รหัสโครงการ SUT3-304-44-12-45

รายงานการวิจัย

การผลิตข้าวโพด (*Zea mays* L.) ดับเบิลแฮพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

(Production of Doubled Haploid Maize (*Zea mays* L.) by Anther Culture)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-44-12-45

รายงานการวิจัย

การผลิตข้าวโพด (*Zea mays* L.) ดับเบิลแฮพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

(Production of Doubled Haploid Maize (*Zea mays* L.) by Anther Culture)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร.ปิยะดา ทิพยผ่อง

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

นายปริญญา ขจัดพาล

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2544

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ธันวาคม 2546

คำชี้แจง

รายงานวิจัยโครงการการผลิตข้าวโพด (*Zea mays* L.) ดับเบิลแฮพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรฉบับนี้ ครอบคลุมงานวิจัยที่ดำเนินการตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2544 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2546 ซึ่งยาวนานกว่าที่ตั้งเป้าหมายไว้ 14 เดือน ทั้งนี้เป็นผลจากการขาดความพร้อมด้านแปลงทดลอง ได้แก่ ความเหมาะสมของดินต่อการปลูกข้าวโพดต่ำ ฯลฯ และด้านห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ปัญหาไฟดับและเครื่องปรับอากาศเสียซึ่งเกิดขึ้นบ่อยครั้ง ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงจำเป็นต้องดำเนินการปลูก donor plants และทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเพิ่มเติมที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา ซึ่งมีความพร้อมมากกว่า ทำให้งานวิจัยสามารถสำเร็จลุล่วงได้ตามที่ตั้งเป้าหมายไว้ แต่เนื่องจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพดต้องใช้เวลานาน และยังมีเนื้อเยื่อบางส่วนที่ยังอยู่ในระหว่างการเจริญเติบโต ข้อมูลที่ปรากฏในรายงานนี้จึงยังไม่เสร็จสิ้นสมบูรณ์ และผู้วิจัยกำลังดำเนินการต่อเพื่อรวบรวมข้อมูลให้ได้สมบูรณ์ที่สุด แม้ว่าได้สิ้นสุดเวลาแล้วก็ตาม

หัวหน้าโครงการ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ ดร.ชะบา จำปาทอง และ รศ.ดร.ประภา ศรีพิจิตต์ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดพันธุ์ต่าง ๆ เพื่อใช้เป็น donor plants ให้คำแนะนำด้านการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร และให้ความเอื้อเฟื้อสถานที่เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรและแปลงปลูกข้าวโพด ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ และขอขอบคุณ ศ.ดร.อารีย์ วรัญญูวัฒก์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดพันธุ์ Pa 91 และคำแนะนำด้านการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร นอกจากนี้ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ และเจ้าหน้าที่สถานวิจัย สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตรที่ให้ความช่วยเหลือด้วยดีตลอดการดำเนินงาน โครงการวิจัยนี้ได้รับงบประมาณจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

ทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเพื่อผลิตข้าวโพดดับเบิลแฮพลอยด์ (DH) โดยใช้เทคนิค early transfer และใช้โพรนามีดเป็นสารเหนี่ยวนำการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม ร่วมกับการใช้ synchronization of cell cycle (SC) เพื่อเพิ่มจำนวนละอองเกสรที่อยู่ในระยะการแบ่งเซลล์ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตต้น DH เปรียบเทียบกับการไม่ใช้ SC ใช้ข้าวโพดพันธุ์แท้ 5 พันธุ์ และลูกผสมระหว่างข้าวโพดเขตร้อนและเขตอบอุ่น 9 คู่ผสม ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี พบว่าสามารถชักนำให้เกิด embryo-like structure (ELS) ได้ทุกจีโนไทป์ โดยลูกผสม Ki 3 x M 24 มีความสามารถในการชักนำให้เกิด ELS (EI) สูงที่สุดเท่ากับ 3.73 % และ 1.30 % เมื่อใช้และไม่ใช้ SC ตามลำดับ และการใช้ SC มีศักยภาพในการชักนำให้เกิด ELS เพิ่มขึ้น แต่เนื่องจาก ELS ที่ได้มีคุณภาพไม่ดีเพราะสภาพแวดล้อมในการปลูกและการเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสม จึงเกิดการพัฒนาของ ELS เป็นต้นเพียง 6 ต้น ซึ่งทุกต้นตายในระหว่างการเพาะเลี้ยง ทำการทดลองเพิ่มเติมที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ โดยเลือกเฉพาะลูกผสมคู่ที่ให้ค่า EI สูงที่สุด 3 คู่ พบว่าการใช้ SC มีศักยภาพในการชักนำให้เกิด ELS เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน แม้ว่า SC จะมีแนวโน้มในการลดความสามารถในการเกิดต้นเล็กน้อย แต่พบว่าความสามารถในการเกิดต้น DH (DRA) ความสามารถในการผลิตต้น DH (DPP) และดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซม (DI) มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อใช้ SC จีโนไทป์เป็นปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการเกิด ELS การเกิดต้น และการรอดชีวิตของต้นที่ชักนำได้ โดยพบว่าลูกผสม Agron 1 x Pa 91 ให้ค่า EI, DRA, DPP และ DI สูงที่สุดเท่ากับ 4.40 %, 2.90 %, 0.13% และ 0.34 เมื่อใช้ SC ตามลำดับ สภาพแวดล้อมในการปลูก donor plants และในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเป็นอีกปัจจัยที่สำคัญและทำให้ได้ค่า EI สูงกว่าการทดลองเดิมประมาณ 2.2 เท่า และได้ ELS คุณภาพดี สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ โดยเฉพาะลูกผสม Agron 1 x Pa 91 ประสบผลสำเร็จในการผลิตต้น DH ที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ (fertile) และสามารถผสมตัวเองได้จำนวน 2 ต้น อย่างไรก็ตามเมล็ดที่ได้ไม่สามารถพัฒนาจนเป็นเมล็ดที่สุกแก่สมบูรณ์และมีชีวิตได้

Abstract

Doubled haploid (DH) maize was produced by anther culture using the early transfer technique and pronamide as chromosome doubling agent together with the synchronization of cell cycle (SC) to synchronize the pollen cell cycle at the mitotic stage suitable for chromosome doubling. The objective was to increase the efficiency of DH production compared to control (not using SC). Five inbred lines and 9 hybrids between tropical and temperate varieties were used for anther culture at Suranaree University of Technology tissue culture laboratory. It was found that all genotypes were capable of embryo-like structure (ELS) induction. Ki 3 x M 24 gave the highest ELS induction (EI), 3.73 % and 1.30 % when using and not using SC, respectively. SC had the potential to increase EI, but the unsuitable environment lowered the ELS quality so that only 6 plantlets were obtained and all the plantlets died in culture. Additional experiment was conducted at the National Corn and Sorghum Research Center using only 3 hybrids with the highest EI. Similarly, it was found that SC had the potential to increase EI of all genotypes. Although SC slightly decreased regeneration ability (RA), it tended to increase DH regeneration ability (DRA), DH plant production (DPP) and doubling index (DI). Genotype is a major factor controlling EI, RA and survivability (S). Agron 1 x Pa 91 gave the highest EI, DRA, DPP and DI of 4.40 %, 2.90 %, 0.13 % and 0.34 when using SC, respectively. Another important factor is environment for donor plant growth and anther culture, which increased the EI *ca.* 2.2-fold over the previous experiment. In addition, good quality ELS capable of regeneration was obtained especially for Agron 1 x Pa 91. Two fertile DH plants had normal morphology and were able to self-pollinate. However, the selfing seeds were unable to fully develop into mature viable seeds.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย และการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
สมมุติฐานของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	4
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	5
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและวิจารณ์	13
บทที่ 4 สรุปและข้อเสนอแนะ	28
บรรณานุกรม	29
ภาคผนวก	32
ประวัติผู้วิจัย	36

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ความสามารถในการชักนำให้เกิด ELS จำนวนต้นที่ชักนำได้ และค่าดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซมของข้าวโพดจีโนไทป์ต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกรรมวิธีที่ใช้และไม่ใช้ synchronization of cell cycle ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 21

ตารางที่ 2 ความสามารถในการชักนำให้เกิด ELS ในการเกิดต้น และในการผลิตต้นของข้าวโพดลูกผสม เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกรรมวิธีที่ใช้และไม่ใช้ synchronization of cell cycle ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ 22

ตารางที่ 3 ความสามารถในการผลิตต้น DH ในการเกิดต้น DH และค่าดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซมของข้าวโพดลูกผสมเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกรรมวิธีที่ใช้และไม่ใช้ synchronization of cell cycle ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ 23

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การตายในระหว่างการเพาะเลี้ยง และหลังจากย้ายปลูกลงดิน และเปอร์เซ็นต์ต้นที่รอดชีวิตต่อต้นที่ชักนำได้ของข้าวโพดลูกผสม เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกรรมวิธีที่ใช้และไม่ใช้ synchronization of cell cycle 24

ตารางที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นดับเบิลแฮพลอยด์ (doubled haploid; DH) 25

ตารางที่ 6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นแฮพลอยด์ (haploid; H) 26

ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบของ induction medium (IM), regeneration medium (RM) และ growth medium (GM) 33

ตารางผนวกที่ 2 องค์ประกอบของสารละลายธาตุอาหาร Hoagland 34

ตารางผนวกที่ 3 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิด ELS ของข้าวโพด 14 พันธุ์ เมื่อใช้โพรนามีดร่วมกับการใช้และไม่ใช้ SC ซึ่งดำเนินการทดลองที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 34

ตารางผนวกที่ 4 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิด ELS เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น และเปอร์เซ็นต์การผลิตต้นของข้าวโพดลูกผสม 3 คู่ผสม เมื่อใช้โพรนามีดร่วมกับการใช้และไม่ใช้ SC ซึ่งดำเนินการทดลองที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ 35

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางผนวกที่ 5 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การผลิตต้น DH เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น DH และดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซมของข้าวโพดลูกผสม 3 คู่ผสม เมื่อใช้โพรนามีดร่วมกับการใช้และไม่ใช้ SC ซึ่งดำเนินการทดลองที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ 35

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แสดงขั้นตอนการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพด 10

1ก ลักษณะต้นข้าวโพดสำหรับเก็บช่อดอก (donor plants)

1ข การเตรียมช่อดอกเพื่อทำ pre-treatment

1ค การทำ pre-treatment ช่อดอก

1ง อับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงในอาหาร IM

1จ การใช้โพรนามีดเพื่อเหนี่ยวนำการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม

1ฉ การทำ synchronization of cell cycle

1ช การย้ายอับละอองเกสรจากอาหาร IM ลง RM

1ซ อับละอองเกสรในอาหาร RM ที่อยู่บนชั้นเพาะเลี้ยง

ภาพที่ 2 แสดงนิวเคลียสระยะต่าง ๆ ของละอองเกสรข้าวโพด 11

2ก นิวเคลียสในระยะ mid-uninucleate

2ข นิวเคลียสในระยะ late-uninucleate

2ค นิวเคลียสในระยะ early-binucleate

ภาพที่ 3 แสดงการเกิด ELS การเกิดต้น การปรับสภาพแวดล้อมก่อนย้ายปลูก
ลักษณะต้นข้าวโพดที่ย้ายปลูกลงดิน และการผสมข้าวโพดเพื่อเก็บเมล็ด 12

3ก ลักษณะการเกิด ELS

3ข ภาพขยายลักษณะการเกิด ELS

3ค ลักษณะการพัฒนาไปเป็นต้น

3ง ลักษณะต้นข้าวโพดที่มีทั้งยอดและราก

3จ ต้นข้าวโพดในอาหาร GM

3ฉ ต้นข้าวโพดที่อยู่ในสารละลาย Hoagland

3ช ลักษณะต้นข้าวโพดที่ย้ายปลูกลงดิน

3ซ ทำการผสมข้าวโพดเพื่อเก็บเมล็ด

ภาพที่ 4 แสดงลักษณะ และจำนวนโครโมโซมของต้นแฮพลอยด์และต้นดับเบิลแฮพลอยด์ 27

4ก ลักษณะของต้นแฮพลอยด์

4ข จำนวนโครโมโซมของต้นแฮพลอยด์ (n=10)

4ค ลักษณะของต้นดับเบิลแฮพลอยด์

4ง จำนวนโครโมโซมของต้นดับเบิลแฮพลอยด์ (2n=20)

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 4 แสดงลักษณะ และจำนวนโครโมโซมของต้นแฮพลอยด์และต้นดับเบิลแฮพลอยด์ (ต่อ) 27

4จ การแตกของอับละอองเกสรของต้นดับเบิลแฮพลอยด์

4ฉ ลักษณะการเกิดไหมของต้นดับเบิลแฮพลอยด์

4ช ลักษณะการเกิด tassel seed

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย และการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

ข้าวโพด (*Zea mays* L.) เป็นธัญพืชที่มีความสำคัญเป็นอันดับสามของโลกรองจากข้าวสาลีและข้าว โดยนำไปใช้เป็นแหล่งของแป้ง (คาร์โบไฮเดรต) และโปรตีนสำหรับมนุษย์และสัตว์ ซึ่งข้าวโพดมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงประมาณ 71 % แต่มีโปรตีนค่อนข้างต่ำประมาณ 9.5 % และมีกรดอะมิโนไลซีน และทริพโตเฟน (กฤษฎา สัมพันธารักษ์, 2531) นอกจากนี้ยังนำไปใช้ในด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น การผลิตแป้ง น้ำมันพืช น้ำตาล สบู่ สีทาบ้านและอีกมากมาย (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ และคณะ, 2541) ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกข้าวโพดประมาณ 7.38 ล้านไร่ และมีผลผลิตรวมประมาณ 4.21 ล้านตันต่อปี ซึ่งไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด ทำให้ต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศปีละ 67 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2545) ดังนั้น จำเป็นต้องมีการพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดให้มีคุณภาพและผลผลิตสูง เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด การสร้างข้าวโพดลูกผสม (hybrid varieties) นั้นเกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์แท้ตั้งแต่ 2-4 พันธุ์ เพื่อใช้ประโยชน์จากความดีเด่น (heterosis) ของลูกผสม โดยปกติการสร้างข้าวโพดพันธุ์แท้จะต้องทำการผสมตัวเอง 5-7 ชั่ว เพื่อให้ยีนทุกคู่อยู่ในสภาพโฮโมไซกัส (homozygous) ที่สูงเพียงพอ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ, 2540) อีกวิธีการหนึ่งคือการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร (anther culture) เพื่อทำให้ได้พืชที่เป็นแฮพลอยด์ (haploid; H) หรือโมโนพลอยด์ (monoploid) ซึ่งเมื่อนำไปชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม (doubling chromosome) จะทำให้ได้พืชที่เป็นโฮโมไซกัสดิพลอยด์ (homozygous diploid) อย่างสมบูรณ์ วิธีดังกล่าวจะช่วยลดระยะเวลาในการสร้างพันธุ์แท้ให้เหลือเพียง 1 ชั่ว และพันธุ์แท้ที่ได้จะมีการถ่ายทอดลักษณะที่คงที่ (stable inheritance; Saisingtong, 1998) Wu et al. (1983) ได้พัฒนาข้าวโพดพันธุ์แท้ชื่อ Qun Hua จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรโดยใช้เวลาเพียง 1 ปี เป็นการลดระยะเวลาได้ถึง 4-6 ปี

