บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง

1. การผสมพันธุ์ข้ามชนิดระหว่างดองดึง *G. superba* Linn. และ *G. rothschildiana* O'Brien.

1.1 การเตรียมพืชทดลอง

1.1.1 การปลูกดองดึงเพื่อใช้เป็นพันธุ์แม่ในการผสมพันธุ์

พบว่าในการปลูกเหง้าดองดึงที่มีการแตกหน่อก่อนปลูก เมื่อปลูกนาน 1 สัปดาห์ เหง้าดองดึงสามารถงอกเป็นต้นและโผล่ขึ้นเหนือดินมีการเจริญได้รวดเร็วกว่าเหง้าดองดึงที่ยังไม่แตกหน่อก่อนปลูกซึ่งอาจต้องใช้เวลานานถึง 2-3 สัปดาห์ขึ้นไปกว่าหน่อของดองดึงจึงโผล่ขึ้นเหนือดินได้ ดองดึงเป็นพืชที่ดูแลปลูกเลี้ยงง่าย เพียงแต่ต้องทำร้านไม้ไผ่ขึงเอ็นให้มือเกาะพยุงลำต้นได้ การเจริญเติบโตของดองดึงนั้นต้นที่เจริญมาจากเหง้าที่มีขนาดใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้เร็วกว่า มีขนาดของต้นโตกว่าและมีการแตกแขนงของกิ่งมากกว่า ให้ดอกจำนวนมากกว่าหรือสมบูรณ์กว่า ต้นดองดึงที่เจริญมาจากเหง้าที่มีขนาดเล็ก ในช่วงของการเจริญเติบโตของดองดึงมีศัตรูตัวสำคัญที่มารบกวนคือ หนอนกินยอดและใบอ่อนซึ่งมีผลทำให้ต้นของดองดึงหยุดการเจริญเติบโต และเพลี้ยไฟซึ่งเป็นแมลงที่ดูดกินน้ำเลี้ยงของยอดและใบอ่อนของดองดึงทำให้ใบเกิดอาการหงิกงอและชะงักการเจริญเติบโต ซึ่งทำให้ต้นดังกล่าวเมื่อออกดอกแล้วดอกมีขนาดเล็กและไม่สมบูรณ์ มีสีซีดหรือบางต้นไม่ออกดอกเลย ส่วนในช่วงของการออกดอกศัตรูที่สำคัญคือ ตัวซันโรงซึ่งเป็นแมลงที่กัดกินเกสรตัวผู้ของดองดึงที่ยังอ่อนอยู่ ในบางครั้งพบว่ามีการกัดส่วนยอดเกสรตัวเมียจนขาดด้วย ทำให้ดอกนั้นไม่สามารถใช้ในการผสมพันธุ์ได้ โดยส่วนใหญ่ตัวซันโรงจะกัดส่วนของกลีบดอกที่ยังไม่บานเพื่อที่จะเข้าไปกัดกินเกสรที่ยังอ่อนอยู่ภายในดอก เมื่อดอกบานจึงทำให้ดอกของดองดึงมีรูปร่างของดอกผิดปกติเป็นดอกที่ไม่สมบูรณ์ จึงจำเป็นต้องใช้ถุงกระดาษครอบดอกที่ยังอ่อนไว้เพื่อป้องกันการทำลายจากตัวซันโรง ดังนั้นจึงทำให้ดอกที่จะนำมาใช้ในการผสมพันธุ์มีจำนวนน้อยลง นอกจากนั้นดอกที่ปล่อยให้ผสมเปิดก็มีโอกาสติดผลน้อยเพราะตัวซันโรงมาเก็บกินเกสรไปเสียส่วนหนึ่ง

1.1.2 การสั่งซื้อดอก *G. rothschildiana* O'Brien.

ช่อดอกที่นำเข้าจากประเทศฮอลแลนด์นั้นจะมีทั้งดอกตูมและดอกบานในช่อเดียวกัน ในส่วนของดอกบานบางดอกจะมีการแตกของอับละอองเกสร มาแล้วซึ่งละอองเกสรดังกล่าวจะไม่นำมาใช้ในการผสมพันธุ์ เพราะไม่ทราบอายุที่แน่นอนของละอองเกสรที่อับละอองเกสรแตก และจะใช้เฉพาะละอองเกสรที่ได้จากอับละอองเกสรที่เพิ่งแตกจากดอกที่บานหลังจากที่สั่งซื้อดอกมาแล้วเท่านั้น สำหรับดอกตูมที่ติดมาด้วยเมื่อทิ้งไว้ในห้องที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส จะสามารถทะยอย ซึ่งละอองเกสรจากดอกดังกล่าวจะนำไปใช้ในการผสมเกสร และเก็บส่วนที่เหลือไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส โดยจะใช้ละอองเกสรที่เก็บไว้นานไม่เกิน 7 วัน เนื่องจากละอองเกสรที่เก็บไว้ 7 วัน จะให้เปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสรเหลือเพียง 52.55 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น (ตารางที่ 2) ดังนั้นจึงไม่นำเอาละอองเกสรส่วนดังกล่าวมาใช้ในการผสมเกสร ในการสั่งซื้อดอกมาใช้ในการผสมเกสร 2 ครั้ง แต่ละครั้งจะมีดอกทะยอยทำให้สามารถใช้ผสมเกสรได้ประมาณ 7-10 วัน ๆ ละ 10-20 ดอก

1.2 การศึกษาเปรียบเทียบทางสัณฐานวิทยาของดองดึง *G. superba* Linn. กับ *G. rothschildiana* O'Brien.

