

บทที่ 4

ผลการศึกษา

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

1.1 การเตรียมพืชทดลอง

1.1.1 หลังปลูกดองคิงนาน 1-2 สัปดาห์ ดองคิงเริ่มงอกลำต้นขึ้นเหนือดิน เมื่อต้นสูงประมาณ 50 เซนติเมตร ต้นที่มีขนาดใหญ่จะแตกกิ่งแขนง 2-4 กิ่ง และเริ่มออกดอกหลังการงอกประมาณ 1-1.5 เดือน ดองคิงจะให้ดอกที่ใช้ผสมพันธุ์ได้ต้นละประมาณ 5-20 ดอก โดยจะทยอยบานเป็นเวลานานประมาณ 2-3 สัปดาห์

1.1.2 ช่อดอก *G. rothschildiana* O'Brien. จากประเทศซอลแลนค์ แต่ละช่อมักจะได้ออกที่บานและยังไม่บานจำนวนประมาณ 2-5 ดอก ซึ่งจะใช้ผสมเกสรไปได้ 7 วัน

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

ดองคิงและ *G. rothschildiana* O'Brien. เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ไม่มีก้านใบ ไม่มีกาบหุ้มใบ ใบมีรูปร่างคล้ายหอก ช่วงโคนกว้างแคบไปหาตอนปลาย ปลายใบแคบยาวและม้วนคล้ายมือเกาะ ทำหน้าที่ยึดเกาะพวงลำต้น ใบอ่อนที่ยอดม้วนเป็นหลอดตามความยาว ขนาดของใบ *G. rothschildiana* O'Brien. จะยาวและใหญ่กว่าใบของดองคิง ส่วนลำต้นของ *G. rothschildiana* O'Brien. จะมีปล้องยาวกว่าปล้องของดองคิง ดอกเป็นดอกเดี่ยวออกตามซอกใบ กลีบดอกมี 6 กลีบ ไม่ซ้อนกัน ดอกของ *G. rothschildiana* O'Brien. จะมีขนาดใหญ่กว่าดอกของดองคิง สิกกลีบดอก *G. rothschildiana* O'Brien. เป็นสีแดงเลือดนกหรือสีบานเย็น ขอบกลีบจะเป็นคลื่นเล็กน้อย ส่วนสีกลีบดอกดองคิงจะเป็นสีแดงหรือแดงส้ม ขอบกลีบเป็นคลื่นมาก มีอับละอองเกสร 6 อัน ยอดเกสรตัวเมีย และก้านเกสรตัวเมีย ทำมุมฉากกับรังไข่ ปลายของยอดเกสรตัวเมียแยกเป็น 3 แฉก รังไข่มี 3 carpel และก้านดอกของ *G. rothschildiana* O'Brien. จะยาวและแข็งกว่าก้านดอกของดองคิง ความ

แตกต่างของพืชทั้ง 2 ชนิด ที่เห็นได้ชัดเจนคือ สีของดอก ขนาดของดอก และความยาวก้านดอกที่ต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 1a และ 1b และตารางที่ 1



ภาพที่ 1 ลักษณะดอกของ (a) ดอกตั้ง *G. superba* Linn. (b) *G. rothschildiana* O'Brien.

บาร์ (bar) = 1 cm.

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของคองคิง *G. superba* Linn. และ *G. rothschildiana* O' Brien. จากค่าเฉลี่ยของพืชทั้งสองชนิดชนิดละ 10 ตัวอย่าง

ส่วนของพืช	คองคิง <i>G. superba</i> Linn.	<i>G. rothschildiana</i> O'Brien.
ลักษณะลำต้นเหนือดิน	ลำต้นมีสีเขียวอ่อน เลื้อย มีการติดของของใบแบบ alternate สลับกับ spiral และ opposite	ลำต้นมีสีเขียวเข้ม มีการติดของของใบแบบ alternate ปล้องยาวประมาณ 4 เซนติเมตร
ลักษณะใบ	ใบเดี่ยว ไม่มีก้านใบ ไม่มีกาบหุ้มใบ ใบรูปร่างคล้ายหอก ช่วงโคนกว้างเรียวไปหาตอนปลาย ปลายใบยืดยาวและม้วนคล้ายมือจับ	ใบเดี่ยว ไม่มีก้านใบ ไม่มีกาบหุ้มใบ ใบรูปร่างคล้ายหอก ช่วงโคนกว้างเรียวไปหาตอนปลาย ปลายใบยืดยาวและม้วนคล้ายมือจับ
สีของใบ	สีเขียวอ่อน (Y100 M40 C60)	สีเขียวสด (Y80 C80 BL60)
ความกว้างของใบ	2.77 เซนติเมตร	4.30 เซนติเมตร
ความยาวของใบ	13.32 เซนติเมตร	14.53 เซนติเมตร
ลักษณะดอก	ดอกเดี่ยว เกิดตามซอกใบ แต่หลอดดอกจะอยู่ชิดกัน กลีบดอกมี 6 กลีบ เมื่อดอกบานกลีบกระดกขึ้นไปรวมกันข้างบน ขอบเป็นคลื่นมาก	ดอกเดี่ยว เกิดตามซอกใบ แต่หลอดดอกจะอยู่ห่างกัน กลีบดอกมี 6 กลีบ เมื่อดอกบานกลีบกระดกขึ้นข้างบน กลีบกระดากแยกกัน ขอบเป็นคลื่นน้อย