ข้าวโพดเป็นพืชที่มีอัตราการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยธรรมชาติ (spontaneous chromosome doubling) เพียง 22 % เมื่อเปรียบเทียบกับพืชอื่น เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าว และ ยาสูบ ซึ่งมีอัตราการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยธรรมชาติ 88, 59 และ 46 % ตามลำดับ (Dieu and Beckert, 1986) และมีอัตราการชักนำให้เกิดต้น (regenerated plant; RP) ต่ำ คือประมาณ 0-11.7 ต้นต่อ 100 อับละอองเกสร (Petolino and Jones, 1986) จึงมีผู้ทดลองเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรโดยการปรับเปลี่ยนสูตรอาหารเพาะเลี้ยง เช่น การเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 12 % และ casein hydrolysate ซึ่งมีผลทำให้ละอองเกสรตัวผู้มีการพัฒนาดีขึ้น (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, 2540) การเติมกลูโคส 25 กรัมต่อลิตร และไคเนติน (kinetin) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้มีการพัฒนาของเอ็มบริโอ (embryo) และการชักนำให้เกิดต้นดีขึ้น (Barloy and Beckert, 1993) เมื่อไม่นานนี้ Saisingtong (1998) ได้ปรับปรุงเทคนิคการ

เพาะเลี้ยงอับละอองเกสร โดยทำการย้ายอับละอองเกสรไปยังอาหารชักนำให้เกิดต้นก่อนการปรากฏของ macroscopic embryo like structure (ELS; เทคนิค early transfer) จนได้อัตรา RP ถึง 7-20 ต้นต่อ 100 อับละอองเกสร และได้ลดระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงลงจากเดิม 2-3 สัปดาห์

จากงานวิจัยส่วนใหญ่ที่ทดลองใช้สารเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมชนิดต่าง ๆ เช่น โคลชิซิน (colchicine) โพรนามีด (pronamide) โอไรซาลิน (oryzalin) และ อะมิโพรฟอสเมทิล (amiprophosmethyl; APM) ในขณะทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเพื่อให้ได้ต้นดับเบิลแฮพลอยด์ (doubled haploid; DH) พบว่าโคลชิซินมีประสิทธิภาพสูงสุดในการชักนำให้ได้ต้น DH (Barloy and Beckert, 1993) โคลชิซินเป็นสารก่อกลายพันธุ์ที่นอกจากจะมีอำนาจในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ทำให้จำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นแล้ว ที่ความเข้มข้นสูงยังทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซม ซึ่งอาจเป็นผลทำให้ได้ต้นที่ผิดปกติ (Rotarenco, 2000) Saisingtong (1998) พบว่าการใช้โคลชิซินในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพดมีผลทำให้การสร้าง ELS ลดลง 30-50 % เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้ (กรรมวิธีควบคุม) ในทางตรงกันข้ามโพรนามีดซึ่งไม่ได้ทำลาย microtubule ทั้งหมด แต่ทำให้สั้นลงจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า และไม่ได้มีผลกระทบต่อการสร้าง ELS และ RP อย่างไรก็ตามโพรนามีดมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมต่ำกว่าโคลชิซินจึงเป็นผลให้อัตราการเกิด DH ในจีโนไทป์ส่วนใหญ่ต่ำกว่าโคลชิซิน ดังนั้นถ้าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มชุดโครโมโซมของโพรนามีดได้ อาจทำให้อัตราการเกิด DH สูงขึ้นกว่าเดิม จากการทดลองของ Rotarenco (2000) พบว่า การทำให้เซลล์มีระยะของวัฏจักรที่คล้ายกัน (synchronization of cell cycle; SC) โดยใช้อุณหภูมิต่ำที่ 2-4 °ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ข้าวโพดที่มี mitotic activity ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์ตอบสนองต่อสารชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซม จากการทดลองให้อุณหภูมิต่ำแก่ต้นกล้าแฮพลอยด์ของข้าวโพดเพื่อกระตุ้นให้เกิด SC ก่อนให้โคลชิซิน พบว่าวิธีนี้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม เช่น เมื่อใช้โคลชิซินความเข้มข้น 0.02 % ร่วมกับ SC ทำให้ได้ DH 12.7% ในขณะที่การให้โคลชิซินในสภาพเดียวกันโดยไม่ได้ทำ SC ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้น DH ได้เลย การนำเทคนิค SC มาใช้ในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพดจึงมีศักยภาพในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืช DH

ในประเทศไทยได้เริ่มมีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรแล้ว แต่ยังไม่ประสบผลสำเร็จมากนัก ปัญหาที่พบได้แก่ อัตราการเกิด RP และ DH ต่ำ DH มีลักษณะผิดปกติ และอัตราการตายของต้น DH สูง (กาญจนา รุจิพจน์, 2540) นอกจากนี้ยังพบว่าจีโนไทป์ของข้าวโพดในเขตร้อนมีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงที่ต่ำมาก เช่น KS6 และ SW3 มีการเกิด ELS เฉลี่ย ต่อ 100 อับละอองเกสร 0-5 และ 0-4.16 % ตามลำดับ และไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ (Saisingtong, 1998) อย่างไรก็ตาม ชะบา จำปาทองและคณะ (2537) พบว่าพันธุ์ข้าวโพดเขตอบอุ่นสามารถถูกชักนำให้เกิด ELS และต้นได้ดี และลักษณะการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวโพดเขตอบอุ่นสามารถถ่ายทอดไปยังพันธุ์ข้าวโพดเขตร้อนได้ เช่นเดียวกับ Saisingtong (1998) ซึ่งแสดงว่า ลูกผสม KS6 x

ETH-M22/4 (ETH-M22/4 เป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการชักนำให้เกิดต้นสูงจากประเทศสวิตเซอร์แลนด์) มีเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS ต่อ 100 อับละอองเกสร และ จำนวนต้นต่อ 100 อับละอองเกสร 26.9 และ 4.3 % ตามลำดับ และ ลูกผสม SW3 x ETH-M22/4 มีเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS ต่อ 100 อับละอองเกสร และจำนวนต้นต่อ 100 อับละอองเกสร 33.55 และ 1.35 % ตามลำดับ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้มีการนำพันธุ์ข้าวโพดเขตอบอุ่น Pa 91 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีอัตราการชักนำให้เกิด ELS สูงจากประเทศสหรัฐอเมริกา แต่มีลักษณะทางการเกษตรไม่ดีมาผสมกับข้าวโพดพันธุ์ไทย เพื่อให้มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรมากขึ้น และมีโอกาสได้พ่อแม่พันธุ์ที่มีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในเขตร้อนได้

การทดลองนี้จะใช้เทคนิค early transfer โดยย้ายอับละอองเกสรไปยังอาหาร RM หลังจากอยู่บนอาหาร IM เพียง 3 สัปดาห์ ก่อนจะมีการพัฒนาของ ELS ซึ่งช่วยเพิ่มจำนวนต้นที่ได้จากการชักนำให้มากขึ้น (Saisingtong, 1998) และใช้โพรนามีดความเข้มข้น 20 µM เป็นเวลา 3 วัน ซึ่ง ประภา ศรีพิจิตต์ และคณะ (2544) พบว่าสามารถเหนี่ยวนำการเพิ่มชุดโครโมโซมและทำให้เกิดจำนวนต้น DH สูงสุด และทำการเปรียบเทียบการใช้และไม่ใช้ SC เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืช DH การศึกษาการผลิตข้าวโพดดับเบิลแฮพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพด นอกจากอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพืช DH และแก้ปัญหาการเกิดต้น DH ที่ผิดปกติ เพื่อใช้เป็นแนวทางการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดต่อไปแล้ว ต้น DH สายพันธุ์ที่ได้จากพันธุ์ลูกผสมยังอาจสามารถนำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผลิตข้าวโพดลูกผสมได้โดยตรง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อปรับปรุงวิธีการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพดให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นและใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพดต่อไป
2. เพื่อเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวโพดลูกผสมระหว่างพันธุ์ไทยและ Pa 91 หรือ M72 ซึ่งอาจทำให้ได้พ่อแม่สายพันธุ์แท้ที่มีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในเขตร้อนได้ดี เพื่อนำไปใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผลิตข้าวโพดลูกผสมต่อไปในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นถึงการศึกษาวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตต้น DH ให้สูงขึ้น โดยการศึกษาอิทธิพลของ SC เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มี mitotic activity ในระหว่างการให้สารเหนี่ยวนำการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม (โพรนามีด) สำหรับ donor plants ใช้ข้าวโพดพันธุ์แท้ 5 พันธุ์ ได้แก่ Agron 1, Agron 18, Agron 20, Pa 91 และ M 72 และ ลูกผสม 9 คู่ผสม ได้แก่ Agron 1 x Pa 91, Agron 18 x Pa 91, Agron 20 x Pa 91, Pa 91 x Agron 1, Pa 91 x Agron 20, Agron 38 x M 72, Agron 43 x M 72, Agron 41 x W 1 และ Ki 3 x M 24 ทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจนได้ต้นพืช แล้วนำไปปลูกในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตัดปลาย

รากมานับจำนวนโครโมโซมในห้องปฏิบัติการ ทำการผสมตัวเองและเก็บเมล็ด เพื่อนำไปประเมินศักยภาพในการใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์เพื่อผลิตลูกผสมต่อไปในอนาคต

สมมุติฐานของการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพด สามารถผลิตต้น DH ที่มีความเป็น homozygosity 100 % ได้ภายในระยะเวลาเพียง 1 ชั่ว และต้นที่ได้สามารถนำไปคัดเลือกเพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผลิตข้าวโพดลูกผสมได้
2. การให้อุณหภูมิต่ำเพื่อให้เกิด synchronization of cell cycle อาจทำให้ประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมเพิ่มขึ้น
3. จีโนไทป์ข้าวโพดในเขตร้อนมีความสามารถในการผลิตต้น DH ที่ต่ำ ซึ่งถ้านำลูกผสมระหว่างพันธุ์ไทยกับ Pa 91 มาเพาะเลี้ยง อาจสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตต้น DH และมีโอกาสได้ต้น DH ที่มีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในเขตร้อนได้ดี เพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในอนาคต

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

1. ได้วิธีการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพดที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น
2. ต้นดับเบิลแฮพลอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของลูกผสมอาจสามารถนำมาใช้เป็นสายพันธุ์แท้ในการผลิตลูกผสมได้โดยตรง
3. ทราบถึงระดับความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวโพดแต่ละพันธุ์ เพื่อใช้เป็นหลักเกณฑ์ในการคัดเลือกพันธุ์เพื่อใช้ผลิตสายพันธุ์แท้โดยวิธีเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรในอนาคต

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 วัสดุ

2.1.1 พันธุ์ข้าวโพดที่ใช้สำหรับการวิจัยนี้คือ

2.1.1.1 ข้าวโพดพันธุ์แท้จำนวน 5 พันธุ์ คือ Agron 1, Agron 18, Agron 20 (ข้าวโพดพันธุ์ไทยที่ได้รับการพัฒนาจากภาควิชาพืชไร่นา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์), Pa 91 (พัฒนามาจาก Pennsylvania State University ประเทศสหรัฐอเมริกา) และ M 72 (พัฒนามาจาก Swiss Federal Institute of Technology ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีศักยภาพในการชักนำให้เกิด ELS สูง

2.1.1.2 ข้าวโพดลูกผสม F_1 จำนวน 9 คู่ผสม คือ Agron 1 x Pa 91, Pa 91 x Agron 1, Agron 18 x Pa 91, Agron 20 x Pa 91, Pa 91 x Agron 20, Agron 38 x M 72, Agron 43 x M 72, Ki 3 x M 24 และ Agron 41 x W 1

2.1.2 วัสดุที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการ เช่น สารเคมี เครื่องแก้ว คีมคีบ มีดผ่าตัด อลูมินัมฟอยล์ สำลี พาราฟิล์ม ฯลฯ

2.1.3 วัสดุการเกษตร เช่น ปุ๋ย กระถาง เวอร์มิคูไลท์ สารเคมีป้องกันและกำจัดศัตรูพืช เช่น เมตาแลกซิล, คาร์โบฟูราน 3 % G, ปุ๋ย N-P-K สูตร 15-15-15, 46-0-0 และ 13-13-21 ฯลฯ

2.1.4 วัสดุสำนักงาน เช่น กระดาษ กรรไกร ฯลฯ

2.2 อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ตู้ปลอดเชื้อ แท่นกวนสารละลาย เครื่องวัดระดับ pH ตู้อบความร้อน ชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เครื่องชั่งละเอียด กล้องจุลทรรศน์ หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ และห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.3 วิธีการ

วางแผนการทดลองแบบ 14 x 2 หรือ 3 x 2 factorial ใน CRD มี 2 ปัจจัย โดยปัจจัยที่ 1 คือ จีโนไทป์ข้าวโพด ประกอบด้วยพันธุ์แท้ 5 พันธุ์ และลูกผสม 9 คู่ผสม (สำหรับการทดลองที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี) และลูกผสม 3 คู่ผสม (Agron 1 x Pa 91, Agron 38 x M 72 และ Agron 43 x M 72; สำหรับทำการทดลองเพิ่มเติมที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ) และปัจจัยที่ 2 คือ วิธีการเพิ่มประสิทธิภาพการเพิ่มชุดโครโมโซมของโพรนามีด ซึ่งมี 2 กรรมวิธี คือ ใช้และไม่ใช้ synchronization of cell cycle (SC) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำ ประกอบด้วย อับละอองเกสรที่เลี้ยงในอาหารจำนวน 10-60 จานเพาะเลี้ยง (30 อับละอองเกสร / จานเพาะเลี้ยง)

ปลูกข้าวโพดพันธุ์ Agron 1, Agron 18, Agron 20, Agron 38 และ Agron 43 ซึ่งเป็นข้าวโพดพันธุ์ไทยที่ได้รับการพัฒนาจากภาควิชาพืชไร่นา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และข้าวโพดพันธุ์ Pa 91 และ M 72 ซึ่งมีศักยภาพในการชักนำให้เกิด ELS สูง

ทำการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสม Agron 1 x Pa 91, Pa 91 x Agron 1, Agron 18 x Pa 91, Agron 20 x Pa 91, Pa 91 x Agron 20, Agron 38 x M 72 และ Agron 43 x M 72 (ส่วนคู่ผสม Agron 41 x W 1 และ Ki 3 x M 24 ได้รับมาจากศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ) ทำการปลูกโดยใช้ระยะ 75 x 30 เซนติเมตร รองพื้นด้วยปุ๋ยสูตร 15–15–15 และ คาร์โบฟูราน 3 % G อัตรา 10 กรัม / ต้น / หลุม หลังปลูกประมาณ 30 วัน ใส่ปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) อัตรา 10 กรัม / ต้น และใส่ธาตุอาหารเสริมอัตรา 5 กรัม / 20 ลิตร หลังทำการผสมพันธุ์ประมาณ 14 วัน ใส่ปุ๋ย 13-13-21 อัตรา 10 กรัม / ต้น (ในกรณีผลิตเมล็ดพันธุ์) ทยอยปลูกทุกๆ 2 สัปดาห์ เพื่อให้มีอับละอองเกสรต่อเนื่องตลอดระยะเวลาในการทดลอง

เมื่อต้นข้าวโพดเจริญอยู่ในระยะที่สร้างช่อดอกตัวผู้ (tassel) จึงเก็บช่อดอกตัวผู้ที่อยู่ในระยะตั้งท้องมาทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร โดยใช้วิธีการและสูตรอาหารที่ดัดแปลงมาจาก กาญจนา รุจิพจน์ (2540) โดยมีขั้นตอนสรุปดังต่อไปนี้

วิธีการเลือกช่อดอก

เก็บช่อดอกตัวผู้ในระยะตั้งท้อง คือ ประมาณ 7 วัน ก่อนช่อดอกตัวผู้โผล่พ้นใบธง (ภาพที่ 1ก) เลือกช่อดอกที่อยู่ในระยะการพัฒนาที่พอดีไม่แก่ไม่อ่อนจนเกินไป สามารถตรวจสอบได้โดยบีบบริเวณโคนของช่อดอก หากอยู่ในระยะพอดี โคนช่อดอกจะแน่นและแข็ง หรืออาจตรวจสอบได้อีกวิธีหนึ่ง โดยการใช้มีดกรีดบริเวณโคนช่อดอก แล้วนำอับละอองเกสรมาแกะดูสีของอับละอองเกสรว่าอยู่ในระยะที่เหมาะสมหรือไม่ (ถ้าทั้ง 6 อัน มี 3 อัน ที่ขนาดใหญ่กว่า มีสีเหลืองสด และ แตกต่างจากอีก 3 อันที่เหลืออย่างชัดเจน แสดงว่าอับละอองเกสรอยู่ในระยะที่เหมาะสม แต่ถ้าหากอับละอองเกสรมีสีเหลืองอ่อนมาก หรือสีเขียวแสดงว่าอับละอองเกสรอยู่ในระยะที่อ่อนเกินไปหรือแก่เกินไปตามลำดับ ไม่เหมาะที่จะนำมาเพาะเลี้ยง)

เมื่อได้ช่อดอกตัวผู้ที่ต้องการแล้วนำมาทำ pre–treatment โดยการนำช่อดอกตัวผู้มาห่อด้วยกระดาษทิชชูที่พรมน้ำชุ่ม แล้วห่อทับด้วยอลูมินัมฟอยล์ (ภาพที่ 1ข) แล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 7 °ซ เป็นเวลา 10 - 14 วัน (ภาพที่ 1ค) นำช่อดอกตัวผู้ที่เก็บไว้เป็นเวลา 10-14 วัน มาตรวจดูระยะของละอองเกสรโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อที่จะเลือกเฉพาะช่อดอกที่ละอองเกสรมีนิวเคลียสอยู่ในระยะ late-uninucleate (ภาพที่ 2ข) ถึง early-binucleate (ภาพที่ 2ค) การคัดเลือกระยะของไมโครสปอร์ที่เหมาะสม ทำได้โดยการแบ่งช่อดอกออกเป็น 2 ส่วนคือ main branch และ side branch และแบ่ง main branch ออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนโคน ส่วนกลาง และส่วนปลายช่อดอก ส่วน side branch ก็แบ่งออกเป็น 3 – 4 ส่วน ตามความยาวและลักษณะของ side branch แล้วสุ่มดอกย่อยจากแต่ละส่วนส่วนละ 2 – 3 ดอก มาตรวจสอบระยะการพัฒนานิวเคลียสของไมโครสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ทำการฟอกฆ่าเชื้ออับละอองเกสรด้วยคลอร็อกซ์ 15 % และ 5 % ตามลำดับ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ในตู้ปลอดเชื้อ นำอับละอองเกสรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร induction medium (IM; ตารางผนวกที่ 1, ภาพที่ 1ง) โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม เพื่อให้ได้รับกรรมวิธีดังต่อไปนี้

A. ใช้โพรนามีดเป็นสารเหนี่ยวนำการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม (กรรมวิธีควบคุม)

B. ใช้โพรนามีดเป็นสารเหนี่ยวนำการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม และมีการเพิ่มประสิทธิภาพ โดยการใช้ synchronization of cell cycle (SC)

<u>กรรมวิธี A</u> : เลือกอับละอองเกสรขนาดใหญ่ 3 อันจาก 6 อันในหนึ่งดอกย่อย ทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรในอาหาร IM ที่มีโพรนามีด (20 μM) ที่อุณหภูมิ 14 °ซ เป็นเวลา 3 วันในที่มืด (ภาพที่1จ) ย้ายอับละอองเกสรไปเพาะเลี้ยงในอาหาร IM ที่ไม่มีโพรนามีด ที่อุณหภูมิ 14 °ซ เป็นเวลา 4 วันในที่มืด แล้วจึงย้ายอับละอองเกสรไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27 °ซ เป็นเวลา 7 วัน ในที่มืด

<u>กรรมวิธี B</u> : เลือกอับละอองเกสรเช่นเดียวกับ กรรมวิธี A ทำ SC โดยนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร IM ที่อุณหภูมิ 2-4 °ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ภาพที่1ฉ) หลังจากนั้นนำมาไว้ที่อุณหภูมิ 27 °ซ เป็นเวลา 7 ชั่วโมงก่อนย้ายไปยังอาหาร IM ที่มีโพรนามีด (20 μM) ที่อุณหภูมิ 14 °ซ เป็นเวลา 3 วัน แล้วย้ายไปยังอาหาร IM ที่ไม่มีโพรนามีด ที่อุณหภูมิ 14 °ซ เป็นเวลา 1 วัน แล้วจึงย้ายอับละอองเกสรไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27 °ซ เป็นเวลา 7 วัน ในที่มืด

หลังจากนั้นย้ายอับละอองเกสรทั้ง 2 กรรมวิธีไปไว้บนชั้นเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27 °ซ เป็นเวลา 7 วันให้แสงสว่างจากหลอดไฟ red white และ cool white ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำการย้ายอับละอองเกสรไปยังอาหาร regeneration medium (RM; ตารางผนวกที่ 1, ภาพที่ 1ช) นำไปเพาะเลี้ยงบนชั้นเพาะเลี้ยงโดยให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน (ภาพที่ 1ช) แล้วทำการตรวจนับจำนวน embryo-like structure (ELS) ทุก ๆ 2 สัปดาห์รวมทั้งสิ้น 3 ครั้ง (ภาพที่ 3ก, 3ข)

เมื่อเกิดต้น (plantlet) ในอาหาร RM (ภาพที่ 3ค, 3ง) ให้ย้ายต้นลงในอาหาร growth medium (GM; ตารางผนวกที่ 1; ภาพที่ 3จ) เมื่อต้นข้าวโพดมีใบ 3-4 ใบ รากยาวประมาณ 5 เซนติเมตร ทำการย้ายต้นข้าวโพดลงในสารละลาย Hoagland (ตารางผนวกที่ 2) 7 วันโดยครอบด้วยขวดพลาสติกใสเพื่อรักษาความชื้นและลดการคายน้ำ และเจาะรูระบายอากาศ (ภาพที่ 3ฉ) ตัดรากยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ต้นละ 2 ราก เพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซม ด้วยวิธี acetocarmine staining technique โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การหยุดวัฏจักรเซลล์ (pre-treatment) เพื่อที่จะยับยั้งการทำงานของสปินเดิลไฟเบอร์ ทำให้เซลล์ส่วนมากหยุดการแบ่งเซลล์อยู่ที่ระยะเมตาเฟสซึ่งโครโมโซมจะหดตัวสั้นที่สุดและกระจายตัวแยกออกจากกัน ไม่เกาะตัวกันเป็นกลุ่มก้อน โดยแช่รากในน้ำกลั่นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 7 °ซ

2. การหยุดการทำงานของเซลล์ (fixation) โดยการแช่เนื้อเยื่อในสารละลายคาร์นอย (เตรียมจาก 3 absolute ethanol : 1 glacial acetic acid) หรือ acetic acid 90 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อหยุดปฏิกิริยาและเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ เพื่อให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะการแบ่งเซลล์ที่ต้องการ โดยไม่ทำให้โครโมโซมบิดเบี้ยว ขยายขนาด หรือหดตัวลงไปอีก และเพื่อให้ส่วนประกอบของเซลล์คงรูปเดิมและมีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด

3. การเก็บรักษาเนื้อเยื่อ (storage) ทำการล้างกรดออกให้หมดด้วย 70 % เอทธานอล 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แล้วแช่เนื้อเยื่อไว้ใน 70 % เอทธานอล เก็บไว้ในห้องแช่แข็งได้นานถึง 6-12 เดือน

4. การแยกเซลล์และย้อมสีโครโมโซม (cell separation and staining of chromosomes) โดยการแช่เนื้อเยื่อรากในสีย้อม acetocarmine แล้วลนไฟให้เดือด เก็บไว้ 24 ชั่วโมง จึงตัดปลายรากยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร หยดด้วย glacial acetic acid 45 % 3 หยด ปิดด้วยแผ่นสไลด์ ลนไฟ เคาะเบาๆ ให้เซลล์มีการกระจายตัว เพื่อให้เห็นโครโมโซมได้ชัดเจน นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์

นำต้นข้าวโพดสายพันธุ์แท้ที่ได้ย้ายลงปลูกในสภาพดินปกติในโรงเรือนทดลอง (ภาพที่ 3ช)

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกจำนวนอับละอองเกสรเริ่มต้นที่ทำการเพาะเลี้ยง
2. ทำการนับจำนวน ELS บน RM ทุก 2 สัปดาห์ รวม 3 ครั้ง
3. ทำการนับจำนวนต้นที่เกิดขึ้นใน RM และหลังย้ายลง GM
4. ทำการนับจำนวนต้น DH
5. ทำการนับจำนวนต้นที่ตายระหว่างการเพาะเลี้ยง และหลังย้ายปลูกลงดิน
6. ทำการนับจำนวนต้นที่รอดชีวิต บันทึกการเจริญเติบโตและลักษณะต่าง ๆ ของต้นที่ได้หลังย้ายปลูกลงดิน (ความสูงต้นและฝัก จำนวนใบ เส้นรอบวงลำต้น วันออกไหม วันละอองเกสรแตก)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรโดยใช้ parameters ต่อไปนี้

1.1 ทำการนับการเกิด ELS ของอับละอองเกสรบน RM แล้วคำนวณหาความสามารถในการชักนำให้เกิด ELS ต่อ 100 อับละอองเกสร ตามสูตร

$$\text{ELS induction (EI) (\%)} = \frac{\text{จำนวน ELS}}{\text{จำนวนอับละอองเกสร}} \times 100$$

1.2 ทำการนับจำนวนต้นที่เกิดขึ้น แล้วคำนวณหาความสามารถในการเกิดต้นต่อ 100 ELS ตามสูตร

$$\text{Regeneration ability (RA) (\%)} = \frac{\text{จำนวนต้น}}{\text{จำนวน ELS}} \times 100$$

1.3 คำนวณหาความสามารถในการผลิตต้นต่อ 100 อับละอองเกสร ตามสูตร

$$\text{Plant production (PP) (\%)} = \frac{\text{จำนวนต้น}}{\text{จำนวนอับละอองเกสร}} \times 100$$

1.4 คำนวณหาความสามารถในการผลิตต้น DH ต่อ 100 อับละอองเกสร ตามสูตร

$$\text{DH plant production (DPP) (\%)} = \frac{\text{จำนวนต้น DH}}{\text{จำนวนอับละอองเกสร}} \times 100$$

1.5 คำนวณหาความสามารถในการเกิดต้น DH ต่อ 100 ELS ตามสูตร

$$\text{DH plant regeneration ability (DRA) (\%)} = \frac{\text{จำนวนต้น DH}}{\text{จำนวน ELS}} \times 100$$

1.6 คำนวณหาดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซม ตามสูตร

$$\text{Doubling index (DI)} = \frac{\text{จำนวนต้น DH}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}}$$

1.7 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตายในระหว่างการเพาะเลี้ยง ตามสูตร

$$\text{Death in culture (DC) (\%)} = \frac{\text{จำนวนต้นที่ตายในระหว่างการเพาะเลี้ยง}}{\text{จำนวนต้นที่ได้จากการชักนำ}} \times 100$$

1.8 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตายหลังย้ายปลูกลงดินในโรงเรือนทดลอง ตามสูตร

$$\text{Death after transplanting (DT) (\%)} = \frac{\text{จำนวนต้นที่ตายหลังย้ายปลูกลงดิน}}{\text{จำนวนต้นที่ได้จากการชักนำ}} \times 100$$

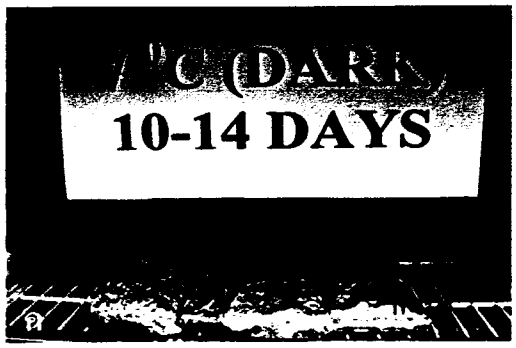
1.9 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ต้นที่รอดชีวิตต่อต้นที่ชักนำได้

$$\text{Survivability (S) (\%)} = \frac{\text{จำนวนต้นที่รอดชีวิต}}{\text{จำนวนต้นที่ได้จากการชักนำ}} \times 100$$

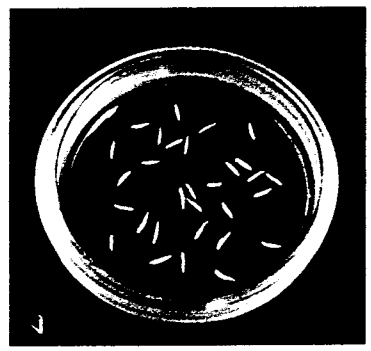
ปรับค่าเปอร์เซ็นต์ทั้งหมด โดยใช้ค่า Arcsine สูตร $\sqrt{X/100}$ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความปรวนแปรทางสถิติ (ANOVA) โดยใช้ F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับ 5%