จะเห็นได้ว่าลักษณะของพืชทั้ง 2 ชนิดมีความคล้ายคลึงกัน ลักษณะที่ความแตกต่างกันชัดเจน ได้แก่ ขนาดของดอก สีดอก และความยาวก้านดอก ซึ่งใน *G. rothschildiana* O'Brien. มีขนาดของดอกใหญ่กว่า สีดอกเข้มกว่า และก้านดอกยาวกว่าดองดึง ซึ่งลักษณะดังกล่าวถือเป็นคุณภาพของไม้ตัดดอกที่ตลาดมีความต้องการ ดังนั้นจึงน่าจะเป็นการดีที่จะถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมที่ดีดังกล่าวจาก *G. rothschildiana* O'Brien. มาสู่ดองดึงซึ่งเป็นวัชพืช ซึ่งอาจจะทำให้ได้พืชพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติที่สามารถใช้เป็นไม้ตัดดอกเพื่อการค้าได้

ในการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *G. rothschildiana* O'Brien. สามารถทำได้เพียงการเปรียบเทียบเฉพาะส่วนของช่อดอกเท่านั้น เนื่องจากมีการสั่งซื้อเฉพาะส่วนของช่อดอกเข้ามาใช้ในการศึกษา และไม่สามารถสั่งซื้อเหง้าของพืชชนิดนี้เข้ามาปลูกได้เนื่องจากมีราคาแพงมาก และไม่พบรายงานว่าการปลูก *G. rothschildiana* O'Brien. ในสภาพอากาศของ

กรุงเทพมหานครจะได้ผลดีจนออกดอกได้ ในข้อจำกัดดังกล่าวข้างต้นจึงทำให้ไม่สามารถทำการผสมพันธุ์แบบสลับพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ (reciprocal cross) ได้ ดังนั้นจึงใช้ *G. rothschildiana* O'Brien. เป็นพันธุ์พ่อเท่านั้น

1.3 การหาเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien.

การหาเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. ในสารละลายน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ ก่อนการนำเอาละอองเกสรไปใช้ในการผสมพันธุ์ข้ามชนิดกับดองดึงเพื่อตรวจสอบความมีชีวิตของละอองเกสรและความสามารถในการงอกหลอดละอองเกสรโดยวางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1-2 ชั่วโมง ซึ่งเป็นการทดสอบก่อนการนำเอาละอองเกสรไปใช้ในการผสมพันธุ์ข้ามเป็นเวลานาน 7 วัน

จากผลการทดลองในตารางที่ 2 จะเห็นว่าในวันแรกที่นำละอองเกสรไปใช้ผสมพันธุ์ จะมีเปอร์เซ็นต์การงอกเฉลี่ยของละอองเกสรค่อนข้างสูงถึง 91.47 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสรจะมีค่าน้อยลงเมื่อจำนวนวันที่เก็บละอองไว้มากขึ้น ซึ่งในวันที่ 7 มีเปอร์เซ็นต์ความงอกของละอองเกสรเฉลี่ยเหลือเพียง 52.55 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่งไม่ควรใช้ในการผสมเกสรแล้ว วิธีการเก็บละอองเกสรในการทดลองนี้ใช้วิธีตัดส่วนของอับละอองเกสรที่แตกแล้วใส่ไว้ในจานแก้วที่ปิดฝาแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น หากสามารถเก็บละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien.ได้ยาวนานขึ้นอาจจะสามารถช่วยให้ผสมเกสรได้ยาวนานขึ้น

1.4 การผสมเกสรด้วยมือ

1.4.1 การผสมเกสรดองดึงด้วยละอองเกสรของ *G. rothschildiana O'Brien.*

การผสมเกสรดองดึงด้วยละอองเกสรของ *G. rothschildiana O'Brien.* ในระยะก่อนดอกบาน 1 วัน ในช่วงเวลา 8.00–12.00 น. ซึ่งมีรายงานว่าเป็นระยะที่ทำให้มีการติดเมล็ดมากที่สุดในการผสมพันธุ์ระหว่างดองดึงกับ *G. rothschildiana* O'Brien. (อมรรัตน์, 2536) หลังจากการผสมเกสรผ่านไป 6 ถึง 10 วัน พบว่ารังไข่เริ่มขยายขนาดขึ้นเล็กน้อย และหลังการผสมเกสรผ่านไป 12 ถึง14 วัน พบว่ารังไข่ไม่มีการขยายขนาดเพิ่มขึ้นและออวุลที่อยู่ภายในส่วนใหญ่เหี่ยวและลีบ

เกือบทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ สราวุฒิ (2536) ที่รายงานว่าการผสมเกสรของดองดึงด้วยละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. หลังการผสมเกสร 14 และ 21 วัน รังไข่ส่วนหนึ่งจะเหี่ยวแห้งไปและมีบางส่วนเท่านั้นที่ขยายขนาดขึ้นเพียงเล็กน้อยและรายงานของอมรรัตน์ (2536) พบว่าหลังผสมเกสรนาน 1 เดือน รังไข่มีการขยายขนาดขึ้นเล็กน้อยและยังมีสีเขียวอยู่เมื่อผ่าดูภายในพบเมล็ดขนาดเล็กสีขาวที่เหี่ยวและลีบทั้งหมด ซึ่งเมื่อเทียบกับรังไข่ที่ได้รับการผสมติดจากการผสมตัวเองของดองดึงจะเห็นความแตกต่างของขนาดได้อย่างชัดเจน ส่วนดอกที่ไม่ได้รับการผสมรังไข่จะเหี่ยวและแห้งไปภายใน 10 วัน