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ส่วนของพืช	คองคิง <i>G. superba</i> Linn.	<i>G. rothschildia</i> O'Brien.
สีของดอก	ดอกที่บานใหม่มีโคนกลีบดอก สีเหลือง(Y40) ปลายกลีบสีแดง ส้ม(Y100 M100 BL 40) เมื่อ ดอกแก่กลีบดอกจะเปลี่ยนเป็น สีแดง (Y100 M100)	ดอกที่บานใหม่มีโคนกลีบดอก สีเหลือง(Y100 C20) ปลาย กลีบสีแดงเกือบคนหรือ บานเย็น(M80) เมื่อดอกแก่กลีบ ดอกจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง (Y20 M100 BL20)
ความกว้างของกลีบดอก	1.03 เซนติเมตร	2.14 เซนติเมตร
ความยาวของกลีบดอก	6.50 เซนติเมตร	7.41 เซนติเมตร
ความยาวของก้านดอก	12.00 เซนติเมตร	14.78 เซนติเมตร
ลักษณะของเกสรตัวเมีย	ยอดเกสรตัวเมียแยกเป็น3 แฉก เมื่อดอกตูมจะซ่อนอยู่ในกลีบ ดอกเมื่อดอกบานจะชี้ออกและ ตั้งฉากกับรังไข่	ยอดเกสรตัวเมียแยกเป็น3 แฉก เมื่อดอกตูมจะซ่อนอยู่ในกลีบ ดอกเมื่อดอกบานจะชี้ออกและ ตั้งฉากกับรังไข่
ความยาวก้านเกสรตัวเมีย	4.53 เซนติเมตร	4.83 เซนติเมตร
ลักษณะของอับละอองเกสร	มี 6 อัน กว้าง 0.23 เซนติเมตร ยาว 0.97 เซนติเมตร	มี 6 อัน กว้าง 0.30 เซนติเมตร ยาว 1.37 เซนติเมตร
ความยาวก้านอับละอองเกสร	4.06 เซนติเมตร	4.37 เซนติเมตร
ลักษณะของรังไข่	มี3carpel กว้าง 0.47 เซนติเมตร ยาว 1.08 เซนติเมตร	มี3carpel กว้าง 0.50 เซนติเมตร ยาว 1.27 เซนติเมตร

หมายเหตุ บันทึกสีใบและสีดอกโดยใช้ตารางเทียบสี ND color ของบริษัท สยามแกรฟฟิคเอเจนซี

จำกัด

1.3 การหาเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien.

พบว่าละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. ที่นำมาทดสอบการงอกในสารละลาย น้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ ก่อนการนำไปใช้ในการผสมเกสร ในวันแรกที่ดอกบานและอับ ละอองเกสรแต่ก็มีเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสรสูงถึง 91.47 เปอร์เซ็นต์ และจะมีเปอร์เซ็นต์ การงอกของละอองเกสรลดลงเมื่อเก็บละอองเกสรไว้ใช้ในการผสมเกสรเป็นเวลานานมากขึ้น เมื่อ ถึงวันที่ 7 วัน เปอร์เซ็นต์การงอกลดลงเหลือเพียง 52.55 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพ ที่ 2a และ 2b

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien.

ในน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์

วันที่ทำการทดสอบ นับจากวันดอกบาน	จำนวนละอองเกสร ทั้งหมด	จำนวนละอองเกสร ที่งอก	เปอร์เซ็นต์การงอก (%)
วันที่ 1	668	611	91.47
วันที่ 2	781	698	89.37
วันที่ 3	566	469	82.86
วันที่ 4	637	520	81.63
วันที่ 5	645	493	76.43
วันที่ 6	707	493	69.73
วันที่ 7	725	381	52.55

1.4 การผสมเกสรด้วยมือ

1.4.1 การผสมเกสรของดิ่งด้วยละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien.

ในการผสมเกสรของดิ่งด้วยละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. ในระยะ ก่อนดอกบาน 1 วัน ระหว่างช่วงเวลา 8.00-12.00 น. พบว่าหลังผสมเกสร 6 วัน กลีบดอกเริ่มเหี่ยว รังไข่มีการขยายขนาดเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ซึ่งมีขนาดยาวประมาณ 1.3-1.6 เซนติเมตร และกว้าง

ประมาณ 0.5-0.6 เซนติเมตร เมื่อแกะดูอวุลที่อยู่ภายในรังไข่ พบว่ามีการขยายขนาดเพิ่มขึ้นเล็กน้อย

หลังจากผสมเกสรผ่านไปได้ 12 วัน รังไข่มีการขยายขนาดเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อย ซึ่งมีความยาวประมาณ 1.5-1.8 เซนติเมตร และกว้างประมาณ 0.6 เซนติเมตร เมื่อแกะดูอวุลที่อยู่ภายในรังไข่พบว่าอวุลจะมีสีขาวซีด และสืบทั้งหมด ดังนั้นในการทดลองนำอวุลมาเลี้ยงในหลอดทดลอง เพื่อให้มีการเจริญพัฒนาเป็นต้นพืชในขั้นตอนที่ 2.2 จึงนำอวุลเฉพาะจากรังไข่ที่มีอายุหลังผสมเกสร 6 8 และ 10 วัน เท่านั้นมาทำการทดลอง

ส่วนรังไข่ของดอกคองคิงที่ไม่ได้รับการผสมเกสรจะเหี่ยวและสืบทั้งหมดหลังจากดอกบานได้ 10 วัน

