บทที่ 2
การสำรวจเอกสาร

พืชในสกุล *Glorisa spp.* อยู่ในวงศ์ Liliaceae มีอยู่ด้วยกัน 6 ชนิด ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกัน ในส่วนของหัวใต้ดิน ลำต้นเหนือดิน ใบและรูปร่างของดอก แต่จะมีลักษณะที่แตกต่างกันในส่วนของขนาดของดอก ความยาวของก้านดอก และสีของดอก ซึ่งในแต่ละชนิดสีของดอกจะแตกต่างกันเห็นได้อย่างชัดเจน (Graf, 1981) คือ

G. superba โคนกลีบดอกสีเหลืองตรงปลายกลีบสีแดงส้ม

G. rothschildiana โคนกลีบดอกสีเหลืองปลายกลีบสีแดงเลือดนก

G. carsonii โคนกลีบดอกสีเหลืองอมเขียว ปลายกลีบสีม่วงแดง

G. verschuurii โคนกลีบดอกสีเหลืองอ่อน ปลายกลีบสีแดงอิฐหรือแดงส้ม

G. greeneae ดอกสีเหลือง

G. simplex เป็นต้นไม้แคระ กลีบดอกสีเหลือง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของดองดึง *Gloriosa superba* Linn.

ดองดึงมีชื่อสามัญว่า climbing lily หรือ superb lily ชื่อท้องถิ่นที่เรียกกันคือ ดาวดึงส์ ว่านหัวขวาน ว่านก้ามปู พันมหา มะขาโค้ง(ภาคเหนือ) (นิจศิริและพยอม, 2534) มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนของทวีปเอเชีย พบมากในอินเดีย ศรีลังกา และอินโดจีน (Hooker, 1894)

ดองดึงเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ลำต้นมี 2 ส่วน ลำต้นใต้ดินเป็นแบบ tuber อายุหลายฤดู และลำต้นเหนือดินอายุสั้นเพียงฤดูเดียว สูงประมาณ 1.5 เมตร รากเป็นระบบรากฝอย (fibrous root system) ใบมีการเรียงตัวเป็นแบบสลับ (alternate) แบบวนรอบ (spiral) และแบบตรงข้าม (opposite) รูปร่างใบคล้ายหอก (lanceolate) ปลายใบเปลี่ยนรูปเป็นมือเกาะ (tendril) ทำหน้าที่พยุงลำต้น โคนใบกว้างประมาณ 3 เซนติเมตร ยาวประมาณ 13 เซนติเมตร ดอกเป็นดอกเดี่ยวสมบูรณ์เพศ รังไข่เป็นแบบ superior ovary มี 3 carpels แต่ละห้องมีออวุลจำนวนมาก การติดของออวุลกับรังไข่เป็นแบบ axile placentation ยอดเกสรตัวเมียแยกเป็น 3 แฉก ก้านเกสรตัวเมียทำมุมฉากกับรังไข่ ยาว

ประมาณ 5 เซนติเมตร อับละอองเกสรมี 6 อัน กว้างประมาณ 0.2 เซนติเมตร ยาวประมาณ 1.1 เซนติเมตร แตกตามแนวยาว ก้านอับละอองเกสรยาวประมาณ 5 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงและกลีบดอกลักษณะเหมือนกันมี 6 กลีบ ขณะดอกตูมห้อยหัวลงเมื่อดอกบานกลีบดอกจะทำมุม 180 องศา กับรังไข่ทำให้เห็นกลีบดอกกระดกกลับขึ้นด้านบน ขอบกลีบดอกเป็นคลื่นมาก โคนกลีบดอกมีสีเหลือง ปลายกลีบดอกมีสีแดงอมส้ม เมื่อบานเต็มที่กลีบดอกมีสีแดงเข้ม กว้างประมาณ 1 เซนติเมตร ยาวประมาณ 6.5 เซนติเมตร ก้านดอกยาวประมาณ 12 เซนติเมตร ผลเป็นแบบ septicidal capsule ยาวประมาณ 4-7 เซนติเมตร เมล็ดเมื่อสุกมีสีแดง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-7 เซนติเมตร จำนวน 30-60 เมล็ดต่อ 1 ฝัก (พรพรหม และคณะ, 2538 ; สราวุฒิ, 2536 ; Backer and Bakhuizen, 1963)