ปัญหาและอุปสรรคในการผสมพันธุ์ข้ามชนิดระหว่างดองดึงกับ *G. rothschildiana* O'Brien. นั้น การผสมไม่ติดอาจเกิดจากสาเหตุหลายประการเช่น

1. ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่เข้ามามีอิทธิพลต่อการผสมไม่ติด เนื่องจากต้น *G. rothschildiana* O'Brien. ไม่มีการปลูกในประเทศไทยซึ่งเป็นเขตร้อนชื้นจำเป็นต้องสั่งซื้อดอกจากประเทศฮอลแลนด์ซึ่งอยู่ในเขตอบอุ่น ซึ่งมีอุณหภูมิและความชื้นที่แตกต่างกันมาก และในช่วงที่มีการศึกษาอยู่นั้นเป็นช่วงฤดูฝนซึ่งในบางวันมีฝนตกและอากาศร้อนชื้นมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความชื้นที่ไม่คงที่ อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มีผลกระทบต่อละอองเกสรและการงอกหลอดละอองเกสรลงไปในก้านเกสรตัวเมีย ซึ่งยาวถึงกว่า 4 เซนติเมตร ทำให้ผสมไม่ติดและยิ่งละอองเกสรที่เก็บไว้หลายวัน ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำยิ่งทำให้ผสมติดยาก

2. อาจเนื่องมาจากปัจจัยภายในของพืชที่ทำให้การผสมพันธุ์ข้ามชนิดประสพผลสำเร็จน้อย ดังจะเห็นได้จากผลการทดลองการผสมพันธุ์ข้ามชนิดระหว่างดองดึงกับ *G. rothschildiana* O'Brien. พบว่ามีการขยายขนาดของรังไข่และออวุลเพิ่มขึ้นได้เพียงเล็กน้อยหลังการผสมเกสรผ่านไป 6-10 วันเท่านั้น แต่จะเกิดอาการเหี่ยวและลีบของออวุลเกือบทั้งหมดหลังการผสมเกสรผ่านไป 12-14 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับรังไข่ของดองดึงที่ไม่ได้รับการผสมเกสรซึ่งจะเกิดการเหี่ยวแห้งตายไปภายใน 10 วัน ดังนั้นการผสมกันไม่ติดของพืชทั้งสองชนิดนี้น่าจะมาจากสาเหตุไซโกตไม่สามารถเจริญและพัฒนาได้ หรือไซโกตเจริญได้แต่เอ็มบริโอเกิดการตายในระยะใดระยะหนึ่งของการพัฒนา หรือเกิดการสลายไปของเอ็นโดเสปิร์ม เช่นในการศึกษาของ Morgan (1995) ที่ได้รายงานถึงการผสมข้ามชนิดระหว่าง *Limonium perigrimun* Bergius กับ *L. purpuratum* L. พบว่า

หลอดละอองเกสรสามารถงอกลงไปผสมกับไข่ได้และไซโกตสามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอได้ แต่เอ็มบริโอเกิดการตายในช่วงแรกของการพัฒนา นอกจากนั้นการผสมพันธุ์ข้ามชนิดในพืชสกุล *Cyclamen spp.*(Ishizaka and Uematsu,1995; Ishizaka,1996) พบว่าเอ็มบริโอเกิดการตาย และเอ็นโดเสปิร์มเกิดการสลายไป หลังการผสมเกสร 35 ถึง 42 วัน และในการศึกษาการผสมพันธุ์ข้ามชนิดในพืชสกุล *Alstroemeria spp.* (De Jeu and Garriga Caldere, 1996) พบว่าเอ็มบริโอมีการพัฒนาได้ช้ามากและมีลักษณะผิดปกติในการแบ่งเซลล์ ส่วนเอ็นโดเสปิร์มหยุดการพัฒนาหลังการผสมเกสร 12 วัน และเอ็มบริโอตายหลังการผสมเกสร 18 ถึง 22 วัน

3. จำนวนโครโมโซมของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ที่ใช้ในการผสมพันธุ์มีผลต่อความสำเร็จของงานทดลองมากพอสมควร ซึ่งการเลือกใช้พันธุ์พ่อที่มีจำนวนโครโมโซมน้อยกว่าพันธุ์แม่จะมีโอกาสได้รับพืชลูกผสมมากกว่าการใช้พันธุ์พ่อที่มีจำนวนโครโมโซมมากกว่าพันธุ์แม่ ซึ่งมีตัวอย่างในการผสมพันธุ์ข้ามชนิดระหว่างพืชในสกุล *Horderm spp.* (Bothmer และคณะ,1995) ซึ่งมีการใช้ *H. vulgare* (2n = 2x = 42) เป็นพันธุ์แม่และใช้ *H. lechleri* (2n = 2x = 14) เป็นพันธุ์พ่อทำให้ได้รับต้นพืชลูกผสมจำนวนมากและมีความหลากหลายของจำนวนโครโมโซม ในทางกลับกันเมื่อใช้ *H. lechleri* เป็นพันธุ์แม่และใช้ *H. vulgare* เป็นพันธุ์พ่อ พบว่าได้พืชลูกผสมจำนวนน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับการผสมพันธุ์ข้ามชนิดระหว่างดองดึง (2n=22) และ *G. rothschildiana* O'Brien. (2n=66) อาจเป็นไปได้ว่าการใช้ดองดึงซึ่งมีจำนวนโครโมโซมน้อยกว่าเป็นพันธุ์แม่นั้นอาจมีผลทำให้ผสมติดน้อยได้เช่นกัน ในการศึกษาต่อไปควรมีการทำ reciprocal cross โดยการใช้ *G. rothschildiana* O'Brien. เป็นพันธุ์แม่ด้วย แต่เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้มีข้อจำกัดดังได้กล่าวไว้แล้ว ดังนั้นจึงไม่สามารถที่จะทำการผสมพันธุ์แบบ reciprocal cross ได้ อย่างไรก็ดีการทดลองผสมเกสรบนช่อดอกที่ตัดมาแช่ในสารละลายช่วยยืดอายุไม้ตัดดอกก็อาจเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่น่านำมาทดลองเพื่อทำ reciprocal cross โดยใช้ *G. rothschildiana* O'Brien. เป็นพันธุ์แม่ และใช้ดองดึงเป็นพันธุ์พ่อ และใช้เทคนิคการช่วยชีวิตเอ็มบริโอร่วมด้วยก็น่าจะมีโอกาสได้พืชลูกผสมได้เช่น

1.4.2 การผสมพันธุ์ดองดึงด้วยละอองเกสรของดองดึง

การผสมพันธุ์ดองดึงด้วยละอองเกสรของดองดึง พบว่าหลังผสมเกสร 1-2 สัปดาห์ รังไข่ของดองดึงมีการขยายขนาดใหญ่ขึ้นอย่างรวดเร็วและมีการติดเมล็ดตามปกติจนฝักแก่และแตก มีเมล็ดสีแดงส้มจำนวนประมาณ 20-30 เมล็ดต่อฝัก ซึ่งมีความแตกต่างจากฝักของดองดึงที่ผสมข้ามด้วยละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. ซึ่งมีการติดฝักแต่ฝักไม่ขยายขนาดและออวุลที่อยู่ภายในเหี่ยวและลีบทั้งหมดเมื่อเวลาผ่านไปหนึ่งเดือน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ อมรรัตน์ (2536)

1.5 การศึกษาการงอกของหลอดละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. บนยอดเกสรตัวเมียและในก้านเกสรตัวเมียของดองดึง

การศึกษาการงอกของหลอดละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. บนยอดเกสรตัวเมียและในก้านเกสรตัวเมียของดองดึง ซึ่งพบว่าหลังการผสมเกสรนาน 24 ชั่วโมง สามารถพบการเจริญของหลอดละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien บนยอดเกสรตัวเมียของดองดึงได้ แต่ไม่สามารถตรวจสอบได้ว่าการเจริญของหลอดละอองเกสรสามารถเจริญในก้านเกสรตัวเมียของดองดึงได้มากน้อยเพียงใด เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องของสารเคมี อุปกรณ์ และวิธีการที่นำมาใช้ศึกษา อีกทั้งยอดเกสรตัวเมียและก้านเกสรตัวเมียของดองดึงมีขนาดใหญ่ยาวและแข็งมาก ดังนั้นจึงดัดแปลงวิธีการของ Shivanna และ Rangaswamy(1992) โดยการแช่ยอดเกสรตัวเมียและก้านเกสรตัวเมียของดองดึงใน Carnoy's solution (absolute ethyl alcohol : chloroform : glacial acetic acid 6:3:1) นาน 1 ชั่วโมง เพื่อทำให้เนื้อเยื่ออ่อนนุ่มลงและย้อมด้วยสี propiono-carmine 2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้สีติดส่วนของนิวเคลียสที่เคลื่อนที่มาตามหลอดละอองเกสร ซึ่งวิธีการดังกล่าวทำให้สามารถตรวจสอบการงอกของหลอดละอองเกสรได้ และจากสีที่ใช้ย้อมทำให้เห็นส่วนของหลอดละอองเกสรที่งอกบนยอดเกสรตัวเมียของดองดึงได้ชัดเจนขึ้น และพบ generative nucleus ของ *G. rothschildiana* O'Brien. ที่อยู่ภายในหลอดละอองเกสรบนยอดเกสรตัวเมียของดองดึง ดังแสดงในภาพที่ 2c และ 2d แต่ไม่สามารถติดตามการงอกของหลอดละอองเกสรลงไปในก้านเกสรตัวเมียและถึงออวุลได้

2. การเลี้ยงออวุลของดองดึงและออวุลของลูกผสมระหว่างดองดึงกับ *G. rothschildiana* O'Brien. ในหลอดทดลอง

2.1 การศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อที่ติดมากับฝักดองดึงในการเลี้ยงออวุลของดองดึง