1.4.2 การผสมเกสรคองคิงด้วยละอองเกสรของคองคิง

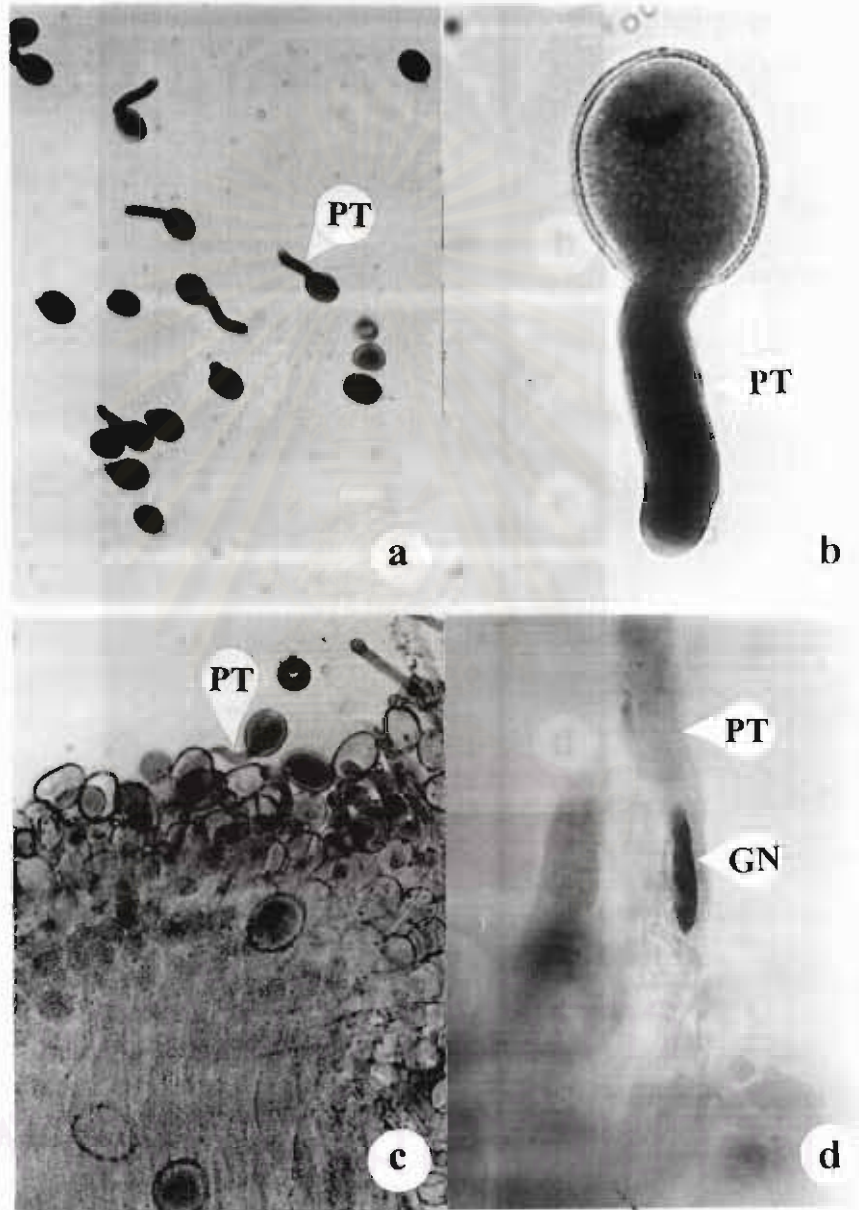
หลังผสมเกสร 6 ถึง 10 วัน กลีบดอกเริ่มเหี่ยวแต่ก้านเกสรตัวเมียยังไม่เหี่ยว ขนาดของรังไข่เริ่มขยายขนาดขึ้น มีความยาว 1.5-1.8 เซนติเมตร และกว้าง 0.6-0.8 เซนติเมตร เมื่อแกะดูอวุลที่อยู่ภายในรังไข่พบว่าอวุลมีการขยายขนาดเพิ่มขึ้น

หลังผสมเกสรผ่านไปได้ 12 ถึง 14 วัน กลีบดอกและก้านเกสรตัวเมียเหี่ยวทั้งหมด รังไข่มีการขยายขนาดเพิ่มมากขึ้น ซึ่งมีความยาวประมาณ 1.8-2.0 เซนติเมตร และกว้างประมาณ 0.8-1.0 เซนติเมตรดังแสดงในภาพที่ 2 เมื่อแกะดูอวุลที่อยู่ภายในรังไข่ พบว่ามีการขยายขนาดเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบการเจริญพัฒนาของรังไข่และอวุลที่อายุเท่ากัน รังไข่ของคองคิงที่ผสมตัวเองจะมีขนาดใหญ่กว่ารังไข่ที่ได้รับการผสมข้าม ดังแสดงในภาพที่ 3

1.5 การงอกหลอดละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. บนยอดเกสรตัวเมีย และในก้านเกสรตัวเมียของคองคิง

จากการตรวจดูการงอกหลอดละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. บนยอดเกสรตัวเมียและในก้านเกสรตัวเมียของคองคิงด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. สามารถงอกหลอดละอองเกสรบนยอดเกสรตัวเมียของคองคิงได้ และพบ generative nucleus ติดสีแดงเข้มอยู่ในหลอดละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien.

ดังแสดงในภาพที่ 2c และ 2d แต่ไม่สามารถติดตามการเจริญของหลอดละอองเกสรลงไปในก้าน
เกสรตัวเมียของคองคิงได้