ประโยชน์ของดองดึงพบว่าเป็นพืชที่นำมาใช้เป็นสมุนไพรในการรักษาโรคไขข้ออักเสบ (พยอม,2521) เนื่องจากมีสารอัลคาลอยด์ (alkaloid) หลายชนิด เช่น superbine gloriosine cornigerine ฯลฯ แต่สารที่สำคัญและมีปริมาณสูง คือ โคลชิซีน (colchicine) (Agarwal และ Ghosh, 1985) โคลชิซีนมีอยู่ในทุกส่วนของต้นดองดึงแต่ที่มีปริมาณมากที่สุดคือ ส่วนของผลและเมล็ด (Sarin,1974) และมีรายงานว่าสารโคลชิซีนที่สกัดจากดองดึงสามารถบำบัดรักษาโรคมะเร็งได้ (ยุพา, 2527) นอกจากนี้โคลชิซีนยังมีคุณสมบัติทำให้จำนวนชุดของโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นโพลีพอยด์ (polyploid) ได้ โดยไปยับยั้งการสร้าง spindle fiber ในขณะที่มีการแบ่งเซลล์จึงสามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้ (Eigsti และคณะ, 1949) แต่โคลชิซีนเป็นสารพิษต่อเซลล์ ถ้ารับประทานเข้าไปจะทำให้รู้สึกแสบร้อนในปากและลำคอ คอแห้งกระหายน้ำ หายใจไม่ออก คลื่นไส้อาเจียนอย่างรุนแรง อุจจาระร่วง ทำให้เกิดการหมดสติ การหายใจติดขัดและตายได้ (พเยาว์, 2520)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของ *G. rothschildiana* O'Brien.

G. rothschildiana O'Brien. มีชื่อสามัญว่า climbing lily หรือ glory lily มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตร้อนของทวีปแอฟริกา เช่น ในยูกันดาและเคนยา มีลักษณะคล้ายต้นดองดึง แต่มีขนาดต้นใหญ่กว่าดองดึง

G. rothschildiana O'Brien. เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ลำต้นมี 2 ส่วน ลำต้นใต้ดินเป็นแบบ tuber อายุหลายฤดู และลำต้นเหนือดินอายุสั้นเพียงฤดูเดียว สูงประมาณ 2 เมตร รากเป็นระบบรากฝอย ใบมีการเรียงตัวเป็นแบบสลับ รูปร่างใบคล้ายหอก ปลายใบเปลี่ยนรูปเป็นมือเกาะ (tendril) ทำหน้าที่พยุงลำต้น โคนใบกว้างประมาณ 4 เซนติเมตร ยาวประมาณ 14 เซนติเมตร ดอกเป็นดอกเดี่ยว สมบูรณ์เพศ มีขนาดดอกใหญ่กว่าดอกดองดึง รังไข่เป็นแบบ superior มี 3 carpels แต่ละห้องมีออวุลจำนวนมาก การติดของออวุลกับรังไข่เป็นแบบ axile placentation ยอดเกสรตัวเมียแยกเป็น 3 แฉก ก้านเกสรตัวเมียทำมุมฉากกับรังไข่ ยาวประมาณ 5 เซนติเมตร อับละอองเกสรมี 6 อัน กว้างประมาณ 0.3 เซนติเมตร ยาวประมาณ 1.3 เซนติเมตร แตกตามแนวยาว ก้านชูอับละอองเกสรยาวประมาณ 5 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงและกลีบดอกลักษณะเหมือนกันมี 6 กลีบ ขณะดอกตูมห้อยหัวลง เมื่อดอกบานกลีบดอกจะทำมุม 180 องศา กับรังไข่ทำให้เห็นกลีบดอกกระดกกลับขึ้นด้านบน ขอบกลีบดอกเป็นคลื่นน้อย โคนกลีบดอกมีสีเหลืองปลายกลีบดอกสีแดงเลือดนกหรือสีบานเย็น เมื่อบานเต็มที่กลีบดอกเปลี่ยนเป็นมีสีม่วง กว้างประมาณ 2 เซนติเมตร ยาวประมาณ 7.5 เซนติเมตร ก้านดอกยาวประมาณ 14 เซนติเมตร ผลเป็นแบบ septicidal capsule (สราวุฒิ, 2536 ; อมรรัตน์, 2536)

การผสมพันธุ์ข้ามชนิด (Interspecific hybridization)

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการผสมพันธุ์ข้ามชนิดเป็นการเพิ่มการแปรผันทางพันธุกรรมให้กับพืช โดยจุดมุ่งหมายของการผสมพันธุ์ข้ามชนิด (Allard, 1960) คือ

1. เพื่อถ่ายทอดลักษณะบางอย่างที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจจากพืชชนิดหนึ่งไปสู่พืชอีกชนิดหนึ่ง เช่น ถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคบางชนิดจากพืชพันธุ์ป่าไปสู่พืชพันธุ์ปลูก

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. เพื่อเพิ่มลักษณะทางพันธุกรรมใหม่ๆ ที่ไม่เคยมีในพืชพันธุ์พ่อแม่มาก่อน ซึ่งอาจจะทำให้ได้ลักษณะที่แปลกใหม่เกิดขึ้น

3. เพื่อสร้างพืชชนิดใหม่จากการทำลายความเป็นหมันของลูกผสมระหว่างพืชต่างชนิด โดยการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมให้เป็นพืช amphidiploid โดยการใช้สารเคมีบางชนิด เช่น โคลชิซีน

4. เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพืชชนิดต่างๆ ซึ่งถ้าพืชชนิดใดสามารถผสมพันธุ์กันได้และได้ลูก F1ไม่เป็นหมันแสดงว่าพืชทั้งสองชนิดมีโครโมโซมชุดเดียวกันหรือเหมือนกัน พืชทั้งสองชนิดอาจถือว่าเป็นพืชชนิดเดียวกัน

การผสมพันธุ์ข้ามชนิด มักมีปัญหาของการผสมไม่ติด ยิ่งถ้าการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์พ่อพันธุ์แม่ที่มีจำนวนโครโมโซมและองค์ประกอบทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันมากโอกาสที่จะได้รับพืชลูกผสมยิ่งมีน้อย แต่ถ้าพันธุ์พ่อพันธุ์แม่มีชุดของโครโมโซมร่วมกัน (homology) อยู่บ้างจะผสมกันได้ง่ายขึ้น (Allard, 1960)

ปัญหาและอุปสรรคของการผสมพันธุ์ข้ามชนิดที่เกิดก่อนการปฏิสนธิ เป็นสาเหตุที่นำไปสู่การปฏิสนธิที่เกิดขึ้นได้ยาก อาจเนื่องมาจาก interspecific incompatibility กล่าวคือ ละอองเกสรไม่สามารถงอกหลอดละอองเกสร (pollen tube) ลงบนยอดเกสรตัวเมียได้ หรือหลอดละอองเกสรไม่สามารถลงไปผสมกับไข่ (egg) ได้ ดังตัวอย่างในการผสมข้ามชนิดระหว่างพืชในสกุล *Pennisetum* พบว่าการผสมพันธุ์ *P. typtoides* ด้วยละอองเกสรของ *P. schweinfurthii, P. hohenacheri, P. orientale* และ *P. squamalatum* หลอดละอองเกสรไม่สามารถงอกบนผิวของยอดเกสรตัวเมียของ *P. typhoides* ได้ (Mohindra และ Minocha, 1991) ซึ่งการผสมไม่ติดนั้นอาจเนื่องมาจากลักษณะทางสัณฐานของพืชหรือปฏิกิริยาชีวเคมีภายในพืช (ลาวัลย์, 2539 ; Shivanna และ Rangaswamy, 1992)

ปัญหาและอุปสรรคของการผสมพันธุ์ข้ามชนิดที่เกิดหลังการปฏิสนธิอันเนื่องมาจากไซโกต หรือเอ็มบริโอที่เกิดขึ้นมีอายุอยู่ได้ไม่นานก็ตาย (abortion) หรือ ลูกผสมที่เจริญขึ้นมามักจะเป็นหมันเพราะไม่สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ให้เป็นปกติได้ ดังตัวอย่างการผสมข้ามชนิดในพืชสกุล *Cyclamen spp.* พบว่าเอ็มบริโอเกิดการตายหลังการผสมเกสร 42 วัน (Ishizaka และ Uematsu, 1992 ; 1995) การผสมข้ามชนิดระหว่าง *Alstroemeria pelegrina* กับ *A. avrea* พบว่าหลังการ

ปฏิสนธิจนได้ไซโกตและเอ็มบริโอเกิดความผิดปกติในการเจริญและพัฒนา เมื่อเทียบกับเอ็มบริโอที่มาจากการผสมตัวเองของ *A. pelegrina* เอ็นโดเสปิร์ม (endosperm) เกิดการสลายไป (degeneration) และเกิดการตายของเอ็มบริโอ หลังการผสมเกสร 12 วัน (De Jeu และ Gearriga Caldere, 1997)

เทคนิคและวิธีการผสมเกสรด้วยมือ (hand pollination) ที่นำมาช่วยให้ผสมติดจากการผสมพันธุ์ข้ามชนิด

จากปัญหาและอุปสรรคที่ทำให้ผสมไม่ติดในการผสมพันธุ์ข้ามชนิด วิธีการดังต่อไปนี้สามารถนำมาช่วยแก้ไขปัญหาได้ (สุมิตรา, 2534 ; Allard, 1960)

1. การใช้จำนวนคู่ผสมมากขึ้นโดยใช้หลาย ๆ สายพันธุ์ขึ้น อาจมีคู่ผสมบางคู่สามารถผสมพันธุ์กันได้

2. การผสมแบบสลับพันธุ์พ่อแม่ (reciprocal cross) ซึ่งการใช้พันธุ์แม่ที่มีจำนวนโครโมโซมสูงกว่าพันธุ์พ่อ จะทำให้มีโอกาสของการผสมติดมีมากขึ้น เนื่องจากการใช้พันธุ์พ่อที่มีจำนวนโครโมโซมสูงกว่าพันธุ์แม่จะมีปัญหาของความไม่สมดุลย์กันของหลอดละอองเกสรกับก้านเกสรตัวเมียของพันธุ์แม่ที่มีจำนวนโครโมโซมต่ำกว่า

