที่มีความเข้มขึ้นกว่าต้นเดิม (ภาพที่ 2)

จากการทดสอบการผสมข้ามระหว่างต้นดิพพลอยด์ ซึ่งเป็นลูกผสมข้ามชนิดชั่วที่ 1 ของปทุมมาxบัวลายลาว ซึ่งเป็นหมันกับปทุมมาต้นพ่อแม่ พบว่าการผสมไม่ประสบผลสำเร็จ (ตารางที่ 2) แต่สำหรับต้นเตตราพลอยด์ ทั้ง 3 เบอร์ เมื่อทำการผสมข้ามกับต้นพ่อ-แม่ปทุมมา พบการผสมติดสูงถึง 33.3-75.0 เปอร์เซ็นต์ โดยต้นเตตราพลอยด์เบอร์ 7 มีความสมบูรณ์พันธุ์กลับคืนมาสูงที่สุด 50.0-75.0 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือเบอร์ 3 ผสมติด 33.3-58.3 เปอร์เซ็นต์ และเบอร์ 9 ผสมติด 33.3-48.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ภาพที่ 2 ลักษณะช่อดอกของปทุมมาลูกผสมต้นแอมฟิดิพพลอยด์หรือเตตราพลอยด์ (4x) และต้นดิพพลอยด์ (2x)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การติดผลของต้นเตตราพลอยด์ เปรียบเทียบกับต้นดิพพลอยด์

คู่ผสม	จำนวนดอกที่ผสม	จำนวนผลที่ติด	เปอร์เซ็นต์การติดผล
การทดลอง ปี 2555			
F_1 เตตราพลอยด์#3 x ปทุมมา	12	7	58.3
F_1 เตตราพลอยด์#7 x ปทุมมา	24	18	75.0
F_1 เตตราพลอยด์#9 x ปทุมมา	47	23	48.9
F_1 ดิพพลอยด์ x ปทุมมา	20	0	0
การทดลองปี 2556			
F_1 เตตราพลอยด์#3 x ปทุมมา	6	2	33.3
F_1 เตตราพลอยด์#7 x ปทุมมา	6	3	50.0
F_1 เตตราพลอยด์#9 x ปทุมมา	9	3	33.3
F_1 ดิพพลอยด์ x ปทุมมา	9	0	0

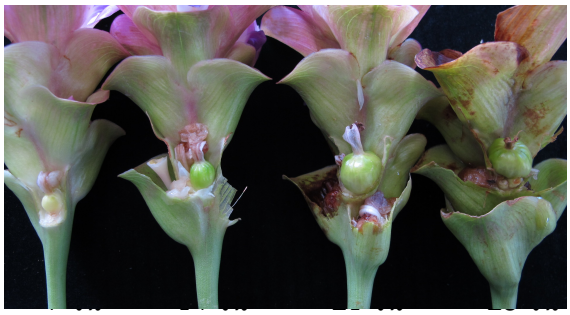
การทดลองย่อยที่ 3 ศึกษาการช่วยชีวิตเอ็มบริโอหรือคัพภะ (Embryo rescue)

ในลูกผสมข้ามชนิดที่สามารถติดเมล็ดได้ในระยะแรกของการผสมเกสร แต่เมล็ดอ่อนแอและฝ่อตายไปในที่สุด ไม่สามารถอยู่รอดได้จนถึงเมล็ดสุกแก่ตามสภาพธรรมชาติได้ การแยกเอ็มบริโอออกมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสม สามารถแก้ปัญหาเอ็มบริโอไม่พัฒนาหรือพัฒนาแต่อ่อนแอได้ในระดับหนึ่ง ผลการทดลองมีดังนี้