จากการศึกษาของสราวุฒิ (2536) ที่เลี้ยงรังไข่ของดองดึงที่ผสมด้วยละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. ได้รายงานว่าประสพปัญหา contamination มาก จึงได้พยายามปรับปรุงเทคนิคการฆ่าเชื้อที่ผิวรังไข่เพื่อนำออวุลมาเลี้ยงในครั้งนี้ เมื่อเปรียบเทียบวิธีการทั้ง 4 วิธี พบว่าสามารถแก้ปัญหา contamination ได้เป็นอย่างดี คือ ทั้ง 4 วิธี ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์เลยเมื่อนำออวุลมาเลี้ยง ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงความประหยัดและการป้องกันอันตรายที่อาจเกิดกับออวุลแล้ว เนื่องจากความเป็นพิษของสารที่ใช้วิธีการที่ 1 คือ แช่รังไข่ใน 95% ethyl alchohol เขย่านาน 1 นาที จากนั้นย้ายรังไข่ไปแช่ใน 25% chlorox เขย่านาน 20 นาที น่าจะเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด เมื่อเทียบกับวิธีการที่ 2 คือ แช่รังไข่ใน 95% ethyl alchohol เขย่านาน 1 นาที จากนั้นย้ายรังไข่ไปแช่ใน 50% chlorox เขย่านาน 20 นาที ส่วนวิธีการที่ 3 มีการจุ่มรังไข่ดองดึงใน 95% ethyl alchohol แล้วผ่านเปลวไฟเป็นวิธีที่ประหยัดและสะดวกรวดเร็วดีแต่ควรให้แน่ใจว่าความร้อนจากเปลวไฟจะไม่ทำให้เกิดอันตรายกับออวุลที่อยู่ภายในรังไข่ได้ ส่วนวิธีการที่ 4 การตัดแยกรังไข่ดองดึงออกเป็นห้อง ๆ นั้น ต้องใช้ความปราณีตและเสียเวลามากกว่าวิธีอื่นและบางครั้งอาจพลาดทำผนังรังไข่แตกหรือฉีกขาดได้ ซึ่งจะเป็นช่องทางให้สารเคมีบางส่วนอาจซึมเข้าไปเป็นอันตรายต่อออวุลที่อยู่ภายในได้ในขณะที่แช่ใน 25% chlorox ดังนั้นวิธีการที่ 1 จึงถูกเลือกมาใช้ในการทดลองเลี้ยงออวุลของดองดึงและออวุลลูกผสมต่อไป

2.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงออวุลของดองดึงที่ผสมด้วยละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. และออวุลของดองดึงที่ผสมตัวเอง

จากผลการเลี้ยงออวุลลูกผสมระหว่างดองดึงกับ *G. rothschildiana* O'Brien.(ตารางที่ 4) พบว่าอายุของออวุลที่เหมาะสมในการนำมาเลี้ยง คือ 8 วันหลังการผสมเกสร ซึ่งมี 2 ออวุลใน 2 ขวดทดลองที่สามารถเจริญได้ คิดเป็น 0.22 เปอร์เซ็นต์ ของออวุลทั้งหมดที่ทำการทดลอง และสูตร

อาหารที่สามารถกระตุ้นการเจริญของออวุลดังกล่าวได้ คือ Induction medium สูตร I-3 หรือ MS+5% sucrose + 1.0 mg/l NAA การเจริญและพัฒนาของออวุลที่พบในอาหารสูตรนี้ คือ (ภาพที่ 4) เริ่มจากการงอกของเนื้อเยื่อที่มีลักษณะคล้าย radicle สั้นๆ ออกมาก่อนจากนั้นจึงเกิดเป็นกลุ่มเนื้อเยื่อแคลลัสสีขาวและขาวอมเหลืองและม่วงเป็นบางส่วนขึ้นจากเนื้อเยื่อที่งอกออกมาในระยะแรก และแคลลัสดังกล่าวมีการเจริญเพิ่มปริมาณขึ้นได้ ซึ่งน่าจะเป็นผลเนื่องมาจากปริมาณน้ำตาลที่สูงถึง 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งพลังงานที่เพียงพอและมี NAA ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญในกลุ่มออกซินในปริมาณ 1.0 mg/l มีผลกระตุ้นการงอกของออวุลและทำให้มีการแบ่งเซลล์ต่อไป เมื่อเนื้อเยื่อดังกล่าวเจริญออกมาสัมผัสอาหารมากขึ้นจึงเกิดเป็นเนื้อเยื่อแคลลัสซึ่งเพิ่มปริมาณได้ต่อไป จะเห็นว่าอาหารสูตร I-3 นี้น่าจะมีผลจำเพาะต่อการกระตุ้นการเจริญของเอ็มบริโอในออวุลหรือเมล็ดอ่อนของดองดึงลูกผสมโดยตรง เนื่องจากไม่พบการเจริญของเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆ เช่น บริเวณผิวของออวุลเลย นอกจากนั้นจากการทดลองแบ่งการเลี้ยงออวุลเป็นในที่มืดกับที่ได้รับแสงประมาณ 1,000 lux 16 ชั่วโมง/วัน พบว่าแสงมีส่วนช่วยกระตุ้นการเจริญและพัฒนาของออวุล ส่วนในที่มืดไม่พบการเจริญเลย