ลักษณะต้นข้าวโพดสำหรับเก็บช่อดอก

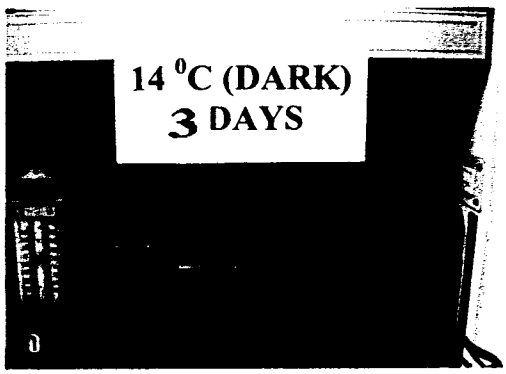
การเตรียมช่อเพื่อทำ pre-treatment



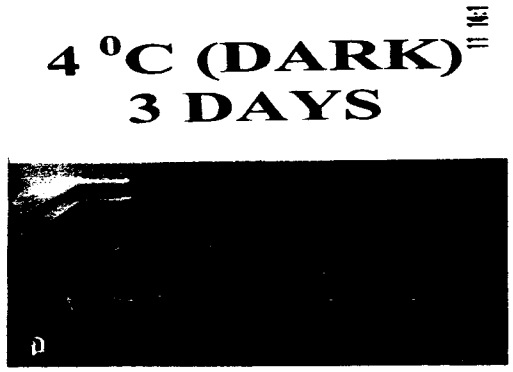
การทำ pre-treatment ช่อดอก



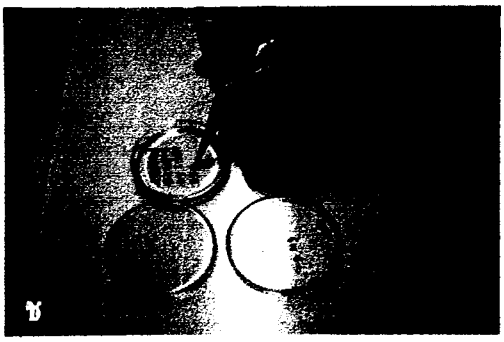
อับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงในอาหาร IM



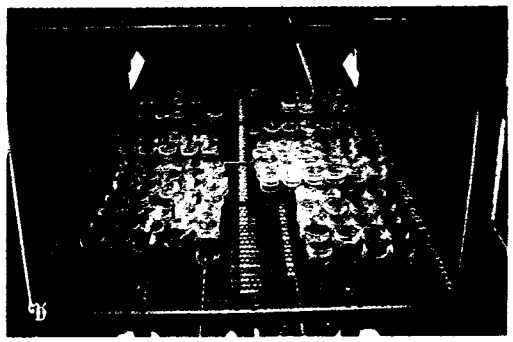
การใช้โพรนามีดเพื่อเหนี่ยวนำการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม



การทำ synchronization of cell cycle

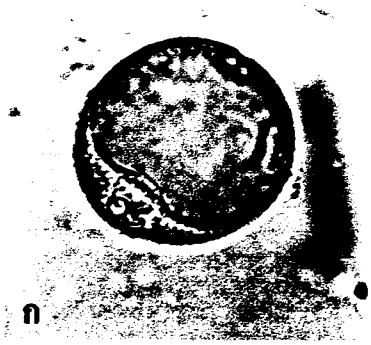


การย้ายอับละอองเกสรจากอาหาร IM ลง RM

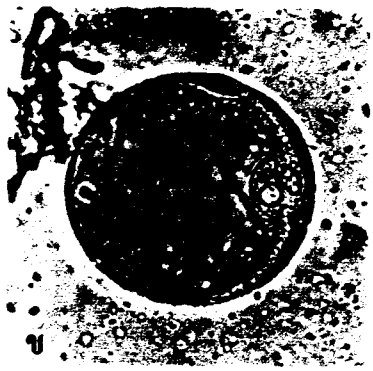


อับละอองเกสรในอาหาร RM ที่อยู่บนชั้นเพาะเลี้ยง

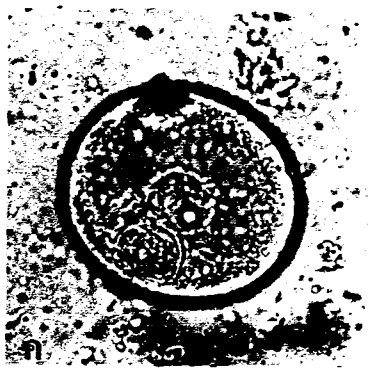
ภาพที่ 1 แสดงขั้นตอนการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพด



นิวเคลียสในระยะ mid-uninucleate

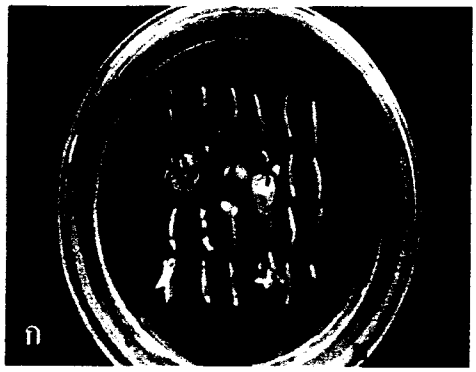


นิวเคลียสในระยะ late-uninucleate



นิวเคลียสในระยะ early-binucleate

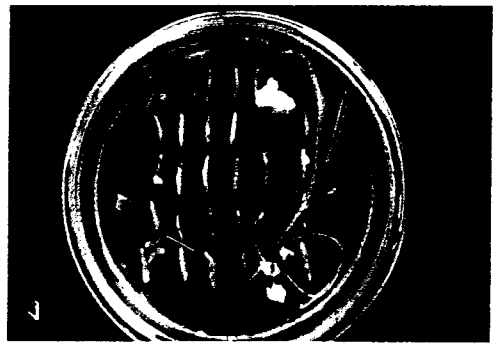
ภาพที่ 2 แสดงนิวเคลียสระยะต่าง ๆ ของละอองเกสรข้าวโพด



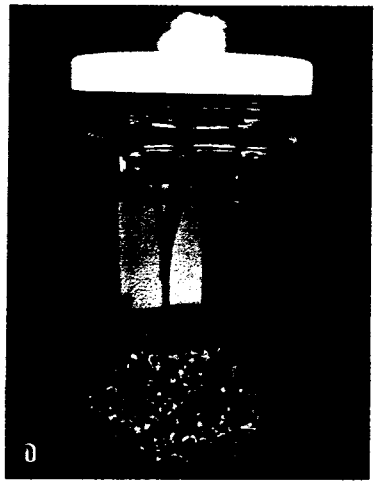
ลักษณะการเกิด ELS

ภาพขยายลักษณะการเกิด ELS

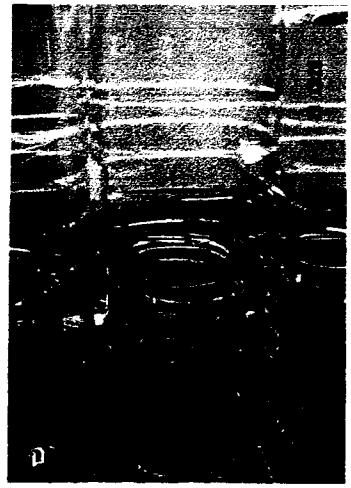
ลักษณะการพัฒนาไปเป็นต้น



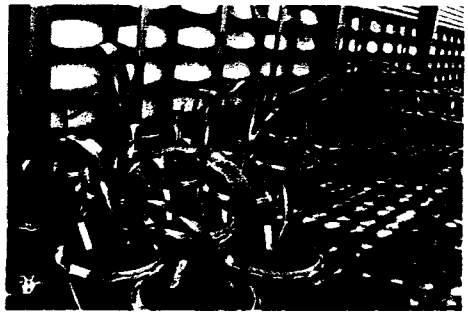
ลักษณะต้นข้าวโพดที่มีทั้งยอดและราก



ต้นข้าวโพดในอาหาร GM



ต้นข้าวโพดที่อยู่ในสารละลาย Hoagland



ลักษณะต้นข้าวโพดที่ย้ายปลูกลงดิน

ทำการผสมข้าวโพดเพื่อเก็บเมล็ด

ภาพที่ 3 แสดงการเกิด ELS การเกิดต้น การปรับสภาพแวดล้อมก่อนย้ายปลูก ลักษณะต้นข้าวโพดที่ย้ายปลูกลงดิน และการผสมข้าวโพดเพื่อเก็บเมล็ด

บทที่ 3
ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและวิจารณ์

งานวิจัยนี้เริ่มดำเนินการที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตต้น DH ของกรรมวิธีเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรที่ใช้และไม่ใช้ synchronization of cell cycle (SC) ของข้าวโพดจีโนไทป์ต่าง ๆ ซึ่งประกอบด้วยข้าวโพดพันธุ์แท้ 5 พันธุ์ และลูกผสม 9 คู่ผสม แต่ประสบปัญหาในการผลิตต้น DH จากการขาดความพร้อมด้านแปลงทดลอง ได้แก่ ความเหมาะสมของดินต่อการปลูกข้าวโพดต่ำ ฯลฯ และด้านห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ปัญหาไฟดับและเครื่องปรับอากาศเสีย ซึ่งเกิดขึ้นบ่อยครั้ง โดยปัญหาดังกล่าวอยู่นอกเหนือความสามารถของคณะผู้วิจัยที่จะแก้ไข ดังนั้นผู้วิจัยจึงจำเป็นต้องดำเนินการปลูก donor plants และทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเพิ่มเติมที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา

3.1 การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.1.1 การเกิด embryo-like structure (ELS)

หลังจากย้ายอับละอองเกสรลงบนอาหาร RM นานประมาณ 2 สัปดาห์ จะเริ่มสังเกตเห็น ELS ซึ่งมีลักษณะเป็นก้อนขนาดเล็ก สีเหลืองหรือขาว พัฒนาขึ้นในอับละอองเกสร ทำการนับจำนวน ELS ทุก 2 สัปดาห์ จนถึงสัปดาห์ที่ 6 แล้วนำมาคำนวณหาความสามารถในการชักนำให้เกิด ELS ต่อ 100 อับละอองเกสร (ELS induction; EI) พบว่า EI มีความแตกต่างกันระหว่างจีโนไทป์ของข้าวโพดอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้าวโพดพันธุ์แท้ทั้ง 5 พันธุ์ (Agron 1, Agron 18, Agron 20, Pa 91 และ M 72) พบว่า Pa 91 ให้ค่า EI สูงที่สุดเท่ากับ 1.76 % และ 1.18 % เมื่อใช้และไม่ใช้ SC ตามลำดับ รองลงมาคือ M 72 (1.11 % และ 0.70 %), Agron 1 (0.98 % และ 0.79 %), Agron 18 (0.83 % และ 0.66 %) และ Agron 20 (0.80 % และ 0.60 %) เมื่อใช้และไม่ใช้ SC ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม EI ของทั้ง 5 พันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในสภาวะการปลูกเขตร้อนและความอุดมสมบูรณ์ของดินต่ำ พันธุ์เขตอบอุ่น Pa 91 และ M 72 มีศักยภาพในการชักนำให้เกิด ELS ไม่แตกต่างจากพันธุ์ไทยที่ได้รับการคัดเลือกแล้ว แม้จะมีรายงานว่าพันธุ์ Pa 91 และ M 72 เมื่อปลูกในเขตอบอุ่น และเพาะเลี้ยงโดยไม่ใช้ SC ในสภาวะที่ใกล้เคียงสามารถให้ค่า EI สูงถึง 8.7 % และ 40 % ตามลำดับ (Saisingtong, 1998; Wassom et al., 2001) Afele et al. (1992) พบว่าการนำต้น donor plants ไปไว้ที่อุณหภูมิต่ำ (18 °ซ/15 °ซ: กลางวัน/ กลางคืน) จะให้จำนวน ELS เพิ่มขึ้น 2-3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 28 °ซ/23 °ซ: กลางวัน/ กลางคืน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากอุณหภูมิต่ำทำให้ไมโครสปอร์พัฒนาอย่างช้า ๆ และมีระยะการพัฒนาที่ใกล้เคียงกัน จึงยืดช่วงเวลาที่ไมโครสปอร์สามารถตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยง หรืออุณหภูมิต่ำอาจมีอิทธิพลต่อระดับฮอร์โมนในเนื้อเยื่อ จึงทำให้เกิดการกระตุ้นไมโครสปอร์ก่อนการเพาะเลี้ยง

สำหรับลูกผสมทั้ง 9 คู่ผสม พบว่าลูกผสม Ki 3 x M 24 ให้ค่า EI (3.73 %) สูงกว่าลูกผสมอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อใช้ SC และลูกผสมที่เหลือส่วนใหญ่ให้ค่า EI ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าตั้งแต่ 0.48 % ใน Agron 41 x W 1 ที่ไม่ใช้ SC ถึง 1.86 % ใน Agron 1 x Pa 91 ที่ใช้ SC และพบว่าลูกผสม Agron 1 x Pa 91 มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงที่ดีกว่าพ่อแม่โดยให้ค่า EI และการเกิดต้นที่สูงกว่า แม้จะไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อแม่ (ตารางที่ 1) แสดงว่าลักษณะการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงที่ดีของ Pa 91 สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ และ/หรือAgron 1 อาจมี positive alleles ที่ complement กับ Pa 91 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ กาญจนา รุจิพจน์ (2540) และ Petolino and Jones (1986) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าลักษณะการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวโพดเขตอบอุ่นสามารถถ่ายทอดมายังข้าวโพดเขตร้อนได้ และพบว่าข้าวโพดเขตอบอุ่นมีการตอบสนองที่สูงกว่าข้าวโพดเขตร้อน Wan et al. (1992) ใช้ RFLP marker ในการหาตำแหน่งยีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการ androgenesis ซึ่งครอบคลุมการเกิด ELS และการเกิดต้นจากเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ พบว่าลูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บนโครโมโซม 1, 2, 3, 6 และ 8 อย่างไรก็ตามเนื่องจากลูกผสม Agron 1 x Pa 91 เมื่อปลูกในแปลง จะมีลักษณะลำต้นใหญ่ ฝักใหญ่ มีความแข็งแรงมาก และอับละอองเกสรมีความสมบูรณ์มากกว่าพันธุ์แท้ จึงอาจเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้มีความสามารถในการชักนำให้เกิด ELS สูงกว่าพันธุ์พ่อแม่ เมล็ดที่ได้จากต้น DH ของพันธุ์นี้อาจมียีนที่ควบคุมลักษณะดีเหล่านี้อยู่ด้วย จึงมีศักยภาพที่จะใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ที่ดีในการผลิตลูกผสม ควรมีการทดสอบต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตามลูกผสมบางคู่ผสมให้ค่า EI ที่ต่ำกว่าหรือไม่แตกต่างกับพันธุ์พ่อและแม่ ความปรวนแปรนี้อาจเกิดจากสาเหตุอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ลักษณะพันธุกรรมที่ควบคุมการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยง แต่อาจเกิดจากสภาพแวดล้อม เช่น ลูกผสมดังกล่าวเจริญเติบโตไม่ค่อยดี เนื่องจากสภาพดินไม่ดี ความอุดมสมบูรณ์ต่ำ และการให้น้ำไม่สม่ำเสมอ ในช่วงหน้าหนาวต้นจะโตช้า และพบการระบาดของโรคราสนิม และใบไหม้บ้าง และสภาพห้องเพาะเลี้ยงในช่วงนั้นอาจเกิดไฟดับและเครื่องปรับอากาศเสีย ซึ่งสาเหตุต่าง ๆ เหล่านี้อาจส่งผลให้ลูกผสมระหว่างข้าวโพดเขตร้อนและเขตอบอุ่นแสดงศักยภาพของพันธุ์ได้ไม่เต็มที่