3.1. การศึกษาการพัฒนาของผล เมล็ด และเอ็มบริโอ (คัพภะ) ของคู่ผสมปทุมมา x บัวลายลาว พบว่าหลังการผสมเกสร 7-14 วัน เมล็ดอ่อนยังมีขนาดเล็กมาก มีลักษณะใสและนิ่มมาก เมื่อผ่าเมล็ดภายใต้กล้อง พบว่าที่ระยะเวลา 7 วัน หลังการผสมเกสรภายในเมล็ดมีของเหลวใสยังไม่พบเอ็มบริโอ ส่วนเมล็ดอ่อนอายุ 14 วัน เอ็มบริโอมีการยืดตัวแต่ยังมีขนาดเล็กมาก มีลักษณะนิ่มและเป็นเส้นบางๆ ยังไม่สามารถแยกเอ็มบริโอออกจากเมล็ดได้ เมื่อเมล็ดมีอายุ 21 วัน เมล็ดมีความแข็งมากขึ้น มีการพัฒนาของเอ็นโดสเปิร์มภายในเมล็ด เมื่อผ่าเมล็ดพบเอ็มบริโอที่มีการขยายขนาดขึ้น แต่มีขนาดไม่ใหญ่มากนัก ขนาดคัพภะประมาณ 0.5 มิลลิเมตร สามารถแยกเอ็มบริโอออกจากเมล็ดได้ง่าย และเมื่อเมล็ดอายุ 28 วัน หลังผสมเกสร เมล็ดจะมีลักษณะคล้ายเมล็ดองุ่นเปลือกและเนื้อเมล็ดแข็งขึ้นและผิวเมล็ดเป็นมัน การผ่าเมล็ดเริ่มทำได้ยากขึ้น แต่เมื่อผ่าเมล็ดออกพบเอ็มบริโอมีขนาดใหญ่กว่าเมล็ดอายุ 21 วัน โดยมีขนาดคัพภะประมาณ 1 มิลลิเมตร และสามารถแยกเอ็มบริโอออกจากเมล็ดได้ง่าย (ภาพที่ 3-5) โดยคู่ผสมปทุมมา x บัวลายลาวนี้จะมีอายุผลสุกแก่ตามธรรมชาติ ประมาณ 35-40 วัน และเมล็ดหลังอายุ 30 วัน จะไม่สามารถแยกเอ็มบริโอออกจากเมล็ดได้ เพราะเมล็ดมีความแข็งมาก เปลือกเมล็ดหนาเป็นมัน ผิวลื่น ไม่สามารถผ่าเมล็ดได้

จากนั้นศึกษาการเพาะเมล็ดอ่อนและเอ็มบริโอ บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากอายุผล 7 วัน และ 14 วันหลังการผสมพันธุ์ เมล็ดยังมีลักษณะอ่อนนิ่ม ภายในใสเป็นวุ้น เอ็มบริโอมีลักษณะนิ่มเป็นเส้นบางๆ ไม่สามารถแยกเอ็มบริโอออกจากเมล็ดได้ จึงทำการผ่าเมล็ดและนำเมล็ดอ่อนที่มีเอ็มบริโออยู่ภายในไปวางบนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเพื่อดูพัฒนาการของชิ้นส่วน ในขณะที่เมล็ดอายุ 21 และ 28 วัน สามารถแยกเอ็มบริโอออกจากเมล็ดมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นได้ ผลการช่วยชีวิตเอ็มบริโอ พบว่าเมื่อนำเมล็ดอ่อนอายุผล 7 วัน และ 14 วัน มาเพาะเลี้ยงใช้เวลาเพาะ 6 เดือน ไม่พบการพัฒนาของเนื้อเยื่อและเมล็ดเปลี่ยนเป็นสีดำตายในที่สุด ส่วนอายุผล 21 วัน แยกเอ็มบริโอขนาด 0.5 มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน พบ 70% เนื้อเยื่อเอ็มบริโอเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่น ไม่ตายแต่ไม่มีการพัฒนา ส่วน