จากการทดลองครั้งนี้มีออวุลเพียง 0.22 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่งอกและสามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นแคลลัสและต้นพืชได้ จึงน่าจะมีการศึกษาต่อไปถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อความสำเร็จในการผสมข้าม ซึ่งมีทั้งปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอก สำหรับปัจจัยภายในนั้นจากการทดลองนี้พบว่าอายุของออวุลที่เหมาะสมที่จะนำมาเลี้ยงนั้นน่าจะเป็น 8 วันหลังผสมเกสร เนื่องจากมีออวุลจำนวน 2 ออวุล ที่สามารถเจริญได้ในขณะที่ออวุลอายุ 6 และ 10 วัน ไม่มีการเจริญเลย สิ่งที่จะช่วยยืนยันเสริมได้อีก คือ การตรวจสอบการปฏิสนธิว่าเกิดขึ้นได้มากน้อยเพียงใดและไซโกตพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอหรือไม่ มีปัญหาที่จุดใด จากขนาดของก้านเกสรตัวเมียของดองดึงที่มีความยาวถึงประมาณ 4 เซนติเมตร อาจเป็นไปได้ว่าการงอกหลอดละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien ในก้านเกสรตัวเมียของดองดึงดำเนินไปได้ช้ามาก เนื่องจากความไม่เหมาะสมของปัจจัยทางชีวภาพภายในพืชซึ่งเป็นอุปสรรคของการผสมพันธุ์ข้ามชนิด ซึ่งก่อนที่หลอดละอองเกสรจะเจริญไปถึงไข่ได้นั้นไข่ก็หมดความพร้อมในการรับการผสมจากเสปิร์มเสียแล้ว จึงไม่เกิดการปฏิสนธิขึ้น ดังนั้นออวุลที่นำมาเลี้ยงส่วนใหญ่จึงไม่มีไซโกตหรือเอ็มบริโอ และไม่สามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นต้น

พืชได้ ซึ่งมีการศึกษาของอมรรัตน์ (2536) รายงานว่าละอองเกสรของดองดึงสามารถงอกหลอดละอองเกสรได้ดี ในสารละลายน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนละอองของ *G. rothschildiana* O'Brien สามารถงอกหลอดละอองเกสรได้ดีในสารละลายน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากความแตกต่างของความสามารถในการงอกหลอดละอองเกสรในสภาพที่ต่างกันนี้ จึงนำไปสู่ข้อสันนิษฐานอีกประการหนึ่งของสาเหตุที่พืชทั้งสองชนิดนี้ผสมติดได้น้อย ออวุลที่นำมาเลี้ยงจึงงอกน้อยมาก

ปัจจัยภายนอกหลายปัจจัยก็อาจเป็นสาเหตุที่เป็นอุปสรรคต่อความสำเร็จในการช่วยชีวิตเอ็มบริโอ เช่น ปัจจัยในเรื่องส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงออวุล ซึ่งใน Induction medium ที่ใช้ในการทดลองนี้เลือกเติมน้ำตาลเพียงความเข้มข้นเดียว คือที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ซูโครสเท่านั้น นอกจากนั้นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชได้ทดลองใช้เพียงชนิดเดียว คือ NAA ซึ่งสารประกอบในกลุ่มของออกซินนั้นมีด้วยกันมากมายหลายชนิด เช่น IAA, IBA, NAA เป็นต้น และส่วนเป็นสารที่นิยมนำมาใช้ในการช่วยชีวิตเอ็มบริโอทั้งสิ้น (Samimy, 1991 ; Van Tuylและคณะ, 1991 ; Morganและคณะ, 1995 ; IshizakaและUematsu, 1995) นอกจากนี้ยังมีสารควบคุมการเจริญในกลุ่มอื่นๆ อีกที่มีการนำมาใช้ช่วยชีวิตเอ็มบริโอเช่นกัน แต่มีการใช้น้อยกว่า เช่น Cytokinin Gibberellin ฯลฯ (Morganและคณะ,1995 ; Samimy, 1991 ; Samimyและคณะ, 1996) รวมถึงปัจจัยแวดล้อม เช่น อิทธิพลในเรื่องของแสง อุณหภูมิ และ pH ซึ่งความเหมาะสมสำหรับพืชแต่ละชนิดอาจจะแตกต่างกันไป เช่น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเอ็มบริโอของมันฝรั่งอยู่ที่ 20 องศาเซลเซียส ส่วนในฝ้ายอยู่ที่ 32 องศาเซลเซียส เป็นต้น pH ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงจะอยู่ระหว่าง 5 ถึง 6 และมีบางรายงานพบว่า แสงจะเป็นตัวยับยั้งการเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอในช่วงแรกของการเจริญและพัฒนาในพืชบางชนิด (Sharma และคณะ, 1996) แต่สำหรับการเลี้ยงออวุลของดองดึงลูกผสม พบว่าแสงมีผลส่งเสริมการเจริญ ในขณะที่ในที่มืดไม่พบการเจริญเลย

ในการชักนำแคลลัสที่ได้จากออวุลลูกผสมให้เป็นต้นพืช เมื่อย้ายแคลลัสจากทั้งสองออวุลไปเลี้ยงใน Regeneration medium 4 ชนิด เปรียบเทียบกับสูตร I-1 พบว่าในอาหารสูตร R-1 (MS+ 3% sucrose + 0.1 mg/l NAA + 1.0 mg/l BAP) R-3 (MS+ 3% sucrose + 0.5 mg/l NAA + 4.0 mg/l BAP) และ I-1 (MS+ 5% sucrose + 0.1 mg/l NAA) แคลลัสสามารถเจริญพัฒนาไปเป็นยอดและ