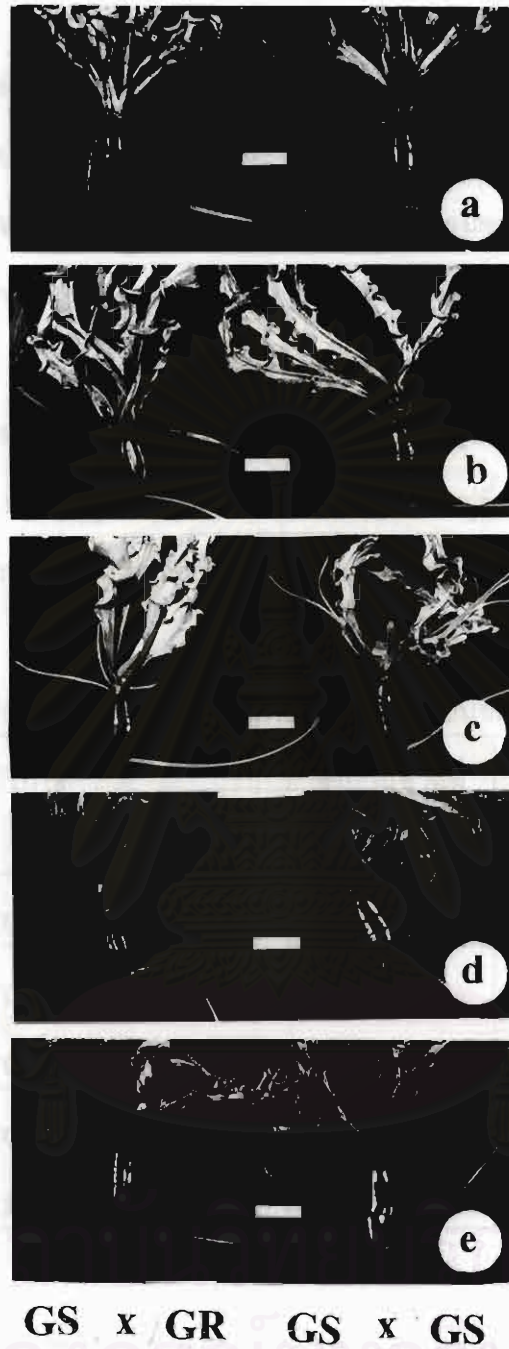
ภาพที่ 2 ลักษณะการงอกหลอดละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien.

PT = หลอดละอองเกสร GN = generative nucleus

(a) และ (b) ในสารละลายน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์

(c) และ (d) บนยอดเกสรตัวเมียของ *G. superba* Linn.

กำลังขยาย (a) 119X, (b) 825X, (c) 197X, (d) 825X



ภาพที่ 3 ลักษณะของรังไข่ของคองคิงหลังการผสมเกสร (a) 6 วัน, (b) 8 วัน, (c) 10 วัน, (d) 12 วัน และ (e) 14 วัน ซ้ายมือของภาพเป็นรังไข่ของคองคิงที่ผสมด้วยละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. ส่วนขวามือของภาพเป็นรังไข่คองคิงที่ผสมตัวเอง
GS = *G. superba* Linn., GR = *G. rothschildiana* O'Brien., บาร์ = 1 cm

2. การเลี้ยงออรูทของคองคิงและออรูทถูกผสมของคองคิง *G. superba* Linn. กับ

G. rothschildiana O'Brien. ในหลอดทดลอง

2.1 การศึกษาเทคนิคการฆ่าเชื้อที่ผิวเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อที่ติดมากับรังไข่ของคองคิงจากการทดลองใช้เทคนิคการฆ่าเชื้อที่ผิวรังไข่ของคองคิงทั้ง 4 วิธี ๆ ละ 20 ขวด ผลปรากฏว่าวิธีการทดลองทั้ง 4 วิธี สามารถฆ่าเชื้อที่ผิวของรังไข่ได้ดี เมื่อตัดแยกและนำออรูทมาเลี้ยงในอาหารที่เตรียมไว้ ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียบนออรูทที่นำมาเลี้ยงในหลอดทดลองเลย ดังแสดงในตารางที่ 3 และออรูทที่เลี้ยงส่วนใหญ่ขยายขนาดใหญ่ขึ้น เปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเขียวเรื่อๆ และเริ่มเหี่ยวแล้วกลายเป็นสีน้ำตาลคล้ายเมล็ดแก่จากฝักที่แตกแล้วแต่ไม่งอกเป็นต้นกล้า

ตารางที่ 3 ผลการศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อที่ติดมากับฝักคองคิง 4 วิธี

วิธีการ	จำนวนขวดที่ เลี้ยงทั้งหมด	จำนวนขวดที่ contamination	เปอร์เซ็นต์(%) contamination
วิธีการที่ 1 95% ETOH+ 25% chlorox	20	0	0
วิธีการที่ 2 95% ETOH+ 50% chlorox	20	0	0
วิธีการที่ 3 95% ETOH+ ผ่านไฟ	20	0	0
วิธีการที่ 4 95% ETOH แยกห้องรังไข่ แช่ใน 25% chlorox	20	0	0

2.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงออรูทของคองคิงที่ผสมด้วยละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. และออรูทของคองคิงที่ผสมตัวเอง

2.2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำการเจริญของออรูทของคองคิงที่ผสมด้วยละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. และออรูทของคองคิงที่ผสมตัวเอง

จากการทดลองใช้ Induction medium 3 สูตร เลี้ยงออรูทที่มีอายุ 6 , 8 และ 10 วัน หลังผสมเกสร และแบ่งเลี้ยงในที่มืด กับที่ได้รับแสง 1,000 lux 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4 การชักนำการเจริญของอสุภของดองคิงที่ผสมด้วยละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien.

Induction medium	อายุอสุภหลังผสมเกสร(วัน)	สภาพแสง	จำนวนขวดที่ทดลอง	จำนวนขวดที่พบการเจริญ	เปอร์เซ็นต์ขวดที่พบการเจริญ
I-1	6	มืด	50	-	-
		สว่าง	50	-	-
	8	มืด	50	-	-
		สว่าง	50	-	-
	10	มืด	50	-	-
		สว่าง	50	-	-
I-2	6	มืด	50	-	-
		สว่าง	50	-	-
	8	มืด	50	-	-
		สว่าง	50	-	-
	10	มืด	50	-	-
		สว่าง	50	-	-
I-3	6	มืด	50	-	-
		สว่าง	50	-	-
	8	มืด	50	-	-
		สว่าง	50	2	0.22
	10	มืด	50	-	-
		สว่าง	50	-	-