ที่เหลืออีก 30% เอ็มบริโอพัฒนาเป็นแคลลัสสีขาวเป็นส่วนใหญ่ ต่อมามีแคลลัสสีเขียวขึ้นปะปน ไม่มีการพัฒนาเป็นต้นเลย และเมื่อนำอายุผล 28 วัน มาแยกเอ็มบริโอจากเมล็ด เอ็มบริโอมีขนาดใหญ่ขึ้นประมาณ 1 มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหาร 6 เดือน พบพัฒนาการของเอ็มบริโอในหลายรูปแบบ (ตารางที่ 3, ภาพที่ 6) ส่วนใหญ่มีการพัฒนาเป็นแคลลัส มีเพียง 1.8% เท่านั้นที่เอ็มบริโอพัฒนาไปเป็นต้นที่มียอดและรากสมบูรณ์ 1 ต้น/1 เอ็มบริโอ โดยไม่พบเนื้อเยื่อแคลลัส และ 12.3% เกิดเป็นกลุ่มยอด (multiple shoot) ซึ่งต่อมาพัฒนาเป็นต้น จำนวน 5-6 ต้น/1 ชิ้นส่วนเอ็มบริโอ เมื่อ subculture กลุ่มยอดออกเป็นต้นเดี่ยวๆ และย้ายลงสูตรอาหารใหม่ สามารถพัฒนาเป็นต้นและออกรากสมบูรณ์ ซึ่งได้ย้ายต้นเหล่านี้ออกปลูกเพื่อประเมินว่าต้นลูกผสมที่ได้เป็นต้นที่ได้จากการผสมพันธุ์ที่เกิดจากเอ็มบริโอโดยตรงหรือเกิดมาจากเนื้อเยื่อส่วนอื่น



ภาพที่ 3 ผลลูกผสมปทุมมาอายุ 7 14 21 และ 28 วัน หลังการผสมเกสร

อายุ 7 วัน

อายุ 14 วัน

อายุ 21 วัน

อายุ 28 วัน

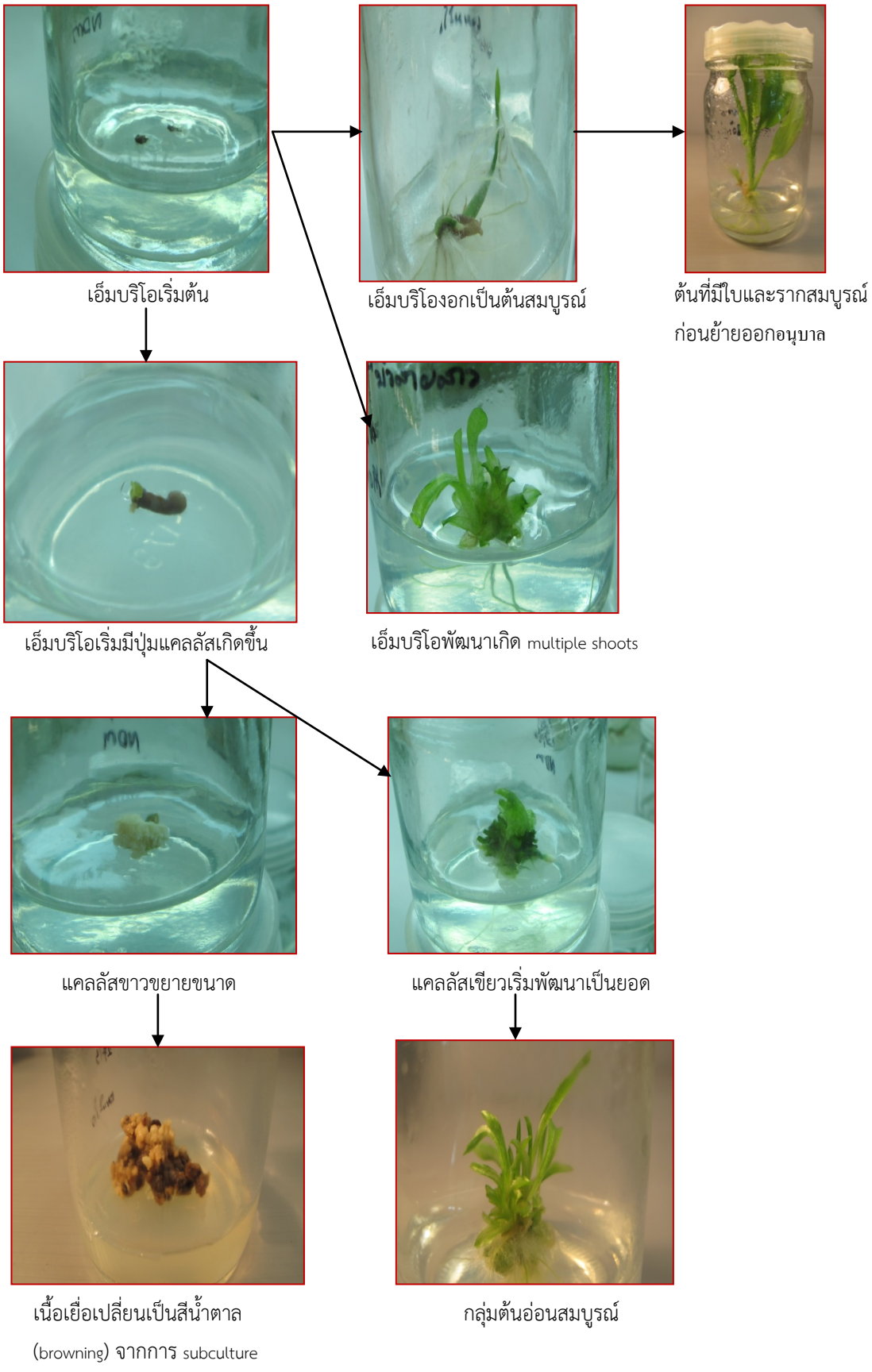
ภาพที่ 4 ผลและเมล็ดปทุมมาอายุ 7 14 21 และ 28 วัน