รากได้ในเดือนที่ 3 โดยสูตร R-1 และ R-3 พบการเจริญเป็นยอดมากกว่าในสูตร I-1 (ตารางที่ 6) แสดงว่าการการเติม BAP ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญในกลุ่มไซโตไคนิน 1.0 และ 4.0 mg/l มีผลช่วยกระตุ้นการเกิดยอดได้ดีขึ้นกว่าการใช้ NAA เพียงอย่างเดียว แต่สัดส่วนของออกซิน-ไซโตไคนินก็มีความสำคัญต่อความสำเร็จในการกระตุ้นแคลลัสให้เจริญเป็นยอด ดังจะเห็นได้ว่า

สูตร I-1 ใช้ NAA 0.1 mg/l เพียงอย่างเดียว แคลลัสสามารถเจริญเป็นยอดได้ 2 ยอด

สูตร R-1 ใช้ NAA 0.1 mg/l + BAP 1.0 mg/l สัดส่วนออกซิน-ไซโตไคนิน 1:10 และสูตร R-3 ใช้ NAA 0.5 mg/l + BAP 4.0 mg/l สัดส่วนออกซิน-ไซโตไคนิน 1:8 แคลลัสเจริญเป็นยอดได้มากขึ้น

แต่สูตร R-2 ใช้ NAA 0.1 mg/l + BAP 4.0 mg/l สัดส่วนออกซิน-ไซโตไคนิน 1:40 และ

สูตร R-4 ใช้ NAA 1.0 mg/l + BAP 4.0 mg/l สัดส่วนออกซิน-ไซโตไคนิน 1:4

ไม่เหมาะสำหรับการเจริญของแคลลัสจากออวุลลูกผสมของคองดึงเลย เนื่องจากแคลลัสตายไปภายในเวลา 1 เดือน

ส่วนการเพิ่มจำนวนต้นพืชที่พัฒนามาจากแคลลัสนั้น (ภาพที่ 5) พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ดีใน Multiplication medium (MM) หรือ MS+3% sucrose + 4.0 mg/l BAP ซึ่งอมรรัตน์ (2540) ได้รายงานไว้ว่าเป็นสูตรที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงต้น *G. rothschildiana* O'Brien. ในหลอดทดลอง แต่เนื่องจากการเพิ่มจำนวนต้นพืชลูกผสม ใน Multiplication medium นี้ แม้จะทำให้ได้จำนวนยอดมากมายแต่ไม่มีราก จึงได้มีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการชักนำให้ต้นพืชลูกผสมเกิดรากในหลอดทดลอง เพื่อนำรากไปใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมโดยการตรวจนับจำนวนโครโมโซมในโซมาติกเซลล์ การชักนำให้ต้นพืชเกิดรากทดลองโดยย้ายยอดมาเลี้ยงในอาหารสูตร R-2 , R-3 และ R-4 ซึ่งได้มีการเติมออกซิน 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0.1, 0.5 และ 1.0 mg/l NAA ร่วมกับ 4.0 mg/l BAP ซึ่งในงานทดลองนี้ พบว่า Regeneration medium R-2 (MS+3% sucrose + 0.1 mg/l NAA+ 4.0 mg/l BAP) สัดส่วนออกซิน-ไซโตไคนิน 1:40 จะให้รากมีขนาดเล็กจำนวนน้อย เมื่อนำไปเคาะโครโมโซมแล้วไม่ค่อยพบเซลล์ระยะที่มีการแบ่งเซลล์ในระยะเมทาเฟส ส่วนใน Regeneration medium R-3 (MS+3% sucrose +0.5 m/l NAA+ 4.0 mg/l BAP) สัดส่วนออกซิน-ไซโตไคนิน 1:8 เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด ในการชักนำให้พืชลูกผสมเกิดรากในหลอด

ทดลอง เนื่องจากสามารถชักนำให้ต้นพืชลูกผสมเกิดรากจำนวนมาก ลักษณะรากมีสีขาวอวบใหญ่และยาว เมื่อนำไปศึกษาโครโมโซมพบว่ามีการแบ่งเซลล์ในระยะเมทาเฟสจำนวนมาก ทำให้สามารถตรวจนับจำนวนโครโมโซมในไซมาติกเซลล์ได้ดี สำหรับ Regeneration medium R-4 (MS+3% sucrose +4.0 mg/l BAP +1.0 mg/l NAA) สัดส่วนออกซิน-ไซโตไคนิน 1:4 นั้น ให้จำนวนรากมาก แต่เป็นรากที่มีลักษณะผิดปกติ คือ สั้นแน่นเป็นกระจุก เมื่อนำรากไปศึกษาโครโมโซมแล้วไม่ค่อยพบเซลล์ระยะที่มีการแบ่งเซลล์ในระยะเมทาเฟส