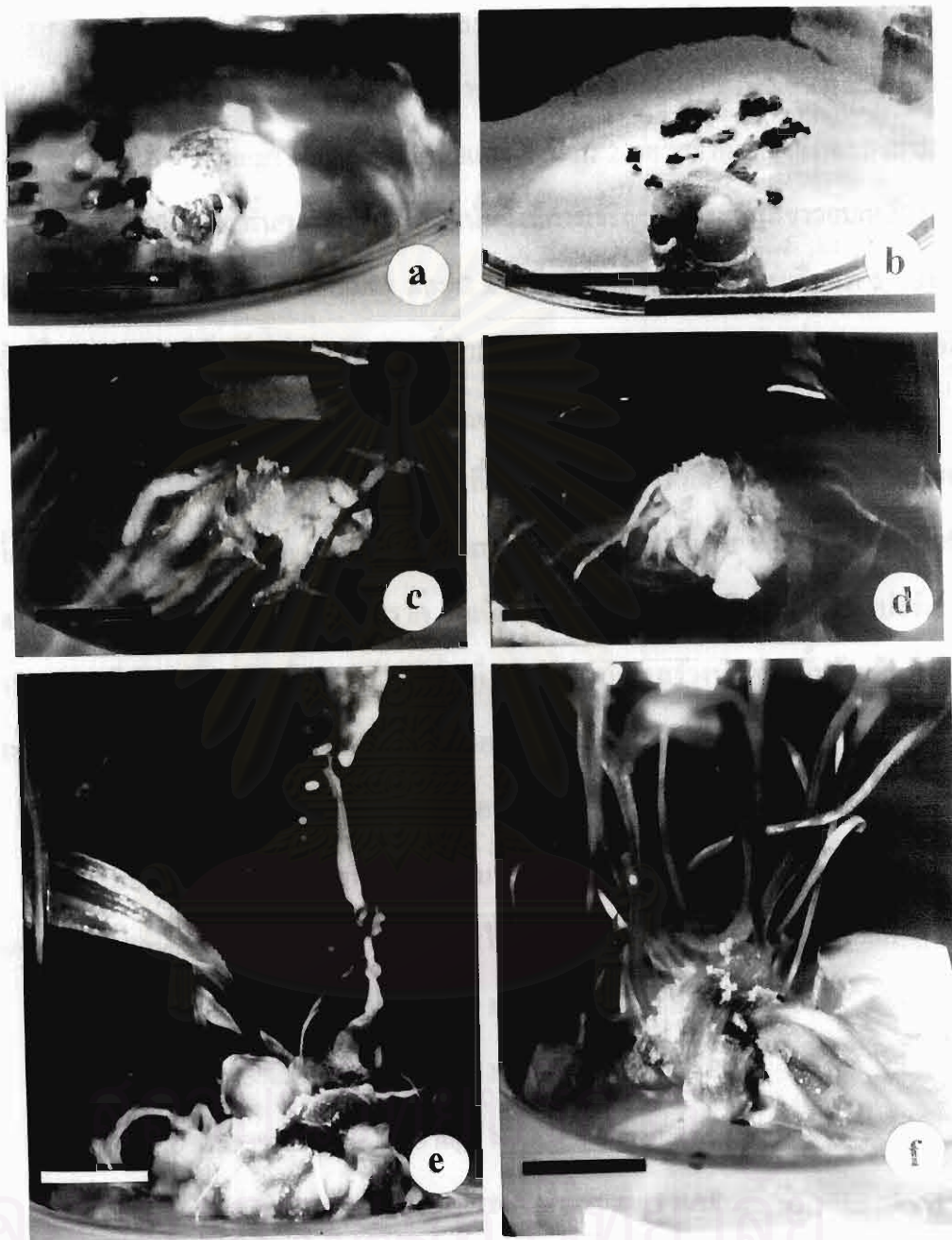
ตารางที่ 5 การชักนำการเจริญของอวูลของคองคิงที่ผสมตัวเอง

Induction medium	อายุอวูลหลังผสมเกสร(วัน)	สภาพแสง	จำนวนขวดที่ทดลอง	จำนวนขวดที่พบการเจริญ	เปอร์เซ็นต์ขวดที่พบการเจริญ
I-1	6	มืด	25	-	-
		สว่าง	25	-	-
	8	มืด	25	-	-
		สว่าง	25	-	-
	10	มืด	25	-	-
		สว่าง	25	-	-
I-2	6	มืด	25	-	-
		สว่าง	25	-	-
	8	มืด	25	-	-
		สว่าง	25	-	-
	10	มืด	25	-	-
		สว่าง	25	-	-
I-3	6	มืด	25	-	-
		สว่าง	25	-	-
	8	มืด	25	-	-
		สว่าง	25	-	-
	10	มืด	25	-	-
		สว่าง	25	1	0.22

ตารางที่ 6 การพัฒนาเป็นต้นพืชของเนื้อเยื่อแคลลัสจากอวูลที่ถูกผสมด้วยละอองเกสรของ

G. rothschildiana O'Brien. ใน Regeneration medium 4 สูตร และ Induction medium I-1

Regeneration medium	Inoculum	จำนวนขวดที่ทดลอง	พัฒนาการของเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้น
R-1 MS+3% sucrose + 0.1 mg/l NAA + 1.0 mg/l BAP	แคลลัสจาก อวูลที่ 1	1	แคลลัสมีพัฒนาการไปเป็นยอดสีเขียวขนาดเล็กในเดือนที่ 3 และพบมียอดเกิดขึ้นรวม 8 ยอด มีราก 9 ราก
R-2 MS+3% sucrose + 0.1 mg/l NAA + 4.0 mg/l BAP	แคลลัสจาก อวูลที่ 2	5	ไม่มีการเจริญ แคลลัสเปลี่ยนเป็น สีน้ำตาล และตายในเวลา 1 เดือน
R-3 MS+3% sucrose + 0.5 mg/l NAA + 4.0 mg/l BAP	แคลลัสจาก อวูลที่ 2	5	มี 1 ขวดที่พบการพัฒนาเป็นยอดขนาดเล็กและรากมากในเดือนที่ 3 ของการเลี้ยง แต่อีก 4 ขวดไม่มีการเจริญ แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในเวลา 1 เดือน
R-4 MS+3% sucrose + 1.0 mg/l NAA + 4.0 mg/l BAP	แคลลัสจาก อวูลที่ 2	5	ไม่มีการเจริญ แคลลัสเปลี่ยนเป็น สีน้ำตาล และตายในเวลา 1 เดือน
I-1 MS+5% sucrose + 0.1 mg/l NAA	แคลลัสจาก อวูลที่ 2	1	ในเดือนแรกแคลลัสเพิ่มปริมาณขึ้นและมีสีขาวและเขียว ต่อมาสามารถพัฒนาไปเป็นยอดขนาดเล็ก 2 ยอด และราก 5 ราก ภายใน 3 เดือน มีการเจริญต่อไปเป็น 2 ต้น และสร้างหัวขนาดเล็กที่โคนต้น