ผ่าเมล็ดอายุ 7 วัน 14 วัน 21 วัน 28 วัน เอ็มบริโออายุ 28 วัน

ภาพที่ 5 การพัฒนาของเอ็มบริโอของเมล็ดอายุต่างๆ กัน

ตารางที่ 3 พัฒนาการของเอ็มบริโอคู่ผสมปทุมมา x บัวลายลาว จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอในช่วงอายุผลต่างๆ กันของเมล็ดลูกผสม

ชิ้นส่วน	อายุผล (วัน)	วันที่เพาะ	วันที่เช็คผล	พัฒนาการของเมล็ดอ่อน/เอ็มบริโอ
เมล็ดอ่อน	7	ต.ค.55	มี.ค.56	ไม่มีการพัฒนาของเนื้อเยื่อ เมล็ดเปลี่ยนเป็นสีดำ
เมล็ดอ่อน	14	ต.ค.55	มี.ค.56	ไม่มีการพัฒนาของเนื้อเยื่อ เมล็ดเปลี่ยนเป็นสีดำ
เอ็มบริโอ	21	ต.ค.55	มี.ค.56	70.0 % ไม่มีการพัฒนา 30.0 % เนื้อเยื่อพัฒนาเป็นกลุ่มแคลลัสสีขาว
เอ็มบริโอ	28	ต.ค.55	มี.ค.56	15.8% ไม่มีการพัฒนา 62.2% เกิดกลุ่มแคลลัสขาว 7.8% เกิดกลุ่มแคลลัสสีเขียวและเริ่มพัฒนาเป็นต้น 12.3% เกิด adventitious bud และพัฒนาเป็นต้น 5-6 ต้น/1 เอ็มบริโอ 1.8% เอ็มบริโองอกเป็นต้นสมบูรณ์ โดยไม่พบเนื้อเยื่อแคลลัส



ภาพที่ 6 การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอที่อายุผล 28 วัน และพัฒนาการต่างๆของเนื้อเยื่อ