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างคู่ผสมที่เป็น reciprocal cross (Agron 1 x Pa 91 และ Pa 91 x Agron 1; Agron 20 x Pa 91 และ Pa 91 x Agron 20) พบว่าไม่ว่าจะใช้ Pa 91 เป็นพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ก็ให้ค่า EI ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตาม Pa 91 มีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในประเทศไทยไม่ค่อยดี มักมีต้นแคระแกร็น อ่อนแอต่อโรคและแมลง ทำให้ไม่ประสบผลสำเร็จในการใช้เป็นพันธุ์แม่ในคู่ผสม Pa 91 x Agron 18 นอกจากนี้พบว่าเมล็ดของคู่ผสม Pa 91 x Agron 1 มีขนาดเล็กกว่า และไม่สมบูรณ์เท่า reciprocal cross ซึ่งอาจเป็นเหตุให้ Agron 1 x Pa 91 มีแนวโน้มให้ค่า EI (1.86 % และ 1.83 %) สูงกว่า Pa 91 x Agron 1 (0.95 % และ 0.72 %) เมื่อใช้และไม่ใช้ SC ตามลำดับ ดังนั้น Pa 91 จึงเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นพันธุ์พ่อมากกว่าเป็นพันธุ์แม่สำหรับผลิตพันธุ์ลูกผสมเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรในประเทศไทย

การใช้ SC ให้ค่า EI แตกต่างจากการไม่ใช้ SC อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 3) การใช้ SC ชักนำให้เกิด ELS เพิ่มขึ้น 2.9 เท่า ($p < 0.05$) ในลูกผสมKi 3 x M 24 อย่างไรก็ตามการใช้ SC ในลูกผสมอื่น ๆ มีแนวโน้มในการเพิ่มค่า EI แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้ SC จากการสังเกตลักษณะ ELS ที่เกิดขึ้น พบว่า ELS ส่วนมากมีลักษณะเป็นก้อนขนาดเล็ก มีสีเหลืองใส อมน้ำตาล คุณภาพไม่ดีพอที่จะพัฒนาเป็นต้นได้ แต่จะแบ่งตัวเพิ่มปริมาณไปเรื่อย ๆ โดยไม่พัฒนาไปเป็นใบหรือราก พบว่าการใช้ SC เพิ่มอัตราส่วนการเกิด ELS ขนาดเล็กที่มีจำนวนมากกว่า 1 ELS / อับละอองเกสร แต่ ELS ส่วนใหญ่มักไม่สมบูรณ์ (ELS ที่สมบูรณ์ จะมีสีขาวขุ่น เจริญเติบโตขยายขนาดอย่างรวดเร็ว พบเนื้อเยื่อสีเขียวที่จะพัฒนาไปเป็นต้นภายใน 4 สัปดาห์หลังจากย้ายลง RM) (ภาพที่ 3ก, 3ข)

ในสูตรอาหาร IM นั้น ได้มีการใช้น้ำตาลในความเข้มข้นสูง (9 %) L-proline (0.0125 %) และผงถ่าน (0.5 %) น้ำตาลซูโครสใช้เป็นแหล่งให้พลังงาน และรักษาความดันออสโมติก ซึ่งความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่สูงจะมีผลต่อความดันออสโมติก และทำให้เกิดขบวนการ dehydration ส่งผลให้องค์ประกอบภายในละอองเกสรมีความแห้งมากขึ้น ทำให้ง่ายต่อการที่จะกระตุ้นให้มีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอต่อไป (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2538) L-proline ที่ใช้ในอาหารเพาะเลี้ยงจะช่วยกระตุ้นให้ไมโครสปอร์ทนต่อความเย็นในการเพาะเลี้ยงได้ (Songstad et al., 1979) Buter et al. (1991) พบว่า L-proline ช่วยในขบวนการ androgenesis โดยผลการทดลองพบว่าการใช้ L-proline จะให้ ELS เพิ่มขึ้น 2-3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้ ส่วนผงถ่านมีความสำคัญต่อการตอบสนองของข้าวโพดมาก โดย Fridborg et al. (1978), Haiso and Bomman (1991) และ Johansson (1983) พบว่า ผงถ่านที่ 0.5% ช่วยให้ระดับการตอบสนองดีขึ้น และยังช่วยดูดซึมสารพิษที่ปลดปล่อยออกมาจากผนังอับละอองเกสร เช่น abscisic acid หรือองค์ประกอบของอาหารที่เป็นพิษ และสารพิษที่เกิดจากเมตาบอลิซึม รวมไปถึงสารต่าง ๆ ในวุ้นที่มีผลยับยั้งการพัฒนาของไมโครสปอร์

3.1.2 การเกิดต้น

จากการทดลองทั้งหมดพบการเกิดต้นในกรรมวิธีที่ใช้ SC ของลูกผสม Agron 1 x Pa 91 เพียง 1 ต้น (เป็นต้นดับเบิลแฮพลอยด์ [doubled haploid; DH]) ส่วนในกรรมวิธีที่ไม่ใช้ SC ของลูกผสม Agron 1 x Pa 91, Agron 43 x M 72 และ Ki 3 x M 24 พบจำนวน 3 ต้น (DH 1 ต้น; แฮพลอยด์ [haploid; H] 2 ต้น; ต้นเผือก 1 ต้น) 1 ต้น (DH) และ 1 ต้น (H) ตามลำดับ ต้นทั้งหมดที่ได้ในการทดลองตายในระหว่างการเพาะเลี้ยง เนื่องจากสาเหตุหลายประการ เช่น 1) การปนเปื้อนของเชื้อรา และแบคทีเรียที่อยู่ภายในอับละอองเกสร ซึ่งทำให้สูญเสียอับละอองเกสรไปส่วนหนึ่ง 2) เครื่องปรับอากาศเสียและไฟดับบ่อย ทำให้อุณหภูมิระหว่างการเพาะเลี้ยงสูง (32-34 °ซ) เป็นเหตุให้อับละอองเกสรตายเป็นจำนวนมาก (สังเกตจากอับละอองเกสรเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล) ภายใน 2-3 สัปดาห์หลังย้ายลงอาหาร RM 3) เกิดการ

ควบแน่นของน้ำที่ฝาภาชนะเพาะเลี้ยง ทำให้น้ำบางส่วนไหลไปยังอับละอองเกสรและทำให้อับละอองเกสรตายโดยไม่ทราบสาเหตุ และเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน

คุณภาพของ ELS นั้นมีความสำคัญต่อการพัฒนาไปเป็นต้นอย่างมาก ซึ่ง ELS ที่มีคุณภาพดีนั้นต้องมาจากต้นที่ให้ช่อดอกที่สมบูรณ์ ซึ่งต้นข้าวโพดที่ปลูก ณ ฟาร์มมหาวิทยาลัยนั้น มีการเจริญเติบโตไม่ค่อยดี ต้นไม่สูง และไม่สม่ำเสมอกัน เนื่องจากคุณภาพดินมีความความเหมาะสมต่อการปลูกข้าวโพดต่ำ แม้ว่าจะให้ปุ๋ยธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารเสริมอย่างสม่ำเสมอตลอดการเจริญเติบโตก็ตาม นอกจากนี้การให้น้ำก็ไม่สม่ำเสมอ จึงส่งผลให้การเพาะเลี้ยงไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร โดยสังเกตจากเมื่อนำอับละอองเกสรมาส่องหาระยะนิวเคลียสที่เหมาะสมใต้กล้องจุลทรรศน์ จะพบละอองเกสรที่มีความสมบูรณ์ต่ำ (รูปร่างวงรี บุบ เบี้ยว ขนาดเล็ก และบริเวณผนังเซลล์ด้านนอกของละอองเกสร (exine) มีการเรืองแสงที่น้อยมาก และสีไม่สดใส (สีน้ำตาล เหลืองซีด ฯลฯ)) ในอัตราส่วนที่สูงมาก (ประมาณ 70 %) ในขณะที่ละอองเกสรที่สามารถพัฒนาเป็น ELS จะมีรูปร่างกลม ขนาดใหญ่ และผนังเซลล์ด้านนอกมีการเรืองแสงอย่างสดใส (สีแดง เขียว ฯลฯ) โดยในข้าวบาร์เลย์ Wang et al. (2000) พบว่าลักษณะละอองเกสรที่สามารถพัฒนาไปเป็น ELS จะมีขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 50-60 ไมครอน และผนังเซลล์ด้านนอกเรืองแสงสีแดง ในขณะที่ละอองเกสรที่พัฒนาไม่ได้ จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 30 ไมครอน และผนังเซลล์ด้านนอกเรืองแสงสีน้ำเงินหรือดำ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของหลายคณะวิจัยเกี่ยวกับอิทธิพลของสภาพแวดล้อมในการปลูก donor plants ได้แก่ อุณหภูมิ ความยาวแสง ความสมบูรณ์ของดิน น้ำ ปุ๋ย และสารปราบศัตรูพืช ต่อการตอบสนองของละอองเกสร (Nitsch et al., 1982; Afele et al., 1992; Saisingtong, 1998)

จากเหตุผลดังกล่าวจึงจำเป็นต้องไปทำการวิจัยเพิ่มเติมที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ ซึ่งดินมีความเหมาะสมต่อการปลูกข้าวโพดมากกว่าที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จากการวิเคราะห์ดินพบว่า ดินบริเวณแปลงปลูกที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติเป็นดินชุดปากช่องมี pH อยู่ระหว่าง 7-7.5 มี P_2O_5 200 ppm K_2O 325 ppm และมีอินทรีย์วัตถุ 3.5 % ดินร่วน ระบายน้ำดี มีรูพรุนสูงและโปร่ง (สุขุม โชติช่วงมณีรัตน์, ติดต่อส่วนตัว) ขณะที่ดินบริเวณแปลงปลูกในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เป็นดินชุดจัตุรัส มี pH 6.4 มี P_2O_5 29 ppm K_2O 300 ppm และ มีอินทรีย์วัตถุ 3.25 % ดินเหนียว ระบายน้ำไม่ค่อยดี มีรูพรุนต่ำ (ฐิติพร มะชิโกวา, 2546)โดยเลือกใช้ลูกผสมที่ให้ EI สูงที่สุด 3 ลูกผสมคือ Agron 1 x Pa 91, Agron 38 x M 72 และ Agron 43 x M 72 สำหรับลูกผสม Ki 3 x M 24 ที่ให้ค่า EI สูงสุดเมื่อใช้ SC เสื่อมความงอก จึงไม่สามารถนำมาใช้ทดลองต่อได้

3.2 การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ

3.2.1 การเกิด ELS

จากการศึกษาลูกผสมทั้งสามพบว่าลูกผสมที่แตกต่างกันให้ค่า EI แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 4) โดยพบว่า Agron 1 x Pa 91 ให้ค่า EI สูงที่สุดในทั้ง 2 กรรมวิธี (4.40 % และ 3.79 % เมื่อใช้ และไม่ใช้ SC ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับลูกผสมอื่น ๆ และพบว่าค่า EI ของข้าวโพดลูกผสมนี้สูงกว่าข้าวโพดลูกผสมเดียวกันที่ปลูกและทดลองที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประมาณ 2.2 เท่า (ตารางที่ 1 และ 2)

การใช้ SC ให้ค่า EI แตกต่างจากกรรมวิธีที่ไม่ใช้ SC อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 4) จากการเปรียบเทียบภายในลูกผสมเดียวกันพบว่าลูกผสม Agron 38 x M 72 ในกรรมวิธีที่ใช้ SC ให้ค่า EI เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนลูกผสมอื่น การใช้ SC มีแนวโน้มในการเพิ่มการเกิด ELS แต่ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้ SC (ตารางที่ 2)

เมื่อส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์พบละอองเกสรที่มีรูปร่างกลม ใหญ่ และมีการเรืองสีที่ขอบผนังในอัตราส่วนที่สูงกว่าการทดลองที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (ประมาณ 60% และ 30% ตามลำดับ) ซึ่งส่งผลให้เกิดจำนวน ELS โดยเฉลี่ยมากกว่า จากการสังเกตลักษณะของ ELS พบว่าส่วนมากจะมีสีขาวขุ่น (มีคุณภาพดี) ซึ่งจะพบการเกิดมากที่สุดในช่วง 2 สัปดาห์แรกหลังจากย้ายลงอาหาร RM (5 สัปดาห์หลังเริ่มเพาะเลี้ยง) แล้วจะค่อย ๆ ลดลงในสัปดาห์ที่ 4 และ 6 ตามลำดับ ซึ่งคล้ายคลึงกับผลการวิจัยของ Saisingtong (1998) ที่ทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวโพดเขตอบอุ่นโดยวิธีเดียวกันและไม่ใช้ SC พบการเกิด ELS มากที่ประมาณ 4-5 สัปดาห์หลังเริ่มเพาะเลี้ยงแล้วจะลดลงเรื่อย ๆ

ปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งที่ทำให้ไมโครสปอร์พัฒนาไปเป็น ELS และต้นได้นั้น คือ ระยะการพัฒนาของไมโครสปอร์ ซึ่งระยะที่เหมาะสมที่สุดคือ ระยะ late-uninucleate ถึง early-binucleate จากการทดลองพบว่าการเก็บเกี่ยวช่อดอกข้าวโพดจากแปลงปลูกก่อนช่อดอกโผล่พ้นใบธงประมาณ 7 วัน ไม่สามารถเก็บเกี่ยวได้พร้อมกัน (สายพันธุ์เดียวกันที่ปลูกพร้อมกัน) เนื่องจากการเจริญเติบโตของต้นไม่เท่ากัน และการพัฒนาของดอกในช่อเดียวกันไม่พร้อมกัน บริเวณปลายช่อดอกจะบานก่อน แล้วทยอยบานเรื่อยลงมาที่โคนช่อดอก ทำให้ไมโครสปอร์บริเวณปลายช่อดอกพัฒนาไปก่อนบริเวณโคนช่อดอก แต่การคัดเลือกระยะของไมโครสปอร์ที่เหมาะสมโดยสุ่มดอกมาตรวจสอบและคัดเลือกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทำได้ล่าช้า เนื่องจากช่อดอกที่เก็บเกี่ยวได้มีจำนวนมาก ดังนั้นจึงเก็บช่อดอกโดยการประเมินด้วยสายตาและอาศัยความชำนาญเท่านั้น ซึ่งถ้ามีการคัดเลือกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในทุก ๆ ส่วนของช่อดอกข้าวโพดทุกครั้งอาจทำให้ได้ไมโครสปอร์ที่มีระยะการพัฒนาของนิวเคลียสที่เหมาะสมอย่างแท้จริง และอาจทำให้การตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงในทุก ๆ พันธุ์มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

ช่วงเวลาที่เก็บช่อดอกก็มีความสำคัญเช่นกัน โดยควรเก็บช่อดอกที่เวลาประมาณ 11.00 น. เพราะการที่ต้นข้าวโพดได้รับแสงแดดจะทำให้ไมโครสปอร์ active มากที่สุด ซึ่งส่งผลให้การเพาะเลี้ยงมีประสิทธิภาพที่ดี แต่ในการทดลองพบว่า ช่วงเวลาที่เก็บช่อดอกของลูกผสม Agron 38 x M 72 และ Agron 43 x M 72 นั้นแม้จะเก็บประมาณ 11.00 น. แต่เป็นช่วงที่มรสุมเข้าติดต่อกันประมาณ 2 สัปดาห์ ฝนตกบ่อยมาก ไม่มีแดดทั้งวัน ทำให้จำเป็นต้องเก็บช่อดอกในช่วงที่ไม่มีแดด ประกอบกับต้นเป็นโรคราน้ำค้างเล็กน้อย จึงเป็นผลให้การเกิด ELS และต้นต่ำกว่าที่เคยมีรายงานไว้ประมาณ 2 เท่า (ประภา ศรีพิจิตต์ และคณะ, ติดต่อส่วนตัว)

3.2.2 การเกิดต้น

ลูกผสมที่แตกต่างกันจะให้ค่าความสามารถในการเกิดต้นต่อ 100 ELS (regeneration ability; RA) และความสามารถในการผลิตต้นต่อ 100 อับละอองเกสร (plant production; PP) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรรมวิธีที่ใช้ และไม่ใช้ SC พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 4) ลูกผสม Agron 1 x Pa 91 ให้ค่า RA (8.55 % และ 10 %) และ PP (0.38 % และ 0.39 %) สูงกว่าลูกผสมอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อใช้และไม่ใช้ SC ตามลำดับ รองลงมาคือลูกผสม Agron 38 x M 72 และ Agron 43 x 72 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบภายในลูกผสมเดียวกัน พบว่าการใช้ SC มีแนวโน้มในการลดค่า RA แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้ SC (ตารางที่ 2) ซึ่งอาจเป็นเพราะการใช้ SC ทำให้ได้อับละอองเกสรที่มีมากกว่า 1 ELS ในอัตราส่วนที่มากกว่าการไม่ใช้ SC ทำให้ได้ ELS ขนาดเล็กลง อาจทำให้มีคุณภาพไม่ดี หรือเกิดการแย่งอาหารกัน ทำให้แต่ละ ELS ได้รับสารอาหารไม่เพียงพอที่จะพัฒนาต่อไปเป็นต้น ซึ่ง Murigneux et al. (1994) สังเกตพบความสัมพันธ์เชิงลบนี้เช่นเดียวกัน และจากการสังเกตพบว่า ELS ที่จะสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้นั้น ส่วนมากจะมีขนาดใหญ่ และมีเพียง 1 ELS / อับละอองเกสร นอกจากนี้แนวโน้มลดลงของค่า RA อาจเป็นผลมาจากอุณหภูมิต่ำมาก (2-4 °ซ) ทำให้ศักยภาพในการพัฒนาเป็นต้นลดลง อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาสาเหตุดังกล่าวต่อไป

3.2.3 ต้นดับเบิลแฮพลอยด์ (doubled haploid; DH)

เมื่อนำปลายรากของต้นที่ได้ทั้งหมดมาตรวจนับจำนวนโครโมโซมโดยวิธีย้อมด้วย acetocarmine แล้วนับจำนวนต้น H ที่มีโครโมโซม 1 ชุด (10 โครโมโซม) และต้น DH ที่มีโครโมโซม 2 ชุด (20 โครโมโซม) (ภาพที่ 4ข, 4ง) นำมาคำนวณค่าความสามารถในการผลิตต้น DH ต่อ 100 อับละอองเกสร (DH plant production; DPP) ความสามารถในการเกิดต้น DH ต่อ 100 ELS (DH regeneration ability; DRA) และดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซม (Doubling index; DI) เมื่อเปรียบเทียบค่า DPP ระหว่างลูกผสมทั้งสามพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้และไม่ใช้ SC พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 5) ลูกผสม Agron 1 x Pa 91 ให้ค่า DPP (0.13 %

และ 0.10 % เมื่อใช้และไม่ใช้ SC ตามลำดับ) สูงที่สุดในทั้ง 2 กรรมวิธี เมื่อเปรียบเทียบกับลูกผสมอื่น ๆ และการใช้ SC มีแนวโน้มในการให้ค่า DPP สูงกว่าการไม่ใช้ SC สำหรับลูกผสม Agron 1 x Pa 91 และ Agron 43 x M 72 แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 3)

สำหรับค่า DRA และ DI ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์และระหว่างกรรมวิธี ซึ่งอาจเป็นผลมาจากค่าสัมประสิทธิ์ของความปรวนแปรของทั้ง 2 ปัจจัยนี้มีค่าสูงมาก (ตารางผนวกที่ 5) อย่างไรก็ตามพบว่าการใช้ SC มีแนวโน้มในการให้ค่า DRA และ DI สูงกว่าการไม่ใช้ โดยให้ค่า DI สูงกว่าการไม่ใช้ SC ประมาณ 1.6 เท่า ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก SC สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีการแบ่งตัวแบบไมโตซิสในระยะที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เพิ่มชุดโครโมโซมโดยใช้โพรนามีด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rotarenco (2000) ซึ่งพบว่าการใช้โคลชิซิน 0.02 % ร่วมกับ SC (2-4 °ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง) สามารถผลิตต้น DH ได้ 12.7 % ขณะที่การไม่ใช้ SC ไม่สามารถผลิตต้น DH ได้เลย

3.2.4 การรอดชีวิต

ปัญหาสำคัญที่พบในการเพาะเลี้ยงคือ การตายของต้นระหว่างการเพาะเลี้ยงและย้ายปลูก ซึ่งพบว่าต้นข้าวโพดที่ได้ส่วนใหญ่มักตายช่วงที่อยู่ในอาหาร GM เช่น พบว่า 19 ใน 21 ต้นของลูกผสม Agron 38 x M 72 ตายในอาหาร GM และลูกผสม Agron 1 x Pa 91 ให้เปอร์เซ็นต์ต้นตายในระหว่างการเพาะเลี้ยง (death in culture; DC) ต่ำสุดเท่ากับ 59.25 % และ 50 % เมื่อใช้และไม่ใช้ SC ตามลำดับ (ตารางที่ 4) การตายมีหลายลักษณะ เช่น ต้นซีดเหลือง ใบแห้ง ลำต้นลีบ ต้นไม่เจริญเติบโต และการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากต้นมีการพัฒนาระบบรากที่ไม่ดี รากน้อย และสั้น เปราะบาง ทำให้ระบบรากทำงานได้ไม่ดี หลังจากย้ายออกปลูก ต้นเหล่านี้จะไม่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมภายนอกได้ดีเท่าที่ควร ถึงแม้จะมีการทำ hardening โดยการนำต้นที่ได้ไปใส่ในสารละลายธาตุอาหาร Hoagland และครอบด้วยขวดพลาสติกใสเจาะรู เพื่อช่วยลดการคายน้ำ เป็นเวลา 7 วัน ก่อนย้ายลงกระถางดินในโรงเรือนทดลอง ซึ่งเป็นกรรมวิธีที่ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุดจากการทดลองของวาสนา วงษ์ใหญ่และคณะ (2542) ลูกผสม Agron 1 x Pa 91 ให้เปอร์เซ็นต์ต้นที่รอดชีวิตต่อต้นที่ชักนำได้ (Survivability; S) สูงที่สุด (25.93 % และ 28.57 %) รองลงมาคือลูกผสม Agron 43 x M 72 (14.29 % และ 12.5 %) เมื่อใช้และไม่ใช้ SC ตามลำดับ ส่วนลูกผสม Agron 38 x M 72 ไม่พบต้นรอดชีวิต (ตารางที่ 4) อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้อาจไม่เที่ยงตรงเท่าที่ควร เนื่องจากจำนวนต้นที่ได้ในแต่ละกรรมวิธีมีน้อย

การตายของต้นเมื่อย้ายปลูกลงดินในโรงเรือนทดลองอาจเกิดจากต้นที่ได้จากการชักนำนั้นอยู่ในสภาพห้องเพาะเลี้ยงมาเป็นเวลานาน (27 °ซ) เมื่อนำมาปลูกในโรงเรือนทดลองจึงทำให้ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมภายนอกที่อุณหภูมิเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาไม่ได้ และตายในที่สุด เหตุผลอีก

ประการหนึ่งคือ ต้น DH ที่ได้มีลักษณะเป็นโฮโมไซกัส ทำให้ต้นข้าวโพดเกิด inbreeding depression อย่างมาก จนไม่สามารถอยู่รอด หรือมีความอุดมสมบูรณ์ในการพัฒนาฝักและช่อดอกตัวผู้ได้

3.2.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่รอดชีวิต

ต้นข้าวโพดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรในครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เป็นต้น H (n = 10) และกลุ่มที่เป็นต้น DH (2n = 20) ทำการแบ่งกลุ่มโดยการตรวจนับจำนวนโครโมโซมปลายราก (ภาพที่ 4ข, 4ง) จากการทดลองพบว่า ต้นข้าวโพดที่รอดชีวิตหลังการย้ายปลูกลงดินมีทั้งต้นที่เป็น H และ DH โดยได้ต้น DH จำนวน 9 ต้น (ลูกผสม Agron 1 x Pa 91 จำนวน 8 ต้น และลูกผสม Agron 43 x M 72 จำนวน 1 ต้น) ซึ่งได้จากกรรมวิธีที่ใช้โพรนามีดร่วมกับการทำ SC จำนวน 6 ต้น และจากกรรมวิธีที่ไม่ใช้ SC จำนวน 3 ต้น (ตารางที่ 5) พบว่าต้น DH ที่ได้มีความสูงเฉลี่ย 59.33 ซม. ซึ่งเป็นความสูงเพียง 1 ใน 3 ของข้าวโพดเขตร้อนปกติ ความสูงเฉลี่ยของฝักวัดจากผิวดิน 26.93 ซม. วันแตกอับละอองเกสร (ภาพที่ 4จ) เฉลี่ยประมาณ 55 วัน หลังการย้ายปลูกลงดิน วันออกไหม (ภาพที่ 4ฉ) เฉลี่ยประมาณ 64 วัน จำนวนใบเฉลี่ยประมาณ 9 ใบ ขนาดใบจะกว้างกว่าต้น H เล็กน้อย (สังเกตจากสายตา) และขนาดเส้นรอบวงของลำต้นโดยเฉลี่ย 4.14 ซม. (ตารางที่ 5; ภาพที่ 4ค) และพบการเกิดเมล็ดบนช่อดอกตัวผู้ (tassel seed; ภาพที่ 4ช) จำนวน 2 ต้น ไม่มีฝักจำนวน 1 ต้น ฝักไม่มีไหมจำนวน 1 ต้น และแตกละอองเกสรก่อนออกไหม จึงไม่สามารถผสมตัวเองได้ จำนวน 3 ต้น จึงทำการผสมข้ามในพันธุ์เดียวกัน (sib-mating) โดยทั่วไปต้นที่รอดชีวิตจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรส่วนใหญ่จะมีอาการผิดปกติเช่นเดียวกันนี้ (Petolino and Jones, 1986; Genovesi, 1990; Saisingtong, 1998) สำหรับต้นปกติที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ (fertile) จำนวน 2 ต้น ทำการผสมตัวเอง (ภาพที่ 3ช) อย่างไรก็ตามเมล็ดที่ได้ไม่สามารถพัฒนาจนเป็นเมล็ดที่สุกแก่สมบูรณ์และมีชีวิตได้

จากการทดลองได้ต้น H จำนวน 8 ต้น (ลูกผสม Agron 1 x Pa 91 จำนวน 7 ต้น และลูกผสม Agron 43 x M 72 จำนวน 1 ต้น) ซึ่งได้จากกรรมวิธีที่ใช้โพรนามีดร่วมกับการทำ SC จำนวน 2 ต้น และจากกรรมวิธีที่ไม่ใช้ SC จำนวน 6 ต้น ซึ่งต้น H ที่ได้มีความสูงเฉลี่ย 52.13 ซม. ความสูงเฉลี่ยของฝักวัดจากผิวดิน 14.23 ซม. วันแตกของอับละอองเกสรเฉลี่ยประมาณ 57 วันหลังย้ายลงปลูกลงดิน วันออกไหมเฉลี่ยประมาณ 62 วัน จำนวนใบเฉลี่ยประมาณ 8 ใบ และขนาดเส้นรอบวงลำต้นโดยเฉลี่ย 3.14 ซม. (ตารางที่ 6; ภาพที่ 4ก) จะเห็นได้ว่าต้น H มีความสูงต้นและขนาดเส้นรอบวงลำต้นต่ำกว่าต้น DH (ตารางที่ 5 และ 6; ภาพที่ 4ก, 4ค) แสดงให้เห็นว่าต้น H มีการเจริญเติบโตและความแข็งแรงต่ำกว่าต้น DH และต้น H ที่ได้ไม่มีละอองเกสร บางต้นให้ละอองเกสรน้อยมากต้องเอามือขยี้อับละอองจึงจะเห็นละอองเกสร และบางต้นไม่มีการบานของดอกตัวผู้ตามธรรมชาติ

ตารางที่ 1 ความสามารถในการชักนำให้เกิด ELS จำนวนต้นที่ชักนำได้ และค่าดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซม ของข้าวโพดจีโนไทป์ต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกรรมวิธีที่ใช้และไม่ใช้ synchronization of cell cycle ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

พันธุ์	กรรมวิธี	จำนวน อับละอองเกสร	การชักนำให้เกิด ELSต่อ 100 อับละอองเกสร (%)	จำนวนต้น ที่ชักนำได้	ดัชนีการเพิ่ม ชุดโครโมโซม
Agron 1	Pronamide	5,100	0.79 ± 0.16 bc	0	-
	Pronamide + SC	6,180	0.98 ± 0.43 bc	0	-
Agron 18	Pronamide	5,430	0.66 ± 0.14 bc	0	-
	Pronamide + SC	3,870	0.83 ± 0.10 bc	0	-
Agron 20	Pronamide	3,930	0.60 ± 0.10 bc	0	-
	Pronamide + SC	3,060	0.80 ± 0.09 bc	0	-
Pa 91	Pronamide	5,430	1.18 ± 0.18 bc	0	-
	Pronamide + SC	5,970	1.76 ± 0.26 b	0	-
M 72	Pronamide	1,380	0.70 ± 0.42 bc	0	-
	Pronamide + SC	1,320	1.11 ± 0.39 bc	0	-
Agron 1 x Pa 91	Pronamide	5,730	1.83 ± 0.62 b	3	0.33
	Pronamide + SC	6,030	1.86 ± 0.28 b	1	1
Agron 18 x Pa 91	Pronamide	1,350	0.62 ± 0.25 bc	0	-
	Pronamide + SC	1,200	1.22 ± 0.19 bc	0	-
Agron 20 x Pa 91	Pronamide	3,600	0.62 ± 0.05 bc	0	-
	Pronamide + SC	3,030	0.71 ± 0.08 bc	0	-
Pa 91 x Agron 1	Pronamide	1,260	0.72 ± 0.01 bc	0	-
	Pronamide + SC	1,290	0.95 ± 0.32 bc	0	-
Pa 91 x Agron 20	Pronamide	1,200	0.60 ± 0.10 bc	0	-
	Pronamide + SC	1,320	0.69 ± 0.35 bc	0	-
Agron 38 x M 72	Pronamide	2,790	0.73 ± 0.12 bc	0	-
	Pronamide + SC	2,730	0.97 ± 0.24 bc	0	-

(ต่อหน้า 22)

ตารางที่ 1 ความสามารถในการชักนำให้เกิด ELS จำนวนต้นที่ชักนำได้ และค่าดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซมของข้าวโพดจีโนไทป์ต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกรรมวิธีที่ใช้และไม่ใช้ synchronization of cell cycle (ต่อ)

ลูกผสม	กรรมวิธี	จำนวนอับละอองเกสร	การชักนำให้เกิด ELS ต่อ 100 อับละอองเกสร (%)	จำนวนต้นที่ชักนำได้	ดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซม
Agron 43 x M 72	Pronamide	3,540	1.47 ± 0.36 bc	1	1
	Pronamide + SC	3,300	1.79 ± 0.30 b	0	-
Agron 41 x W 1	Pronamide	1,320	0.48 ± 0.09 c	0	-
	Pronamide + SC	1,350	0.71 ± 0.10 bc	0	-
Ki 3 x M 24	Pronamide	1,830	1.30 ± 0.60 bc	1	0
	Pronamide + SC	1,260	3.73 ± 0.85 a	0	-

แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE)

ค่าเฉลี่ยในแถวแนวตั้งเดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 2 ความสามารถในการชักนำให้เกิด ELS ในการเกิดต้น และในการผลิตต้นของข้าวโพดลูกผสมเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกรรมวิธีที่ใช้และไม่ใช้ synchronization of cell cycle ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ

ลูกผสม	กรรมวิธี	จำนวนอับละอองเกสร	การชักนำให้เกิดELS ต่อ100 อับละอองเกสร (%)	การเกิดต้น ต่อ 100 ELS (%)	การผลิตต้นต่อ 100 อับละอองเกสร (%)	จำนวนต้นที่ชักนำได้
Agron1 x Pa 91	Pro	7,200	3.79 ± 0.26 ab	10.00 ± 1.45 a	0.39 ± 0.08 a	28
	Pro+SC	7,200	4.40 ± 0.35 a	8.55 ± 0.39 a	0.38 ± 0.03 a	27
Agron38 x M72	Pro	7,200	3.08 ± 0.32 bc	5.57 ± 0.76 b	0.17 ± 0.01 b	11
	Pro+SC	7,200	4.25 ± 0.27 a	3.90 ± 0.72 b	0.15 ± 0.04 b	10
Agron 43 x M 72	Pro	7,200	2.45 ± 0.10 c	4.45 ± 0.75 b	0.11 ± 0.02 b	8
	Pro+SC	7,200	3.06 ± 0.07 bc	3.41 ± 0.89 b	0.10 ± 0.03 b	7

แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE)

ค่าเฉลี่ยในแถวแนวตั้งเดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ .

ตารางที่ 3 ความสามารถในการผลิตต้น DH ในการเกิดต้น DH และค่าดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซมของข้าวโพดลูกผสมเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกรรมวิธีที่ใช้และไม่ใช้ synchronization of cell cycle ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ

ลูกผสม	กรรมวิธี	จำนวนต้นที่ชักนำได้	การผลิตต้น DH ต่อ 100 อับละอองเกสร (%)	การเกิดต้น DH ต่อ 100 ELS (%)	ดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซม
Agron 1 x Pa 91	Pro	28	0.10 ± 0.04 ab	2.40 ± 0.83	0.23 ± 0.05
	Pro+SC	27	0.13 ± 0.01 a	2.90 ± 0.42	0.34 ± 0.06
Agron 38xM72	Pro	11	0.045 ± 0.01 ab	1.40 ± 0.51	0.25 ± 0.08
	Pro+SC	10	0.045 ± 0.00 ab	1.52 ± 0.11	0.52 ± 0.17
Agron 43xM72	Pro	8	0.03 ± 0.02 b	1.09 ± 0.63	0.21 ± 0.13
	Pro+SC	7	0.04 ± 0.03 b	1.44 ± 0.92	0.29 ± 0.17

แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE)

ค่าเฉลี่ยในแถวแนวตั้งเดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การตายในระหว่างการเพาะเลี้ยง และหลังจากย้ายปลูกลงดิน และเปอร์เซ็นต์ต้นที่รอดชีวิตต่อต้นที่ชักนำได้ของข้าวโพดลูกผสม เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกรรมวิธีที่ใช้และไม่ใช้ synchronization of cell cycle

ลูกผสม	กรรมวิธี	จำนวนต้นที่ชักนำได้	เปอร์เซ็นต์การตายในระหว่างเพาะเลี้ยง (%)	จำนวนต้นที่ย้ายปลูกลงดิน	เปอร์เซ็นต์การตายภายหลังย้ายปลูกลงดิน (%)	จำนวนต้นที่รอดชีวิต	เปอร์เซ็นต์ต้นที่รอดชีวิตต่อต้นที่ชักนำได้ (%)
Agron1 x Pa 91	Pro	28	50.00	14	21.43	8	28.57
	Pro+SC	27	59.25	11	14.81	7	25.93
Agron 38 x M 72	Pro	11	81.82	2	18.18	0	0.00
	Pro+SC	10	100.00	0	-	0	0.00
Agron 43 x M 72	Pro	8	62.50	3	25.00	1	12.50
	Pro+SC	7	71.43	2	14.29	1	14.29

ตารางที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นดับเบิลแฮพลอยด์ (doubled haploid; DH)

ลูกผสม	กรรมวิธี	ความสูงต้น (ซม.)	ความสูงฝัก (ซม.)	วันแตกอับละอองเกสร (หลังย้ายออกปลูก)	วันออกไหม	จำนวนใบ	เส้นรอบวงลำต้น (ซม.)	หมายเหตุ
Agron 1 x Pa 91	Pro+SC	50	8	50	65	8	2.9	อับละอองเกสรแตกก่อนออกไหม
Agron 1 x Pa 91	Pro+SC	60	18	50	65	9	3.5	อับละอองเกสรแตกก่อนออกไหม
Agron 1 x Pa 91	Pro+SC	80	40	67	71	12	5.4	ต้นปกติ, ละอองเกสรมาก
Agron 1 x Pa 91	Pro+SC	45	NSE[1/]	49	-	8	3.9	มีละอองเกสรน้อย ฝักไม่มีไหม
Agron 1 x Pa 91	Pro+SC	45	45	54	55	5	4.9	tassel seed[3/]
Agron 1 x Pa 91	Pro	80	NE[2/]	51	-	9	3.1	ไม่มีฝัก
Agron 1 x Pa 91	Pro	75	23	55	66	9	4.3	ต้นปกติ
Agron 1 x Pa 91	Pro	42	42	63	65	7	4.0	tassel seed
Agron 43 x M 72	Pro+SC	57	12.5	53	63	10	5.3	อับละอองเกสรแตกก่อนออกไหม
เฉลี่ย		59.33	26.93	54.67	64.29	8.55	4.14	

[1/] ฝักไม่มีไหม (no silking ear: NSE)

[2/] ไม่มีฝัก (no ear: NE)

[3/] การเกิดเมล็ดบนช่อดอกตัวผู้ (tassel seed)

ตารางที่ 6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นแฮพลอยด์ (haploid; H)

ลูกผสม	กรรมวิธี	ความสูงต้น (ซม.)	ความสูงฝัก (ซม.)	วันแตกอับละอองเกสร (หลังย้ายออกปลูก)	วันออกไหม	จำนวนใบ	เส้นรอบวงลำต้น (ซม.)	หมายเหตุ
Agron 1 x Pa 91	Pro	63	5	46	56	6	2.0	ไหมสั้นมาก, ไม่มีละอองเกสร อับละอองเกสรเหี่ยว
Agron 1 x Pa 91	Pro	87	15	60	69	9	3.3	ไหมสั้นมาก, ไม่มีละอองเกสร อับละอองเกสรเหี่ยว
Agron 1 x Pa 91	Pro	40	NE[2/]	-	-	6	3.0	อับละอองเกสรเหี่ยว ไม่แตก
Agron 1 x Pa 91	Pro	60	30	-	62	11	4.6	ไหมสั้นมาก, ละอองเกสรน้อยมาก
Agron 1 x Pa 91	Pro	40	NSE[1/]	-	-	7	2.9	ฝักไม่มีไหม ไม่มีละอองเกสร
Agron 1 x Pa 91	Pro +SC	40	NE	-	-	7	2.6	ดอกตัวผู้เป็นหมันและไม่บาน ไม่มีละอองเกสร
Agron 1 x Pa 91	Pro+SC	45	NE	65	-	8	3.3	ไม่มีฝัก
Agron 43 x M 72	Pro	42	6.9	-	60	8	3.4	ไหมสั้นมาก, ไม่มีละอองเกสร
เฉลี่ย		52.13	14.23	57.00	61.75	7.75	3.14	

[1/] ฝักไม่มีไหม (no silking ear: NSE)

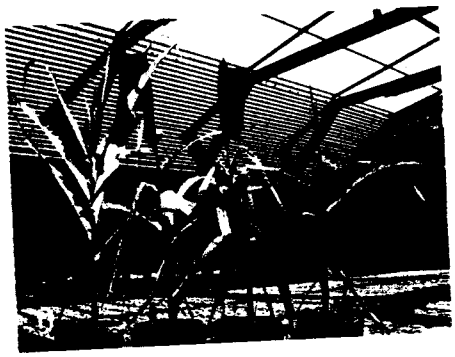
[2/] ไม่มีฝัก (no ear: NE)

ก

ลักษณะของต้นแฮพลอยด์

ข

จำนวนโครโมโซมของต้นแฮพลอยด์ (n=10)



ค

ลักษณะของต้นดับเบิลแฮพลอยด์

ง

จำนวนโครโมโซมของต้นดับเบิลแฮพลอยด์ (2n=20)

จ

การแตกของอับละอองเกสรของต้นดับเบิลแฮพลอยด์

ฉ

ลักษณะการเกิดไหมของต้นดับเบิลแฮพลอยด์

ช

ลักษณะการเกิด tassel seed

ภาพที่ 4 แสดงลักษณะ และจำนวนโครโมโซมของต้นแฮพลอยด์และต้นดับเบิลแฮพลอยด์

บทที่ 4

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. การทำ synchronization of cell cycle (SC) โดยให้อุณหภูมิต่ำ (2-4°ซ) กับอับละอองเกสรเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วย้ายไปยังอุณหภูมิ 27 °ซ 7 ชั่วโมงก่อนให้โพรนามีด มีศักยภาพในการชักนำให้เกิด ELS เพิ่มขึ้นในข้าวโพดพันธุ์แท้และลูกผสมจีโนไทป์ต่าง ๆ โดยไม่พบปฏิกิริยาระหว่างกรรมวิธี (การใช้และไม่ใช้ SC) กับจีโนไทป์ แม้ว่า SC มีแนวโน้มในการลดความสามารถในการชักนำต้นเล็กน้อย แต่พบว่าความสามารถในการชักนำต้น DH ความสามารถในการผลิตต้น DH และดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซม มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อใช้ SC การลดลงของความสามารถในการชักนำต้นอาจเนื่องมาจากผลกระทบเชิงลบของอุณหภูมิต่ำ จึงควรมีการพัฒนาวิธีการทำ SC ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เช่น ใช้อุณหภูมิต่ำในช่วงเวลาที่สั้นลง หรือใช้สารเคมี เช่น hydroxyurea ในการยับยั้งวัฏจักรของเซลล์แทน ซึ่งสมควรทำการวิจัยเพิ่มเติมในอนาคต
2. จีโนไทป์มีอิทธิพลต่อการเกิด ELS การเกิดต้น และการรอดชีวิตของต้นที่ชักนำได้ โดยพบว่าลูกผสม Agron 1 x Pa 91 ให้ค่าความสามารถในการชักนำ ELS ในการเกิดต้น DH ในการผลิตต้น DH และดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซมสูงที่สุด
3. สภาพแวดล้อมในการปลูก donor plants และในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเป็นปัจจัยที่สำคัญมากในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร ควรปลูกพืชในสภาพที่มีความอุดมสมบูรณ์ของดินสูง มีน้ำเพียงพอ และปลอดโรคและแมลงศัตรูพืช เพื่อให้ได้อับละอองเกสรที่สมบูรณ์และมีศักยภาพในการเกิด ELS และการเกิดต้นสูง และควรควบคุมสภาพแวดล้อมในห้องเพาะเลี้ยงให้เหมาะสม เพื่อลดอัตราการตาย และการปนเปื้อนของเนื้อเยื่อ
4. การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของลูกผสม Agron 1 x Pa 91 ประสบผลสำเร็จในการผลิตต้น DH ที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ (fertile) และสามารถผสมตัวเองได้ จำนวน 2 ต้น อย่างไรก็ตามเมล็ดที่ได้ไม่สามารถพัฒนาจนเป็นเมล็ดที่สุกแก่สมบูรณ์ และมีชีวิตได้

บรรณานุกรม

กาญจนา รุจิพจน์. (2540). การตอบสนองของจีโนไทป์ข้าวโพดต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 99 หน้า.