ภาพที่ 4 (a)ระยะแรกของออวูลที่งอกซึ่งต่อมาเจริญเป็นแคลลัส (b)ใน Induction medium (I-3)

(c) แคลลัสเริ่มพัฒนาเป็นยอดและรากใน Regeneration medium (R-1)

(d) แคลลัสเริ่มพัฒนาเป็นยอดและรากใน Induction medium (I-1)

(e) แคลลัสที่พัฒนาเป็นต้นพืชและสร้างหัวขนาดเล็กที่โคนใน Induction medium I-1

(f) ต้นพืชจำนวนมากที่พัฒนาจากแคลลัสใน Regeneration medium (R-3)

บาร์ = 1 cm

ผลปรากฏว่าการเจริญของออวูลของคองคิงที่ผสมด้วยละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. พบว่า มีออวูลอายุ 8 วัน หลังผสมเกสร ที่เลี้ยงใน Induction medium I-3 คือ MS + 5% sucrose + 1.0 mg/l NAA ในที่ได้รับแสง จำนวน 2 ออวูลจาก 2 ขวดทดลองสามารถงอกเป็นเนื้อเยื่อคล้าย radicle สั้นๆ ออกมาก่อนจากนั้นจึงมีการเจริญเป็นแคลลัสสีขาวอมเหลือง บางส่วนมีสีม่วงขนาดประมาณ 5 x 8 มิลลิเมตร และ 2 x 3 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในเดือนที่ 5 ของการเลี้ยง คิดเป็น 0.22 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนขวดที่ทำการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4 และภาพที่ 4 จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อแคลลัสไปทดลองเลี้ยงใน Regeneration medium ในขั้นตอนที่ 2.2.2 ต่อไป

ส่วนการเจริญของออวูลของคองคิงที่ผสมตัวเอง พบว่า มีออวูลอายุ 10 วัน หลังผสมเกสรที่เลี้ยงใน Induction medium I-3 ในที่ได้รับแสง เพียงออวูลเดียวจาก 1 ขวดทดลองเท่านั้นที่มีการพัฒนาไปเป็นต้นพืช 1 ต้น มียอดและราก ในเดือนที่ 2 ของการเลี้ยงคิดเป็น 0.22 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนขวดที่ทำการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 5 แต่ไม่พบการสร้างหัว จากนั้นย้ายต้นที่ได้ไปเพิ่มจำนวนต้นด้วย Multiplication medium ในขั้นตอนที่ 2.2.3 ต่อไป

2.2.2 การศึกษาสูตรอาหารเพื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เจริญจากออวูลให้พัฒนาเป็นต้นพืช

เมื่อย้ายเนื้อเยื่อแคลลัสที่เจริญออกมาจากออวูลที่ถูกผสมด้วยละอองเกสรของ *G. rothschildiana* O'Brien. จากอาหารสูตร I-3 มาเลี้ยงใน Regeneration medium 4 สูตร ได้แก่

R-1 คือ MS+3% sucrose + 0.1 mg/l NAA + 1.0 mg/l BAP

R-2 คือ MS+3% sucrose + 0.1 mg/l NAA + 4.0 mg/l BAP

R-3 คือ MS+3% sucrose + 0.5 mg/l NAA + 4.0 mg/l BAP

R-4 คือ MS+3% sucrose + 1.0 mg/l NAA + 4.0 mg/l BAP

Induction medium I-1 คือ MS+5% sucrose + 0.1 mg/l NAA

พบการตอบสนองของเนื้อเยื่อแคลลัสจากออวูลที่ 1 มีพัฒนาการไปเป็นยอดและราก ในอาหารสูตร R-1 ในเดือนที่ 3 ของการเลี้ยง และแคลลัสจากออวูลที่ 2 มีพัฒนาการไปเป็นยอดและราก ในอาหารสูตร R-3 และ I-1 ในเดือนที่ 3 ของการเลี้ยง ดังแสดงในตารางที่ 6 และภาพที่ 4 จากนั้นนำต้นลูกผสมที่ได้ไปเพิ่มจำนวนใน Multiplication medium (MM)

2.2.3 การเพิ่มจำนวนยอดของต้นคองคิงลูกผสม และคองคิงจากการเลี้ยงออกล

เมื่อย้ายยอดของต้นคองคิงลูกผสมและต้นคองคิงผสมตัวเองที่เกิดขึ้นในหลอดทดลอง มาเลี้ยงใน Multiplication medium (MM) คือ MS + 3% sucrose + 4.0 mg/l BAP พบว่า

ทั้งยอดของต้นคองคิงลูกผสมและต้นคองคิงผสมตัวเอง มีการเพิ่มจำนวนยอดได้มากมายและยอดเจริญขึ้นเป็นลำต้นค่อนข้างดี นอกจากนั้นยังสร้างหัวซึ่งมีลักษณะคล้ายหัวของคองคิงที่ปลูกในธรรมชาติ แต่มีขนาดเล็ก และสามารถ subculture เพิ่มจำนวนยอดได้ทุก 4 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามในอาหารสูตร MM นี้ ต้นพืชไม่มีราก (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ลักษณะต้นพืชที่เจริญเป็นยอดจำนวนมากภายใน Multiplication medium (MM) คือ MS + 3% sucrose + 4.0 mg/l BAP , 1 บาร์ = 1 cm

2.2.4 การชักนำให้เกิดรากในหลอดทดลองของยอดดองดิงลูกผสม ดองดิงผสมตัวเอง และ *G. rothschildiana* O'Brien.