3. การผสมในขณะที่เกสรตัวเมียยังอ่อนอยู่ เพื่อให้หลอดละอองเกสรมีเวลานานพอที่จะเจริญลงไปผสมกับไข่ได้

4. การตัดก้านเกสรตัวเมียให้สั้นลงเพื่อเป็นการย่นระยะทางที่หลอดละอองเกสรเจริญไปผสมกับไข่ได้เร็วขึ้น

การศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสรที่จะนำไปใช้ในการผสมเกสร

1. การทดสอบความมีชีวิตของละอองเกสรเพื่อนำไปใช้ในการผสมเกสร โดยการย้อมสีละอองเกสรด้วย 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride ซึ่งละอองเกสรที่มีชีวิตจะมี hydrogen ion จากปฏิกิริยาการหายใจที่สามารถทำปฏิกิริยากับสีที่ใช้ย้อมจะทำให้เกิดเป็นสีแดงกับ active

oxidative หรือ peroxides enzymes ซึ่งใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสรได้ แต่ปฏิกิริยาของสีดังกล่าวให้การทดสอบที่ไม่ชัดเจน (ลาวัลย์, 2539)

2. การทดสอบการงอกของละอองเกสรจะเป็นการบอกถึงความมีชีวิตได้ ซึ่งองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงละอองเกสรประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส และสารเคมีอื่น ๆ เช่น boric acid และ calcium nitrate ซึ่งในพืชแต่ละชนิดจะมีความต้องการความเข้มข้นของน้ำตาลที่แตกต่างกันออกไป โดยทั่วไประดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสอยู่ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ boric acid 100 mg/l และ calcium nitrate 300 mg/l ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ในการศึกษาการงอกของละอองเกสรของพืชได้หลายชนิด (Shivanna และ Rangaswamy, 1992)

3. การเก็บละอองเกสรและรักษาความมีชีวิตของละอองเกสร เพื่อนำไปใช้ในการผสมเกสร โดยการเก็บรักษาละอองเกสรไว้ใช้ในระยะเวลาสั้นๆให้อยู่ในสภาพมีชีวิตจำเป็นต้องเก็บในที่อุณหภูมิต่ำและความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ เช่นที่ 5 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเก็บรักษาความมีชีวิตของละอองเกสรได้ระยะหนึ่ง ส่วนการเก็บละอองเกสรเพื่อนำไปใช้ในระยะเวลาที่ยาวนาน จำเป็นต้องเก็บละอองเกสรแบบ cryopreservation ซึ่งสามารถเก็บรักษาละอองเกสรในสภาพที่มีชีวิตได้นาน 1 เดือน ถึง 1 ปี เพื่อหลีกเลี่ยงความล้มเหลวในการเก็บและการผสมเกสรจึงจำเป็นต้องมีการทดสอบความมีชีวิตของละอองในห้องปฏิบัติการ (ลาวัลย์, 2539 ; Shivanna และ Rangaswamy, 1992)

การศึกษาการเจริญของหลอดละอองเกสรบนยอดเกสรตัวเมียและในก้านเกสรตัวเมีย

เพื่อตรวจสอบการงอกของหลอดละอองเกสรที่เจริญบนยอดเกสรตัวเมียและในก้านเกสรตัวเมียลงไปผสมกับไข่ เป็นการศึกษารูปร่างลักษณะโครงสร้างภายในของเกสรตัวเมีย (pistil) เพื่อดูรายละเอียดของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างหลอดละอองเกสรกับเกสรตัวเมีย ในการศึกษาการเจริญเพื่อตรวจดูตำแหน่งของหลอดละอองเกสรบนยอดเกสรตัวเมียและในก้านเกสรตัวเมียนั้น โดยทั่วไปใช้วิธีผ่าเนื้อเยื่อของเกสรตัวเมียตามยาวแล้วย้อมสีดูหลอดละอองเกสร หรือการทำให้เนื้อเยื่อของเกสรตัวเมีย อ่อนนุ่มลงโดยการใช้สารเคมีหรือใช้เอ็นไซม์ เช่น pectinase แล้วจึงย้อมสีดูการงอกของหลอดละอองเกสร (Shivanna และ Rangaswamy, 1992) เช่น การศึกษาเพื่อดูตำแหน่งของหลอดละอองเกสรบนยอดเกสรตัวเมียและในก้านเกสรตัวเมียของการผสมข้ามระหว่าง *Asperagus*