3.2 การศึกษาการช่วยชีวิตเอ็มบริโอ (embryo rescue) ในคู่ผสม F1 x พันธุ์พ่อแม่

จากการทดลองใช้ลูกผสมข้ามชนิดรุ่นที่ 1 ที่มีระดับความเป็นหมันของเกสรเพศผู้ มาผสมพันธุ์ชั้นที่ 2 กับต้นพ่อแม่ 3 คู่ผสม พบว่าทั้ง 3 คู่ สามารถผสมติดได้โดยรังไข่จะบวมโตขึ้นหลังจากได้รับการ fertilization แต่หลังจาก 2 สัปดาห์หลังการผสม รังไข่จะเริ่มเหลือง ฝ่อ และตายไปในที่สุด ยกเว้นคู่ผสม F_1 x บัวขาว ซึ่งมีบางชุดที่รังไข่พัฒนาได้เกิน 3 สัปดาห์ ทำการช่วยชีวิตเมล็ดลูกผสมโดยการแยกออกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ โดยชุดที่มีอายุผลที่พัฒนาได้เพียง 14 วัน ไม่สามารถแยกเอ็มบริโอออกจากเมล็ดได้ จึงต้องเพาะเมล็ดอ่อนโดยการผ่าเมล็ดเพื่อเปิดให้เอ็มบริโอสัมผัสอาหาร ส่วนชุด F_1 x บัวขาว ที่สามารถเก็บเกี่ยวผลที่อายุ 21 วัน สามารถแยกเอ็มบริโอออกมาเลี้ยงได้ จากการทดลองพบว่า การช่วยชีวิตลูกผสมปทุมมาซึ่งยังไม่พัฒนาเต็มที่ จะประสบผลสำเร็จแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของลูกผสม และอายุและความแข็งแรงของเอ็มบริโอที่ได้จากการผสมพันธุ์ (ตารางที่ 4) โดยคู่ผสมระหว่าง F_1 x บัวขาว เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอที่อายุ 21 วัน เอ็มบริโอสามารถเกิดเป็นต้นได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเพาะเมล็ดอ่อนอายุ 14 วัน ในทุกคู่ผสมยังไม่ประสบผลสำเร็จในการช่วยชีวิตเท่าที่ควร ส่วนใหญ่ชิ้นส่วนไม่พัฒนา มีบางส่วนที่มีการพัฒนาเป็นแคลลัสสีขาว และมีเพียงคู่ผสม F_1 x ปทุมรัตน์ ที่มีชิ้นส่วนเพียง 2.9% พัฒนาเป็นยอดสีเขียว ซึ่งจากการทดลองที่ 3.1 และ 3.2 จะพบว่าการเพาะเมล็ดอ่อนอายุ 14 วัน เนื้อเยื่อพัฒนาเป็นแคลลัสมากกว่าให้กำเนิดเป็นต้น จึงจำเป็นต้องมีการปรับสูตรอาหารให้เหมาะสมสำหรับการช่วยชีวิตเอ็มบริโออ่อนต่อไป โดยเฉพาะการปรับสัดส่วนของฮอร์โมน BA ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มักกระตุ้นให้เกิดเนื้อเยื่อแคลลัส

ตารางที่ 4 การช่วยชีวิตเมล็ดอ่อนและเอ็มบริโอเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

คู่ผสม	อายุผล (วัน)	ชิ้นส่วน	จำนวนชิ้นส่วนที่เลี้ยง	จำนวนชิ้นส่วนที่พัฒนาเป็นต้น (%การพัฒนาเป็นต้น)	จำนวนชิ้นส่วนที่พัฒนาเป็นแคลลัส	จำนวนชิ้นส่วนที่ไม่พัฒนา	จำนวนชิ้นส่วนที่ตาย
F_1 x ปทุมมา (ALxBL) x AL	14	เมล็ดอ่อน	10	0 (0%)	1	6	3
F_1 x ปทุมรัตน์ (ALxPP) x PP	14	เมล็ดอ่อน	35	1 (2.9%)	6	28	0
F_1 x บัวขาว (LPSxPP) x LPS	14	เมล็ดอ่อน	6	0 (0%)	2	4	0
	21	เอ็มบริโอ	9	9 (100%)	0	0	0

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การทดลองย่อยที่ 1 การใช้สารเสริมการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มความสมบูรณ์พันธุ์

ผลสำเร็จของการใช้สารเสริมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มความสมบูรณ์พันธุ์ของต้นลูกผสมที่เป็นหมันขึ้นอยู่กับระดับความรุนแรงของการเป็นหมันของลูกผสมนั้นๆ ผลการทดลองพบว่า สาร Brasinolide 4,000 ppm จัดเป็นสารเสริมการเจริญเติบโตที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการนำมาฉีดพ่นต้นลูกผสมปทุมมาข้ามชนิดที่เป็นหมันให้กลับคืนความสมบูรณ์พันธุ์ได้ พบการผสมติด 6.3-28.6%