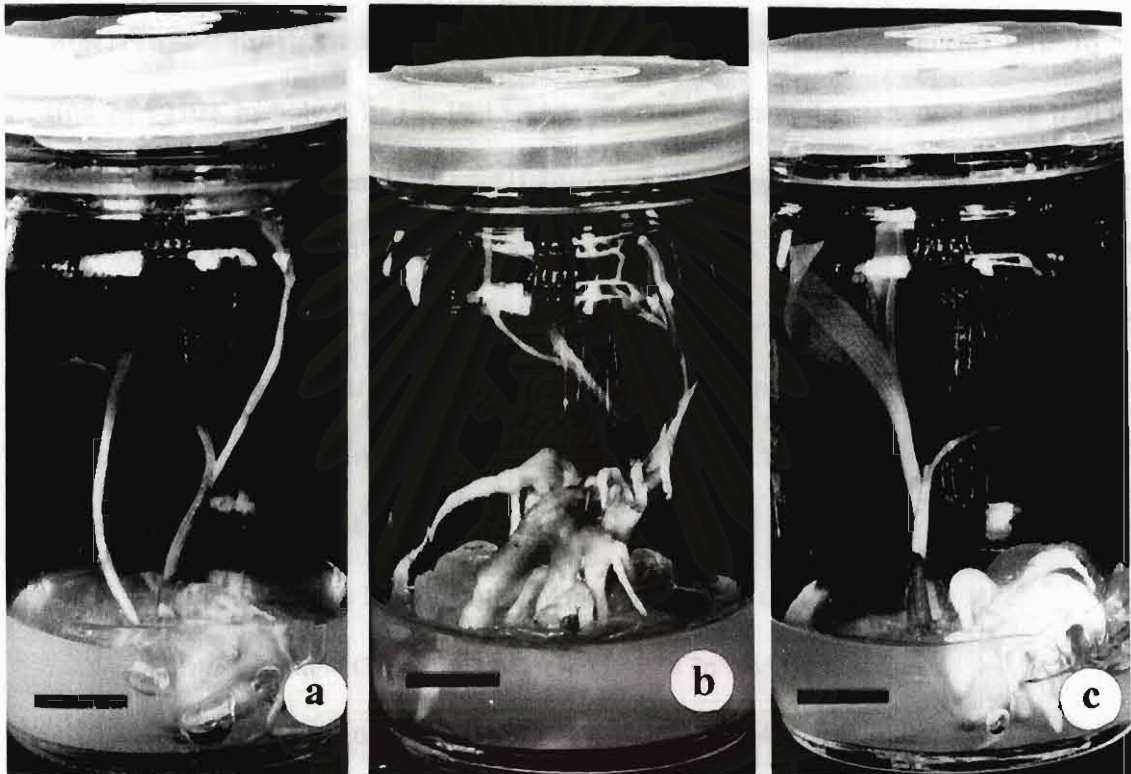
จากการทดลองเลี้ยงยอดของดองดิงลูกผสม ดองดิงผสมตัวเอง *G. rothschildiana* O'Brien. ในอาหารสูตร R-2 , R-3 และ R-4 อย่างละ 10 ขวด พบว่าพืชทั้ง 3 ชนิด ตอบสนองต่ออาหารทั้ง 3 สูตร คล้ายคลึงกัน เมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือน (ภาพที่ 6) คือ

ในอาหารสูตร R-2 (MS+ 3% sucrose + 0.1 mg/l NAA+ 4.0 mg/l BAP) มีราก 3-5 ราก แต่เป็นรากขนาดเล็กจำนวนน้อย ลำต้นและใบมีการเจริญเพียงเล็กน้อย ดังแสดงในภาพที่ 6a

ในอาหารสูตร R-3 (MS+ 3% sucrose + 0.5 mg/l NAA+ 4.0 mg/l BAP) มีรากเกิดขึ้น 10-15 ราก เป็นรากที่มีการเจริญดีมีขนาดใหญ่และยาว ส่วนลำต้นและใบมีการเจริญเพียงเล็กน้อย ดังแสดงในภาพที่ 6b

ส่วนในอาหารสูตร R-4 (MS+ 3% sucrose + 1.0 mg/l NAA+ 4.0 mg/l BAP) มีรากจำนวน 10-15 ราก แต่เป็นรากที่มีขนาดใหญ่สันเกิดเป็นกระจุกแน่น การเจริญของลำต้นและใบไม่สมบูรณ์เช่นกัน ดังแสดงในภาพที่ 6c

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 6 (a) ลักษณะต้นพืชที่เจริญเป็นยอดและรากใน Regeneration medium (R-2)

(b) ลักษณะต้นพืชที่เจริญเป็นยอดและรากใน Regeneration medium (R-3)

(c) ลักษณะต้นพืชที่เจริญเป็นยอดและรากใน Regeneration medium (R-4)