โดยการเก็บส่วนของเกสรตัวเมียหลังการผสมเกสร 48 ชั่วโมง แช่ในสารละลาย FAA (1:8:1 v/v/v formatin : 96% ethanol : glacial acetic acid) หลังจากนั้นนำเกสรตัวเมียไปล้างใน 8 M NaOH นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ชั่วโมง และย้อมสี aniline blue 0.1% ใน 0.03 M K_3PO_4 และนำ pistil วางบนสไลด์ หยดด้วย glycerine 1 หยด ปิดทับด้วย cover glass แล้วนำสไลด์ไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Fluorescence (Marcellen และ Camadro, 1996) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างหลอดละอองเกสรยอดเกสรตัวเมียและก้านเกสรตัวเมียของ *Pennisetum spp.* โดยตัดส่วนของ spikelets หลังการผสมเกสร 1 ชั่วโมง fix ใน alchohol : lactic acid (2:1, v/v) และย้อมสีหลอดละอองเกสรด้วยวิธีดัดแปลงของ D'Souza (1992) อ้างตาม(Mohindra และ Minocha, 1991) ซึ่ง hydrolyze ด้วย 0.1 N HCl ที่ 60°C นาน 20-25 นาที และย้อมสี 1% aniline blue แล้วจึงนำไปตรวจดูตำแหน่งของหลอดละอองเกสรภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Fluorescence

การเจริญพัฒนาของเอ็มบริโอและการช่วยเอ็มบริโอให้รอดชีวิตในหลอดทดลอง

ภายหลังการผสมเกสรและเกิดปฏิสนธิแล้วไซโกตเซลล์เดียวจะเริ่มมีพัฒนาการไปเป็นเอ็มบริโอจากการแบ่งตัวออกเป็น 2 เซลล์ ที่มีขนาดไม่เท่ากัน เซลล์ที่มีขนาดเล็กเรียกว่า apical cell ซึ่งอยู่ทางด้านบน ส่วนเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าอยู่ทางด้านล่างเรียกว่า basal cell ส่วนที่จะพัฒนาเป็นเอ็มบริโอคือ apical cell ซึ่งจะแบ่งเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นเรื่อยๆ จากลักษณะเป็นก้อนกลมเรียกระยะนี้ว่า ระยะ globular shape และเปลี่ยนเป็น heart shape ซึ่งลักษณะคล้ายรูปหัวใจ และพัฒนาไปเป็น torpedo shape จนสุดท้ายมีพัฒนาไปเป็น mature embryo และส่วนของ basal cell จะแบ่งตัวทางด้านขนานซึ่งจะได้เซลล์แถวยาวที่เรียกว่า suspensor ซึ่งทำหน้าที่ช่วยยึดตัวเอ็มบริโอให้ฝังอยู่ใน nucellus และช่วยดูดซึมอาหารให้แก่เอ็มบริโอ เซลล์ที่อยู่ตรงรอยต่อระหว่างเอ็มบริโอกับ suspensor เรียกว่า hypophysis cell ซึ่งทำหน้าที่เป็นจุดกำเนิดราก (root primordial) เมื่อเอ็มบริโอเจริญและพัฒนาเต็มที่แล้วส่วนของ suspensor ก็จะหมดหน้าที่และละลายตัวไป (ประศาสตร์, 2538)

ระยะของการพัฒนาของเอ็มบริโอที่นำมาเลี้ยงในหลอดทดลอง ถ้าเอ็มบริโออยู่ในระยะ heterotrophic ซึ่งเป็นระยะของเอ็มบริโอมีขนาดเล็กมากจะมีความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชจากภายนอกที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมและต้องการความเข้มข้นของน้ำตาลค่อนข้างสูง

เพื่อใช้ในพัฒนาของเอ็มบริโอ แต่ถ้าเอ็มบริโออยู่ในระยะ autotrophic ซึ่งเป็นเอ็มบริโอที่อยู่ในระยะพัฒนาใกล้เต็มที่หรือมีการพัฒนาเต็มที่แล้ว การพัฒนาของเอ็มบริโอที่เลี้ยงในหลอดทดลองในระยะนี้อาจไม่ต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชจากภายนอกก็สามารถเกิดการพัฒนาได้ และมีความต้องการความเข้มข้นของน้ำตาลที่น้อยลง (Raghavan และ Srivastava, 1982 ; Niederwieser และคณะ, 1990)

การช่วยชีวิตเอ็มบริโอให้สามารถรอดชีวิตได้นั้น ความสำเร็จจะขึ้นอยู่กับ

1. อายุหรือระยะการเจริญของเอ็มบริโอที่นำมาเลี้ยง

2. องค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงซึ่งต้องมีความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสม และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชทั้งชนิดและในความเข้มข้นที่เหมาะสม

3. สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในระหว่างที่เลี้ยง

การช่วยชีวิตเอ็มบริโอนี้นอกจากจะทำให้เอ็มบริโอของลูกผสมเจริญเติบโตต่อไปเป็นต้นพืชได้แล้ว ยังมีประโยชน์ในการช่วยย่นระยะเวลาที่ใช้ในการรอให้ออวุลที่ถูกผสมแล้วเจริญจนเป็นเมล็ดที่โตเต็มที่ และในพืชบางชนิดยังมีการพักตัวของเมล็ด (seed dormancy) ที่ต้องการเวลาอีกระยะหนึ่งจึงจะพ้นการพักตัวซึ่งใช้เวลานานหลายเดือน ดังนั้นการเลี้ยงรังไข่หรือออวุลหรือเอ็มบริโอในหลอดทดลองจึงช่วยย่นระยะเวลาการผลิตต้นกล้า (seedling) ได้ (Sharma และคณะ, 1996)

โดยทั่วไปการช่วยชีวิตเอ็มบริโอนิยมนำมาใช้กับเอ็มบริโอที่มีความอ่อนแอมาแต่กำเนิดอันเนื่องมาจากความบกพร่องของอาหารที่มีอยู่ในเอ็นโดเสปิร์มหรือมาจากผลของการรวมกันระหว่างพันธุกรรมที่มีความห่างไกลกัน โดยส่วนใหญ่เอ็มบริโอเหล่านี้จะตายก่อนที่จะพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอที่สมบูรณ์ ซึ่งถ้านำเอ็มบริโอดังกล่าวไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ในหลอดทดลองก่อนที่เอ็มบริโอจะตายหรือก่อนเอ็นโดเสปิร์มจะสลายไป ด้วยวิธีการที่เหมาะสมก็จะสามารถช่วยให้เอ็มบริโอรอดชีวิตได้ ซึ่งอาจจะใช้วิธีการผ่าแยกเอาเฉพาะเอ็มบริโอออกมาจากออวุล หรือแยกออวุลออกจากรังไข่ แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ แต่ในพืชบางชนิดเอ็มบริโอมีขนาดเล็กมาก จึงเป็นการยากที่จะหาเทคนิคที่จะแยกเอาเอ็มบริโอออกจากออวุลได้ ดังนั้นจึงนิยมนำทั้งออวุลหรือทั้งรังไข่ไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์เลย เช่นในการช่วยชีวิตเอ็มบริโอโดยการเลี้ยงออวุลของยาสูบ

(Reed และ Collins, 1978 ; Nikova และ Zagorska, 1990) การช่วยชีวิตเอ็มบริโอโดยการเลี้ยงออวุลของฝ้าย (Stewart, 1981) การช่วยชีวิตเอ็มบริโอโดยการเลี้ยงออวุลของ *Brassica spp.* (Bajaj และคณะ, 1986 ; Agnihotri และคณะ, 1990) การเลี้ยงออวุลใน *Helianthus* (Espinasse และคณะ, 1991) การเลี้ยงรังไข่ใน *Lilium* (Hayashi และคณะ, 1986 ; Kanoh และคณะ, 1988) การเลี้ยงส่วนของรังไข่รวมกับอับละอองเกสรใน *Lilium* (Van Tuyl และคณะ, 1991) เป็นต้น

การช่วยชีวิตเอ็มบริโอโดยการนำออวุลจากรังไข่จากการผสมพันธุ์ข้ามชนิดระหว่าง *Fagoyrum esculentum* กับ *F. tatoricum* ไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ พบว่าไม่มีการเจริญเกิดขึ้น แต่การแยกเอาออวุลจากการผสมตัวเองของ *F. tataricum* ขนาด 1.8-2.0 mm หลังการผสมเกสร 4-7 วัน ไปเลี้ยงในสูตรอาหารของ MS + 5% sucrose + 2 mg/l BAP + 0.2 mg/l IAA + 2000 mg/l casein hydrolysate + 0.7% agar พบว่าเอ็มบริโอสามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบรูณ์ได้ (Samimy ,1991)

การช่วยชีวิตเอ็มบริโอลูกผสมระหว่าง *Lilium spp.* โดยการเลี้ยงรังไข่ในอาหารสูตร MS + 10% sucrose + 1.0 mg/l NAA และเลี้ยงออวุลในอาหารสูตร MS + 5% sucrose + 0.1 mg/l NAA ทำให้มีการเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นพืชลูกผสมที่สมบูรณ์ได้ (Van Tuyl และคณะ ,1991)

การช่วยชีวิตเอ็มบริโอลูกผสมระหว่าง *Allium cepa* และ *Allium sativam* สามารถได้รับต้นพืชลูกผสมจากการเลี้ยงออวุลในอาหารสูตร MS + 5.7 x 10^{-8}M IBA (Ohsumi และคณะ ,1993)