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. (2531). พืชไร่. บริษัทการพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช: กรุงเทพมหานคร. 26 หน้า.

ชะบา จำปาทอง, Bernd Buter, พิทยาภรณ์ บุญใหญ่, ราเชนทร์ ถิรพร และนิตย์ศรี แสงเดือน. (2537). การชักนำให้เกิดข้าวโพดสายพันธุ์แท้โดยวิธีการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 32 สาขาพืช, 3-5 กุมภาพันธ์ 2537. หน้า 487-500. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพมหานคร.

ฐิติพร มะชิโกวา. (2546). ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับศักยภาพในการให้ผลผลิตของถั่วเขียวอายุสั้น: การแสดงออกและการถ่ายทอด. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ประภา ศรีพิจิตต์, วาสนา วงษ์ใหญ่, นิตย์ศรี แสงเดือน และ ภัทรพร ศุภปัญญาพงศ์. (2544). Breeding early maturing maize by conventional methods and biotechnology. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. (2538). เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. โอเดียนสโตร์: กรุงเทพมหานคร. 158 หน้า.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ. (2540). หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี: นครราชสีมา. 165 หน้า.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. (2540). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพมหานคร. หน้า 107-109.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, เรวัติ เลศฤทัยโยธิน, ชูศักดิ์ จอมพุก และ จุฑามาศ ร่วมแก้ว. (2541). พฤกษศาสตร์พืชเศรษฐกิจ. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพมหานคร. 189 หน้า.

วาสนา วงษ์ใหญ่, ประภา ศรีพิจิตต์, นิตย์ศรี แสงเดือน และ จรีภรณ์ ดำรง. (1999). Breeding early maturing maize by conventional methods and biotechnology. ใน เทคโนโลยีที่เหมาะสมสำหรับการปรับสภาพพืชก่อนการย้ายพืชออกปลูก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพมหานคร.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2545). สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปีเพาะปลูก 2544/45. กรุงเทพมหานคร. 318 หน้า.

Afele, J.C., Kannenberg, L.W., Keats, R., Sohota, S. and Swanson, E.B. (1992). Increased induction of microspore embryos following manipulation of donor plant environment and culture temperature in corn (*Zea mays* L.). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 28: 87-90.

Azcon-Bieto, J. (1983). Inhibition of photosynthesis by carbohydrates in wheat leaves. Plant Physiol. 73: 681-686.

Azcon-Bieto, J. (1986). The control of photosynthetic gas exchange by assimilate accumulation in wheat. In: Marcelle, R., Clijsters, H. and Van Pouke, M. (eds.) Biological Control of Photosynthesis. Martinus Nijhoff Publishers: Dordrecht. pp. 231-240.

Barloy, D. and Beckert, M. (1993). Improvement of regeneration ability of androgenetic embryos by early anther transfer in maize. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 33: 45-50.

Buter, B., Schmid, J.E. and Stamp, P. (1991). Effects of L-proline and post-planting temperature treatment on maize (*Zea mays* L.) anther culture. Plant Cell Rep. 10: 325-328.

Dieu, P. and Beckert, M. (1986). Further studies of androgenetic embryo production and plant regeneration from *in vitro* cultured anther of maize (*Zea may* L.). Maydica. 31: 245-259.

Fridborg, G., Pedersen, M., Landstrom, L.E. and Eriksson, T. (1978). The effect of activated charcoal on tissue cultures : adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. Physiol. Plant. 43:104-106.

Genovesi, A.D. (1990). Maize (*Zea mays* L.): *In vitro* production of haploids. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, V. 12, Haploids in Crop Management I Springer-Verlag: Heidelberg. pp. 176-203.

Haiso, K.C. and Bomman, C.H. (1991). Further studies on autoclave-induced toxicity in tissue culture media : gauging sugar breakdown by spectrophotometry. Physiol. Plant. 82: 261-265.

Johansson, L. (1983). Effects of activated charcoal in anther cultures. Physiol. Plant. 59: 397-403.

Murigneux, A., Bentolila , S., Hakdy, T., Baud, S., Tahar, S.B., Feryssinet, G. and Beckert, M.(1994). Genotypic variation of quantitative trait loci controlling *in vitro* androgenesis in maize. Genome. 37: 970-976.

Nitsch, C., Andersen, S., Godard, M., Nueffer, M.G. and Sheridan, W.F. (1982). Production of haploid plant of *Zea mays* and *Pennisetum* through androgenesis. In: Earle, E.D. and Demarly, Y. (eds.). Variability in Plants Regenerated from Tissue Culture. Praeger: New York. pp. 66-91. Quoted in Buter, B., Schmid, J.E. and Stamp, P. (1991). Effects of L-proline and post-planting temperature treatment on maize (*Zea mays* L.) anther culture. Plant Cell Rep. 10: 325-328.

Petolino, J.F. and Jones, A.M. (1986). Anther culture of elite genotypes of maize. Crop Sci. 26: 1072-1074.

Rotarenco,V.A. (2000). Synchronization of cell cycles as a means of enhancing the efficiency of chromosome doubling in maize [Online]. Available: http://www.agron.missouri.edu/mnl/74/46rotarenco.html

Saisingtong, S. (1998). Study on the *in vitro* regeneration of doubled haploid maize (*Zea mays* L.) plant. Ph.D. dissertation. Institute of Plant Sciences of the Swiss Federal Institute of Technology (ETH) Zurich: Switzerland. pp. 55-85.

Songstad, D.D., Duncan, D.R. and Widholm, J.M. (1979). Proline and polyamine involvement in chilling tolerance of maize suspension culture. J. Exp. Bot. 41: 289-294.

Wan Y., Rocheford, T.R. and Widholm, J.M. (1992). RFLP analysis to identify putative chromosomal regions involved in the anther culture response and callus formation of maize. Theor. Appl. Genet. 85:360-365.

Wang, M., Bergen, S.V. and Duijn, B.V. (2000). Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. Plant Physiol. 124: 523-530.

Wassom, J.J., Mei, C., Rocheford, T.R. and Widholm, J.M. (2001). Interaction of environment and ABA and GA treatments on the maize anther culture response. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 64: 69-72.

Wu, J.K., Zhong, L.Q., Nong, F.H., Chen, M.L., Zhang, H.Y. and Zheng, B.L. (1983). Selection of pure line of maize (*Zea mays* L.) by anther culture and observation on its hybrids. Sci. Sin. 26(7): 725-733.

Zobayed, S.M.A., Afreen- Zobayed, F., Kubota, C. and Kozai, T. (1999). Stomatal characteristics and leaf anatomy of potato plantlets cultured *in vitro* under photoautotrophic and photomixotrophic conditions. *In Vitro* Cell Dev. Biol. Plant 35: 183-188.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบของ induction medium (IM), regeneration medium (RM) และ growth medium (GM)โดย Buter et al. (1991)

	องค์ประกอบ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	IM	RM	GM
Macro - nutrients	KNO_3	2,500	2,500	2,500
	NH_4NO_3	165	165	165
	$CaCl_2.2H_2O$	176	176	176
	KH_2PO_4	510	510	510
	$MgSO_4.7H_2O$	370	370	370
Micro - nutrients	$MnSO_4.H_2O$	4.4	4.4	4.4
	$ZnSO_4.7H_2O$	1.5	1.5	1.5
	H_3BO_3	1.6	1.6	1.6
	KI	0.8	0.8	0.8
	Na_2EDTA (Titriplex III)	41.0	41.0	41.0
	$FeSO_4.7H_2O$	27.8	27.8	27.8
Organic supplements	Thiamine-HCl	0.25	0.25	-
	Nicotinic acid	1.3	25.0	-
	Succinic acid	-	1.5	-
	L-Proline	125.0	-	-
	L-Glutamine	125.0	125.0	-
	L-Asparagine	15.0	-	-
	Inositol	-	100.0	-
Growth regulators	Triiodobenzoic acid	0.1	-	-
	Kinetin	-	2.5	-
	NAA	-	-	1.0
	IBA	-	-	1.0
อื่น ๆ	Activated charcoal	5×10^3 (= 5 ก.)	-	-
	Sucrose	90×10^3 (= 90 ก.)	30×10^3 (= 30 ก.)	25×10^3(= 25 ก.)
	Phytagel	1.5×10^3 (= 1.5 ก.)	-	25×10^3(= 25 ก.)

ตารางผนวกที่ 2 องค์ประกอบของสารละลายธาตุอาหาร Hoagland โดย Buter et al. (1991)

	องค์ประกอบ	มิลลิกรัมต่อลิตร
Macro - nutrients	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	1181.00
	$MgSO_4.7H_2O$	493.00
	KNO_3	60.67
	KH_2PO_4	13.60
	Sequestrene 330 Fe	232.70
Micro - nutrients	H_3BO_3	1.55
	$MnSO_4.H_2O$	0.34
	$CuSO_4.5H_2O$	0.125
	$ZnSO_4.7H_2O$	0.575
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.121
	KCL	18.61

ตารางผนวกที่ 3 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิด ELS ของข้าวโพด 14 พันธุ์ เมื่อใช้โพรนามีดร่วมกับการใช้และไม่ใช้ SC ซึ่งดำเนินการทดลองที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Source of variation	df	MS
กรรมวิธี	27	10.25**
พันธุ์ (A)	13	14.56**
Pro และ Pro + SC (B)	1	33.94**
A X B	13	4.12 ns
ความคลาดเคลื่อน	84	3.94
CV (%)		36

** = มีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01 ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 4 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิด ELS เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น และเปอร์เซ็นต์การผลิตต้นของข้าวโพดลูกผสม 3 คู่ผสม เมื่อใช้โพรนามีดร่วมกับการใช้และไม่ใช้ SC ซึ่งดำเนินการทดลองที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ

Source of variation	df	MS		
		การชักนำให้เกิด ELS ต่อ 100 อับละอองเกสร	การเกิดต้น ต่อ 100 ELS	การเกิดต้นต่อ 100 อับละอองเกสร
กรรมวิธี	5	5.9**	41.0**	2.41**
ลูกผสม (A)	2	9.5**	93.0**	6.00**
Pro และ Pro + SC (B)	1	9.4**	18.0 ns	0.04 ns
A X B	2	0.5 ns	0.3 ns	0.007 ns
ความคลาดเคลื่อน	18	0.6	5.0	0.20
CV (%)		7.22	16.25	17.92

** = มีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01 ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 5 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การผลิตต้น DH เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น DH และดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซมของข้าวโพดลูกผสมทั้ง 3 คู่ผสม เมื่อใช้โพรนามีดร่วมกับการใช้และไม่ใช้ SC ซึ่งดำเนินการทดลองที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ

Source of variation	df	MS		
		การเกิดต้น DH ต่อ 100 อับละอองเกสร	การเกิดต้น ต่อ 100 ELS	ดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซม
กรรมวิธี	5	1.1 ns	18.62 ns	0.05 ns
พันธุ์ (A)	2	2.6*	43.47 ns	0.04 ns
Pro และ Pro + SC (B)	1	0.1 ns	5.67 ns	0.15 ns
A X B	2	0 ns	0.25 ns	0.02 ns
ความคลาดเคลื่อน	18	0.5	13.77	0.06
CV (%)		55.26	55.26	78

* = มีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาง ปิยะดา นามสกุล ทิพยผ่อง

(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Piyada Thipyapong

2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ (ถ้ามี)

3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
111 ถนน มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี อ.เมือง จ. นครราชสีมา 30000
โทร. (044) 224-204 โทรสาร (044) 224-150

5. ประวัติการศึกษา

5.1 ปริญญาตรี สาขาวิชา เกษตร สถาบัน ม. เกษตรศาสตร์
ปีที่สำเร็จ 1988 (เกียรตินิยมอันดับ 1)

5.2 ปริญญาโท ไม่มี (เข้าศึกษาต่อปริญญาเอกหลังจบปริญญาตรี)

5.3 ปริญญาเอก สาขาวิชา การปรับปรุงพันธุ์พืช (Plant Breeding)
สถาบัน Cornell University สหรัฐอเมริกา ปีที่สำเร็จ 1997

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Plant Biotechnology, Plant Molecular Biology, Plant Breeding

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยและงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ :
ระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่า เป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว: ชื่อแผนงานวิจัย และ/หรือโครงการวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย

1. Effects of colchicine on aseptic culture of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). (1988). ปัญหาพิเศษ
2. Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. (1995). Phytochemistry 40: 673-676. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
3. Defensive role of polyphenol oxidases against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. (1996). Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists, San Antonio, Texas. Plant Physiol 111s: 168. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน

4. Polyphenol oxidase gene family: differential expression during vegetative and reproductive development, and in response to injuries, and defensive functional analysis. (1997). วิทยานิพนธ์
5. Tomato polyphenol oxidase (PPO): differential response of the PPO F promoter to injuries and wound signals. (1997). Plant Physiol 115: 409-418. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
6. Differential expression and turnover of the tomato polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development. (1997). Plant Physiol 113: 707-718. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
7. Modification of polyphenol oxidase expression in transgenic tomato: role of PPO in disease resistance. (1997). Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Copper Mountain, Colorado. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
8. Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. (1997). 5th International Congress of Plant Molecular Biology, Singapore. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
9. PPO expression and accumulation during pollen germination and pollen tube growth. (2002). Fourteenth Annual Penn State Symposium in Plant Physiology: Plant Reproduction 2002, State College, Pennsylvania. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
10. การส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดภายใต้สภาพ photoautotrophic. (2003). การประชุมศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติประจำปี, นครปฐม. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน)
11. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants increases resistance to common cutworm (*Spodoptera litura* (F.)). (2003). Plant Biology 2003, Honolulu, Hawaii. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
12. Overexpression of a bacterial branched-chain α-keto acid dehydrogenase complex in Arabidopsis results in accumulation of branched-chain acyl-CoAs and alteration of free amino acid composition in seeds. (2003). Plant Sci. 165: 1213-1219. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 2
13. การผลิตข้าวโพดดับเบิลแฮพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร. การประชุมบัณฑิตศึกษาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรครั้งที่ 1. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน)
14. Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. (in press). Plant sci. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
15. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. (submitted). ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1

7.2 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อแผนงานวิจัย และ/หรือโครงการวิจัย การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย

1. บทบาทของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดซ (polyphenol oxidases) ในการต้านทานของมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* L.) ต่อการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura* (F.)) หัวหน้าโครงการ
2. การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วฝักยาว ถั่วฝักยาวไร้ค้าง ถั่วเขียว และถั่วเหลือง หัวหน้าโครงการ
3. การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวเพื่อเพิ่มผลผลิต หัวหน้าโครงการ