บาร์ = 1 cm

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

จากการเตรียมเซลล์แบบ Feulgen squash โดยใช้ปลายรากที่ได้จากการเลี้ยงพืชในหลอดทดลองที่เลี้ยงในอาหารสูตร R-3 (MS+ 3% sucrose + 0.5 mg/l NAA+ 4.0 mg/l BAP) โดยการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ในสารละลายอิมิดัวของ alphas-bromonaphthalene (pretreatment) นาน 16 20 และ 24 ชั่วโมง hydrolyze ใน 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 8 10 และ 12 นาที และแช่ในสีย้อม Schiff's reagent นาน 1 ชั่วโมง แล้วไปย้อมสี propiono carmine 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการแช่ปลายรากในสารละลายอิมิดัวของ alphas-bromonaphthalene นาน 24 ชั่วโมง ทำให้พบการแบ่งเซลล์ในระยะ metaphase จำนวนมากและมีการหดตัวของโครโมโซมดี นอกจากนั้นการ hydrolyze ปลายรากใน 1 N HCl นาน 10 นาที ทำให้แท่งโครโมโซมที่ย้อมด้วยสีของ Schiff's reagent ติดสีแดงเข้มสามารถเห็นแท่งโครโมโซมได้ชัดเจน และผลของการตรวณนับโครโมโซมในไซมาติกเซลล์ของพืช 4 กลุ่มตัวอย่าง พบว่า

ดองดึง *G. superba* Linn. มีจำนวนโครโมโซม $2n = 22$ แท่ง

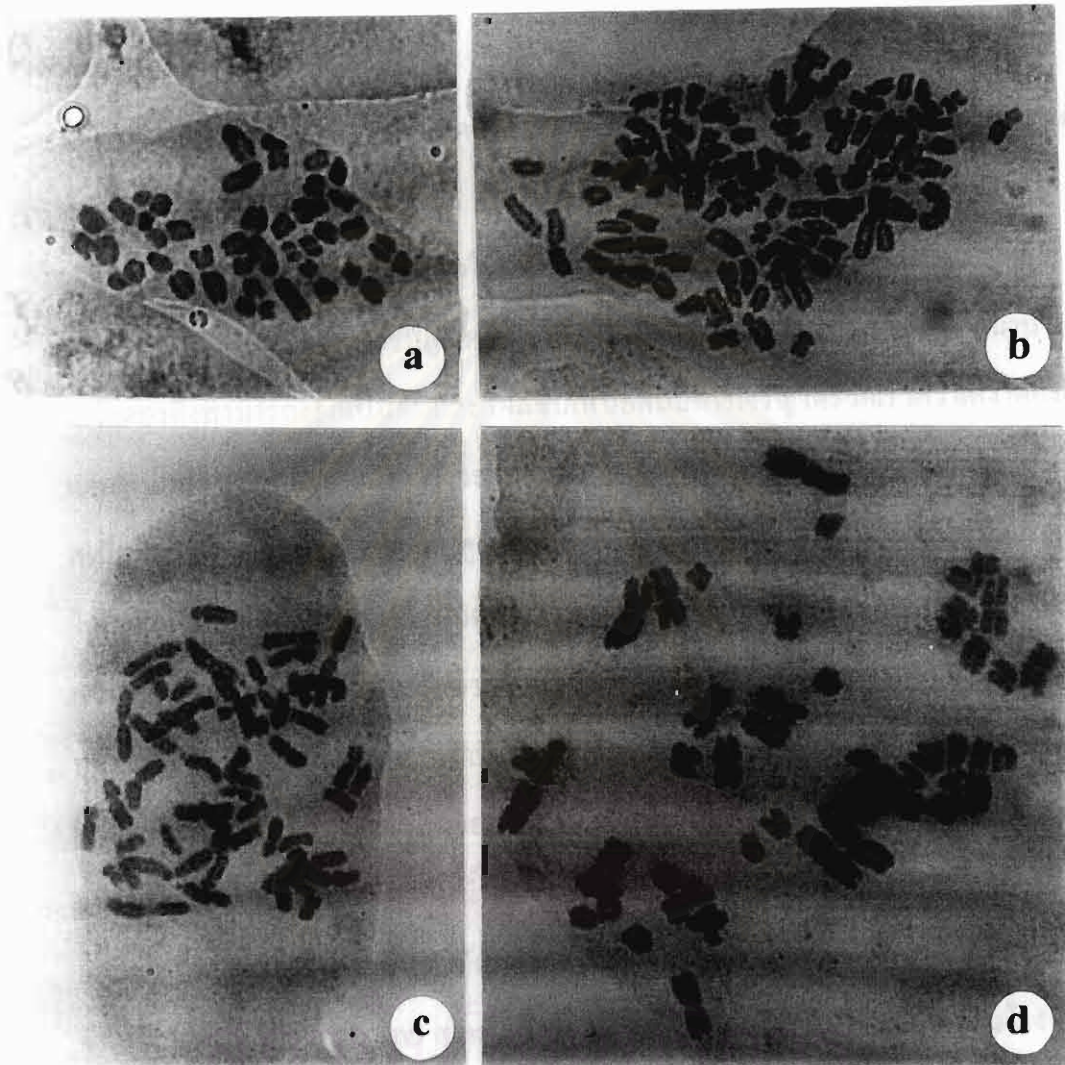
G. rothschildiana O'Brien. มีจำนวนโครโมโซม $2n = 66$ แท่ง

ต้นพืชลูกผสมจากออวูลที่ 1 มีจำนวนโครโมโซม $2n = 44$ แท่ง

ต้นพืชลูกผสมจากออวูลที่ 2 มีจำนวนโครโมโซม $2n = 44$ แท่ง

ดังแสดงในภาพที่ 7a 7b 7c และ 7d ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 7 จำนวนโครโมโซมในไซมาติกเซลล์ของ

- (a) ดอกดิ่ง *G. superba* Linn. มีจำนวน $2n = 22$ แท่ง (1283X)
 (b) *G. rothschildiana* O'Brien. มีจำนวน $2n = 66$ แท่ง (1283X)
 (c) ต้นพืชลูกผสมจากอวุลที่ 1 มีจำนวน $2n = 44$ แท่ง (1283X)
 (d) ต้นพืชลูกผสมจากอวุลที่ 2 มีจำนวน $2n = 44$ แท่ง (1944X)