การช่วยชีวิตเอ็มบริโอใน *Rosa bybrida* L. โดยการเลี้ยงออวุลและการเลี้ยงเอ็มบริโอในอาหารสูตร MS ดัดแปลง 6 สูตร ที่ความเข้มข้นของอาหารที่ต่างกัน 3 ระดับ คือ MS 1/2 MS 1/4MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ พบว่าได้รับต้นพืชลูกผสมจากการเลี้ยงออวุลหลังการผสมเกสร 5 สัปดาห์ ในอาหารสูตร MS + 2% sucrose และแยกเอ็มบริโอไปเลี้ยงในสูตรอาหาร 1/4 MS + 2% sucrose (Gudin, 1994)

การช่วยชีวิตเอ็มบริโอลูกผสมของ lily ทำให้ได้รับต้นพืชลูกผสมจากการเลี้ยงรังไข่ในอาหารสูตร MS (pH 6.0) + 10% surcrose +1.0 mg/l NAA และการเลี้ยงออวุลในอาหารสูตร MS (pH 5.5) + 5% surcrose +1.0 mg/l NAA แล้วนำไปเก็บไว้ในอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อทำลายระยะฟักตัวของเมล็ดเป็นเวลา 8-10 สัปดาห์ (Van Tuyl และคณะ ,1991)

จากการทดลองช่วยชีวิตเอ็มบริโอของ *Ornithogalum dubium* โดยนำเอ็มบริโอที่มีอายุต่าง ๆ กันมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ซึ่งดัดแปลงโดยเติมซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0.1, 10, 30, 50 และ 70 g/l และเติม NAA + BA + GA_3 ความเข้มข้น 0, 0.01, 0.1 และ 1.0 mg/l พบว่าอายุของเอ็มบริโอที่นำมาเลี้ยงมีผลต่อความสำเร็จของการได้รับต้นพืช และมีความต้องการความเข้มข้นของซูโครสแตกต่างกัน โดยอาหารที่เติม 70 g/l sucrose จะช่วยให้เอ็มบริโอในระยะ proembryo เจริญได้ดี ในขณะที่ 10-30 g/l ซูโครสเหมาะต่อการเจริญของเอ็มบริโอในระยะ globular และพบว่าสารควบคุมการการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้เติมลงไปสูตรอาหาร คือ BA, NAA และ GA_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอ (Niederwieser และคณะ ,1990)

สภาพแวดล้อมในระหว่างการเลี้ยงเอ็มบริโอเพื่อช่วยชีวิตพืชลูกผสมมีผลต่อการเจริญพัฒนาในระยะต่าง ๆ ด้วย จากการศึกษาการผสมพันธุ์ข้ามชนิดใน *Cyclamen spp.* พบว่าเอ็มบริโอจะตาย หลังการผสมเกสร 42 วัน แต่สามารถช่วยให้เอ็มบริโอรอดชีวิตได้และได้รับต้นพืชลูกผสมจากการเลี้ยงออวุลหลังผสมเกสรอายุ 35 วัน ในอาหารสูตร MS + 3% sucrose +10% น้ำมะพร้าว ในสภาพที่ไม่มีแสง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อเอ็มบริโอเจริญและพัฒนาเป็นต้นจึงนำไปเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Ishizaka และ Uematsu ,1995 ; Ishizaka, 1996)

การช่วยชีวิตเอ็มบริโอของลูกผสมจากการผสมพันธุ์ข้ามชนิดระหว่าง *Limonium perigrinum* และ *L. purpurratum* พบว่าได้รับต้นพืชลูกผสมจากการเลี้ยงเอ็มบริโอที่แยกจากออวุลหลังการผสมเกสร 12-15 วัน ในอาหารสูตรดัดแปลงของ B5-Gamborg et al. (1968) หรือ Kao & Michayluk (1975) ที่เติม 10 g/l sucrose และ 7.5 g/l agar และเพิ่มจำนวนต้นในอาหารสูตรดัดแปลงของ MS + 0.6 mg/l BA +0.3 mg/l NAA (Morgan และคณะ, 1995)

การช่วยชีวิตเอ็มบริโอของลูกผสมจากการผสมพันธุ์ข้ามชนิดระหว่าง *Cucurbita pepo* L. และ *C. martinezii* พบว่าได้รับต้นพืชลูกผสมจากการเลี้ยงเอ็มบริโอในระยะ heart-shape หลังการผสมเกสร 14 วัน ในอาหารสูตร MS + 0.1 mg/l IAA + 0.1 mg/l Kinetin ความเข้มแสง 1000 Lux นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26 ± 1 องศาเซลเซียส (Metwally และคณะ, 1996)

การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะของพ่อแม่และพืชลูกผสมเพื่อพิสูจน์ความเป็นลูกผสมข้ามชนิด