จากการเลี้ยงออวุลของดองดึงที่ผสมตัวเอง พบว่ามีเพียงออวุลเดียวซึ่งคิดเป็น 0.22 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับการเลี้ยงออวุลลูกผสม ที่สามารถเจริญเป็นต้นได้ใน Induction medium สูตร I-3 เช่นกันคือ MS+ 5%sucrose + 1.0 mg/l NAA จากอายุของออวุลหลังการผสมเกสร 10 วัน เมื่อเลี้ยงออวุลของดองดึงนาน 2 เดือน แต่การเจริญที่พบไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น ออวุลของดองดึงส่วนใหญ่ที่ไม่เจริญและพัฒนาเป็นต้นพืชนั้นจะมีการขยายขนาดในระยะแรกเป็นเมล็ดที่ใหญ่ขึ้น แต่ในที่สุดกลับมีลักษณะเป็นเมล็ดสีน้ำตาล แข็ง ขนาดประมาณ 2-2.5 มิลลิเมตร การทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ สราวุฒิ (2536) ที่ทดลองเลี้ยงรังไข่และออวุลของดองดึง และพบว่าออวุลส่วนใหญ่กลายเป็นสีน้ำตาลแข็งและไม่งอกมีเพียงออวุลเดียวเท่านั้นเกิดบาดแผลในระหว่างการ subculture ในสูตรอาหาร MS+5%sucrose +0.1 mg/l NAA และสามารถงอกเป็นต้นกล้า 1 ต้น แต่ในการศึกษาวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ ออวุลงอกเป็นต้นกล้าได้ในอาหารที่เติม 1.0 mg/l NAA แสดงว่า NAA ความเข้มข้น 0.1-1.0 mg/l สามารถกระตุ้นการงอกออวุลดองดึงให้เป็นต้นกล้าได้ แต่การที่ดองดึงผสมตัวเองงอกเป็นต้นได้น้อยน่าจะเป็นเพราะ dormancy จาก hard seed coat ที่พบในหลอดทดลองด้วย

3. การศึกษาจำนวนโครโมโซมของดองดึง *G. superba* Linn. *G. rothschildiana* O'Brien. และพืชลูกผสมระหว่างพืชทั้งสองชนิด

จากผลการศึกษาจำนวนโครโมโซมของดองดึง *G. superba* Linn. *G. rothschildiana* O'Brien. และพืชลูกผสมระหว่างพืชทั้งสองชนิดจำนวน 2 กลุ่มตัวอย่าง โดยใช้ปลายรากจากพืชที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อใน Regeneration medium R-3 (MS+3% sucrose +0.5 m/l NAA+ 4.0 mg/l BAP) นำมาเตรียมเซลล์แบบ Feulgen squash พบว่าการหยุดวงชีพเซลล์ (pretreatment) แล้วเก็บชิ้น

ส่วนเนื้อเยื่อไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาที่พบการแบ่งเซลล์ในระยะ metaphase มากและโครโมโซมหดสั้นดีที่สุด

ในการแยกเซลล์และย้อมสีโครโมโซม (hydrolysis-Feulgen squash) โดยนำเนื้อเยื่อปลายรากไปแยกเซลล์โดยใช้ 1 N.HCl (normal hydrochloric acid) ละลายผนังเซลล์ middle lamella ด้วยการอุ่นให้ร้อนถึง 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำให้โครโมโซมติดสีได้ดีที่สุด การแยกเซลล์ด้วยกรดดังกล่าวจะทำให้ เบส purine (adenine และ guanine) แยกจาก deoxyribose glucosidic bone ของดีเอ็นเอ ทำให้ได้หมู่ aldehyde ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ lecco-basic fuchsin (Schiff's reagent) เกิดสีม่วงแดง (กันยารัตน์, 2532)

จากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมในโซมาติกเซลล์ของพืชทั้ง 4 กลุ่มตัวอย่าง พบว่า ดองดึง *G. superba* Linn. ที่ใช้เป็นพันธุ์แม่มีจำนวนโครโมโซมในโซมาติกเซลล์ 2n = 22 แท่ง *G. rothschildiana* O'Brien. ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อมีจำนวนโครโมโซมในโซมาติกเซลล์ 2n = 66 แท่ง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Vijiyavalli และ Mathew (1992) และพืชลูกผสมจาก 2 กลุ่มตัวอย่างมีจำนวนโครโมโซมในโซมาติกเซลล์ 2n = 44 แท่ง ซึ่งสันนิษฐานว่าโครโมโซมจำนวน 11 แท่งมาจากพันธุ์แม่ และโครโมโซมจำนวน 33 แท่งมาจากพันธุ์พ่อ ซึ่งรวมกันได้จำนวนโครโมโซม 44 แท่ง ซึ่งเป็นหลักฐานที่ยืนยันได้ว่าต้นพืชที่ได้มีการเจริญและพัฒนามาจากไซโกตหรือไซโกติกเอ็มบริโอ ไม่ใช่เจริญและพัฒนามาจากโซมาติกเอ็มบริโอจากเซลล์ของออวุลที่นำมาเลี้ยง จากผลของการตรวจนับจำนวนโครโมโซมข้างต้นไม่สามารถบอกจำนวน basic number (x) ได้เนื่องจากงานทดลองนี้ไม่มีการจัดคาริโอไทป์

จากจำนวนโครโมโซมของพืชลูกผสมทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง มีจำนวนอยู่ระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ ซึ่งเป็นข้อมูลอย่างหนึ่งที่แสดงว่าพืชลูกผสมที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอ โดยการเลี้ยงออวุลในหลอดทดลอง เป็นต้นพืชลูกผสมจริง แต่ในงานทดลองนี้ยังไม่ได้เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชลูกผสมกับพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ เนื่องจากไม่สามารถแยกความแตกต่างของพืชลูกผสมกับพ่อและแม่ในหลอดทดลองได้ชัดเจน

การปลูกพืชพันธุ์พ่อพันธุ์แม่และลูกผสมในแปลงทดลอง เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกันเป็นงานวิจัยที่น่าสนใจซึ่งควรทำในโอกาสต่อไป