การทดลองย่อยที่ 2 การเพิ่มชุดโครโมโซมเพื่อแก้ความเป็นหมันของปทุมมาลูกผสมชั่วที่ 1

การชักนำให้ปทุมมาลูกผสมข้ามชนิด (interspecific hybrid) เพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม จาก 2x เป็น 4x เป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยแก้ไขปัญหาให้ต้นลูกผสมที่เป็นหมันกลับคืนความสมบูรณ์พันธุ์และสามารถนำลูกผสมนั้นๆ มาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์เพื่อสร้างลูกผสมในชั้นต่อไปได้ โดยการผสมข้ามระหว่างต้นดิพพลอยด์ (2x) ที่เป็นหมันกับปทุมมาซึ่งเป็นพ่อแม่ของต้นดิพพลอยด์ พบว่าผสมไม่ติด ไม่สามารถสร้างเมล็ดลูกผสมได้ในขณะที่การผสมระหว่างต้นเตตราพลอยด์ (4x) กับปทุมมาต้นพ่อแม่ พบการผสมติดสูงถึง 33.3-75.0 เปอร์เซ็นต์

การทดลองย่อยที่ 3 ศึกษาการช่วยชีวิตเอ็มบริโอ (Embryo rescue)

ในลูกผสมข้ามชนิดที่สามารถติดเมล็ดได้ในระยะแรกของการผสมเกสรแต่เมล็ดอ่อนแอและฝ่อตายในที่สุด ไม่สามารถอยู่รอดได้จนถึงเมล็ดสุกแก่ตามธรรมชาติได้ การช่วยชีวิตโดยการแยกเอ็มบริโอที่อายุผล 21 และ 28 วัน มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสม สามารถช่วยชีวิตเอ็มบริโอให้มีชีวิตอยู่รอดจนพัฒนาเป็นต้น มียอดและรากสมบูรณ์ได้ในระดับหนึ่ง แต่ถ้าผลมีอายุอ่อน 1-2 สัปดาห์หลังการผสมเกสร การพัฒนาของเอ็มบริโอยังไม่สมบูรณ์ การช่วยชีวิตยังไม่ประสบผลสำเร็จ ส่วนใหญ่มีการพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อแคลลัสโดยไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ จำเป็นต้องพัฒนาเทคนิคและสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับช่วยชีวิตเมล็ดอ่อนต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ณรงค์ โฉมเฉลา และอุทัย จารณศรี. 2519. บทบาทของ Amphidiploid ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้. วิทยาสารสโมสรกล้วยไม้บางเขน 4 : 181-195.

นิพัฒน์ สุขวิบูลย์, วิภาดา ทองทักษิณ และสุปัน ไม้ดัดจันทร์. 2553. การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของลูกผสมกระเจียวโดยใช้สารโคลชิซิน 9 หน้า. ใน: รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร.

วิภาดา ทองทักษิณ. 2543. การปรับปรุงพันธุ์ปทุมมา. ใน: ไม้ตัดดอกเศรษฐกิจและการปรับปรุงพันธุ์. หน้า 79-84. เอกสารวิชาการที่ 24 สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร.

อุบลวรรณ รัตนทิพยาภรณ์ และธนะชัย พันธ์เกษมสุข. 2555. ผลของสารคล้ายบราสซินต่อคุณภาพผลของลำไยพันธุ์ดอ. วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 29(2) : 8-14.

เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี, ธัญญะ เตชะศีลพิพัฒน์ และธราธร ทีรฆฐิติ. 2551. การปรับปรุงพันธุ์ของพืชในสกุล *Curcuma* และพืชสกุลใกล้เคียง. ในเอกสารการประชุมเรื่อง การพัฒนาศักยภาพการผลิตไม้ดอกไม้ประดับไทยเพื่อการส่งออก: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. วันที่ 15 กรกฎาคม 2551 โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ.

http://www.hos.ufl.edu/mooreweb/Tissue Culture