ปัจจุบันเทคนิคที่นำมาใช้มีอยู่หลายวิธีที่ค่อนข้างจะเป็นมาตราฐานในการพิสูจน์ความเป็นลูกผสมข้ามชนิดของต้นพืชโดยการเปรียบเทียบผลที่ได้กับผลของพ่อและแม่ ในการศึกษานั้นสามารถทำได้ตั้งแต่ในระดับเซลล์ ระดับของโปรตีนและจนถึงระดับโมเลกุลของ DNA ดังตัวอย่างการศึกษาดังต่อไปนี้

1. การศึกษาความเป็นพืชลูกผสมข้ามชนิดโดยการตรวจนับจำนวนโครโมโซมในโซมาติกเซลล์ของลูกที่ได้รับเปรียบเทียบกับพ่อแม่ ในพืชสกุล *Cyclamen spp.* (Ishizaka และ Uemasu, 1992, 1995, ; Ishizaka, 1996) ใน *Solanum spp.* (Bukenya และ Carasco, 1995) ใน *Limonium spp.* (Morgan และคณะ, 1995)

2. การศึกษาความเป็นพืชลูกผสมข้ามชนิดโดยการตรวจนับจำนวนโครโมโซมในเยิร์มไลน์เซลล์ของการแบ่งนิวเคลียสแบบ meiosis ซึ่งอาจศึกษาจาก embryosac mother cell (EMC) หรือ pollen mother cell (PMC) เช่น การศึกษาจำนวนโครโมโซมในเยิร์มไลน์เซลล์ของพืชลูกผสมเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างทานตะวันกับพืชพันธุ์ป่าในสกุลเดียวกันสี่ชนิด (Espinasse และคณะ, 1991, 1995) ใน *Limonium spp.*(Morgan และคณะ, 1995) ใน *Cucurbita spp.* (Mmetwally และคณะ, 1996)

3. การศึกษาความเป็นพืชลูกผสมข้ามชนิดโดยใช้เทคนิคทางอิเล็คโตรฟอไรซิส (electrophoresis) เช่น การใช้ไอโซไซม์ (isozyms) ในการตรวจความเป็นพืชลูกผสมข้ามชนิดของลูก F1 จากการผสมกันระหว่าง *Cucurbita pepo* L. และ *C. martinezii* (Mmetwally และคณะ, 1996)

4. การศึกษาความเป็นพืชลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *Phaseolus vulgaris* L. และ *P. lunatus* L. โดยใช้ restriction endonuclease analysis ของ rDNA (Kuboyama และคณะ, 1991)

5. การศึกษาความเป็นพืชลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *Helianthus spp* โดยใช้ restriction fragmant length polymorphism (RFLP). (Krauter และคณะ, 1991)

6. การศึกษาความเป็นพืชลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *Fagopyrum spp.* โดยใช้ random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Samimy และคณะ, 1996)

7. การศึกษาความเป็นพืชลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *Limonium perrigrinum* Bergius และ *L. purpuratum* L.โดยตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอในโซมาติกเซลล์ ด้วยวิธี flow cytometry (Morgan และคณะ, 1995) เป็นต้น

ขอบเขตการศึกษาของวิทยานิพนธ์

1. ศึกษาการผสมพันธุ์ข้ามชนิดระหว่างดองดึง *Gloriosa superba* Linn. กับ *G. rothschildiana* O'Brien.

1.1 เตรียมพืชทดลอง

1.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *G. superba* Linn. เปรียบเทียบกับ *G. rothschildiana* O'Brien.

1.3 หาเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien.

1.4 ผสมเกสรด้วยมือ (hand pollination)

1.5 ศึกษาการงอกของหลอดละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. บนยอดเกสรตัวเมีย และในก้านเกสรตัวเมียของดอกดองดึง

2. ศึกษาการเลี้ยงออวุลของดองดึงที่ผสมด้วยละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. เพื่อชักนำออวุลที่ได้หลังการผสมเกสรแล้วให้เจริญเป็นต้นพืชลูกผสมในหลอดทดลอง

3. ศึกษาจำนวนโครโมโซมของของดองดึง *G. superba* Linn., *G. rothschildiana* O'Brien. และพืชลูกผสมระหว่างพืช 2 ชนิด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาวิธีการผสมพันธุ์ข้ามชนิดระหว่างดองดึง *Gloriosa superba* Linn. กับ *G. rothschildiana* O'Brien. และเพื่อชักนำออวุลที่ได้หลังการผสมเกสรแล้วให้เจริญเป็นต้นพืชถูกผสมในหลอดทดลอง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยนี้

ทำให้ทราบถึงปัญหาและอุปสรรคในการผสมพันธุ์พืชข้ามชนิดระหว่างดองดึง *Gloriosa superba* Linn. กับ *G. rothschildiana* O' Brien. และเรียนรู้วิธีการที่เหมาะสมในการผสมเกสรและการเลี้ยงออวุลในหลอดทดลองเพื่อช่วยให้เอ็มบริโอสามารถเจริญพัฒนาขึ้นเป็นต้นพืชถูกผสมได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย