การผลิตข้าวโพด (*Zea mays* L.) ดับเบิลแฮพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

นาย ปริญญา ขจัดพาล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-533-290-9

PRODUCTION OF DOUBLED HAPLOID MAIZE (*Zea mays* L.) BY ANTHER CULTURE

Mr. Parinya Khajudparn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Crop Production Technology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2003

ISBN 974-533-290-9

การผลิตข้าวโพด (*Zea mays* L.) ดับเบิลแฮพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....

(อาจารย์ ดร. โสภณ วงศ์แก้ว)

ประธานกรรมการ

.....

(อาจารย์ ดร. ปิยะดา ทิพยผ่อง)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

.....

(ศาสตราจารย์ ดร. อารีย์ วรัญญูวัฒก์)

กรรมการ

.....

(ดร. ชะบา จำปาทอง)

กรรมการ

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. สราวุฒิ สุจิตจร)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. กนก ผลารักษ์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ปริญญา ขจัดพาล : การผลิตข้าวโพด (*Zea mays* L.) ดับเบิลแฮพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร (PRODUCTION OF DOUBLED HAPLOID MAIZE (*Zea mays* L.) BY ANTHER CULTURE)

อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร. ปิยะดา ทิพยผ่อง, 109 หน้า.

ISBN 974-533-290-9

การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพด โดยศึกษา อิทธิพลของวัสดุค้ำยึดและน้ำตาลที่มีต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดและ zygotic embryo ในสภาพปลอดเชื้อ และศึกษาวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มชุดโครโมโซมของ โพรนามีด โดยการทำให้เซลล์มีระยะของวัฏจักรที่คล้ายกัน (synchronization of cell cycle; SC) การทดลองที่ 1 การศึกษาการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดพันธุ์คาร์กิล 939 ที่เพาะเลี้ยงจากเมล็ดภายใต้สภาพ photoautotrophic (ไม่เติมน้ำตาลซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยง) ผลการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงในสภาพ photoautotrophic จะให้ค่าความยาวใบ (leaf length; LL) ความยาวราก (root length; RL) น้ำหนักสดใบ (leaf fresh weight; LFW) และน้ำหนักสดราก (root fresh weight; RFW) สูงที่สุดในทุกระยะการเจริญเติบโต (ที่ 3, 5, 7 และ 9 วัน; $p < 0.05$) โดยที่ระยะ 9 วันให้ค่า LL, LFW น้ำหนักแห้งใบ (leaf dry weight; LDW) จำนวนราก (number of root; NR) RL, RFW และน้ำหนักแห้งราก (root dry weight; RDW) สูงกว่ากรรมวิธีควบคุม (เติมน้ำตาลซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยงร่วมกับการใช้วุ้น (agar) เป็นวัสดุค้ำยึด) 1.5, 1.7, 1.05, 1.6, 1.7, 4.1 และ 1.2 เท่าตามลำดับ สำหรับการเพาะเลี้ยงในสภาพ photomixotrophic (เติมน้ำตาลซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยง) พบว่าการใช้วุ้นได้ต้นข้าวโพดที่มีการเจริญเติบโตดีกว่าการใช้ vermiculite ในบางระยะการเจริญเติบโต ดังนั้นการใช้ vermiculite เป็นวัสดุค้ำยึดจะช่วยให้ข้าวโพดเจริญเติบโตได้รวดเร็วขึ้นในสภาพ photoautotrophic แต่อาจยับยั้งการเจริญเติบโตได้ในสภาพ photomixotrophic ซึ่งความยาวและจำนวนรากที่เพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพ photoautotrophic อาจช่วยเพิ่มโอกาสรอดชีวิตของต้นข้าวโพดหลังย้ายปลูกลงดิน

การทดลองที่ 2 การศึกษาอิทธิพลของวัสดุค้ำยึด (vermiculite และวุ้น) และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (0, 12.5 และ 25 กรัม/ลิตร) ที่มีต่ออัตราการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง zygotic embryo ในสภาพปลอดเชื้อ โดยการใช้วุ้นร่วมกับน้ำตาลซูโครส 25 กรัม/ลิตร จัดเป็นกรรมวิธีควบคุม ผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้ vermiculite และวุ้นเป็นวัสดุค้ำยึด จะให้ค่า LL, LDW, NR, RL, RFW และ RDW ที่ 20 วัน ไม่แตกต่างทางสถิติ แต่ค่าทั้งหมดยกเว้น NR จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสที่ระดับต่างๆกัน ซึ่งการใช้ vermiculite ร่วมกับอาหาร Growth medium (GM) ที่ใส่น้ำตาลซูโครส 12.5 กรัม/ลิตร จะให้ค่า LL, LFW, LDW, NR, RL, RFW และ RDW สูงที่สุด ซึ่งให้ค่าสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ1.7, 2.09, 2.05, 7.0, 5.8, 6.46 และ 4.86 เท่าตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีควบคุม จะให้ค่า LL, LFW, LDW, NR, RFW และ RDW ต่ำที่สุด จากผลการ

ทดลองที่ 1 และ 2 จึงมีการนำ vermiculite มาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงต้นข้าวโพดที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

การทดลองที่ 3 ทำการเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของโพรนามีด โดยการทำ SC (ให้อุณหภูมิ 2-4 ^{0}ซ นาน 72 ชั่วโมง และ 27 ^{0}ซ นาน 7 ชั่วโมง) ก่อนให้โพรนามีด เปรียบเทียบกับการไม่ทำ SC ในการทดลองนี้ใช้สายพันธุ์แท้ และ ลูกผสมเดี่ยว จำนวน 5 สายพันธุ์ และ 9 คู่ผสม ตามลำดับ ทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ผลการทดลองพบว่า ลูกผสม Ki 3 x M 24 เมื่อใช้โพรนามีดร่วมกับการทำ SC ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ embryo like structure (ELS) induction (EI) สูงกว่าการไม่ทำ SC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 2.9 เท่า ส่วนพันธุ์อื่นๆ SC จะมีแนวโน้มให้ค่า % EI สูงขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ได้จำนวนต้นจากการชักนำทั้งสิ้น 6 ต้น โดยเป็นต้น doubled haploid (DH) และ haploid (H) อย่างละ 3 ต้น เลือกพันธุ์ที่ให้ค่า % EI สูง ได้แก่ ลูกผสม Agron 1 x Pa 91, Agron 38 x M72 และ Agron 43 x M72 ไปเพาะเลี้ยงที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติซึ่งมีความอุดมสมบูรณ์ของดินสูงกว่า ผลการทดลองพบว่า การใช้ SC มีศักยภาพในการชักนำให้เกิด ELS เพิ่มขึ้น แต่พบความแตกต่างทางสถิติเฉพาะในลูกผสม Agron 38 x M72 และพบว่า เมื่อใช้โพรนามีดร่วมกับการทำ SC จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการชักนำให้เกิดต้น (Regeneration ability; RA) และการผลิตต้นพืช (Plant production; PP) ต่ำกว่าการไม่ทำ SC เล็กน้อย แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ อย่างไรก็ตาม SC มีแนวโน้มให้ค่าความสามารถในการผลิตต้น DH ต่อ 100 อับละอองเกสร (DH plant production; DPP) การเกิดต้น DH ต่อ 100 ELS (DH plant regeneration ability; DRA) และ ดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซม (doubling index; DI) สูงขึ้นแม้จะไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยให้ค่า DI สูงขึ้นเฉลี่ย 1.65 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ทำ SC ซึ่งจีโนไทป์เป็นปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการเกิด ELS การเกิดต้นและการรอดชีวิตของต้นที่ชักนำได้ ลูกผสม Agron 1 x Pa 91ให้ค่า RA และ PP ในทั้ง 2 ทรีตเมนต์ สูงกว่าลูกผสมอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และให้ค่า % EI, % DRA, % DPP และ DI สูงที่สุดเท่ากับ 4.4 %, 2.9 %, 0.13 % และ 0.34 เมื่อใช้ SC ตามลำดับ สภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการเกิด ELS เช่นเดียวกันโดยพบว่า ลูกผสม Agron 1 x Pa 91, Agron 38 x M72 และ Agron 43 x M72 เมื่อปลูกที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติให้ค่า % EI สูงกว่าที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 2.37, 4.38 และ 1.71 เท่า เมื่อทำ SC และ 2.07, 4.22 และ 1.67 เท่า เมื่อไม่ทำ SC ตามลำดับ สามารถชักนำต้นได้จากลูกผสม Agron 1 x Pa 91 และ Agron 43 x M72 รวมทั้งสิ้น 17 ต้น (เป็นต้น DH และ H จำนวน 9 และ 8 ต้น ตามลำดับ) ซึ่งต้น DH ที่ได้เป็นต้นที่มีลักษณะผิดปกติ เช่น tassel seed จำนวน 2 ต้น ต้นที่แตกอับละอองเกสรก่อนออกไหมจำนวน 3 ต้น ต้นที่ไม่มีฝักและฝักไม่ออกไหมอย่างละ 1 ต้น และพบต้นปกติที่สามารถผสมตัวเองได้จำนวน 2 ต้น อย่างไรก็ตามเมล็ดที่ได้ไม่สามารถพัฒนาจนเป็นเมล็ดที่สุกแก่สมบูรณ์และมีชีวิตได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนักศึกษา.....ปริฉัตร ขจัดพาล.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

PARINYA KHAJUDPARN : PRODUCTION OF DOUBLED HAPLOID MAIZE (*Zea mays* L.) BY ANTHER CULTURE
THESIS ADVISOR: PIYADA THIPYAPONG, Ph.D. 109 PP.
ISBN: 974-533-290-9

To improve the efficiency of maize anther culture, synchronization of cell cycle (SC) was performed prior to pronamide treatment to increase chromosome doubling efficiency of pronamide. In addition the effects of supporting materials and sucrose on *in vitro* maize growth from seed and zygotic embryo culture were evaluated. Experiment 1: the growth of *in vitro* maize (var. Cargill 939) plantlets from seed culture under photoautotrophic condition (without sucrose). The results showed that growth of *in vitro* maize plantlets cultured on MS medium photoautotrophically had the highest values of leaf length (LL), root length (RL), leaf fresh weight (LFW) and root fresh weight (RFW) at all stages of growth (days 3, 5, 7 and 9; $p < 0.05$). On day 9 they had 1.5, 1.7, 1.05, 1.6, 1.7, 4.1 and 1.2-fold higher LL, LFW, leaf dry weight (LDW), number of root (NR), RL, RFW, root dry weight (RDW) than control (with sucrose and agar as supporting material), respectively. Under photomixotrophic condition (with sucrose), it was found that using agar as supporting material led to higher growth than vermiculite at some stages of growth. Therefore, using vermiculite as supporting material promoted growth of *in vitro* maize plantlets under photoautotrophic condition, but may inhibit growth under photomixotrophic condition. The increase in length and number of roots under photoautotrophic condition may enhance survivability during *ex vitro* acclimatization.

Experiment 2 : the effects of supporting materials (vermiculite and agar) and sucrose concentration (0, 12.5 and 25 g/L) on growth of *in vitro* maize (var. Insee 2) plantlets from embryo culture. The method of using agar and 25 g/L sucrose was used as control treatment. The results showed that on day 20, plantlets cultured on vermiculite and agar had similar LL, LDW, NR, RL, RFW and RDW. But different sucrose concentration led to significant difference in all values except NR. Using vermiculite and 12.5 g/L sucrose gave the highest LL, LFW, LDW, NR, LR, RFW and RDW that were 1.7, 2.09, 2.05, 7.0, 5.8, 6.46 and 4.86- fold higher than control, respectively. Whereas control gave the lowest LL, LFW, LDW, NR, RFW and RDW. The results of experiment 1 and 2 supported the use of vermiculite for culture of maize plantlets from anther culture.

Experiment 3 : the increase in chromosome doubling efficiency of pronamide by using SC (transferring anthers to 2-4 ^{o}C for 72 hours and 27 ^{o}C for 7 hours) before treatment with pronamide in comparison with not using SC. The anther culture was conducted at Suranaree University of Technology with 5 inbred lines and 9 hybrid varieties. The results showed that Ki 3 x M 24 gave significantly higher % embryo like structure (ELS) induction (EI) when SC was used (2.9-fold higher than not using SC). SC also tended to increase % EI in other varieties but no significant difference between

the two treatments was observed. Six regenerated plantlets were obtained (3 doubled haploid [DH] and 3 haploid [H]). Three varieties giving the highest % EI (Agron 1 x Pa 91, Agron 38 x M72 and Agron 43 x M72) were selected for additional anther culture at the National Corn and Sorghum Research Center where soil fertility is higher. SC had the potential to increase % EI of all genotypes though significant difference was only observed in Agron 38 x M72. Genotype is a major factor controlling % EI, % regeneration ability (RA) and % survivability (S). Agron 1 x Pa 91 gave the significantly highest values of % RA and % plant production (PP) compared to other varieties in both SC and without SC treatments. In addition it gave the highest % EI, % DRA, % DPP and DI of 4.4 %, 2.9 %, 0.13 % and 0.34 when using SC, respectively. Similarly, environment had the effect on % EI. The anther culture of Agron 1 x Pa 91, Agron 38 x M72 and Agron 43 x M72 grown at National Corn and Sorghum Research Center had 2.37, 4.38, and 1.71-fold higher % EI than at Suranaree University of Technology when using SC and 2.07, 4.22 and 1.67-fold higher % EI when not using SC, respectively. SC slightly decreased % RA and % PP in all varieties but no significant difference was observed. However, SC tended to increase % DH plant production (DPP), % DH plant regeneration ability (DRA) and doubling index (DI) though without statistical significance. On average, SC gave *ca.*1.65-fold higher DI than without SC. Seventeen regenerated plantlets was obtained from Agron 1 x Pa 91 and Agron 43 x M72. From these 17 plants, 9 were DH and 8 were H. Seven of the DH plants had abnormal morphology such as tassel seed (2), asynchronous pollen shedding and silk emergence (3), no ear (1) and no silking ear (1). 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.

School of Crop Production Technology
Academic Year 2003

Student's Signature.....Parinya Khajudparn.....
Advisor's Signature.....
Co – advisor's Signature.....
Co – advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

การดำเนินงานครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี เพราะได้รับความช่วยเหลือและคำแนะนำจากบุคคลต่าง ๆ หลายฝ่าย ทั้งในด้านวิชาการ และการดำเนินการวิจัยดังต่อไปนี้

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ อ.ดร ปิยะดา ทิพยผ่อง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งกรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบคุณ ศ.ดร อารีย์ วรัญญูวัฒก์ ซึ่งกรุณาให้ความรู้ คำแนะนำในการทดลอง และอนุญาตให้ใช้ข้าวโพดพันธุ์ Pa 91 ในการทดลอง ขอขอบคุณ ดร. ชะบา จำปาทอง และ รศ.ดร ประภา ศรีพิจิตต์ ซึ่งกรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับอุปกรณ์สำหรับห้องปฏิบัติการที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ ขอขอบคุณ รศ.ดร. วาสนา วงษ์ใหญ่ ที่กรุณามอบเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง ขอขอบคุณ ดร. จิรายุส เลาหวนิช ที่ให้คำแนะนำในการทดลอง ขอขอบคุณคณะกรรมการวิจัยและพัฒนาแห่งชาติ และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่สนับสนุนเงินอุดหนุนเพื่อทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ และขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ที่สนับสนุนเงินทุนการศึกษา

ขอขอบคุณ คุณเอกวัฒน์ จันทรวงศ์ คุณนวลปราง อุทัยดา และเจ้าหน้าที่ประจำอาคารศูนย์เครื่องมือ ฯ 3 ทุกท่าน ซึ่งช่วยอธิบายวิธีใช้เครื่องมือต่าง ๆ ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับอุปกรณ์สำหรับห้องปฏิบัติการ คุณจิตติพร ดวงโสมา พนักงานฟาร์มมหาวิทยาลัยที่ได้ช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในส่วนของแปลงทดลอง คุณอนงค์นุช ผลวงศ์ และ คุณวิภาภรณ์ วรรณธนาเลิศ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทดลอง คุณละออง ไกยสวนและคุณมณฑา พิมอินทร์ เจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติที่ให้ความช่วยเหลือในการทดลอง รวมถึงเพื่อน พี่น้องนักศึกษาปริญญาโทและปริญญาเอกทุกท่าน ที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำงานวิจัยนี้จนแล้วเสร็จ

ท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่และพี่น้องอย่างมาก ที่สนับสนุนและให้กำลังใจในการศึกษาเล่าเรียนมาโดยตลอดจนประสบความสำเร็จ

ปริญญา ขจัดพาล

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)……. ง

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)…… ฉ

กิตติกรรมประกาศ……. ซ

สารบัญ…..…….. ฌ

สารบัญตาราง……. ฎ

สารบัญภาพ……... ฏ

รายชื่อคำย่อ…….…….. ฑ

บทที่

1 บทนำ……..…… 1

วัตถุประสงค์…… 4

2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……..… 5

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าวโพด.....…….……... 5

การจำแนกระยะการเจริญเติบโตของข้าวโพด…….……..…….…..... 8

การพัฒนาของเซลล์ละอองเกสรและวงชีพ……..……..….. 8

วัฏจักรเซลล์ (cell cycle) …….…….……..... 11

การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพด …….……. 12

ระยะการพัฒนาของ microspore……..…….……..… 13

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร…….……. 15

การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในข้าวโพด..... ……..……. 22

เทคโนโลยีที่เหมาะสมสำหรับการปรับสภาพพืชก่อนการย้ายพืชออกปลูก……..... 24

ปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาลักษณะทางกายภาพ และสรีระวิทยาของต้นพืช..... 24

ปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาลักษณะทางกายภาพ และสรีระวิทยาของรากพืช....…..... 27

เทคนิคการปรับสภาพพืชก่อนการย้ายปลูก (*In – vitro* acclimatization).....…..... 29

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย……...……...…….……	31
3.1 วัสดุอุปกรณ์…….……....	31
3.2 สถานที่ทำการทดลอง…..……..……...	32
3.3 ระยะเวลาการทดลอง…...……...…...…	32
3.4 วิธีการทดลอง……..……..……..……...	32
3.4.1 การทดลองที่ 1: การศึกษาการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดพันธุ์คาร์กิล 939 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาพ photoautotrophic…….....	32
3.4.2 การทดลองที่ 2: การศึกษาอิทธิพลของวัสดุค้ำยึด (vermiculite และวุ้น [agar]) และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในระดับต่าง ๆที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดที่ได้จากการเพาะเลี้ยง zygotic embryo ……..…	33
3.4.3 การทดลองที่ 3: การเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มชุดโครโมโซมของโพรนามีด…….	35
4. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง……...….	40
5. สรุปผลการทดลอง…….…	78
ข้อเสนอแนะ.....….….....	79
6. รายการเอกสารอ้างอิง…….……..……..	80
7. ภาคผนวก…….…….…….……	91
8. ประวัติผู้เขียน…….……...…	109

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ดอกตัวผู้ของข้าวโพด	6
2	การเกิดขบวนการ microsporogenesis และ microgametogenesis……..……	10
3	แสดงการพัฒนาของละอองเกสรข้าวโพด.....……..	11
4	กราฟแสดงค่าความยาวใบของต้นข้าวโพดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ใส่และไม่ใส่น้ำตาลซูโครสโดยใช้วุ้นและ vermiculite เป็นวัสดุค้ำยึด…….……...…...…..	44
5	กราฟแสดงค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งใบของต้นข้าวโพดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ใส่และไม่ใส่น้ำตาลซูโครสโดยใช้วุ้นและ vermiculite เป็นวัสดุค้ำยึด…...……..	45
6	แสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่างต้นข้าวโพดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ใส่และไม่ใส่น้ำตาลซูโครสโดยใช้วุ้นและ vermiculite เป็นวัสดุค้ำยึด…….....…...	46
7	กราฟแสดงค่าจำนวนและความยาวรากของต้นข้าวโพดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ใส่และไม่ใส่น้ำตาลซูโครส โดยใช้วุ้นและ vermiculite เป็นวัสดุค้ำยึด……. ...……....	47
8	กราฟแสดงค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งรากของต้นข้าวโพดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ใส่และไม่ใส่น้ำตาลซูโครส โดยใช้วุ้นและ vermiculite เป็นวัสดุค้ำยึด…....….....	48
9	แสดงลักษณะต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยง zygotic embryo เมื่อใช้ vermiculite (ก, ข และ ค) และวุ้น (ง, จ และ ฉ) เป็นวัสดุค้ำยึดร่วมกับอาหารที่ไม่ใส่น้ำตาลซูโครส (ก, ง) ใส่น้ำตาลซูโครส 12.5 กรัม/ลิตร (ข, จ) และ ใส่น้ำตาลซูโครส 25 กรัม/ลิตร (ค, ฉ) .....……..	54
10	แสดงลักษณะ ELS ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร……..……..…	73
11	เปรียบเทียบลักษณะ microspore ที่สมบูรณ์ (ใหญ่) และไม่สมบูรณ์ (เล็ก)…….…..…….	73
12	แสดงลักษณะต้น จำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายราก และลักษณะปากใบของต้นข้าวโพด DH……..……..…	74
13	แสดงลักษณะต้น จำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายราก และลักษณะปากใบของต้นข้าวโพด H…….……..……	75
14	ระยะเวลาการเกิด ELS ของข้าวโพดพันธุ์ต่าง ๆ ในกรรมวิธีที่ใช้โพรนามีดร่วมกับการไม่ใช้ SC (ก) และ การใช้ SC (ข) ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี…….	76
15	ระยะเวลาการเกิด ELS ของข้าวโพดลูกผสมพันธุ์ต่าง ๆ ในกรรมวิธีที่ใช้โพรนามีดร่วมกับการไม่ใช้ SC (ก) และ การใช้ SC (ข) ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ....	77

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่ **หน้า**

1 แสดงการเพาะเลี้ยง zygotic embryo ของข้าวโพด…….. 104

2 แสดงขั้นตอนการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพด…….. 105

3 แสดงระยะนิวเคลียสของ microspore……...….. 107

4 แสดงพัฒนาการของ ELS……..… 108

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงค่าความยาวใบ น้ำหนักสดใบ และน้ำหนักแห้งใบ ของต้นข้าวโพดที่ได้จากการเพาะเลี้ยง zygotic embryo เมื่อใช้วัสดุค้ำยึด 2 ชนิด (vermiculite และวุ้น) และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสระดับต่าง ๆ (0, 12.5 และ 25 กรัม/ลิตร)……..	52
2	แสดงค่าจำนวนราก ความยาวราก น้ำหนักสดราก และน้ำหนักแห้งรากของต้นข้าวโพดที่ได้จากการเพาะเลี้ยง zygotic embryo เมื่อใช้วัสดุค้ำยึด 2 ชนิด (vermiculite และวุ้น) และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสระดับต่าง ๆ (0, 12.5 และ 25 กรัม/ลิตร)……..	53
3	ความสามารถในการชักนำให้เกิด ELS จำนวนต้นที่ชักนำได้ และค่าดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซม ของข้าวโพดจีโนไทป์ต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกรรมวิธีที่ใช้และไม่ใช้ SC ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.....…….....……..	65
4	ความสามารถในการชักนำให้เกิด ELS ในการเกิดต้น และในการผลิตต้นของข้าวโพดลูกผสมเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกรรมวิธีที่ใช้และไม่ใช้ SC ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ .....…….....……	67
5	ความสามารถในการผลิตต้น DH ในการเกิดต้น DH และค่าดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซมของข้าวโพดลูกผสมเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกรรมวิธีที่ใช้และไม่ใช้ SC ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ .....……	68
6	เปอร์เซ็นต์การตายในระหว่างการเพาะเลี้ยงและหลังจากย้ายปลูกลงดิน และเปอร์เซ็นต์ต้นที่รอดชีวิตต่อต้นที่ชักนำได้ของข้าวโพดลูกผสม เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกรรมวิธีที่ใช้และไม่ใช้ SC ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ.....……...	69
7	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นข้าวโพด DH ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร…….	70
8	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นข้าวโพด H ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร……	71
9	แสดงขนาดและจำนวนปากใบของต้นข้าวโพด DH ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร..	72
10	แสดงขนาดและจำนวนปากใบของต้นข้าวโพด H ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร….	72

รายชื่อคำย่อ

APM	=	amiprophosmethyl
^{O}C	=	degree Celsius
DC	=	death in culture
DH	=	doubled haploid
DI	=	doubling index
DPP	=	DH plant production
DRA	=	DH plant regeneration ability
DT	=	death after transplanting
ELS	=	embryo-like structure
EI	=	ELS induction
GM	=	growth medium
H	=	haploid
IBA	=	Indole-3-butyric acid
IM	=	induction medium
LDW	=	leaf dry weight
LFW	=	leaf fresh weight
LL	=	leaf length
NR	=	number of root
PP	=	plant production
RA	=	regeneration ability
RDW	=	root dry weight
RFW	=	root fresh weight
RL	=	root length
RM	=	regeneration medium
RP	=	regenerated plant
S	=	survivability
SC	=	synchronization of cell cycle

บทที่ 1
บทนำ

ข้าวโพด (*Zea mays* L.) เป็นธัญพืชที่มีความสำคัญเป็นอันดับสามของโลกรองจากข้าวสาลีและข้าว โดยนำไปใช้เป็นแหล่งของแป้ง (คาร์โบไฮเดรต) และโปรตีนสำหรับมนุษย์และสัตว์ ซึ่งข้าวโพดมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงประมาณ 71 เปอร์เซ็นต์ แต่มีโปรตีนค่อนข้างต่ำประมาณ 9.5 เปอร์เซ็นต์ และมีกรดอะมิโนไลซีนและทริพโตเฟน (กฤษฎา สัมพันธารักษ์, 2531) นอกจากนี้ยังนำไปใช้ในด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น การผลิตแป้ง น้ำมันพืช น้ำตาล สบู่ สี และอีกมากมาย (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ และคณะ, 2541) ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกข้าวโพดประมาณ 7.38 ล้านไร่ และมีผลผลิตรวมประมาณ 4.21 ล้านตัน/ปี ซึ่งไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด ทำให้ต้องมีการนำเข้าจาก ต่างประเทศปีละ 67 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2545) ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดให้มีคุณภาพและผลผลิตสูง เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด การสร้างข้าวโพดลูกผสม (hybrid varieties) นั้นเกิดจากการผสมระหว่างสายพันธุ์แท้ตั้งแต่ 2-4 สายพันธุ์ เพื่อใช้ประโยชน์จากความดีเด่น (heterosis) ของลูกผสม โดยปกติการสร้างข้าวโพดสายพันธุ์แท้ จะต้องทำการผสมตัวเอง 5-7 ชั่วเพื่อให้ยีนทุกคู่อยู่ในสภาพโฮโมไซกัส (homozygous) ที่สูงเพียงพอ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ, 2540) อีกวิธีการหนึ่งคือการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร (anther culture) เพื่อ ทำให้ได้พืชที่เป็น haploid (H) หรือ monoploid ซึ่งเมื่อนำไปชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม (doubling chromosome) จะทำให้ได้พืชที่เป็นโฮโมไซกัสอย่างสมบูรณ์ วิธีดังกล่าว จะช่วยลดระยะเวลาในการสร้างสายพันธุ์แท้ให้เหลือเพียง 1 ชั่ว และสายพันธุ์แท้ที่ได้จะมีการ ถ่ายทอดลักษณะที่คงที่ (stable inheritance; Saisingtong, 1998) Wu et al. (1983) ได้พัฒนาข้าวโพด สายพันธุ์แท้ชื่อ Qun Hua จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรโดยใช้เวลาเพียง 1 ปี เป็นการลด ระยะเวลาได้ถึง 4-6 ปี

ข้าวโพดเป็นพืชที่มีอัตราการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยธรรมชาติ (spontaneous chromosome doubling) เพียง 22 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับพืชอื่น เช่น ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าว และ ยาสูบ ซึ่งมีอัตราการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยธรรมชาติ 88, 59 และ 46 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Dieu and Beckert, 1986) และมีอัตราการชักนำให้เกิดต้น (regenerated plant; RP) ต่ำ คือประมาณ 0-11.7 ต้นต่อ 100 อับละอองเกสร (Petolino and Jones, 1986) จากงานวิจัยส่วนใหญ่ที่ทดลองใช้สารเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมชนิดต่าง ๆ เช่น โคลชิซิน (colchicine) โพรนามีด (pronamide) โอไรซาลิน

(oryzalin) และ อะมิโพรฟอสเมทิล (amiprophosmethyl; APM) ในขณะทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเพื่อให้ได้ต้นดับเบิลแฮพลอยด์ (doubled haploid; DH) พบว่า โคลชิซินมีประสิทธิภาพสูงสุดในการชักนำให้ได้ต้น DH (Barloy and Beckert, 1993) โคลชิซินเป็นสารก่อกลายพันธุ์ที่นอกจากจะมีอำนาจในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ทำให้จำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นแล้ว ที่ความเข้มข้นสูงยังทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซม ซึ่งอาจเป็นผลทำให้ได้ต้นที่ผิดปกติ (Rotarenco, 2000) Saisingtong (1998) พบว่าการใช้โคลชิซินในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพดมีผลทำให้การสร้าง embryo-like structure (ELS) ลดลง 30-50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้ (กรรมวิธีควบคุม) ในทางตรงกันข้ามโพรนามีด มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า และไม่มีผลกระทบต่อการสร้าง ELS และ RP อย่างไรก็ตามโพรนามีดมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมต่ำกว่าโคลชิซิน จึงเป็นผลให้อัตราการเกิด DH ในจีโนไทป์ส่วนใหญ่ต่ำกว่าโคลชิซิน ดังนั้นถ้าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มชุดโครโมโซมของโพรนามีดได้อาจทำให้อัตราการเกิด DH สูงขึ้น กว่าเดิม จากการทดลองของ Rotarenco (2000) พบว่า การทำให้เซลล์มีระยะของวัฏจักรที่คล้ายกัน (synchronization of cell cycle; SC) โดยใช้อุณหภูมิต่ำที่ 2-4 ^{o}ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ข้าวโพดที่มี mitotic activity ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์ตอบสนองต่อสารชักนำการเพิ่ม ชุดโครโมโซม จากการทดลองให้อุณหภูมิต่ำแก่ต้นกล้าแฮพลอยด์ (haploid; H) ของข้าวโพด เพื่อกระตุ้นให้เกิด SC ก่อนให้โคลชิซิน พบว่าวิธีนี้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม เช่น เมื่อใช้โคลชิซินความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ SC ทำให้ได้ DH 12.7 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การให้โคลชิซินในสภาพเดียวกันโดยไม่ได้ทำ SC ไม่สามารถชักนำให้เกิด ต้น DH ได้เลย การนำเทคนิค SC มาใช้ในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพดจึงมีศักยภาพในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืช DH

ในประเทศไทยได้เริ่มมีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรแล้ว แต่ยังไม่ประสบ ผลสำเร็จมากนัก ปัญหาที่พบได้แก่ อัตราการเกิด RP และ DH ต่ำ DH มีลักษณะผิดปกติ และ อัตราการตายของต้น DH สูง (กาญจนา รุจิพจน์, 2540) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้มีการนำเอาสายพันธุ์ ข้าวโพดเขตอบอุ่น Pa 91 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีอัตราการชักนำให้เกิดต้นสูงในการเพาะเลี้ยง อับละอองเกสรจากประเทศสหรัฐอเมริกา แต่มีลักษณะทางการเกษตรไม่ดีมาผสมกับข้าวโพด สายพันธุ์ไทยเพื่อให้มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรที่เพิ่มมากขึ้น และมีโอกาส ได้พ่อแม่พันธุ์ที่มีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในเขตร้อนได้ การทดลองนี้ใช้เทคนิค early transfer โดยย้ายอับละอองเกสรไปยังอาหาร Regeneration medium (RM) หลังจากอยู่บนอาหาร Induction medium (IM) เพียง 3 สัปดาห์ ก่อนจะมีการพัฒนาของ ELS ซึ่งช่วย เพิ่มจำนวนต้นที่ได้จากการชักนำให้มากขึ้น (Saisingtong, 1998) และใช้โพรนามีดความเข้มข้น 20 μM เป็นเวลา 3

วัน ซึ่ง ประภา ศรีพิจิตต์ และ คณะ (2544) พบว่าสามารถเหนี่ยวนำการเพิ่ม ชุดโครโมโซมและทำให้เกิดจำนวนต้น DH สูงสุด และทำการเปรียบเทียบการทำและไม่ทำ SC เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืช DH นอกจากนี้ได้ศึกษาการตอบสนองของต้นข้าวโพดที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ vermiculite และวุ้นเป็นวัสดุค้ำยึดภายใต้สภาพ photoautotrophic (สภาพเพาะเลี้ยงที่ไม่มี การเติมน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยง พืชจะสังเคราะห์ด้วยแสงโดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศเท่านั้น) เปรียบเทียบกับ photomixotrophic (สภาพเพาะเลี้ยงที่มีการเติมน้ำตาลในอาหาร เพาะเลี้ยง พืชจะได้แหล่งคาร์บอนจากอาหารเพาะเลี้ยงและจากการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยใช้ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ) และเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของต้นที่ได้จากการ เพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

vermiculite คือ แร่ siligate ที่มีการเรียงตัวของธาตุ siliga เป็นแบบแผ่นแบน จัดเป็น 1^0 siligate มักพบเป็นแผ่นแทรกตัวอยู่ระหว่างชั้นหินบริเวณที่เป็นภูเขาไฟ ภายในโมเลกุลประกอบด้วยธาตุต่างๆ คือ Si, Al, Mg, Ca, K, Fe, Ti, H, O และ อื่น ๆ ซึ่ง vermiculite สามารถปลดปล่อยธาตุเหล่านี้ ให้พืชนำไปใช้ได้อย่างช้า ๆ ในประเทศไทยพบได้ในจังหวัดลำปาง ลพบุรี ตาก และ กาญจนบุรี เป็นต้น (อัศจรรย์ สุขธำรง, ติดต่อส่วนตัว)

ปัจจุบันได้มีการนำเอา vermiculite มาใช้เป็นวัสดุเพาะเลี้ยงแทนวุ้นมากขึ้นภายใต้สภาพ photoautotrophic เนื่องจาก vermiculite มีความโปร่งไม่อัดตัวแน่น ทำให้การถ่ายเทแลกเปลี่ยน ของก๊าซต่าง ๆ รอบ ๆ ลำต้น ภายใต้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีมากขึ้น ซึ่งส่งผลให้ความชื้นสัมพัทธ์ ในระบบเพาะเลี้ยงลดลงจาก 100 เป็น 85-90 เปอร์เซ็นต์ (Aitken-Christie et al., 1995) และยังช่วยกระตุ้นขบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและการคายน้ำให้มากขึ้น ส่งผลให้มีการดูดซึมน้ำและธาตุอาหาร เพิ่มมากขึ้น (Kitaya et al., 1997) รวมไปถึงกระตุ้นให้มีการสร้าง wax เคลือบที่ใบและปากใบ อีกทั้งยังทำให้พืชมีระบบรากที่แข็งแรง การแตกรากแขนงเพิ่มขึ้น และลดปัญหาการปนเปื้อนเนื่องจากไม่มีการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งให้คาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยง (Ziv, 1995) Kirdmanee et al. (1995) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงยอดยูคาลิปตัสในวัสดุเพาะเลี้ยงต่าง ๆ คือ วุ้น ตาข่ายพลาสติก เจลไรท์ (Gelrite) และ vermiculite พบว่า พืชมีการเจริญเติบโตดีที่สุดใน vermiculite และเมื่อใช้ในสภาพที่ได้รับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เต็มที่จะมีการแตกรากฝอย จำนวนราก และจำนวนใบที่ไม่ถูกทำลายมากที่สุด ซึ่งข้อดีต่าง ๆ ของ vermiculite นี้ส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมจริงหลังการย้ายปลูกลงดินได้ดีขึ้น ทำให้การรอดชีวิตของต้นพืชมีสูงขึ้น

การศึกษาวิธีการผลิตข้าวโพด DH โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพดนี้ นอกจาก อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพืช DH แก้ปัญหาการเกิดต้น DH ที่ผิดปกติ และเพิ่มอัตรา รอด

ชีวิตของต้น DH เพื่อใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดต่อไปแล้ว ต้น DH สายพันธุ์ ที่ได้จากพันธุ์ลูกผสมยังอาจสามารถนำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผลิตข้าวโพดลูกผสมได้โดยตรง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อปรับปรุงวิธีการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพดให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น
2. เพื่อเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวโพดลูกผสมระหว่างสายพันธุ์ไทยกับ Pa 91 และพันธุ์ไทยกับ M 72 ซึ่งอาจทำให้ได้พ่อแม่สายพันธุ์แท้ที่มีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในเขตร้อนได้ดี เพื่อนำไปใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผลิตข้าวโพดลูกผสมต่อไปในอนาคต
3. เพื่อศึกษาอิทธิพลของ vermiculite และน้ำตาลซูโครสในอาหารที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดและเพาะเลี้ยง zygotic embryo ในสภาพปลอดเชื้อ และใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพดต่อไป

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ข้าวโพด (Maize, *Zea mays* L.) จัดอยู่ในวงศ์ (family) Gramineae เป็นพืชประเภท diploid มีจำนวนโครโมโซม (chromosome) 2n = 20 มีถิ่นกำเนิดที่ประเทศเม็กซิโกในแถบอเมริกากลาง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าวโพด

ราก

เป็นแบบรากฝอย (fibrous root system) มีการเจริญของราก 2 ส่วนได้แก่

1. รากที่เจริญมาจากส่วนของ embryo เป็นรากที่พัฒนามาจากส่วนของ radicle ของ embryo เรียกว่า primary root หรือ first seedling root และมีรากแขนงแตกออกมาเรียกว่า secondary root หรือ lateral root นอกจากนี้ยังมีรากที่เกิดขึ้นที่ scutellar node เรียกว่า seminal root รากทั้งหมดมีการเจริญในระยะต้นกล้าและจะตายในที่สุด

2. รากที่เจริญมาจากส่วนข้อของลำต้น เรียกว่า adventitious root เจริญมาจากจุดกำเนิดราก (root primodia) ที่ส่วนของลำต้นส่วนล่าง ข้อแรกที่เกิด adventitious root ได้แก่ coleoptilar node รากเหล่านี้จะเจริญเติบโตอยู่ตลอดชีวิตของต้นข้าวโพด

ลำต้น

ลำต้นประกอบด้วยข้อและปล้อง ในส่วนของข้อประกอบด้วย เนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) จุดกำเนิดราก (root primordia) กาบใบ (leaf sheath) และ ตา (bud) ซึ่งตาส่วนล่าง ๆ สามารถเจริญเป็นหน่อ (tiller) ได้ ลำต้นของข้าวโพดเรียกว่า culm หรือ stalk มีความสูงตั้งแต่ 30 เซนติเมตร จนถึง 3 เมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.5-5.0 เซนติเมตร ซึ่งฝัก (ear shoot) จะเกิดบริเวณตาข้อที่ 7-8 นับจากใบธงลงมา

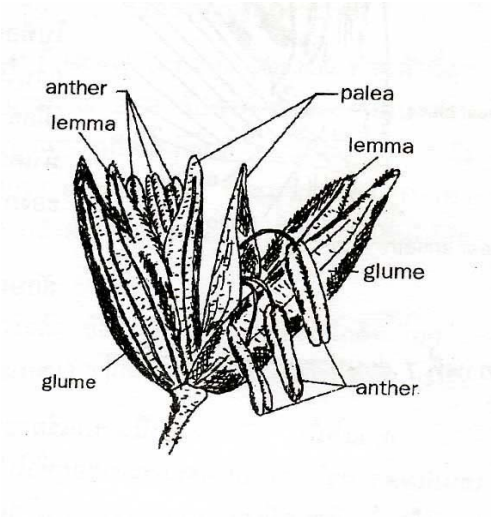
ใบ

ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ กาบใบ (leaf sheath) และ แผ่นใบ (leaf blade) โดยกาบใบจะหุ้มลำต้นไว้ และแผ่นใบมีเส้นกลางใบ เรียกว่า mid rib และมีเส้นใบขนานไปกับเส้นกลางใบ นอกจากนี้ส่วนต่อระหว่างกาบใบและแผ่นใบจะพบเยื่อกันน้ำ (ligule) หูใบหรือเขี้ยวใบ (auricle) และรอยต่อระหว่างกาบใบและแผ่นใบ (leaf collar) นอกจากนี้ระหว่างฝักกับลำต้นจะพบกลุ่มเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่มีลักษณะคล้ายใบที่ไม่มีเส้นกลางใบ มีลักษณะเป็น 2 เส้น เรียกว่า prophyllum

ช่อดอกและดอก

ข้าวโพดมีช่อดอกตัวผู้และช่อดอกตัวเมียอยู่บนต้นเดียวกัน (monoecious plant) แต่อยู่คนละตำแหน่งกัน

ช่อดอกตัวผู้ (staminate inflorescence) เกิดที่ส่วนปลายยอดของลำต้น ช่อดอกเป็นแบบ panicle เรียกว่าดอกหัว (tassel) เจริญจากปล้องสุดท้ายของลำต้น หรืออาจเรียกว่าก้านช่อดอก (peduncle) ส่วนแกนกลางของช่อดอก เรียกว่า rachis หรือ panicle axis จากส่วนของ rachis มีกิ่งที่แตกจาก rachis เรียกว่า primary branch และกิ่งก้านที่แตกจาก primary branch เรียกว่า secondary branch การแตกกิ่งก้านของก้านแขนงในช่อดอกมีการจัดเรียงแบบ spiral ใน 1 ช่อดอกมีดอกประมาณ 300 ดอก ดอกเกิดเป็นคู่บนก้านแขนง โดยดอกหนึ่งมีก้านดอก (pedicel spikelet) และอีกดอกหนึ่งไม่มีก้านดอก (sessile spikelet) ดอกตัวผู้ (staminate spikelet) ทั้งที่มีก้านดอกและที่ไม่มีก้านดอกจะมีกลีบหุ้ม 2 กลีบ ได้แก่ กลีบดอกด้านนอก (outer glume) และ กลีบดอกด้านใน (inner glume) มีลักษณะเป็นรูปไข่และมีขนเล็กน้อย ภายในแต่ละกลุ่มดอก (spikelet) ประกอบด้วยดอกย่อย (floret) 2 ดอก ดอกย่อยที่อยู่ด้านบนจะมีขนาดใหญ่และเจริญดีกว่าดอกย่อยที่อยู่ด้านล่าง แต่ละดอกย่อยจะถูกหุ้มด้วย lemma และ palea (ภาพที่ 1) ภายในแต่ละดอกย่อยมีเกสรตัวผู้ 3 อัน มีเยื่อรองรับไข่ (lodicule) 2 อัน และมีเกสรตัวเมียที่ไม่ทำหน้าที่ (rudimentary pistil) 1 อัน (ภาพที่ 1) ใน 1 อับละอองเกสรมีประมาณ 2,500 ละอองเกสร ดังนั้นใน 1 ช่อดอกตัวผู้จะมีละอองเกสรประมาณ 4,500,000 ละอองเกสร



ภาพที่ 1 ดอกตัวผู้ของข้าวโพด ที่มา: กฤษฎา สัมพันธารักษ์ (2541)

ช่อดอกตัวเมีย (pistillate inflorescence) เป็นแบบ spike มีชื่อเรียกทั่วไปว่า ฝัก (ear) ดอกตัวเมีย (pistillate spikelet) เกิดเป็นคู่เรียงเป็นแถวยาวบนแกนกลางช่อดอกหรือซัง (cob) ที่มีขนาดใหญ่ ช่อดอกตัวเมียคือฝักข้าวโพด ดังนั้นฝักข้าวโพดจึงมีจำนวนแถวของเมล็ดเป็นคู่ในแนวตั้ง ดอกมีก้านดอกสั้นทำให้ดูเหมือนว่าดอกอยู่ติดกับซังโดยตรง ดอกถูกหุ้มด้วยกลีบสั้น ๆ 2 กลีบ ภายในดอกแต่ละดอกมีดอกย่อย 2 ดอก แต่มีเฉพาะดอกย่อยบนเท่านั้นที่เจริญ ส่วนดอกย่อยล่างไม่เจริญ ดอกย่อยถูกหุ้มด้วย lemma และ palea ซึ่งรวมเรียกว่า chaff มีความยาวสั้นกว่ากลีบดอก ภายในดอกย่อยแต่ละดอกมีเกสรตัวเมีย 1 อัน มีเยื่อรองรังไข่ 2 อัน และเกสรตัวผู้ที่เป็นหมัน 3 อัน เกสรตัวเมียมีส่วนรับละอองเกสรตัวผู้เรียกว่าไหม มีความยาวประมาณ 10-30 ซม. ที่ผิวมีลักษณะเหนียวเพื่อรองรับละอองเกสรตัวผู้ โดยปกติไหมจะมีชีวิตอยู่เพื่อรับละอองเกสรตัวผู้ได้เป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ ภายในรังไข่มี 1 โอวูล (ovule)

ดอกที่อยู่ส่วนกลางของฝักจะส่งไหมออกจากเปลือกหุ้มฝักได้ก่อน จึงได้รับการผสมเกสรก่อน ส่วนดอกที่อยู่ส่วนโคนของฝักจะมีการเจริญในเวลาเดียวกับดอกที่อยู่ส่วนกลางของฝัก แต่ต้องใช้เวลาที่นานกว่าเพื่อส่งไหมให้พ้นจากเปลือกหุ้มฝัก และดอกที่อยู่ส่วนปลายของฝักเป็นดอกที่มีการเจริญและส่งไหมออกมาช้าที่สุด จึงทำให้มีโอกาสที่ได้รับการผสมน้อยกว่าดอกในส่วนอื่นของฝัก โดยดอกที่ได้รับการผสมก่อนจะได้เปรียบในด้านของการสะสมอาหาร ดังนั้นเมล็ดที่อยู่ตอนกลางฝักจึงมีขนาดใหญ่กว่าเมล็ดที่อยู่ที่ส่วนโคนและส่วนปลายฝัก

ผลและเมล็ด

ผลเป็นแบบ caryopsis ที่เยื่อหุ้มผลติดอยู่กับส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ด มีลักษณะเป็นเยื่อบาง ๆ ใสไม่มีสี ส่วนบนของเมล็ดจะพบรอยที่เกิดจากที่ไหมแห้งและหลุดร่วงไป รอยนี้เรียกว่า silk scar ส่วนของเยื่อหุ้มผลกับเยื่อหุ้มเมล็ดรวมเรียกว่า hull ภายในประกอบด้วย embryo ซึ่งมีน้ำมันค่อนข้างสูงและส่วนสะสมอาหารคือ เอนโดสเปิร์ม embryo ประกอบด้วยส่วนของรากอ่อน ยอดอ่อน ใบเลี้ยงที่ไม่มีการพัฒนา เนื้อเยื่อที่กั้นระหว่างคัพภะและเอนโดสเปิร์ม บริเวณรอบนอกของเอนโดสเปิร์มมีเนื้อเยื่อห่อหุ้มโดยรอบเรียกว่า aleurone layer หลังการผสมเกสรได้ประมาณ 45 วัน เมล็ดจะหยุดการเจริญเติบโต รูปร่างของเมล็ดขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของเมล็ดบนฝัก เมล็ดที่อยู่ส่วนปลายและส่วนโคนจะมีลักษณะที่ค่อนข้างกลม ส่วนเมล็ดที่อยู่ตรงกลางจะมีลักษณะแบนและมีเหลี่ยมมุมที่ฐานของก้านดอกจะพบเนื้อเยื่อสีดำเรียกว่า black layer ปรากฏให้เห็นเมื่อเมล็ดสุกแก่ทางสรีระวิทยา

เอนโดสเปิร์มมีสีต่าง ๆ เช่น เหลือง ส้ม และขาวเป็นต้น แป้งที่สะสมในส่วนของเอนโดสเปิร์มมีอยู่ 2 ลักษณะได้แก่

1. แป้งอ่อน เป็นแป้งที่อยู่กันอย่างหลวม ๆ มีลักษณะสีขาวขุ่น โดยมากพบที่ส่วนบนหรือส่วนกลางของเมล็ด
2. แป้งแข็ง เป็นแป้งที่รวมกันแน่น มีลักษณะค่อนข้างใส พบที่ด้านข้างและด้านบนของเมล็ด

การจำแนกระยะการเจริญเติบโตของข้าวโพด

ในการพัฒนาของข้าวโพดตั้งแต่ระยะเริ่มงอกจนถึงระยะเก็บเกี่ยว จะมีปรากฏการณ์ให้เห็นถึงการเพิ่มจำนวนใบ การเพิ่มจำนวนราก การออกดอก การพัฒนาของเมล็ด และการสุกแก่ปรากฏการณ์เหล่านี้สามารถจำแนกระยะการเจริญเติบโตอย่างกว้าง ๆ ดังนี้

1. ระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ (vegetative stage) เป็นระยะเริ่มตั้งแต่ที่ coleoptile โผล่พ้นผิวดินจนถึงระยะออกดอกตัวผู้ ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 45-55 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุกรรมของข้าวโพดและสภาพแวดล้อมของการเจริญเติบโต โดยเฉพาะอย่างยิ่งอิทธิพลจากอุณหภูมิ

2. ระยะออกดอก (flowering stage) เป็นระยะตั้งแต่ดอกตัวผู้บานจนถึงระยะที่ไหมโผล่พ้นกาบหุ้มฝัก ตลอดจนระยะผสมเกสร ใช้เวลาทั้งสิ้นประมาณ 5-15 วัน

3. ระยะการสะสมน้ำหนักเมล็ด (grain filling) เป็นระยะที่เมล็ดมีการสะสมแป้งในเมล็ดจนถึงระยะที่เมล็ดหยุดการพัฒนา ใช้เวลาทั้งสิ้นประมาณ 35-45 วัน

   3.1 ระยะน้ำนม (early milk stage และ milk stage)

   3.2 ระยะแป้งอ่อน (dough stage)

4. ระยะการสุกแก่ทางสรีระ (physiological maturity) เป็นระยะที่มีชั้นเนื้อเยื่อสีดำ (black layer) ปรากฏที่ส่วนโคนของเมล็ด การสะสมน้ำหนักแห้งจะสิ้นสุดลง เป็นระยะที่ข้าวโพดมีน้ำหนักแห้งสูงที่สุด

5. ระยะสุกแก่เก็บเกี่ยว (harvesting maturity) เป็นระยะที่ต้นและใบของข้าวโพด รวมทั้งกาบหุ้มฝักแห้ง ฝักคลายตัวจากกาบหุ้ม เมล็ดมีการลดความชื้นอย่างต่อเนื่องตามสภาพอุณหภูมิและความชื้นของบรรยากาศ (ราเชนทร์ ถิรพร, 2539)

การพัฒนาของเซลล์ละอองเกสรและวงชีพ

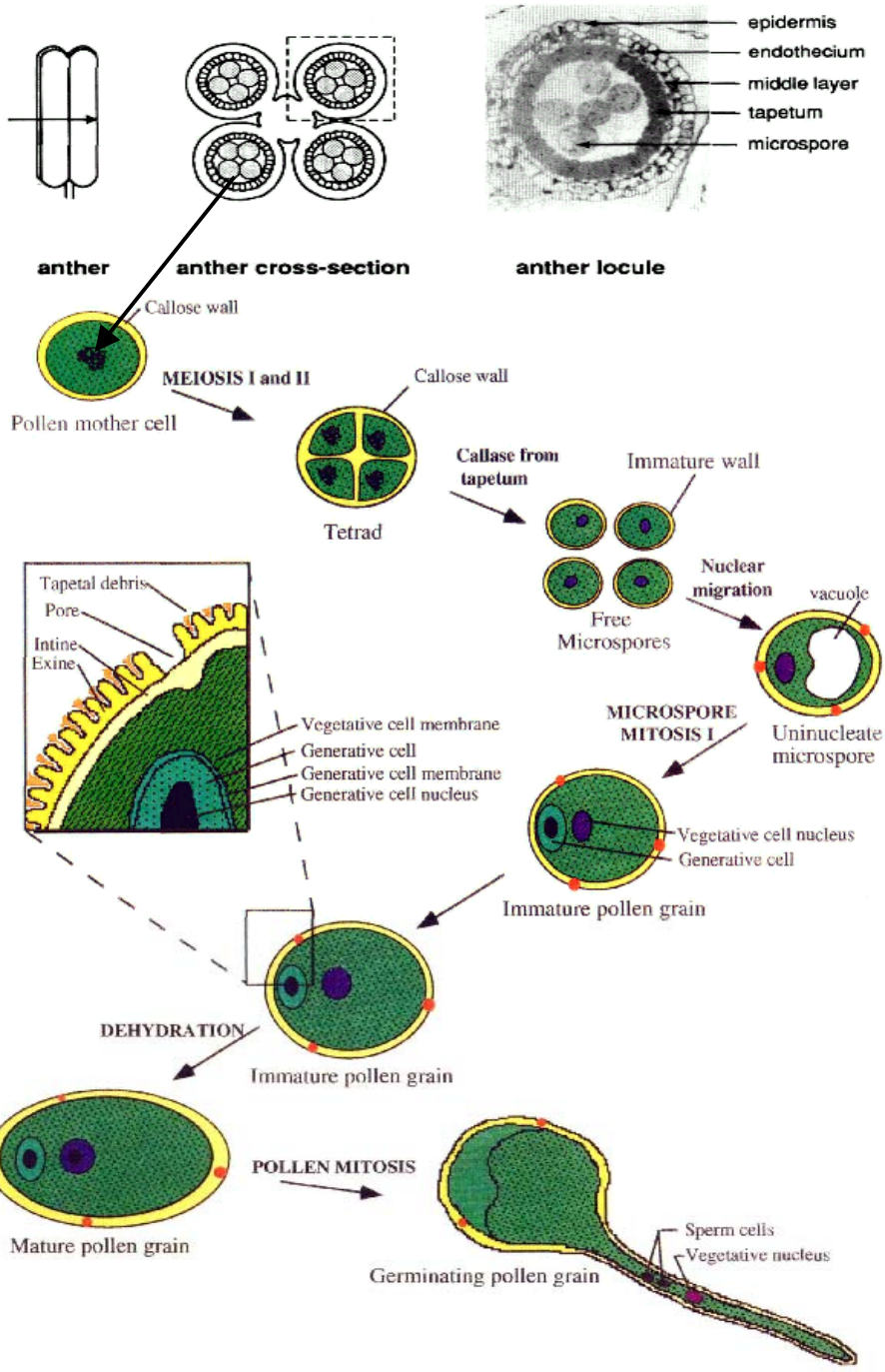
การพัฒนาของละอองเกสรถูกแบ่งเป็น 2 ขบวนการใหญ่ ๆ คือ

1. microsporogenesis คือ เริ่มจากการแบ่งเซลล์แบบ meiosis หลังจากแบ่งเซลล์จะได้ microspore 4 อัน ซึ่งอยู่ภายใน callose wall หลังจาก callose wall สลายตัว Microspore แต่ละอันก็เป็นอิสระ แต่ละ microspore จะสร้างผนังชั้นนอก (exine) โดยมีการสะสมของ sporopollenin และผนังชั้นใน (intine) โดยมีการสะสมของ pectocellulosic และแต่ละ microspore มี 1 นิวเคลียส ขนาดใหญ่ประมาณ 1/3 ถึง 1/2 ของปริมาตรทั้งหมด Germ pore จะปรากฏก่อนที่ microspore จะขยายใหญ่ขึ้น ขณะที่ไซโตพลาสซึมกระจายทั่วทั้งเซลล์ เมื่อละอองเกสรเพิ่มขนาดใหญ่นิวเคลียสจะยังอยู่ใกล้กับ germ pore และจะมีขนาดเล็กลง ต่อจากนั้น vacuole จะอยู่ตรงกลางเซลล์ และมีขนาดใหญ่ขึ้น แล้วนิวเคลียสจะถูกดันไปติดผนัง microspore ด้านตรงข้ามกับ germ pore เมื่ออยู่ในตำแหน่งนี้

แล้ว DNA จะจำลองตัวเอง การสังเคราะห์ RNA และโปรตีนจะเกิดขึ้นเป็นผลให้เซลล์และนิวเคลียสมีขนาดเพิ่มขึ้น และเตรียมพร้อมที่จะแบ่งนิวเคลียส (ภาพที่ 2 และ 3)

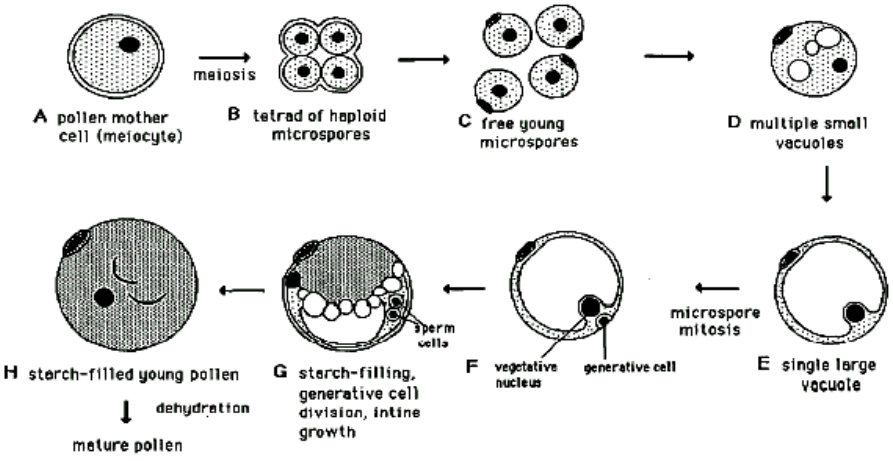
2. microgametogenesis เริ่มจาก microspore แบ่งตัวแบบไม่สมมาตร (asymmetrically) จะแบ่งตัวแบบ mitosis ครั้งแรกได้ vegetative และ generative cell ในระยะนี้เรียกว่า ละอองเกสร ซึ่ง vegetative cell หรือ tube cell จะมีขนาดใหญ่กว่า ซึ่งในระยะนี้จะมีการสะสมแป้งในพลาสติดมากขึ้น นิวเคลียสจะมีขนาดใหญ่ขึ้น แล้ว generative cell พร้อมด้วยไซโตพลาสซึมจำนวนเล็กน้อยจะแยกออกจาก vegetative cell โดยสร้างผนังเซลล์ที่โค้งมนติดกับผนังชั้นในของละอองเกสร ซึ่ง generative cell ถูกกำหนดให้แบ่งแบบ mitosis ครั้งที่สองได้ 2 sperm cells ต่อไปจะเกิดการงอก pollen tube เพื่อส่ง sperm cell เข้าผสม (Pescitelli and Petolino, 1988; Bedinger, 1992 [ภาพที่ 3]; McCormick, 1993 [ภาพที่ 2])

ละอองเกสรเป็นโครงสร้างของเซลล์สืบพันธุ์ตัวผู้ของพืชดอก ประกอบด้วยสารอาหารดังนี้คือ โปรตีน 20 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 37 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 4 เปอร์เซ็นต์ และเกลือแร่อื่น ๆ 3 เปอร์เซ็นต์ ผนังชั้นในเป็นส่วนของเซลลูโลสที่มีอัตราส่วนของสารเปกติก (pectic substance) และโพลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) สูง ซึ่งภายในละอองเกสรประกอบด้วย vegetative cell และ generative cell ไซโตพลาสซึม เซลล์เมมเบรน และผนังเซลล์ ส่วนประกอบอื่น ๆ เหมือนกับส่วนประกอบของเซลล์โดยทั่ว ๆ ไป ซึ่งหมายถึงภายในไซโตพลาสซึมจะประกอบด้วย organelle ต่างๆ เช่น golgi apparatus, mitochondria และ endoplasmic reticulum เป็นต้น ที่ผนังเซลล์ด้านนอกสุดเป็นส่วนที่แข็งเรียกว่า exine ภายในเซลล์ละอองเกสรไม่มีคลอโรพลาสต์จึงไม่มีกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ในส่วนของผนังด้านนอก (exine) ของละอองเกสรและสปอร์นั้นจะประกอบด้วยสารเคมีที่ทนทานต่อการสลายตัว ได้แก่ สารประเภทกลุ่ม pectinous คือ sporopollenins หรือที่เรียกว่า Pollenin ซึ่งมีสูตรเคมีว่า $C_{90}H_{129}(OH)_5$ และภายในโพรโตพลาสซึมของละอองเกสรบรรจุไปด้วย โปรตีน กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต monocarboxylic หรือ dicarboxylic acid กรดไขมัน วิตามิน ฮอร์โมน เอนไซม์และองค์ประกอบของสารต่าง ๆ ได้แก่ โพแทสเซียม แมกนีเซียม แคลเซียม ทองแดง เหล็ก ซิลิคอน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ และคลอรีน เป็นต้น (ลาวัลย์ รักสัตย์, 2539)



ภาพที่ 2 การเกิดขบวนการ microsporogenesis และ microgametogenesis

ที่มา: McCormick, S. (1993)



ภาพที่ 3 แสดงการพัฒนาของละอองเกสรข้าวโพด ที่มา : Bedinger, P (1992)

ข้าวโพดเป็นพืชที่นักวิทยาศาสตร์นำมาใช้ในการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์อย่างแพร่หลาย เพราะว่าเป็นพืชที่มีจำนวนโครโมโซมน้อยเพียง 10 คู่ และแท่งโครโมโซมมีขนาดใหญ่ ลักษณะของข้าวโพดนั้นถูกควบคุมโดยยีน หรือ กลุ่มยีนที่อยู่บนแท่งโครโมโซม จากความรู้ดังกล่าวทำให้นักปรับปรุงพันธุ์พืช สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการพัฒนาพันธุ์ข้าวโพด

วัฏจักรเซลล์ (cell cycle)

สิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เกิดจากการที่เซลล์มารวมกันเป็นกลุ่มก้อนโดยผ่านกระบวนการแบ่งเซลล์ (cell division) และการเปลี่ยนแปลงพัฒนา

การเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation หรือ multiplication) ในสิ่งมีชีวิตพวก eukaryotes จะมีวงจรการเจริญของเซลล์ดังนี้ ในแต่ละรอบมีการจำลองโครโมโซมเดิมตลอดเวลา และจำเป็นต้องมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA synthesis) มีการแบ่งนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมออกเป็น 2 เซลล์ โดยกระบวนการไซโตไคเนซิส (cytokinesis) เมื่อมีการแบ่งตัวซ้ำจะมีช่วงเวลาที่คั่นระหว่าง mitosis แต่ละรอบ ซึ่งรู้จักกันในชื่อว่าระยะ interphase stage การสังเคราะห์ดีเอนเอเกิดขึ้นในระยะดังกล่าวนี้ แต่โดยปกติแล้วเกิดได้ตลอดเวลาหากแต่มีระยะที่เรียกว่า G1 (G ย่อมาจาก GAP หรือช่วงว่าง) ก่อนการสังเคราะห์ดีเอนเอ (อาจเรียกว่าระยะ pre-DNA synthetic interphase) และ G2 ที่เป็นระยะหลังการสังเคราะห์ดีเอนเอเกิดขึ้นแล้ว (post-DNA synthetic interphase) แต่ละช่วงนี้มีความต่อเนื่องกัน ดังนั้น mitosis จะเกิดขึ้นทันทีที่เกิดระยะ G2 แล้ว และลำดับของการเกิดระยะที่ต่อเนื่องกันเป็นวงจรนี้มีชื่อเรียกว่า cell cycle หรือ วงจรเซลล์ ระยะ mitosis นี้มีช่วงเวลาค่อนข้างสั้นไม่เกิน 1-2 ชม. ในขณะที่ส่วนใหญ่ของวงจรเซลล์ประกอบด้วยระยะ G1, S และ G2 จะใช้เวลาประมาณ 10 ชม.

แม้การแบ่งเซลล์แบบ mitosis จะเป็นกระบวนการต่อเนื่อง แต่ก็สามารถแบ่งออกเป็น 4 ขั้นใหญ่ ๆ คือ prophase, metaphase, anaphase และ telophase

Prophase เป็นระยะที่โครโมโซมหดตัวสั้นเข้า และหนาขึ้น โดยการพันเกลียวของ DNA ทำให้เห็นโครโมโซมชัดเจน เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่ละโครโมโซมประกอบด้วย 2 โครมาติด เยื่อหุ้มนิวเคลียสจะเริ่มสลายตัวไปในระยะนี้

Metaphase โครมาติดแต่ละอันจะมาเรียงเป็นคู่อยู่ตรงกลางพร้อมกับมีสาย microtubules ยื่นออกจากแต่ละขั้วของเซลล์มาติดกับโครมาติดบริเวณ centromere เนื่องจากระยะนี้โครมาติดหดตัวสั้นและมีขนาดใหญ่ที่สุด ดังนั้นจึงมองเห็นได้อย่างชัดเจน จึงนิยมสังเกตดูความผิดปกติของโครโมโซมในระยะ metaphase

Anaphase ถึงระยะนี้ centromere ของแต่ละโครโมโซมจะแบ่งตัวจาก 1 เป็น 2 สายใยสปินเดิลดึงโครมาติดแยกออกจากกันไปคนละขั้วของเซลล์ และทำหน้าที่เป็นโครโมโซมของเซลล์ใหม่

Telophase ระยะนี้โครโมโซมที่เหมือนกัน 2 ชุดที่อยู่แต่ละขั้วของเซลล์เริ่มคลายเกลียวเพื่อเข้าสู่ระยะอินเตอร์เฟส มีการสร้างเยื่อหุ้มนิวเคลียสล้อมรอบทำให้ได้นิวเคลียส 2 นิวเคลียส พร้อมกับการสลายตัวไปของ microtubules

การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพด

การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร คือ การนำอับละอองเกสรที่ยังเจริญไม่เต็มที่ (immature anther) ซึ่งภายในบรรจุด้วยเซลล์ที่จะแบ่งตัวให้ละอองเกสร (microspore mother cell) มาเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ต้น H ซึ่งมีจำนวนโครโมโซม 1 ชุด (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2538) ต้น H ที่ได้มีประโยชน์มากทางด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช สาเหตุการเกิดพืช H มีได้หลายทางแต่ที่พบกันมาก คือ

1. ไจโนเจนเนซิส (gynogenesis) ในกรณีนี้เซลล์ไข่ที่ไม่ได้รับการผสมมีการเจริญพัฒนาขึ้นมา สาเหตุหนึ่งอาจเนื่องมาจากการผสมเกสรเกิดขึ้นช้าหรือถูกชะลอไป หรือละอองเกสรฝ่อตาย เช่น ถูกฉายรังสี เป็นต้น พบได้บ่อยในการผสมกันระหว่างชนิด

2. แอนโดรเจนเนซิส (androgenesis) ในกรณีนี้นิวเคลียสของเซลล์ไข่อาจถูกกำจัดหรือทำลายไปก่อนเกิดการผสม ดังนั้นต้น H ที่เกิดขึ้นจึงมีเพียงนิวเคลียสจากตัวผู้

พืช H ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร เกิดจากขบวนการที่เรียกว่า แอนโดรเจนเนซิส มีการวิเคราะห์ขบวนการ androgenesis ในข้าวโพด โดยใช้การสังเกตในระดับ ultrastructure โดยใช้สายพันธุ์จากประเทศจีน พบว่า ELS จะเริ่มพัฒนาจากการแบ่งตัวแบบซ้ำ ๆ กันของ 1) vegetative cell 2) generative cell 3) ทั้ง vegetative และ generative cell 4) การแบ่งตัวแบบสมมาตร (symetrical) ของ vegetative และ generative cell โดยไม่มี differentiation (Pescitelli and Petolino, 1988) ซึ่งข้อ 1 มีโอกาสเป็นไปได้มากที่สุด (Pescitelli and Petolino, 1988; Barnabas et al., 1987) เนื่องจากการเจริญ

ของ microspore ในอาหารสังเคราะห์เกิดขึ้น โดย microspore จะแบ่งให้เซลล์ใหม่ที่มีขนาดเท่ากัน การเจริญของ microspore แบบนี้เรียกว่า B pathway นิวเคลียสที่ได้มีลักษณะเหมือนกันและคล้ายกับลักษณะของ vegetative cell คือ มีขนาดใหญ่ โครมาติน (chromatin) กระจาย ย้อมติดสีจางทั้ง 2 เซลล์ สามารถแบ่งและเจริญต่อไปได้เช่นเดียวกัน ซึ่ง vegetative cell สามารถแบ่งเซลล์เพื่อผลิต embryogenic precursor จำนวนมากและเจริญต่อไปเป็น callus หรือ embryo การแบ่งของ vegetative cell เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วได้จำนวนเซลล์ประมาณ 20-30 เซลล์อยู่ภายในผนังละอองเกสรเดิม ขนาดของละอองเกสรไม่เพิ่มขึ้นหรือเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ลักษณะของนิวเคลียสที่ได้จากการแบ่งเหมือนนิวเคลียสของเซลล์เดิมทุกประการ การแบ่งของ vegetative cell นี้สามารถแบ่งได้ไม่จำกัดและมีผนังเซลล์เกิดขึ้นล้อมรอบแต่ละนิวเคลียส สามารถพัฒนาต่อไปเป็น ELS ได้ ส่วนของ generative cell จะสลายไปอย่างรวดเร็ว การแบ่งของ generative cell ไม่มีผนังเซลล์มาล้อมรอบ ดังนั้นนิวเคลียสจึงอยู่อย่างอิสระตามแนวผนังด้านในของละอองเกสร และไม่สามารถพัฒนาต่อไปเป็น ELS ได้ (บุญยืน กิจวิจารณ์ 2540; Vasil, 1980; Barnabas et al., 1987; Sunderland, 1973 อ้างถึงใน Thomas, 1997)

Barnabas et al. (1987) พบว่าในช่วงแรกของการพัฒนา microspore ในอาหาร นิวเคลียสและ organelle ต่าง ๆ จะอยู่ตรงกลางของ microspore ถูกล้อมรอบโดย vacuole และมีไขมันล้อมรอบ นิวเคลียสทั้ง 2 จะมีขนาดเล็กและมีแป้งมาก บางส่วนของ vegetative cell รวมตัวแน่น ซึ่งบ่งบอกถึงการรวมตัวกันของ vegetative component ในการสร้าง multicellular pollen grains (MPG_3) MPG_3 ทั้งหลาย จะมีรูปร่างต่าง ๆ กัน ซึ่งแสดงว่า vegetative cell จะพัฒนาไปเป็น ELS ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

1. เพื่อการผลิตต้นพืชที่มีโครโมโซมชุดเดียว (H plant) เพราะว่า microspore เป็นเซลล์สืบพันธุ์ที่ได้มาจากการแบ่งเซลล์แบบ meiosis ของ microspore mother cell ฉะนั้น microspore จึงมีโครโมโซมเพียงชุดเดียว หากเราสามารถผลิตต้นพืชจาก microspore ได้ พืชต้นนั้นก็จะมีโครโมโซมชุดเดียวกัน พืชนี้จะมีประโยชน์มากสำหรับนักปรับปรุงพันธุ์พืช
2. เพื่อการผลิตพืชสายพันธุ์แท้ (pure line plant) ใช้ต้นพืชที่มีโครโมโซมชุดเดียว มาทำการเพิ่มชุดโครโมโซม (double chromosome) จะได้ต้นพืชที่มีโครโมโซม 2 ชุด (diploid) ซึ่งยีนทุกชุดที่เพิ่มขึ้นมาโดยวิธีนี้จะเหมือนเดิม (homozygous gene) ก็จะได้พืชสายพันธุ์แท้ที่เป็นประโยชน์สำหรับนักปรับปรุงพันธุ์พืช (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2538)

ระยะการพัฒนาของ microspore

การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรให้ได้ผลสำเร็จอย่างรวดเร็วนั้นยังเป็นปัญหาที่สำคัญ แต่เป็นที่ยอมรับว่าละอองเกสรสามารถเปลี่ยนจากการเจริญแบบปกติได้ถ้านำเอาไปเพาะเลี้ยงในอาหารใน

ระยะการเจริญที่เหมาะสม เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของอับละอองเกสรในระยะต่าง ๆ จึงจัดแบ่งเป็น 6 ระยะคือ

ระยะที่ 1 microspore ยังติดกันอยู่หรือเพิ่งหลุดออกจากกัน จึงอยู่ในระยะที่เป็น G1 ของวัฏจักรเซลล์

ระยะที่ 2 ใน microspore เกิด vacuole และนิวเคลียสอยู่ชิดกับผนังของ microspore แต่ยังอยู่ใน G1

ระยะที่ 3 microspore กำลังจำลอง DNA หรือหลังจากจำลองแล้ว (DNA replication, S หรือ G2) ระยะนี้แตกต่างจากระยะที่ 2 คือนิวเคลียสมีขนาดใหญ่

ระยะที่ 4 microspore เริ่มแบ่งนิวเคลียสครั้งแรก

ระยะที่ 5 microspore มีทั้ง generative nucleus และ vegetative nucleus

microspore จากระยะที่ 1 ถึงระยะที่ 4 เป็นระยะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดขบวนการ androgenesis เพราะว่าเป็นระยะที่มีหนึ่งนิวเคลียส (uninucleate) หรือ ช่วงระยะแรกของการแบ่ง mitosis เนื่องจากถ้าละอองเกสรเข้าสู่ขบวนการแบ่งนิวเคลียสในระยะ mitosis แล้วจะมีการสะสมแป้งภายใน และเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น องค์ประกอบของเซลล์ที่สำคัญต่อการเจริญและการพัฒนาถูกใช้ไปเกือบหมด และความสมดุลของระดับฮอร์โมนในเนื้อเยื่อของอับละอองเกสรได้เปลี่ยนแปลงไป ทำให้ยากต่อการชักนำให้เกิดขบวนการ androgenesis (บุญยืน กิจวิจารณ์, 2540)

ระดับ ploidy ในละอองเกสร

ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเป็นต้น H เนื่องจากมีจีโนมที่ได้จากต้นพ่อหรือต้นแม่มา 1 ชุด ซึ่งการเจริญของละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงได้มี 2 แบบ คือ เกิดเป็น embryoid หรือเป็น callus ก่อนแล้วเจริญเป็นต้น ในกรณีที่เกิดเป็น callus ก่อน ถ้าเลี้ยง callus ไปนาน ๆ อาจมีการเจริญที่ผิดปกติ เช่น โครโมโซมเพิ่มขึ้นอีกเท่าหนึ่ง เพราะฉะนั้นการเพาะเลี้ยงละอองเกสรไม่ควรทำให้เกิดเป็น callus ควรชักนำให้เกิดเป็นต้นเลย เพื่อหลีกเลี่ยงความปรวนแปรต่าง ๆ (คำนูญ กาญจนภูมิ, 2542)

Pescitelli and Petolino (1988) ได้เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของ ข้าวโพดพันธุ์ Pa 91 x FR 16 และศึกษาการพัฒนาของ microspore ที่ระยะเวลาต่าง ๆ โดยตรวจนับ microspore ที่แบ่งเซลล์ผิดปกติ multicellular masses และ ELS พบว่าความถี่ของ microspore ที่แบ่งเซลล์ผิดปกติจะสูงสุดที่ระยะ 7 วันแรกหลังเพาะเลี้ยง แล้วจะค่อย ๆ ลดลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ของ vegetative cell จะตอบสนองต่อการแบ่งแบบ mitosis และจะพบ multicellular masses และ ELS ได้ตั้งแต่ 14 และ 25 วัน ตามลำดับ ซึ่ง microspore ส่วนมากจะพัฒนาไม่ถึงระยะ multicellular stage และตายระหว่างการสร้าง ELS

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพืชโดยวิธีนี้ คือ จีโนไทป์และความสมบูรณ์ของต้น การทำ pre-treatment ระยะการพัฒนาของละอองเกสร สูตรอาหารเพาะเลี้ยงและการชักนำให้เกิดต้น (Keller et al., 1987)

1. จีโนไทป์และความสมบูรณ์ของต้น

ราเชนทร์ ถิรพร และ คณะ (2538) ได้ทำการศึกษาการตอบสนองของจีโนไทป์ข้าวโพดต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร โดยใช้ข้าวโพดเขตร้อน เขตอบอุ่น และคู่ผสมระหว่างข้าวโพดเขตร้อนและเขตอบอุ่นจำนวน 8, 27 จีโนไทป์ และ 47 คู่ผสม ตามลำดับ พบว่าข้าวโพดเขตร้อนสามารถชักนำให้เกิด ELS ได้ 5 จีโนไทป์ คือ Ki11, DK888, Pi3264, SW3 และ KS6 โดยเกิด ELS 0.2, 0.4, 2.4, 0.9 และ 3.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้น ส่วนข้าวโพดเขตอบอุ่นสามารถชักนำให้เกิด ELS ได้ทุกจีโนไทป์ โดยพบว่าจีโนไทป์ M 24/2 เกิด ELS สูงสุด และเกิดต้น 66.82 และ 16.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนพันธุ์ M-A 25 จะเกิดจำนวนต้นสูงสุดถึง 37.93 เปอร์เซ็นต์ และสำหรับคู่ผสมระหว่างข้าวโพดเขตร้อนและเขตอบอุ่น พบว่าสามารถชักนำให้เกิด ELS ได้ทุกจีโนไทป์ โดยพบว่าจีโนไทป์ SW3 X M29 เกิด ELS สูงสุด และเกิดต้น 87.85 และ 6.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนคู่ผสม SW3 X M 24/2 จะเกิดจำนวนต้นสูงสุดถึง 31.49 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าจากจำนวนต้นทั้งหมดที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จำนวน 99 ต้น มีต้น DH จำนวน 12 ต้น คิดเป็น 12.12 เปอร์เซ็นต์ ต่อมากาญจนา รุจิพจน์ (2540) ได้ทำการศึกษาการตอบสนองของจีโนไทป์ข้าวโพดต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร โดยใช้ข้าวโพดจำนวน 20 จีโนไทป์ พบว่าการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวโพดเขตอบอุ่นดีกว่าข้าวโพดเขตร้อนและพบว่า ข้าวโพดเขตอบอุ่นจำนวน 5 จีโนไทป์ สามารถชักนำให้เกิด ELS และสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ทั้งหมด โดย M16/3/7 ให้จำนวนต้นสูงสุด คือ 14.09/100 ELS สำหรับข้าวโพดเขตร้อนจำนวน 5 จีโนไทป์ นั้น SW3 KS6 DK888 และ CG 919 สามารถชักนำให้เกิด ELS และต้นได้ ส่วน KSX 3601 สามารถชักนำให้เกิด ELS แต่ไม่เกิดต้นขึ้น นอกจากนี้คู่ผสมระหว่างข้าวโพดเขตร้อนและเขตอบอุ่นจำนวน 10 คู่ผสม สามารถชักนำให้เกิด ELS และต้นได้ทุกคู่ผสม โดยคู่ผสมระหว่าง SW3 x M19/2/4 ได้จำนวนต้นสูงสุดคือ 16.16/ 100 ELS ข้าวโพดทุกต้นที่ได้ยังมีลักษณะผิดปกติและไม่สามารถผสมตัวเองได้

Saisingtong (1998) ได้ทำการศึกษาการตอบสนองของจีโนไทป์ข้าวโพดต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร โดยใช้ข้าวโพดเขตร้อนจำนวน 18 จีโนไทป์ พบว่า ข้าวโพดทุกจีโนไทป์สามารถชักนำให้เกิด ELS ได้ทั้งหมด แต่มีเพียง 2 จีโนไทป์เท่านั้นที่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้คือ KS23 และ KS24 เพียง 0.03 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และได้ศึกษาคู่ผสมระหว่างข้าวโพดเขตร้อน

และเขตอบอุ่นจำนวน 9 คู่ผสม พบว่าทุกคู่ผสมสามารถชักนำให้เกิด ELS และต้นได้ โดยคู่ผสมระหว่าง KS6 x ETH-M22/4 ได้เปอร์เซ็นต์ ELS และต้นสูงสุดคือ 16.0 และ 4.3 ตามลำดับ Petolino and Jones (1986) ได้ศึกษาการตอบสนองของสายพันธุ์ข้าวโพดต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร โดยในปี 1984 ได้ทดสอบ 25 สายพันธุ์ พบว่ามี 6 สายพันธุ์ ที่เกิด ELS มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ และในปี 1985 ได้ทดสอบ 27 สายพันธุ์ พบว่า มี 9 สายพันธุ์เกิด ELS มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพันธุ์ที่ใช้เป็นลูกผสมทั้งหมด ซึ่งพันธุ์ที่ตอบสนองส่วนมากจะมีเชื้อพันธุกรรมของพันธุ์ H99, FR 16 และ Pa 91 อยู่ และสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ แต่อัตราการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมยังต่ำมาก Petolino and Jones (1986) รายงานว่าพันธุ์ข้าวโพดจาก United State corn belt จำนวน 39 พันธุ์ มี 12 พันธุ์ที่เกิด ELS มากกว่า 30.8 เปอร์เซ็นต์ และสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ Dieu and Beckert (1986) รายงานว่าจากพันธุ์ข้าวโพดในทวีปยุโรป อเมริกาเหนือ จีน และแอฟกานิสถาน ทั้งหมด 94 สายพันธุ์มีเพียง 5 สายพันธุ์ ที่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้มากกว่า 5.3 เปอร์เซ็นต์

Beaumont et al. (1995) กล่าวว่า การที่ข้าวโพดแต่ละจีโนไทป์มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงต่างกันเนื่องมาจากมียีนควบคุมการตอบสนองอยู่ โดย Wan et al. (1992) ได้ศึกษาถึงตำแหน่งของยีนบนโครโมโซมที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้าง callus, ELS และ ต้น โดยใช้ RFLP marker กับจีโนไทป์ที่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยง ได้แก่ Pa 91 x FR 16 (PF), H99 x Pa 91 (HP) และ H99 x FR16 (HF) ใช้ 52, 58 และ 35 RFLP markers ตามลำดับ พบว่าจากประชากร PF, HP และ HF พบ 6 ตำแหน่งบนโครโมโซม 1, 2 (2 ตำแหน่ง), 3, 6 และ 8 ซึ่งสัมพันธ์กับการสร้าง ELS จากละอองเกสร และการชักนำให้เกิดต้น โดยพบว่าส่วนปลายของแขนข้างยาวของโครโมโซมที่ 2 และ 8 สัมพันธ์กับการสร้าง ELS ส่วนบริเวณอื่นจะสัมพันธ์กับการสร้าง ELS และ/หรือ การชักนำให้เกิดต้น และยังพบบริเวณที่ควบคุมการเกิด friable callus, embryogenic callus (โครโมโซม 1 และ 3 และตรงใกล้ centromere ของโครโมโซม 2) และบริเวณที่ควบคุมการสร้าง ELS (โครโมโซม 1 และ 3) Ku et al. (1981) รายงานว่าความถี่ของการตอบสนองของละอองเกสรนั้นสามารถเพิ่มขึ้นได้ โดยมีพันธุกรรมและสภาพแวดล้อมเป็นตัวควบคุม

Afele et al. (1992) ได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณ ELS ของพันธุ์ข้าวโพดหวานลูกผสม “Seneca 60” โดยควบคุมสภาพแวดล้อมในการปลูกและอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง พบว่าการปลูกในโรงเรือนเพาะชำที่ (28 °ซ/23 °ซ: กลางวัน/กลางคืน) ให้ ELS ต่ำกว่าต้นที่ปลูกใน growth chamber (อยู่ในโรงเรือนเพาะชำ 4 สัปดาห์ แล้วย้ายไป growth chamber (18 °ซ/15 °ซ: กลางวัน/กลางคืน)) ถ้าเก็บละอองเกสรจากต้นใน growth chamber แล้วนำมาเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 32 °ซ 10 วัน แล้วย้ายไป 25 °ซ จะให้ ELS สูงกว่าการเลี้ยงที่ 25 °ซ อย่างต่อเนื่อง และให้ ELS ที่เป็นแบบแข็งมากกว่า ซึ่งทำให้ได้ ELS ที่สามารถชักนำให้เป็นต้นได้มากกว่าเดิม 2 เท่า Petolino and Jones (1986) พบว่า สภาพแวดล้อมที่ปลูกข้าวโพดและความแข็งแรงของต้นเป็นสิ่งสำคัญมากในการที่ข้าวโพดจะตอบสนองดีหรือไม่ดี

Petolino and Thompson (1987) พบว่า การปลูกข้าวโพดในโรงเรือนเพาะชำในฤดูหนาวจะทำให้การตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงไม่ดีเท่าปลูกในแปลง

2. การทำ pre-treatment

เทคนิคการทำ pre-treatment ได้มีผู้ทำการศึกษาวิจัยกันอย่างมากมายในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร พบว่าการนำอับละอองเกสรไปทำการบ่มในอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมก่อนทำการเพาะเลี้ยง จะช่วยให้การเจริญและการพัฒนาของละอองเกสรดีขึ้น (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2538) ปกติ microspore มีความสามารถที่จะพัฒนาไปเป็นต้น H โดยขบวนการ androgenesis ซึ่งการทำให้ microspore ได้รับสภาพเครียด (stress treatment) เช่น การให้รับอุณหภูมิต่ำประมาณ (7 °ซ, 10-14 วัน) (Genovesi and Collins, 1982) จะกระตุ้นให้พัฒนาไปใน sporophytic pathway คือนำไปสู่การแบ่ง mitosis ครั้งแรกแบบสมมาตร (symmetric division) เพื่อที่จะพัฒนาไปเป็น embryo และเป็นต้นต่อไป แทนการพัฒนาไปเป็น gametophytic pathway (Alisher et al., 1997; Keller et al., 1987; ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา, 2534)

ในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพด การให้ความเย็นกับช่อดอกจะทำให้ microspore มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงมากขึ้น (Genovesi, 1990) โดย Nitsch et al. (1982) ได้ทำการช็อคด้วยอุณหภูมิ (temperature shock) ที่ 7 °ซ 10-14 วัน พบว่าช่วยกระตุ้นขบวนการ androgenesis โดยเปลี่ยนจาก gametophytic pathway ไปเป็น sporophytic pathway ซึ่งนำไปสู่การสร้าง H ELS ในที่สุด ต่อมา Afele et al. (1992) ได้ศึกษาถึงการให้อุณหภูมิต่ำ (cold shock pre-treatment) กับ microspore ก่อนการเพาะเลี้ยง พบว่าจะช่วยยืดอายุของ microspore ที่อยู่ในระยะตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยง (responsive stage) ให้ยาวขึ้น นพดล และ สันติ (2530) กล่าวว่า การทำ pre-treatment โดยให้ความเย็นจะช่วยให้ 1) ความมีชีวิตของ microspore นานขึ้น 2) เซลล์ถูกกระตุ้นให้แบ่งตัวผิดปกติ คือแทนที่จะได้ vegetative cell และ generative cell จะได้เฉพาะ vegetative cell โอกาสที่จะประสบความสำเร็จจะมีมากขึ้น

Pescitelli et al. (1990) พบว่า การทำ post-plating (การเปลี่ยนอุณหภูมิหลังจากการเพาะเลี้ยง) ให้ได้รับอุณหภูมิเย็นก่อน แล้วเพิ่มอุณหภูมิมาที่อุณหภูมิห้อง จะช่วยเพิ่มการสร้าง ELS ได้ โดยพบว่า การให้อุณหภูมิต่ำที่ประมาณ 15 °ซ 4 วันแรกแล้วจึงย้ายไปยังอุณหภูมิห้อง จะช่วยเพิ่มความมีชีวิตของ microspore ได้ถึง 2 เท่า และการเพิ่มน้ำตาลซูโครส (8-9.5 เปอร์เซ็นต์) จะเพิ่มการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงได้ดีขึ้น และ Petolino and Jones (1986) ยังพบว่าการทำ pre-treatment ที่ 7 °ซ เป็นเวลา 14 วัน จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิด ELS สูงที่สุด และ Afele et al. (1992) พบว่า การทำ pre-treatment ที่ 10 °ซ เป็นเวลา 14 วัน จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิด ELS สูงกว่าการไม่ทำประมาณ 6 เท่า Afele and Kannenberg (1990), Buter et al. (1991) และ ราเชนทร์ และ คณะ (2537) รายงานว่าการทำ

pre-treatment กับช่อดอกตัวผู้ที่อุณหภูมิ 6-8 °ซ เป็นเวลา 10-14 วัน หลังจากนั้นนำไปคัดเลือกระยะการพัฒนาของ microspore ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง เป็นวิธีที่ก่อให้เกิดการตอบสนองของอับละอองเกสร โดยจะมีการสร้าง ELS และต้นดีที่สุด

3. ระยะการพัฒนาของละอองเกสร

ช่อดอกข้าวโพดที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรคือ ระยะที่มีนิวเคลียสเดียว (uninucleate) (Kuo and Lu, 1984; Petolino and Jones 1986; Afele and Kannenberg, 1990; Hongchang et al., 1991; Tsay et al., 1986) เพราะว่าสามารถเปลี่ยนการพัฒนาจาก gametophytic pathway ไปเป็น sporophytic pathway ซึ่งช่อดอกที่มีนิวเคลียสระยะนี้จะไม่โผล่พ้นใบธงออกมา อับละอองเกสรในระยะนี้มักจะมีสีเหลืองสด อวบใหญ่ (Chang and Neuffer, 1989)

อับละอองเกสรที่ผลิต embryo จำนวนสูงที่สุดคืออับละอองเกสรที่มีละอองเกสรอยู่ในช่วงประมาณการแบ่ง mitosis ครั้งแรก (late uninucleate-early binucleate) ซึ่งช่วงนี้จะตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดขบวนการ androgenesis มากที่สุด (Raghava, 1986 อ้างถึงใน Thomas, 1997) Afele et al. (1992) พบว่าระยะ late-uninucleate เป็นระยะที่ตอบสนองต่อขบวนการเกิด androgenesis สูงสุด Pereddy and Petolino (1990) ได้ใช้ละอองเกสรที่มีนิวเคลียสอยู่ในระยะ mid-late uninucleate พบว่ามีการตอบสนองที่ดี และ Petolino and Thompson (1987), Petolino et al. (1988) และ Buter et al. (1991) ได้ใช้ละอองเกสรที่มีนิวเคลียสอยู่ในระยะ late uninucleate-early binucleate ก็พบการตอบสนองที่ดีเช่นกัน กลุ่มนักวิทยาศาสตร์ชาวจีนที่สามารถทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพดได้สำเร็จ โดยได้รายงานว่าใช้อับละอองเกสรที่มี microspore อยู่ในระยะ mid-late uninucleate นำมาเพาะเลี้ยงบน MS basal medium (Murashige and Skoog, 1962) ซึ่งมีน้ำตาลในช่วง 12-24 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถพบการเกิด ELS เช่นกัน (Keller et al., 1987)

4. สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพดมีอยู่หลายสูตร เช่น อาหารสูตร White (1943), MS (1962), Miller (1963) และ Linsmaier and Skoog (1965) (นิตย์ศรี แสงเดือน, 2536) อาหารสูตร N6 (Miao et al., 1981; Nitsch et al., 1982; Brettell et al., 1981; Chung-Shen, 1982) สูตร Yu-Pei (YP) (Ku et al., 1981; Nitsch et al., 1982; Genovesi and Collins, 1982; Petolino and Jones, 1986; Dieu and Beckert, 1986; Afele and Kannenberg, 1990; Buter et al., 1991) สูตร Zheng 14 (Ting et al., 1981) และ 6M1 (Miao, 1980)

นักวิจัยชาวจีนได้สูตรอาหารแรกที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรคือ อาหารสูตร MS ซึ่งใช้น้ำตาล 12-24 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เกิด ELS อย่างน้อยประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ (Anonymous, 1975)

ต่อมาได้มีการพบว่าสูตร N6 มีประสิทธิภาพดีกว่า MS (Chu, 1966) นอกจาก MS และ N6 แล้ว สูตร YP ก็มีการใช้อย่างแพร่หลาย ซึ่งสูตรอาหารเหล่านี้ส่วนมากจะแตกต่างกันตรงปริมาณไนโตรเจนที่ใช้ และมีการใช้ organic nitrogen source เพื่อกระตุ้นให้เนื้อเยื่อมีการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาที่ดี เช่น lactalbumin (Ku et al., 1981), casein hydrolysate (Miao et al., 1981) หรือ L-proline (Nitsch et al., 1982)

อาหารสังเคราะห์ที่ใช้เพาะเลี้ยงมีส่วนประกอบมากมายหลายชนิด รวมไปถึงสถานะของอาหารก็มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชด้วย ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับอาหารเพาะเลี้ยงมีดังนี้

สถานะของอาหาร จากรายงานการศึกษาพบว่า อับละอองเกสรที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง (solid media) สามารถพัฒนาให้ callus ได้ดีกว่าเลี้ยงในอาหารเหลว (liquid media) แต่ callus ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งมีการพัฒนาไปเป็นต้นพืชได้น้อยกว่าที่เลี้ยงในอาหารเหลว ทั้งนี้อาจเป็นเพราะวุ้นมีสารประกอบบางชนิดที่มีผลต่อการพัฒนาของพืช แต่ในกรณีที่เลี้ยงในอาหารเหลวนั้น พบว่าอัตราการเจริญของ callus ต่ำกว่า อาจเป็นเพราะสภาพขาดแคลนอากาศ (anaerobic condition) เพราะตัวอย่างพืชจมอยู่ใต้อาหาร ฉะนั้นหากต้องการจะเลี้ยงอับละอองเกสรบนอาหารแข็งมีผู้เสนอแนะให้เติมผงถ่าน (activated charcoal) ลงไปด้วย เพื่อช่วยดูดซับสารบางชนิดที่เป็นพิษต่อพืชไว้

น้ำตาลซูโครสใช้เป็นแหล่งให้พลังงานและรักษาความดันออสโมติก (osmotic pressure) ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส มีผลต่อความดันออสโมติก และทำให้เกิดขบวนการ dehydration ส่งผลให้องค์ประกอบภายในละอองเกสรมีความแห้งเพิ่มขึ้น ทำให้ง่ายต่อการที่จะกระตุ้นให้มีการพัฒนาไปเป็น embryo ต่อไป (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2538) ซึ่งมีการใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 6-15 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าถ้ามีการเติม TIBA (2, 3, 5-triiodobenzoic acid) ซึ่งเป็นแอนติออกซินลงในอาหารจะทำให้อับละอองเกสรมีการตอบสนองในระดับสูงขึ้น มีนักวิจัยหลายคณะได้ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสระดับแตกต่างกันไปโดยเริ่มที่ 6 เปอร์เซ็นต์ (Nitsch et al., 1982), 9 เปอร์เซ็นต์ (Tsay et al., 1986) 12 เปอร์เซ็นต์ (Ku et al., 1981; Miao et al., 1981; Dieu and Beckert, 1986) และ 15 เปอร์เซ็นต์ (Ting et al., 1981) Ku et al. (1981) ได้ใช้น้ำตาลซูโครส 6 และ 12 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการใช้น้ำตาลซูโครส 12 เปอร์เซ็นต์ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิด ELS 5.85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าการใช้น้ำตาลซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ที่ให้เพียง 2.25 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ Miao et al. (1981) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร N6 โดยใช้น้ำตาลซูโครส 12 เปอร์เซ็นต์ ผงถ่าน 0.5 เปอร์เซ็นต์, casein hydrolysate 500 มก./ล., 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) 2 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล. จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS สูงขึ้น 17 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์ Ku et al. (1981) รายงานว่าพบเปอร์เซ็นต์การตอบสนองเพิ่มขึ้น 13.1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้อาหารสูตร YP basal medium ซึ่งเติมผงถ่าน 0.5 เปอร์เซ็นต์, lactalbumin

hydrolysate 500 มก./ล. น้ำตาล 12 เปอร์เซ็นต์ และใช้ TIBA 0.1 มก./ล. เปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์

Nitsch et al. (1982) ได้ศึกษาผลของ L-proline ที่อยู่ใน IM พบว่า ช่วยส่งเสริมการสร้างรากให้กับต้นอ่อนได้ ต่อมา Armstrong and Green (1985) พบว่า L-proline ยังมีหน้าที่สำคัญในการสร้าง embryogenic callus และ Schmid (1988) อ้างถึงใน Buter et al. (1991) ได้ทดลองให้ L-proline 5 มล./ต้น ก่อนนำมาทำการเพาะเลี้ยง พบว่าทำให้อับละอองเกสรมีการสร้าง embryo เพิ่มขึ้น Withers and King (1979) พบว่า L-proline สามารถนำมาใช้ในการทำ cyroprotectant สำหรับเก็บรักษาเซลล์ข้าวโพดในสภาพเยือกแข็ง และ Songstad et al. (1979) ยังพบว่า L-proline ที่ใช้ในอาหารเพาะเลี้ยงช่วยกระตุ้นให้ microspore ทนต่อความเย็นในการเพาะเลี้ยงได้ Buter et al. (1991) พบว่า L-proline ช่วยในขบวนการ embryogenesis (direct androgenesis) และได้ศึกษาผลของ L-proline และอุณหภูมิ พบว่าการเพาะเลี้ยงใน IM ซึ่งประกอบด้วย YP basal salts (Ku et al., 1981) ที่มี L-proline 125 มก./ล. ในที่มืด อุณหภูมิ 14 °ซ เป็นเวลา 4 วัน แล้วย้ายไปอยู่ใน 27 °ซ เป็นเวลา 10 วัน ย้ายออกให้ได้รับแสงเป็นเวลา 7 วัน แล้วย้ายลง RM จะให้ ELS เพิ่มขึ้น 2-3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ให้ L-proline

Kuo et al. (1985) เสนอว่า ความสำคัญของสูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรที่กลุ่มนักวิจัยชาวจีนใช้ เพื่อให้มีการตอบสนองของการเพาะเลี้ยงที่ดี คือ ใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง ผงถ่าน และ organic nitrogen source Nitsch et al. (1982) ได้ใช้สายพันธุ์ของนักวิจัยชาวจีน โดยใช้สูตร N6 และ YP ซึ่งเติม casein hydrolysate 500 มก./ล., ผงถ่าน 0.5 เปอร์เซ็นต์, TIBA 0.1 มก./ล., น้ำตาลซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ และ L-proline 100 มก./ล. และได้ทำ pre-treatment ที่ 14 °ซ 7 วัน พบว่าในสูตรอาหาร N6 และ YP ให้อัตราการสร้าง ELS อยู่ที่ประมาณ 3 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ผงถ่านมีความสำคัญต่อระดับการตอบสนองของข้าวโพดมาก ช่วยดูดซับสารพิษที่ปลดปล่อยออกมาจากผนังอับละอองเกสร เช่น abscisic acid หรือดูดซับองค์ประกอบของอาหารที่เป็นพิษ และที่เกิด metabolism แล้วเกิดความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อ รวมไปถึงสารต่าง ๆ ในวุ้นที่มีผลยับยั้งการพัฒนาของ microspore พบว่าการเติมผงถ่าน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ระดับของการตอบสนองดีขึ้น (Fridborg et al., 1978; Haiso and Bomman, 1991; Johansson, 1983)

Miao et al. (1981) ใช้อาหารสูตร N6 basal ร่วมกับ 2,4-D 2 มก./ล. และ kinetin 1 มก./ล. พบการเกิด callus หรือ ELS สูงสุดที่ 7 เปอร์เซ็นต์ Ting et al. (1981) ใช้อาหารสูตร Zheng-14 basal ร่วมกับ 2,4- D 2 มก./ล., 6-benzylaminopurine (BAP) 1 มก./ล. และ alpha-napthaleneacetic acid (NAA) 1 มก./ล. พบการเกิด callus หรือ ELS สูงสุดที่ 17 เปอร์เซ็นต์ Ku et al. (1981) ทำการเปรียบเทียบสูตรอาหาร YP basal ที่ใส่ 2,4-D 2 มก./ล., kinetin 1 มก./ล. และ BAP 2 มก./ล. กับ YP basal ที่ใส่แอนติออกซินระดับต่าง ๆ กัน (TIBA ระดับ 0.05, 0.1 และ 0.5 มก./ล.) พบว่าอาหาร YP ที่ใส่ TIBA 0.1 มก./ล. จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิด ELS สูงที่สุดถึง 15 เปอร์เซ็นต์ Dieu and Beckert (1986)

เปรียบเทียบสูตรอาหาร Zheng-14 ที่เติม 2, 4 -D, BAP และ NAA ที่ระดับ 0.05, 0.1 และ 0.5 มก./ล. กับสูตร YP basal ที่เติม TIBA 0.1 มก./ล. พบว่าสูตรอาหาร YP basal ที่เติม TIBA 0.1 มก./ล. ให้ผลดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญ

Ke (1987) กล่าวว่า การที่ ELS พัฒนาไปเป็นรากแต่ไม่มียอด ควรทำการ balance auxin และ cytokinin ซึ่งจะกระตุ้นให้สร้างยอดและรากไปพร้อม ๆ กัน Pescitelli et al. (1989) สามารถชักนำให้เกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารสูตร N6 ที่เติม dicamba และ 2, 4-D Hongchang et al. (1991) ใช้อาหารสูตร N6 ที่เติม 2,4-D 2 มก./ล. และ kinetin 1.5 มก./ล. สามารถชักนำให้อับละอองเกสรมีการพัฒนาแบบ direct embryogenesis ได้

มีการใช้ agarose เปรียบเทียบกับวุ้น พบว่า agarose ให้เปอร์เซ็นต์การเกิด ELS 13.51 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งดีกว่าวุ้นซึ่งให้เพียง 8.33 เปอร์เซ็นต์ ปัจจุบันได้มีการใช้ Gelrite ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่าวุ้นแต่ราคาแพง และ Phytagel ซึ่งมีความบริสุทธิ์สูงอย่างแพร่หลาย (Ting et al., 1981)

แอนโดรเจนเนซิส (androgenesis)

แอนโดรเจนเนซิส คือ embryogenesis ชนิดหนึ่งที่เกิดกับเซลล์ของละอองเกสรจนในที่สุดพัฒนาเป็นต้น H ขึ้นมา ซึ่งในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรจะชักนำให้ microspore ผ่านขบวนการ embryogenesis ซึ่งแบ่งเป็น 2 แบบ คือ

1. Direct androgesis หรือ embryogenesis คือ การเอา microspore มาเลี้ยง แล้วชักนำให้ microspore พัฒนาไปเป็น embryo แล้วจึงให้ embryo นั้นเจริญไปเป็นต้นอีกครั้งหนึ่ง
2. Indirect androgenesis หรือ organogenesis คือ การชักนำให้ microspore ที่นำมาเพาะเลี้ยงมีการพัฒนาผ่านกระบวนการสร้าง callus ก่อน แล้วจึงชักนำให้เกิดกระบวนการ embryogenesis เพื่อสร้างเป็น embryo

ซึ่งการพัฒนาทั้ง 2 แบบนี้จะพบว่า การเกิดของ embryo จะเกิดจากเซลล์เดียวของ microspore หรือของ callus ซึ่งคล้ายกับการพัฒนาของ embryo ในเมล็ด แต่จะไม่พบส่วนสะสมอาหารใน embryo ที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร ดังนั้นจึงควรย้าย embryo ลงเพาะเลี้ยงในอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นเพื่อให้ต้นสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ (เรวัติ เลิศฤทัยโยธิน, 2536)

พืช H ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรมีขนาดเล็ก และช่อเกสรตัวผู้และตัวเมียอยู่ตำแหน่งเดียวกันจำเป็นต้องได้รับการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมเสียก่อนจึงสร้างช่อดอกและฝักได้เพื่อที่จะสามารถผสมตัวเองเพื่อเก็บเมล็ดสายพันธุ์แท้เพื่อนำไปสร้างลูกผสม F_1 และนำไปทดสอบศักยภาพในแปลงต่อไป (Kuo et al., 1985; Genovesi, 1990) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะชักนำให้พืชที่ได้มีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม

การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในข้าวโพด

Ku et al. (1981) พบว่า อัตราการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมตามธรรมชาติในข้าวโพดเกิดขึ้นในอัตราที่ต่ำมากประมาณ 4-10 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น Wan et al. (1989) เสนอว่าการใช้สารเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม กระตุ้นให้เกิดการเพิ่มชุดของโครโมโซมจึงมีความสำคัญในการผลิตต้น DH

ปกติแล้วละอองเกสรพัฒนาไปเป็นต้นพืช H ได้ แต่จะเป็นหมัน ซึ่งแก้ปัญหานี้โดยใช้สารเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม เช่น โคลชิซีนและโพรนามีด ซึ่งโคลชิซีนจะยับยั้งการทำงานของสายใยสปินเดิล ซึ่งเป็นผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม ทำให้ได้ต้นพืช DH เป็นการสร้างสายพันธุ์โฮโมไซกัสจากพ่อแม่สายพันธุ์ทางได้ภายในระยะเวลาเพียง 1 ชั่วเท่านั้น ซึ่งประโยชน์ของการผลิตสายพันธุ์แท้วิธีนี้ทำให้ขบวนการคัดเลือกลักษณะที่เราต้องการมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Jensen, 1974)

Sunderland (1971) กล่าวว่า ระยะของ microspore ที่ตอบสนองมากที่สุดต่อการเพิ่มโครโมโซม คือ ก่อน microspore มีการแบ่งแบบ mitosis ครั้งแรก โดยทำการเพาะเลี้ยงอับละอองลงบน IM ที่มีโพรนามีด ทำให้ได้ต้น DH เร็ว และเกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมของโครงสร้าง microspore ที่เป็นเซลล์เดียวตั้งแต่แรก ดังนั้นจะไม่เกิดปัญหา chimerism กับต้น DH

โพรนามีด (pronamide) มีสูตรเคมีคือ 3,5-dichloro-N-(1,1-dimethyl-2-propynyl) benzamide จัดอยู่ในกลุ่ม benzamide herbicide ซึ่งสามารถยับยั้งหรือรบกวนขบวนการ mitosis ซึ่งโพรนามีดไม่ได้เป็นตัวยับยั้ง spindle microtubule เหมือนโคลชิซิน แต่ทำให้หลอด microtubules ลดประสิทธิภาพในการดึงแยกโครโมโซมออกจากกันลง (Vaughan and Vaughn, 1987 และ Vaughn and Lehnen, 1991) Wan et al. (1991) รายงานว่าโพรนามีดที่ 10 μM ไม่ก่อให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของ callus ข้าวโพด และไม่ทำลายความสามารถในการเกิดต้น Saisingtong (1998) รายงานว่าโพรนามีด (LD_{50} = 8350 มก./กก. ที่ทำให้หนูตาย) มีความเป็นพิษน้อยกว่าโคลชิซิน (LD_{50} = 1.6 มก./กก. ที่ทำให้หนูตาย) เมื่อให้โพรนามีดความเข้มข้น 10 μM กับ callus เป็นเวลา 72 และ 96 ชั่วโมง จะทำให้ได้ต้น DH เพิ่มขึ้น 69 และ 53 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้ ตามลำดับ

Wan et al. (1991) ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของ callus ข้าวโพด โดยใช้สารปราบวัชพืชประเภท antimicrotubule herbicide 4 ชนิดคือ APM, โพรนามีด, oryzalin และ trifluralin พบว่าการได้รับโพรนามีด 10 μM 3 วัน สามารถเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถสร้างต้น DH ได้ 70 เปอร์เซ็นต์ และสามารถติดเมล็ดด้วย Saisingtong (1998) ได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเพิ่มชุดโครโมโซม (โคลชิซิน, APM, โพรนามีด และ oryzalin) พบว่าการให้อับละอองเกสรได้รับโพรนามีดที่ความเข้มข้นต่ำปริมาณ 0.64 มก./ล. 3 วัน สามารถเพิ่มจำนวนต้น DH ต่อจำนวนต้นที่ชักนำได้ทั้งหมดและจำนวนต้น DH ต่อ 100 อับละอองเกสรได้ดีที่สุด และโพรนามีดยังส่งผลทางลบต่อจำนวน ELS และ ต้นที่ได้จากการชักนำน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารที่เหลือ และพบว่าอุณหภูมิมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดการสร้าง ELS

โดยเฉพาะเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารเพิ่มชุดโครโมโซม โดยได้ศึกษาการใช้โคลชิซิน 250 มก./ล. ที่ 27 °ซ จะเกิด 0.98 ELS/ 100 อับละอองเกสร ขณะที่ 14 °ซ เกิด 20 ELS/ 100 อับละอองเกสร

จากการทดลองของ Rotarenco (2000) พบว่าการทำ SC โดยใช้อุณหภูมิต่ำที่ 2-4 °ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ข้าวโพดที่มี mitotic activity ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์ตอบสนองต่อสารชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซม จากการทดลองให้อุณหภูมิต่ำแก่ต้นกล้า H ของข้าวโพดเพื่อกระตุ้นให้เกิด SC ก่อนให้โคลชิซิน พบว่าวิธีนี้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม เช่น เมื่อใช้โคลชิซินความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ SC ทำให้ได้ DH 12.7 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การให้โคลชิซินในสภาพเดียวกันโดยไม่ได้ทำ SC ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้น DH ได้เลย การนำเทคนิค SC มาใช้ในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพดจึงมีศักยภาพในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืช DH

5. การพัฒนาไปเป็นต้น (regeneration)

Hongchang et al. (1991) รายงานว่า ในอดีตการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพดจะชักนำให้เกิดต้นโดยวิธี indirect embryogenesis คือชักนำให้เป็น callus และย้าย callus ลงอาหารอีกสูตรหนึ่งเพื่อพัฒนาเป็นต้น ซึ่งทำให้เสียค่าใช้จ่าย เวลา และวัสดุอุปกรณ์ มากกว่าวิธี direct embryogenesis ซึ่งสามารถได้ต้นจากอับละอองเกสรโดยตรง โดยไม่ผ่าน callus ซึ่งสูตรอาหารที่ได้คิดค้นคือ สูตรอาหาร N6 + 2, 4–D 2.0 มก./ล. และ kinetin 1.5 มก./ล. สามารถเพิ่มจำนวนอับละอองเกสรของคู่ผสม K809 x A619W และ A 2–1 ให้พัฒนาเป็นต้นได้ 1-4 เปอร์เซ็นต์ Petolino and Jones (1986) พบว่าการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรวิธีดั้งเดิม คือ ชักนำให้เกิด ELS ใน IM แล้วค่อยย้ายลง RM ทำให้ความสามารถในการชักนำให้เกิดต้นต่ำเพียง 0-11.7 RP/100 อับละอองเกสร ต่อมา Barloy and Beckert (1993) ได้ปรับปรุงวิธีการเพาะเลี้ยงโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า early anther transfer คือย้ายอับละอองเกสรจาก IM ไป RM ที่ 21 วันก่อนเกิด microscopic ELS ซึ่งพบว่าสามารถผลิตต้นได้มากกว่าวิธีเดิม (เพาะเลี้ยง 5-9 สัปดาห์ แล้วจึงย้ายอับละอองเกสรที่เกิด ELS ลง RM) 10 เท่า โดยพบว่าพันธุ์ที่ตอบสนองดีจะสร้าง 18.9 ต้น/ 100 ELS และ 4.7 ต้น/100 อับละอองเกสร ซึ่งมากกว่าวิธีเก่าซึ่งให้เพียง 3.3 ต้น/ 100 ELS และ 1.3 ต้น/ 100 อับละอองเกสร Saisingtong (1998) ได้ใช้เทคนิค early anther transfer จนได้อัตราการเกิดต้น (RP) ถึง 7-20 ต้น/100 อับละอองเกสร และได้ลดระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงลงจากเดิม 2-3 สัปดาห์

อัตราส่วนของออกซินและไซโตไคนิน มีความสำคัญต่อการเกิดรากและยอดคือ ถ้าอัตราส่วนของไซโตไคนินต่อออกซินต่ำกว่าระดับปกติของการเจริญของ callus จะทำให้เกิดราก ถ้าอัตราส่วนเหมาะสมจะเกิดการแบ่งเซลล์ได้ callus เรื่อย ๆ ถ้าอัตราสูงกว่าปกติจะทำให้เกิดยอด

โดยปกติการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรนิยมชักนำให้เกิดต้นโดยตรงจาก embryo โดยไม่ผ่านการพัฒนาเป็น callus เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาต้นที่ได้มีการแสดงลักษณะที่ผิดปกติ เช่น ไม่มีช่อดอกตัวผู้ ไม่มีฝัก ฝักและช่อดอกอยู่ตำแหน่งเดียวกัน การแตกของอับละอองเกสรกับการออกไหมไม่เหมาะสมกัน (Miao et al., 1981; Petolino and Jones, 1986)

เทคโนโลยีที่เหมาะสมสำหรับการปรับสภาพพืชก่อนการย้ายพืชออกปลูก

สาเหตุหลักของการตายของพืชหลังการย้ายออกปลูก คือการสูญเสียน้ำของต้นพืชจากการคายน้ำผ่านทางปากใบและผิวใบ (Shackel et al., 1990) และข้อจำกัดในการดูดซับน้ำของรากพืช (Kirdmanee et al., 1995) เนื่องจากลักษณะทางกายภาพ สรีระวิทยา และชีวเคมีของพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีลักษณะแตกต่างจากพืชในสภาพธรรมชาติ อีกสาเหตุของการตาย คือ ความสามารถในการสังเคราะห์ด้วยแสงต่ำ ทำให้ปริมาณคาร์บอนที่พืชได้รับไม่เพียงพอต่อการดำรงชีวิต ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงการเจริญของต้นพืชจากการได้รับแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาล (photomixotrophic growth) มาเป็นการใช้คาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศในการเจริญเติบโต (photoautotrophic growth) ตั้งแต่อยู่ในภาชนะเพาะเลี้ยง เพื่อให้พืชสามารถปรับลักษณะทางกายภาพ สรีระวิทยา และชีวเคมีให้ใกล้เคียงกับพืชในสภาพธรรมชาติมากที่สุดจึงเป็นสิ่งสำคัญ และควรปรับปรุงแก้ไขปัจจัยทางฟิสิกส์ (ความชื้น ความเข้มแสง อุณหภูมิ คาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาณออกซิเจนในระบบราก วัสดุค้ำยึด ฯลฯ) และปัจจัยทางเคมี (น้ำตาล ธาตุอาหาร ฯลฯ) ให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของพืช

ปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาลักษณะทางกายภาพ และสรีระวิทยาของต้นพืช

ลักษณะกายภาพของพืชที่เหมาะสมในการย้ายออกปลูกควรลักษณะดังนี้ 1) ใบมีความต้านทานต่อการสูญเสียน้ำสูง 2) มีระบบรากใหญ่ สัดส่วนของรากต่อยอดสูง 3) ต้นเตี้ย ข้อและปล้องสั้น ในขณะที่พืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีแนวโน้มที่จะแสดงลักษณะทางกายภาพและสรีระวิทยาดังนี้ 1) มีการสร้าง wax ที่ผิวใบน้อย 2) การทำงานที่ผิดปกติของปากใบ 3) จำนวนปากใบที่น้อย 4) ลักษณะอวบน้ำ 5) โครงสร้างของ spongy, palisade และ vascular ที่บวมผิดปกติ 6) ปริมาณคลอโรฟิลล์ต่ำ 7) การสังเคราะห์ด้วยแสงต่ำ 8) ลำต้นผอมสูง ข้อปล้องยาว โคนต้นบอบบาง ง่ายต่อการหักล้ม ลักษณะเหล่านี้สามารถปรับปรุงได้โดยปัจจัยต่อไปนี้

1. ส่วนประกอบของก๊าซ การแลกเปลี่ยนของก๊าซระหว่างภายในและภายนอกภาชนะเพาะเลี้ยง และระหว่างอากาศและอาหารภายในภาชนะเพาะเลี้ยง มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ของพืช เช่น มีผลต่อการขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนของ red clover (Campbell and Tomes, 1984) การสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Lee and Shuler, 1991) คุณภาพของยอด (McClelland and Smith, 1990) การ

เจริญของพืช (Smith and McClelland, 1991) การเกิดการอวบน้ำ (Dillen and Buysens, 1989) การปรับปรุงการถ่ายเทอากาศของภาชนะเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถทำโดยการใช้วัสดุกรองอากาศ เช่น การใช้เยื่อกรองอากาศ (membrane filter) การใช้กระดาษกรอง การใช้สำลี การใช้ปั๊มอัดอากาศที่ผ่านการกรองด้วยตัวกรองอากาศ การถ่ายเทอากาศมีผลโดยตรงต่อความเข้มข้นของก๊าซแต่ละชนิดในภาชนะเพาะเลี้ยง เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ ออกซิเจน เอทธีลีน ฯลฯ

1.1 คาร์บอนไดออกไซด์ มีผลโดยตรงต่อการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช การเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ มีผลต่อการเพิ่มการสังเคราะห์ด้วยแสงของต้นพืช และกระตุ้นอวัยวะที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง (ปากใบ) ให้เกิดการทำงานดีขึ้น Fournioux and Bessis (1986) อ้างถึงใน National Center for Genetic Engineering and Biotechnogy (2000) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในภาชนะเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชระหว่างกลางวันและกลางคืน พบว่า คาร์บอนไดออกไซด์ในภาชนะปิดลดลงในระดับจุดวิกฤตในการสังเคราะห์ด้วยแสง (compensation point) 5 μmol mol^{-1} ในเวลากลางวัน เนื่องจากความต้องการคาร์บอนไดออกไซด์ในการสังเคราะห์ด้วยแสง และเพิ่มสูงขึ้นในระดับ 5,000 -8,000 μmol mol^{-1} เนื่องจากการหายใจของพืชในช่วงเวลากลางคืน ซึ่งเป็นระดับที่เป็นพิษต่อต้นพืช ดังนั้นการเพิ่มการถ่ายเทอากาศ สามารถเพิ่มความเข้นข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ในเวลากลางวันและลดความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ในเวลากลางคืนได้เป็นอย่างดี ซึ่งช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช และส่งเสริมการพัฒนาของส่วนต่างๆให้ทำงานปกติเช่น คลอโรฟิลล์ ปากใบ ฯลฯ Kozai and Smith (1994) รายงานว่าสามารถกระตุ้นให้พืชที่มีอวัยวะในการสังเคราะห์ด้วยแสงที่พร้อม เกิดการเจริญเติบโตโดยอาศัยการสังเคราะห์ด้วยแสง (photoautotrophic) ได้ ซึ่งระบบการเจริญดังกล่าวสามารถกระตุ้นการเกิดราก ช่วยปรับลักษณะทางกายภาพ กายวิภาค และสรีระวิทยาของพืช เพื่อเตรียมความพร้อมก่อนการย้ายปลูกในสภาพธรรมชาติ

1.2 ออกซิเจน มีความสำคัญต่อการหายใจในเวลากลางวัน (photorespiration) และการหายใจในเวลากลางคืน (dark respiration) ในกลุ่มพืช C_3 ประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชลดลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการหายใจของพืชในเวลากลางวัน ในเวลากลางคืนออกซิเจนในภาชนะเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะลดลงในระดับความเข้มข้นเดียวกับการเพิ่มขึ้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (5,000-8,000 μmol mol^{-1}) Kvaalen et al. (1991) รายงานการเพิ่มอัตราการขยายพันธุ์ เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพที่มีออกซิเจนสูง (450 μmol mol^{-1}) และคาร์บอนไดออกไซด์ที่สูง (60 μmol mol^{-1}) การเพิ่มขึ้นของออกซิเจนจึงเป็นการกระตุ้นการเกิดขบวนแตกสารโมเลกุลใหญ่ให้เป็นสารโมเลกุลเล็กซึ่งต้องใช้พลังงานจากการหายใจ

1.3 เอทธีลีน เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชและมีอิทธิพลต่อการเจริญและ

พัฒนาการของพืช Biddington (1992) รายงานว่าผลของเอทธีลีนต่อการเจริญของพืชในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในพืชกลุ่ม Magnolia, Pinus, Gerbera, ขนุน และ ไทร ในสภาพภาชนะเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ปิดจะมีเอทธีลีนเพิ่มขึ้นถึง 2-26 μmol mol^{-1} ในระหว่าง 3 ถึง 9 สัปดาห์หลังการเพาะเลี้ยง การเพิ่มการถ่ายเทอากาศของภาชนะเพาะเลี้ยงจึงเป็นวิธีที่สามารถลดความเป็นพิษของเอทธีลีนในภาชนะเพาะเลี้ยงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. ความชื้น มีผลต่อการพัฒนาการของพืชและเป็นสาเหตุสำคัญของการสูญเสียพืชหลังการย้ายปลูก พืชจะคายน้ำเพิ่มขึ้น 5 เท่า เมื่อความชื้นลดลงจาก 98 เปอร์เซ็นต์ เป็น 95 เปอร์เซ็นต์ (Fujiwara and Kozai, 1995) ความชื้นมีผลต่อการสร้าง wax ของใบพืช โครงสร้างของ spongy cell การจัดเรียงตัวของโครงสร้างเซลล์ภายในใบพืช การทำงานของปากใบ การต้านทานการสูญเสียน้ำของปากใบ การอวบน้ำ ความดันน้ำภายในต้นพืช และการเจริญในสภาพความชื้นสูง พืชจะแสดงลักษณะทางกายภาพและสรีระวิทยาที่ผิดปกติ (morphological disorder และ physiological disorder) การเพาะเลี้ยงต้นพืชภายใต้ความชื้นต่ำ (80-90 เปอร์เซ็นต์) สามารถปรับปรุงลักษณะทางกายภาพและสรีระวิทยาของพืชเพื่อเตรียมความพร้อมในการย้ายพืชออกปลูก เช่น ลดการอวบน้ำ ปรับปรุงประสิทธิภาพในการใช้น้ำของพืช การลดความชื้นภายในภาชนะเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถทำได้ โดยเพิ่มการถ่ายเทอากาศโดยการเปิดฝาขวดเป็นเวลา 2-3 วัน ก่อนการย้ายปลูก ทำให้พืชสามารถปรับตัวต่อความชื้นต่ำและเพิ่มประสิทธิภาพการดูดน้ำของราก

3. แสง ความเข้มแสงมีผลโดยตรงต่อการเจริญและพัฒนาการของต้นพืช แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ มีความยาวคลื่นอยู่ระหว่าง 400-700 นาโนมิเตอร์ ความเข้มแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ 1,000 ลักซ์ มีค่าประมาณ 11.4 μmol $m^{-2}s^{-1}$ ความเข้มแสงที่สูงมีผลต่อการกระตุ้นการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช อย่างไรก็ตามที่ระดับความเข้มแสงที่สูงจะมีผลต่ออุณหภูมิที่สูงขึ้นภายในภาชนะเพาะเลี้ยง ซึ่งมีผลต่อการขาดน้ำของพืช โดยจะพบลักษณะอาการใบเหี่ยว การเปลี่ยนสีเป็นสีแดงบริเวณหลังใบ ลักษณะของพืชที่มีความแข็งแรงเหมาะแก่การย้ายพืชออกปลูก คือ พืชที่มีลำต้นใหญ่สมบูรณ์ ข้อปล้องมีขนาดสั้น มีระบบรากขนาดใหญ่ ลักษณะเหล่านี้สามารถปรับปรุงได้โดยการเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงสูง การใช้แหล่งพลังงานแสงที่มีช่วงคลื่นของแสงสีน้ำเงินสูงกว่าช่วงแสงสีแดง หรือเหนือแดง หรือการใช้ช่วงเวลาให้แสงที่ยาว (16 ชั่วโมง/วัน) (Kirdmanee et al., 1995)

4. อุณหภูมิ ภายในภาชนะเพาะเลี้ยงในช่วงที่ให้แสงจะมีอุณหภูมิภายในสูงกว่าภายนอกประมาณ 1-2 ^{o}ซ ภายใต้การได้รับแสงที่ระดับความเข้มประมาณ 40 μmol m^{-2} s^{-1} ซึ่งเป็นปรากฏการณ์เช่นเดียวกับปรากฏการณ์เรือนกระจก จากผลของแสงจึงทำให้พืชได้รับอุณหภูมิที่แตกต่างกันในช่วงเวลากลางวันและกลางคืน Watanabe et al. (1993) รายงานว่าการให้อุณหภูมิที่ต่ำในช่วงเวลากลางวันและสูงในเวลากลางคืน (negative DIF) มีผลต่อการยืดตัวของต้นพืชและส่งผลให้พืชไม่แข็งแรง

ขณะย้ายปลูก ดังนั้นการควบคุมอุณหภูมิของห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในช่วงเวลากลางวันให้ต่ำกว่ากลางคืน 1-2 °ซ จะมีประโยชน์กับการผลิตพืชเพื่อการย้ายออกปลูก ถิ่นกำเนิดของพืชยังมีผลกับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง พืชที่เจริญเติบโตในเขตร้อนจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่าการ เพาะเลี้ยงพืชที่เจริญในเขตหนาว การให้อุณหภูมิที่สูงกับต้นพืชก่อนการย้ายปลูกในระยะ 2-3 วัน มีส่วนในการกระตุ้นระบบการลำเลียงน้ำและรักษาน้ำภายในต้นพืช

ปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาลักษณะทางกายภาพ และสรีระวิทยาของรากพืช

1. พันธุกรรม พืชบางชนิดมีความสามารถชักนำรากได้ง่ายในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น กล้วย เบญจมาศ สตรอเบอรี่ ในขณะที่พืชหลาย ๆ ชนิดจะชักนำการเกิดรากได้ยากโดยเฉพาะในกลุ่มไม้ยืนต้น ในช่วงเวลา 30 ปีที่ผ่านมา ความพยายามชักนำการเกิดรากโดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินประสบความสำเร็จในหลายชนิด แต่ก็ยังไม่เป็นที่ชัดเจนว่ากลไกในการเกิดรากพืชถูกควบคุมด้วยยีนใดบ้าง ทฤษฎีการเกิดรากของพืช (cellular totipotency) ชี้ให้เห็นว่าเซลล์ของพืชชั้นสูงมีพันธุกรรมที่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ แต่อยู่ภายใต้ปัจจัยที่ไม่กระตุ้นให้สามารถแสดงลักษณะการเกิดรากขึ้นได้ สิ่งนี้ชี้ให้เห็นว่าการเกิดรากของพืชถูกควบคุมด้วยหลายปัจจัย (Kirdmanee et al., 1995)

2. ความสัมพันธ์ของน้ำในต้นพืช การเกิดรากแก้วจะเกิดบนสภาพที่มีน้ำอย่างเพียงพอ ในขณะที่การเกิดรากฝอยหรือขนรากจะพบขณะที่พืชอยู่ในสภาพเครียดจากการขาดน้ำ ปัจจัยที่มีความสำคัญในการเกิดรากพืชคือความเต่งของน้ำภายในเซลล์และความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์ที่สูง ภาวะการขาดน้ำก่อนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหรือขณะย้ายเนื้อเยื่อพืชจึงมีอิทธิพลต่อการเกิดรากพืชอย่างมาก จากการทดลองการออกรากของพืชภายใต้ความเข้มแสงต่ำและไม่อยู่ภายใต้สภาพความเครียดน้ำ พบการออกรากที่สูง ค่าความดันของน้ำที่ต่ำของใบและกิ่งพืชมีความสัมพันธ์กับการเกิดรากที่ต่ำ ในชิ้นส่วนของพืช ความเข้มแสงที่สูงมีผลต่อการเพิ่มอุณหภูมิในต้นพืช พืชจึงคายน้ำเพื่อลดอุณหภูมิ ซึ่งมีผลกระทบทำให้พืชเกิดการสูญเสียน้ำ การเพิ่มระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่สูงขึ้นมีผลต่อการสูญเสียของน้ำจากปากใบ เนื่องจากการเพิ่มระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์มีผลทำให้ค่าความต้านทานของปากใบเพิ่มขึ้น ในภาวะการขาดน้ำพืชมีกลไกสร้างสาร เช่น proline กรดอะมิโนอื่น ฯลฯ มีผลทำให้ความดันน้ำในเซลล์พืชลดลง และพืชจะเกิดภาวะเครียดของการขาดน้ำ ซึ่งเป็นปัจจัยทำให้พืชออกรากได้น้อย การเพิ่มระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่สูงมีผลต่อการกระตุ้นการเกิดรากพืช การเกิดรากขนอ่อน และความแข็งแรงของพืช (Kirdmanee et al., 1995)

3. ออกซิเจน ปริมาณอากาศและความชื้น มีผลต่อการเกิดของราก การพัฒนาการเกิดรากต้องอาศัยออกซิเจนในการแบ่งเซลล์ การใช้วุ้นซึ่งเป็นวัสดุที่มีการแทรกซึมของอากาศลงสู่วุ้นใน

ปริมาณที่ต่ำ เป็นสาเหตุของการเกิดรากน้อย พืชมีกลไกการเคลื่อนย้ายออกซิเจนจากใบสู่รากได้บางส่วน แต่ไม่เพียงพอต่อการเจริญที่ปกติของพืช ความสามารถในการสร้างพลังงานของพืชลดลงเกือบ 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อรากพืชขาดออกซิเจน ดังนั้นความเข้มข้นของออกซิเจนที่รากพืชได้รับจึงขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเหลว หรือปริมาณออกซิเจนที่แทรกซึมอยู่ในวัสดุค้ำยึด (Fujiwara et al., 1993) การได้รับออกซิเจนบริเวณรากจึงขึ้นกับสัดส่วนของอากาศและน้ำในวัสดุค้ำยึด นอกจากออกซิเจนมีผลต่อการเกิดรากพืชแล้ว ยังพบว่าปริมาณออกซิเจนมีผลอย่างมากต่อการเกิดรากแขนงและการเกิดรากขนอ่อน Fujiwara et al. (1993) วัดการแทรกซึมของก๊าซออกซิเจนในอาหารเหลวและอาหารแข็งที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ออกซิเจนสามารถแทรกซึมในอาหารเหลวได้ 2×10^{-9} m^2 s^{-1} และในอาหารแข็งได้ 1×10^{-9} m^2 s^{-1} ซึ่งถือว่ามีค่าที่ต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณออกซิเจนที่แทรกซึมในดิน

4. ความเข้มข้นของธาตุอาหาร ปริมาณไนโตรเจนที่ต่ำในอาหารมีผลต่อการกระตุ้นการเกิดรากพืช ในขณะที่การขาดแคลเซียมและโบรอนมีผลต่อการลดการเกิดรากของพืช ดังนั้นการชักนำรากพืชจะเกิดได้ดี เมื่อชักนำรากพืชภายใต้อาหารที่มีธาตุไนโตรเจนที่ต่ำ และมีธาตุอาหารรองและอาหารเสริม การใช้สารเร่งการเจริญเติบโต IBA มีผลต่อการเคลื่อนตัวของธาตุอาหารไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโปแตสเซียมไปยังบริเวณการเกิดราก และมีผลในการชักนำการเกิดรากสูง ผลของการใช้ IBA จะเกิดขึ้นอย่างชัดเจนในพืชซึ่งขาดโบรอน ทั้งนี้เนื่องจาก IBA และโบรอนมีผลที่คล้ายคลึงต่อการเพิ่มระดับน้ำตาลอิสระในบริเวณที่เกิดรากพืช และกระตุ้นการเคลื่อนที่ของน้ำตาลเพื่อใช้ไปเป็นพลังงานสำคัญในการแบ่งเซลล์ของต้นพืช การขาดโบรอนของต้นพืชมีผลต่อการเกิด lignification และ xylem differentiation ที่ต่ำลง การเกิดรากนอกจากผลของปัจจัยอาหารภายนอกยังขึ้นกับปัจจัยภายในต้นพืช จากการทดลองในพืชหลายชนิด พบว่า สูตรอาหาร MS เป็นสูตรอาหารที่มีธาตุอาหารที่สูงโดยเฉพาะในกลุ่มไนโตรเจน การลดความเข้มข้นของธาตุอาหารไนโตรเจน หรือความเข้มข้นของอาหารเป็นครึ่งเท่า มีผลกระตุ้นการเกิดรากที่ดีขึ้น (Kirdmanee et al, 1995)

5. อุณหภูมิ มีผลต่อระดับคาร์โบไฮเดรตภายในต้นพืช น้ำตาลที่มีโมเลกุลเล็กและการสะสมของคาร์โบไฮเดรต เกิดขึ้นได้ดีเมื่อพืชถูกเลี้ยงที่อุณหภูมิ 15-20 °ซ การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของการหายใจของพืช ซึ่งมีส่วนสำคัญในการเผาผลาญอาหารและย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตในต้นพืช ได้มีการทดลองการเกิดรากของเบญจมาศที่อุณหภูมิ 25 และ 30 °ซ พบว่าที่อุณหภูมิ 30 °ซ ยอดเบญจมาศเกิดรากได้ดี ในขณะที่อุณหภูมิ 25 °ซ รากมีการยืดตัวและมีการพัฒนาขนรากมากขึ้น จึงอาจสรุปว่าอุณหภูมิที่สูงเหมาะสมกับการชักนำการเกิดราก ในขณะที่อุณหภูมิต่ำกระตุ้นให้เกิดการยืดตัวและการพัฒนารากแขนง (Watanabe et al., 1993)

เทคนิคการปรับสภาพพืชก่อนการย้ายปลูก (*In- vitro* acclimatization)

พืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความอ่อนแอต่อสภาพแวดล้อมภายนอก ทำให้พืชเกิดการสูญเสียน้ำภายในต้นอย่างรวดเร็ว โดยทั่วไปแล้วพืชที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาพการเพาะเลี้ยงที่ปิดสนิทมีผลทำให้ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ภายในภาชนะต่ำ มีการสะสมก๊าซเอทธีลีนในปริมาณที่สูง และความชื้นในภาชนะค่อนข้างสูง (95-100 เปอร์เซ็นต์; Kozai et al., 1997) ปัจจัยเหล่านี้มีผลทำให้พืชมีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติทั้งในด้านสรีระวิทยาและสัณฐานวิทยาดังที่กล่าวไว้ข้างต้น แล้วยังมีอีกหลายปัจจัยที่ส่งผลให้พืชอ่อนแอ เช่น การใส่น้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานของพืช นอกจากทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้ง่ายแล้วยังมีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase (Rubisco) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช (Aitken-Christie et al., 1995) และน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงทำให้ค่า water potential สูง ทำให้พืชดูดน้ำและแร่ธาตุไปใช้ได้ยากขึ้น พืชเกิดความเครียดเนื่องจากการขาดน้ำ การใช้ gelling agent เช่น วุ้น หรือ Gelrite ทำให้ก๊าซออกซิเจนมีอัตราการแพร่ลงไปในอาหารต่ำ (Kirdmanee et al, 1995) รากขาดก๊าซที่ใช้ในการหายใจ พืชจึงเจริญเติบโตได้ช้าและมีระบบรากที่อ่อนแอ ดังนั้นการปรับสภาพพืชให้มีความแข็งแรงทนทานต่อสภาพภายนอกก่อนการปลูกจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง

การควบคุมสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เช่น แสง ความชื้น การแลกเปลี่ยนก๊าซระหว่างภายในและภายนอกภาชนะ รวมถึงการใช้วัสดุค้ำยึด เพื่อส่งเสริมความแข็งแรงของพืช ช่วยให้พืชมีการพัฒนาและเจริญเติบโตที่ปกติ และมีการปรับตัวให้มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมภายนอก การใช้วัสดุที่ยอมให้มีการแลกเปลี่ยนก๊าซ (porous filter) ในอัตราที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงทำให้ภายในภาชนะมีความชื้นลดต่ำลงมีผลทำให้พืชลดอาการอวบน้ำตลอดจนชักนำให้พืชมีการสร้างอวัยวะป้องกันการสูญเสียน้ำ เช่น wax ขึ้นตามลำต้นและใบ อีกทั้งยังส่งเสริมให้กลไกทางสรีระวิทยาต่าง ๆ เช่น การดูดน้ำของต้นพืช การควบคุมการปิดเปิดปากใบ ซึ่งมีผลทำให้กลไกการคายน้ำของพืชทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงมีการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ด้วยแสงมากขึ้นเนื่องจากมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์อันเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ด้วยแสงเพิ่มขึ้น (Kozai et al., 1997) การใช้อาหารที่ปราศจากน้ำตาลช่วยลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์และช่วยให้กลไกการสังเคราะห์ด้วยแสงทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ (Aitken-Christie et al., 1995) การเพาะเลี้ยงพืชในอาหารเหลวโดยใช้วัสดุค้ำยึดที่มีช่องอากาศพรุน เช่น vermiculite หรือ florialite ทำให้ก๊าซออกซิเจนแพร่ไปยังรากพืชได้มากขึ้น พืชสามารถพัฒนาระบบราก มีการสร้างรากแขนงและขนรากเป็นจำนวนมาก ซึ่งมีผลทำให้พืชสามารถดูดน้ำและแร่ธาตุไปใช้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ดังนั้นการปรับสภาพพืชก่อนการย้ายปลูกจึงมีบทบาทสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากช่วยลดเวลา ค่าใช้จ่าย แรงงาน และการสูญเสียต้นพืชหลังการย้ายปลูก ทำให้

สามารถลดต้นทุนการผลิต และสามารถผลิตพืชในระดับอุตสาหกรรม (large-scale production) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Kozai et al., 1997)

ดังนั้นการเตรียมความพร้อมให้กับต้นพืชก่อนการย้ายออกปลูก โดยการเพาะเลี้ยงต้นพืชในอาหารที่ไม่เติมน้ำตาล เพิ่มอัตราการแลกเปลี่ยนอากาศโดยใช้วัสดุถ่ายเทอากาศ เพื่อให้ต้นพืชมีการเจริญแบบกระตุ้นการสังเคราะห์ด้วยแสง นอกจากนี้การปรับสภาพการเจริญของรากโดยใช้วัสดุค้ำยึดที่มีระดับความชื้นและอากาศที่เหมาะสมเช่น vermiculite เป็นวัสดุค้ำยึดเพื่อให้ระบบรากของพืชมีการพัฒนาได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งการปรับสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีผลทำให้ต้นพืชมีศักยภาพในการสังเคราะห์ด้วยแสงได้ดีขึ้น และมีกลไกในการป้องกันการสูญเสียน้ำจากการคายน้ำ เช่น การสร้าง wax เคลือบผิวใบ และเพิ่มศักยภาพการทำงานของปากใบในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ และป้องกันการสูญเสียน้ำ ดังนั้นเมื่อทำการย้ายต้นพืชที่ผ่านการเตรียมต้นในระบบการเจริญแบบกระตุ้นการสังเคราะห์ด้วยแสงออกปลูกในสภาพธรรมชาติ ต้นพืชจึงมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้มี 3 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 : การศึกษาการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดพันธุ์คาร์กิล 939 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดภายใต้สภาพ photoautotrophic

เป็นการศึกษาอิทธิพลของวัสดุค้ำยึด 2 ชนิดคือ วุ้น (agar) และ vermiculite และ การมีน้ำตาลซูโครส (30 กรัม/ลิตร; photomixotrophic) และ ไม่มีน้ำตาลซูโครส (photoautotrophic) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ด

การทดลองที่ 2 : การศึกษาอิทธิพลของวัสดุค้ำยึดรากและน้ำตาลซูโครส ที่มีต่ออัตราการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดที่ได้จากการเพาะเลี้ยง zygotic embryo

เป็นการศึกษาอิทธิพลของวัสดุค้ำยึดราก 2 ชนิดคือ วุ้น (agar) และ vermiculite และน้ำตาลซูโครสระดับต่าง ๆ (0 , 12.5 และ 25 กรัม/ลิตร) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยง zygotic embryo

การทดลองที่ 3 : การเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มชุดโครโมโซมของโพรนามีด

เป็นการศึกษาวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มชุดโครโมโซมของโพรนามีด มี 2 กรรมวิธี คือ มีและไม่มีการทำ SC โดยทำ ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 พันธุ์ข้าวโพดที่ใช้ในเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรมีดังนี้คือ

3.1.1.1 ข้าวโพดสายพันธุ์แท้จำนวน 5 พันธุ์ คือ Agron 1, Agron 18, Agron 20 (ข้าวโพดสายพันธุ์ไทยที่ได้รับการพัฒนาจากภาควิชาพืชไร่นา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์), Pa 91 (พัฒนาจาก Pennsylvania State University ประเทศสหรัฐอเมริกา) และ M 72 (พัฒนาจาก Swiss Federal Institute of Technology ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการชักนำให้เกิด ELS สูง

3.1.1.2 ข้าวโพดลูกผสม F_1 จำนวน 9 ลูกผสม 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

3.1.2 พันธุ์ข้าวโพดที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง zygotic embryo คือ พันธุ์อินทรี 2

3.1.3 พันธุ์ข้าวโพดลูกผสมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเมล็ด คือ พันธุ์คาร์กิล 939

3.1.4 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง (ภาคผนวก)

3.1.4.1 สารเคมีสำหรับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวโพด ได้แก่ สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962; ตารางผนวกที่ 1)

3.1.4.2 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ ได้แก่ สูตร N6 (Chu, 1966; ตารางผนวกที่ 2) และ Growth medium (GM; Buter et al., 1991; ตารางผนวกที่ 3)

3.1.4.3 สารเคมีสำหรับการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพด ได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในสูตรอาหาร Induction medium (IM), Regeneration medium (RM), Growth medium (GM) และ Hoagland nutrient solution (Buter et al., 1991; ตารางผนวกที่ 3 และ 4)

3.1.5 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการปลูกพืช

3.2 สถานที่ทำการทดลอง

การทดลองที่ 1, 2 และ 3 ทำการทดลองที่ฟาร์มมหาวิทยาลัย และอาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และการทดลองที่ 3 บางส่วนได้ไปทำเพิ่มเติมที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

3.3 ระยะเวลาการทดลอง

1 มกราคม 2544 -30 ธันวาคม 2546

3.4 วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 : การศึกษาการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดพันธุ์คาร์กิล 939 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดภายใต้สภาพ photoautotrophic

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มี 5 ซ้ำ ๆ ละ 2 ต้น มี 3 กรรมวิธี คือ

1. อาหารสูตร MS (ตารางผนวกที่ 1) ที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครสและใช้ vermiculite เป็นวัสดุค้ำยึด (MS ที่ไม่มีน้ำตาลซูโครส + vermiculite)
2. อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร และใช้ vermiculite เป็นวัสดุค้ำยึด (MS ที่มีน้ำตาลซูโครส + vermiculite)
3. อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร และใช้วุ้น (agar) เป็นวัสดุค้ำยึด (MS ที่มีน้ำตาลซูโครส + วุ้น; กรรมวิธีควบคุม)

ทำการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวโพดลูกผสมพันธุ์คาร์กิล 939 ด้วยคลอร็อกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ก่อนนำไปวางบนกระดาษเพาะในสภาพปลอดเชื้อ นำไปวางไว้ที่ตู้เพาะเมล็ดให้ได้รับแสง 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 4 วัน แล้วเลือกเมล็ดที่มีใบงอกยาวประมาณ 1 เซนติเมตร นำไปเพาะเลี้ยงในขวดที่ปิดด้วยลูกยางพลาสติกอุดสำลีเพื่อให้มีการถ่ายเทอากาศได้สะดวก นำไปไว้บนชั้นเพาะเลี้ยงให้ได้รับแสงความเข้มประมาณ 17.1 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ (ประมาณ 3,000 ลักซ์) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 27 °ซ หลังจากนำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 3, 5, 7 และ 9 วัน ทำการบันทึกข้อมูลดังต่อไปนี้

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกความยาวใบ (วัดจากจุดที่เมล็ดงอกจนถึงปลายใบที่ยาวที่สุด)
2. จำนวนราก (นับจำนวนรากหลักและรากแขนงรวมกัน)
3. ความยาวราก โดยใช้เครื่องวัดความยาวราก
4. น้ำหนักสดใบและราก โดยน้ำหนักสดใบชั่งรวมส่วนของเมล็ดด้วย

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) โดยใช้ F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับ 5 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 2 : การศึกษาอิทธิพลของวัสดุค้ำยึด (vermiculite และวุ้น [agar]) และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในระดับต่าง ๆ ที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดที่ได้จากการเพาะเลี้ยง zygotic embryo

วางแผนการทดลองแบบ 2x3 factorial in CRD มี 2 ปัจจัย คือ วัสดุค้ำยึดราก (vermiculite และวุ้น) และ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในระดับต่าง ๆ (0, 12.5 และ 25 กรัม/ลิตร) มี 5 ซ้ำ ๆ ละ 2 ต้น รวมทั้งสิ้น 6 กรรมวิธี คือ

1. อาหาร GM (ตารางผนวกที่ 3) ไม่ใส่น้ำตาลซูโครส + vermiculite
2. อาหาร GM ใส่น้ำตาลซูโครส 12.5 กรัม/ลิตร + vermiculite
3. อาหาร GM ใส่น้ำตาลซูโครส 25 กรัม/ลิตร + vermiculite
4. อาหาร GM ไม่ใส่น้ำตาลซูโครส + วุ้น
5. อาหาร GM ใส่น้ำตาลซูโครส 12.5 กรัม/ลิตร + วุ้น
6. อาหาร GM ใส่น้ำตาลซูโครส 25 กรัม/ลิตร + วุ้น

แต่ละกรรมวิธีมีจำนวนต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยง zygotic embryo จำนวน 10 ต้น

1. การปลูกข้าวโพดและการดูแลรักษา

การเตรียมแปลงเริ่มจากไถตากดินไว้ 15 วัน ไถพรวน ทำการปลูกโดยใช้ระยะ 75x30 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

2. การเพาะเลี้ยง zygotic embryo ข้าวโพดมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.1 ทำการสุ่มตรวจ immature zygotic embryo จากฝักข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 หลังทำการผสมประมาณ 13-14 วัน บริเวณกลางฝัก 2-3 เมล็ด ถ้ามีขนาดยาว 3 มม. เลือกมาทั้งฝัก

2.2 ทำการลอกเปลือกและไหมออกให้หมด แล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ และใส่ Tween 20 ประมาณ 4-5 หยด เป็นเวลา 30 นาที

2.3 นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ โดยราดลงบนฝัก 3-4 ครั้ง

2.4 ใช้มีดเฉือนเมล็ดบนฝักออก 1 ส่วน 3 ของเมล็ด จะมองเห็น immature zygotic embryo

2.5 ใช้มีดแคะเอา immature zygotic embryo แล้วนำไปวางเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 (ตารางผนวกที่ 2) ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 1.5 x 10 เซนติเมตร วาง 6 แถว ๆ ละ 5 ชิ้น (จานละ 30 ชิ้น) (ภาพผนวกที่ 1 ก)

2.6 ปิดผนึกจานเพาะเลี้ยงด้วยพาราฟิล์มแล้วนำไปวางไว้ในกล่องมืดในห้องเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน จะเกิดใบงอกออกมา แล้วไปวางบนชั้นเพาะเลี้ยงให้ได้รับแสง 16 ชั่วโมง/วัน ที่ความเข้มแสง 17.1 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ (ประมาณ 3,000 ลักซ์) เป็นเวลา 10 วัน ต้นข้าวโพดจะมีใบยาวประมาณ 3.5-4 เซนติเมตร (ภาพผนวกที่ 1 ข)

2.7 เลือกต้นข้าวโพดที่มีขนาดใกล้เคียงกัน เพาะเลี้ยงในอาหารทั้ง 6 กรรมวิธี ที่อยู่ในขวดสูง 20 เซนติเมตร ที่ปิดด้วยลูกยางเจาะรู อุดด้วยสำลี

2.8 นำไปวางในตู้เพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสงประมาณ 7500 ลักซ์ อุณหภูมิ 27 ^{o}ซ ความชื้น 85 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 20 วัน (ภาพผนวกที่ 1 ค)

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกความยาวใบ วัดจากจุดที่ใบงอกจนถึงปลายใบที่ยาวที่สุด
2. จำนวนราก (นับรากหลักและรากแขนงรวมกัน)
3. ความยาวราก
4. น้ำหนักสดใบและราก โดยน้ำหนักสดใบชั่งรวมส่วนของ zygotic embryo
5. น้ำหนักแห้งใบและราก นำใบและรากไปอบที่อุณหภูมิ 70 ^{o}ซ เป็นเวลา 3 วัน ก่อนนำมาชั่ง

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) โดยใช้ F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับ 5 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 3 การเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มชุดโครโมโซมของโพรนามีด

วางแผนการทดลองแบบ 14 x 2 หรือ 3 x 2 factorial ใน CRD มี 2 ปัจจัย โดยปัจจัยที่ 1 คือ จีโนไทป์ข้าวโพด ประกอบด้วยสายพันธุ์แท้ 5 สายพันธุ์ และลูกผสม 9 ลูกผสม (สำหรับการทดลองที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี) และลูกผสม 3 ลูกผสม (Agron 1 x Pa 91, Agron 38 x M 72 และ Agron 43 x M 72; สำหรับทำการทดลองเพิ่มเติมที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ) และปัจจัยที่ 2 คือ วิธีการเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มชุดโครโมโซมของโพรนามีด ซึ่งมี 2 กรรมวิธี คือ ใช้และไม่ใช้ SC ทำการทดลอง 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยอับละอองเกสรที่เลี้ยงในอาหารจำนวน 10-60 จานเพาะเลี้ยง (30 อับละอองเกสร/จานเพาะเลี้ยง)

1. ปลูกข้าวโพดสายพันธุ์ Agron 1, Agron 18, Agron 20, Agron 38 และ Agron 43 ซึ่งเป็นข้าวโพดสายพันธุ์ไทยที่ได้รับการพัฒนาจากภาควิชาพืชไร่นา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ข้าวโพดสายพันธุ์ Pa 91 ซึ่งเป็นข้าวโพดสายพันธุ์ที่พัฒนาจาก Pennsylvania State University ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีศักยภาพในการชักนำให้เกิด ELS สูง แต่มีลักษณะทางการเกษตรไม่ดี และข้าวโพดสายพันธุ์ M 72 ซึ่งเป็นข้าวโพดสายพันธุ์ที่พัฒนามาจาก Swiss Federal Institute of Technology ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ ซึ่งมีศักยภาพในการชักนำให้เกิด ELS สูง

2. 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 (ส่วนลูกผสม 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) ทยอยปลูกทุก ๆ 2 สัปดาห์ เพื่อให้มีอับละอองเกสรต่อเนื่องตลอดระยะเวลาในการทดลอง (ภาพผนวกที่ 2 ก)

3. เมื่อต้นข้าวโพดเจริญอยู่ในระยะที่สร้างช่อดอกตัวผู้ (tassel) จึงเก็บช่อดอกตัวผู้ที่อยู่ในระยะตั้งท้องมาทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร โดยใช้วิธีการและสูตรอาหารที่ดัดแปลงมาจากกาญจนา รุจิพจน์ (2540) โดยมีขั้นตอนสรุปดังต่อไปนี้

วิธีการเลือกช่อดอก

เก็บช่อดอกตัวผู้ในระยะตั้งท้องคือ ประมาณ 7 วัน ก่อนช่อดอกตัวผู้โผล่พ้นใบธง เลือกช่อดอกที่อยู่ในระยะการพัฒนาที่พอดีไม่แก่ไม่อ่อนจนเกินไป สามารถตรวจสอบได้โดยบีบบริเวณโคนของช่อดอก หากอยู่ในระยะพอดีโคนช่อดอกจะแน่นและแข็ง หรืออาจตรวจสอบได้อีกวิธีหนึ่ง โดยการใช้มีดกรีดบริเวณโคนช่อดอกแล้วนำอับละอองเกสรมาแกะดูสีของอับละอองเกสรว่าอยู่ในระยะที่เหมาะสมหรือไม่ (ถ้าทั้ง 6 อัน มี 3 อัน ที่ขนาดใหญ่กว่า มีสีเหลืองสด และแตกต่างจากอีก 3 อันที่เหลือ

อย่างชัดเจน แสดงว่าอับละอองเกสรอยู่ในระยะที่เหมาะสม แต่ถ้าหากอับละอองเกสรมีสีเหลืองอ่อนมาก หรือสีเขียวแสดงว่าอับละอองเกสรอยู่ในระยะที่อ่อนเกินไปหรือแก่เกินไปตามลำดับ ไม่เหมาะที่จะนำมาเพาะเลี้ยง)

4. เมื่อได้ช่อดอกตัวผู้ที่ต้องการแล้วนำมาทำ pre-treatment โดยการนำช่อดอกตัวผู้มาห่อด้วยกระดาษทิชชูที่พรมน้ำชุ่ม แล้วห่อทับด้วยอลูมินัมฟอยล์ (ภาพผนวกที่ 2 ข) แล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 7 °ซ เป็นเวลา 10-14 วัน (ภาพผนวกที่ 2 ค) นำช่อดอกตัวผู้ที่เก็บไว้เป็นเวลา 10-14 วัน มาตรวจดูระยะของละอองเกสรโดยใช้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นละอองเกสรที่มีนิวเคลียสอยู่ (ภาพผนวกที่ 3 ก, 3 ข และ 3 ค) เลือกเฉพาะช่อดอกที่ละอองเกสรมีนิวเคลียสอยู่ในระยะ late uninucleate (ภาพผนวกที่ 3 ข) ถึง early-binucleate (ภาพผนวกที่ 3 ค) การคัดเลือกระยะของ microspore ที่เหมาะสมทำได้โดยการแบ่งช่อดอกออกเป็น 2 ส่วนคือ main branch และ side branch และแบ่ง main branch ออกเป็น 3 ส่วน (ภาพผนวกที่ 2 ง) คือ ส่วนโคน ส่วนกลาง และส่วนปลายช่อดอก ส่วน side branch ก็แบ่งออกเป็น 3-4 ส่วน ตามความยาวและลักษณะของ side branch แล้วสุ่มดอกย่อยจากแต่ละส่วน ๆ ละ 2 -3 ดอก มาตรวจสอบระยะการพัฒนานิวเคลียสของ microspore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5. ทำการฟอกฆ่าเชื้ออับละอองเกสรด้วยคลอร็อกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ในตู้ปลอดเชื้อ นำอับละอองเกสรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร induction medium (IM; ตารางผนวกที่ 3) โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม เพื่อให้ได้รับกรรมวิธี ดังต่อไปนี้

A. ใช้โพรนามีดเป็นสารเหนี่ยวนำการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม

B. ใช้โพรนามีดเป็นสารเหนี่ยวนำการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม และมีการเพิ่มประสิทธิภาพ โดยการใช้ SC

<u>กรรมวิธี A</u>: เลือกอับละอองเกสรขนาดใหญ่ 3 อันจาก 6 อันในหนึ่งดอกย่อย (ภาพผนวกที่ 2 จ) ทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรในอาหาร IM ที่มีโพรนามีด (20 μM) 30 อับละอองเกสร/จานเพาะเลี้ยง (ภาพผนวกที่ 2 ฉ) ที่อุณหภูมิ 14 °ซ เป็นเวลา 3 วันในที่มืด (ภาพผนวกที่ 2 ช) ย้ายอับละอองเกสรไปเพาะเลี้ยงในอาหาร IM ที่ไม่มีโพรนามีด ที่อุณหภูมิ 14 °ซ เป็นเวลา 4 วันในที่มืด แล้วจึงย้ายอับละอองเกสรไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27 °ซ เป็นเวลา 7 วัน ในที่มืด (ภาพผนวกที่ 2 ฌ)

<u>กรรมวิธี B</u>: เลือกอับละอองเกสรเช่นเดียวกับ กรรมวิธี A ทำ SC โดยนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร IM ที่อุณหภูมิ 2-4 °ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อทำให้เกิด SC (ภาพผนวกที่ 2 ซ) 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 (ภาพผนวกที่ 2 ฌ)

หลังจากนั้นย้ายอับละอองเกสรทั้ง 2 กรรมวิธีไปไว้บนชั้นเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27 °ซ เป็นเวลา 7 วัน ให้แสงสว่างจากหลอดไฟ red white และ cool white ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน (ภาพผนวกที่ 2 ญ) ทำการย้ายอับละอองเกสรไปยังอาหาร regeneration medium (RM; ตารางผนวกที่ 3; ภาพผนวกที่ 2 ฎ) นำไปเพาะเลี้ยงบนชั้นเพาะเลี้ยงโดยให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมง/วัน (ภาพผนวกที่ 2 ฎ) แล้วทำการตรวจนับจำนวน ELS ทุก ๆ 2 สัปดาห์ รวมทั้งสิ้น 3 ครั้ง (ภาพผนวกที่ 4 ก และ 4 ข)

6. เมื่อเกิดต้น (plantlet) ในอาหาร RM (ภาพผนวกที่ 4 ค และ 4 ง) ให้ย้ายต้นลงในอาหาร growth medium (GM; ตารางผนวกที่ 3; ภาพผนวกที่ 2 ฐ) เมื่อต้นข้าวโพดมีใบ 3-4 ใบ รากยาวประมาณ 5 เซนติเมตร ทำการย้ายต้นข้าวโพดลงในสารละลาย Hoagland (ตารางผนวกที่ 4) 7 วัน โดยครอบด้วยขวดพลาสติกใสเพื่อรักษาความชื้นและลดการคายน้ำ และเจาะรูระบายอากาศ (ภาพผนวกที่ 2 ฑ) ตัดรากยาวประมาณต้นละ 1 เซนติเมตร จำนวน 2 รากเพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซมด้วยวิธี acetocarmine staining techniques โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

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

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

3. การเก็บรักษาเนื้อเยื่อ (storage) ทำการล้างกรดออกให้หมดด้วยเอทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แล้วแช่เนื้อเยื่อไว้ในเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ในห้องแช่แข็งได้นานถึง 6-12 เดือน

4. การแยกเซลล์และย้อมสีโครโมโซม (cell separation and staining of chromosome) โดยการแช่เนื้อเยื่อรากในสีย้อม acetocarmine แล้วลนไฟให้เดือด เก็บไว้ 24 ชั่วโมง จึงตัดปลายรากยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร หยดด้วย glacial acetic acid 45 เปอร์เซ็นต์ 3 หยด ปิดด้วยแผ่นสไลด์ ลนไฟแล้วเคาะเบาๆ ให้เซลล์มีการกระจายตัวเพื่อให้เห็นโครโมโซมได้ชัดเจน นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ (Shaw, 1973) นำต้นข้าวโพดสายพันธุ์แท้ที่ได้ย้ายลงปลูกในสภาพดินปกติในโรงเรือนทดลอง (ภาพผนวกที่ 2 ฒ)

7. ทำการผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ (ภาพผนวกที่ 2 ณ)

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 วันอับละอองเกสรแตก วัดขนาดและนับจำนวนปากใบ)

วิธีการวัดขนาดและนับจำนวนปากใบ

1. นำบริเวณกลางใบของต้นข้าวโพดอายุประมาณ 30 วัน หลังย้ายออกปลูกลงกระถาง
2. ทำการฉีกใบเฉียง ๆ อย่างช้า ๆ จะเกิดเนื้อเยื่อชั้น epidermis บาง ๆ ลอกออกมา
3. ทำการดึงเนื้อเยื่อชั้น epidermis ใต้ใบมาวางบนแผ่นสไลด์ หยดน้ำกลั่น1-2 หยด แล้วปิดด้วย cover glass
4. นำมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์
5. ทำการวัดขนาดปากใบโดยใช้ micrometer จำนวน 10 ปากใบ/ตัวอย่าง และนับจำนวนปากใบ 3 ครั้ง/ตัวอย่าง และหาค่าเฉลี่ย

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ทำการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรโดยใช้ parameters ต่อไปนี้

1.1 ทำการนับการเกิด ELS ของอับละอองเกสรบน RM แล้วคำนวณหาความสามารถในการชักนำให้เกิด ELS ต่อ 100 อับละอองเกสร ตามสูตร

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

1.2 ทำการนับจำนวนต้นที่เกิดขึ้น แล้วคำนวณหาความสามารถในการเกิดต้นต่อ 100 ELS ตามสูตร

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

1.3 คำนวณหาความสามารถในการผลิตต้นต่อ 100 อับละอองเกสร ตามสูตร

$$\text{Plant production (PP) (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนต้น x 100}}{\text{จำนวนอับละอองเกสร}}$$

1.4 คำนวณหาความสามารถในการผลิตต้น DH ต่อ 100 อับละอองเกสร ตามสูตร

1.5 คำนวณหาความสามารถในการเกิดต้น DH ต่อ 100 ELS ตามสูตร

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

1.6 คำนวณหาดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซม ตามสูตร

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

1.7 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตายในระหว่างการเพาะเลี้ยง ตามสูตร

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

1.8 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตายหลังย้ายปลูกลงดินในโรงเรือนทดลอง ตามสูตร

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

1.9 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ต้นที่รอดชีวิตต่อต้นที่ชักนำได้

$$\text{Survivability (S) (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนต้นที่รอดชีวิต x 100}}{\text{จำนวนต้นที่ได้จากการชักนำ}}$$

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

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการทดลองที่ 1 การศึกษาการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดพันธุ์คาร์กิล 939 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดภายใต้สภาพ photoautotrophic

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโพดในสภาพ photoautotrophic (อาหาร MS ที่ไม่ใส่น้ำตาลซูโครส) และ photomixotrophic (อาหาร MS ที่ใส่น้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร) โดยจัดวิธีที่นิยมใช้คือการใช้วุ้นเป็นวัสดุค้ำยึดร่วมกับอาหาร MS ที่ใส่น้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร เป็นกรรมวิธีควบคุม พบว่าการเพาะเลี้ยงในสภาพ photoautotrophic จะให้ค่าความยาวใบ (leaf length; LL) สูงที่สุดในทุกระยะการเจริญเติบโต (ที่ 3, 5, 7 และ 9 วัน) และมีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในระบบ photomixotrophic และพบว่าที่ระยะการเจริญเติบโต 9 วัน การเพาะเลี้ยงในสภาพ photoautotrophic จะให้ค่า LL สูงกว่ากรรมวิธีควบคุม 1.5 เท่า (ภาพที่ 4; ตารางผนวกที่ 5 และ 6)

เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสดใบ (leaf fresh weight; LFW) และน้ำหนักแห้งใบ (leaf dry weight; LDW) พบว่าการเพาะเลี้ยงในสภาพ photoautotrophic จะให้ค่า LFW และ LDW สูงที่สุดในทุกระยะการเจริญเติบโต และมีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในระบบ photomixotrophic (ยกเว้น ค่า LDW ที่ระยะการเจริญเติบโตที่ 3, 5 และ 9 วัน ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ) และพบว่าที่ระยะการเจริญเติบโต 9 วัน การเพาะเลี้ยงในสภาพ photoautotrophic จะให้ค่า LFW และ LDW สูงกว่า กรรมวิธีควบคุม 1.7 และ 1.05 เท่า ตามลำดับ (ภาพที่ 5 ก และ 5 ข ตามลำดับ; ตารางผนวกที่ 5 และ 6) นอกจากนี้พบว่า ต้นข้าวโพดที่เพาะเลี้ยงในสภาพ photoautotrophic จะมีใบสีเขียวเข้มกว่าและมีลักษณะสมบูรณ์ ไม่ม้วนงอ หรือเหี่ยวที่ปลาย เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น (ภาพที่ 6)

เมื่อเปรียบเทียบค่าจำนวนราก (number of root; NR) พบว่าการเพาะเลี้ยงในสภาพ photoautotrophic จะให้ค่า NR สูงที่สุดในทุกระยะการเจริญเติบโต และที่ระยะการเจริญเติบโต 3 วัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในทุกกรรมวิธี เนื่องจากเป็นจำนวนรากที่งอกออกมาจากเมล็ดโดยตรง ยังไม่แตกรากแขนง เพราะว่าในช่วงแรกของการเจริญเติบโตจะมีการใช้อาหารสะสมในเมล็ด (เอนโดสเปิร์ม) เป็นหลัก ดังนั้นพืชจึงไม่จำเป็นที่จะกระตุ้นกลไกในการหาอาหารของรากโดยการเพิ่มจำนวนรากให้มากขึ้น อย่างไรก็ตามที่ 7 และ 9 วัน พบว่าค่า NR ของทั้ง 3 กรรมวิธี แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย MS ที่ไม่มีน้ำตาลซูโครส + vermiculite ให้ NR สูงที่สุด (61.2 และ 91.3 ราก ที่ 7 และ

9 วัน ตามลำดับ) ตามด้วย MS ที่มีน้ำตาลซูโครส + วุ้น (43.0 และ 56.4 ราก ตามลำดับ) และ MS ที่มีน้ำตาลซูโครส + vermiculite (29.4 และ 40.7 ราก ตามลำดับ) ตามลำดับ และที่ระยะการเจริญเติบโต 9 วัน การเพาะเลี้ยงในสภาพ photoautotrophic จะให้ค่า NR สูงกว่ากรรมวิธีควบคุม 1.6 เท่า (ภาพที่ 7 ก; ตารางผนวกที่ 5 และ 6) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเมื่ออาหารสะสมในเมล็ดเริ่มลดลงจนเกือบหมด ปัจจัยทางกายภาพในภาชนะเพาะเลี้ยงจะเริ่มมีบทบาทในการส่งเสริมการเจริญเติบโตมากขึ้น จากการสังเกตพบว่าจำนวนรากหลักที่ออกมาจากเมล็ดโดยตรงจะมีประมาณ 11-13 ราก และที่เหลือจะเป็นรากแขนง

เมื่อเปรียบเทียบค่าความยาวราก (root length; RL) พบว่าการเพาะเลี้ยงในสภาพ photoautotrophic จะให้ค่า RL สูงที่สุดในทุกระยะการเจริญเติบโต และมีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในระบบ photomixotrophic และที่ระยะการเจริญเติบโต 9 วัน การเพาะเลี้ยงในสภาพ photoautotrophic จะให้ค่า RL สูงกว่า กรรมวิธีควบคุม 1.7 เท่า (ภาพที่ 7 ข; ตารางผนวกที่ 5 และ 6)

เมื่อเปรียบเทียบค่าน้ำหนักสดราก (root fresh weight; RFW) และน้ำหนักแห้งราก (root dry weight; RDW) พบว่าการเพาะเลี้ยงในสภาพ photoautotrophic จะให้ค่า RFW และ RDW สูงที่สุดในทุกระยะการเจริญเติบโต เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในระบบ photomixotrophic และที่ระยะการเจริญเติบโต 9 วัน การเพาะเลี้ยงในสภาพ photoautotrophic จะให้ค่า RFW และ RDW สูงกว่ากรรมวิธีควบคุม 4.1 และ 1.2 เท่า ตามลำดับ (ภาพที่ 8 ก และ 8 ข ตามลำดับ; ตารางผนวกที่ 5 และ 6)

ผลการทดลองนี้คล้ายคลึงกับที่เคยมีรายงานมาก่อน เช่น Kirdmanee et al. (1995) พบว่าการเพาะเลี้ยงต้นยูคาลิปตัสภายใต้การให้คาร์บอนไดออกไซด์เต็มที่ (1200 $\mu mol\ mol^{-1}$) และใช้ vermiculite เป็นวัสดุค้ำยึดจะให้ค่าน้ำหนักแห้ง (วัดทั้งต้น) พื้นที่ใบ จำนวนราก และ ความยาวรากสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้วัสดุค้ำยึดชนิดอื่นๆ (วุ้น, Gelrite และ ตาข่ายพลาสติก) และมีเปอร์เซ็นต์ใบและรากที่เสียหายน้อยที่สุด และยังพบว่าการใช้วุ้นจะให้เปอร์เซ็นต์ใบและรากที่เสียหายสูงกว่าการใช้ vermiculite Kozai et al. (1998) พบว่าการเพาะเลี้ยงต้นกาแฟในสภาพที่ไม่มีน้ำตาลซูโครสในอาหารร่วมกับการใช้ Florialite (vermiculite + เซลลูโลสไฟเบอร์) จะให้ค่าน้ำหนักสดและแห้ง (วัดทั้งต้น) ความยาวราก ความสูงต้น และพื้นที่ใบสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการใส่น้ำตาลซูโครสลงในอาหารร่วมกับการใช้ vermiculite และวุ้นเป็นวัสดุค้ำยึด

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้ vermiculite และวุ้นร่วมกับอาหาร MS ที่ใส่น้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร พบว่าการใช้วุ้นให้ค่า LL สูงกว่า vermiculite ในทุกระยะการเจริญเติบโต แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ และที่ระยะการเจริญเติบโต 9 วัน การใช้วุ้นให้ค่า LL สูงกว่า vermiculite 1.15 เท่า (ภาพที่ 4; ตารางผนวกที่ 5 และ 6) ที่ระยะการเจริญเติบโต 3 วัน ค่า NR ทั้ง 2 กรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ที่ระยะ 5 วันเป็นต้นไป การใช้วุ้นจะให้ NR สูงกว่าการใช้ vermiculite อย่างมีนัยสำคัญ 1.4-1.8 เท่า (ภาพที่ 7 ก; ตารางผนวกที่ 5 และ 6)

เมื่อเปรียบเทียบค่า LFW และ LDW พบว่าที่ระยะการเจริญเติบโต 3, 5 และ 7 วัน การใช้วุ้นให้ค่า LFW สูงกว่าการใช้ vermiculite แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ แต่ที่ระยะการเจริญเติบโต 9 วัน การใช้วุ้นจะให้ค่า LFW สูงกว่าการใช้ vermiculite อย่างมีนัยสำคัญ 1.3 เท่า (ภาพที่ 5 ก; ตารางผนวกที่ 5 และ 6) และพบว่าการใช้วุ้นจะให้ค่า LDW สูงกว่าการใช้ vermiculite ในทุกระยะการเจริญเติบโต แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ (ภาพที่ 5 ข; ตารางผนวกที่ 5 และ 6)

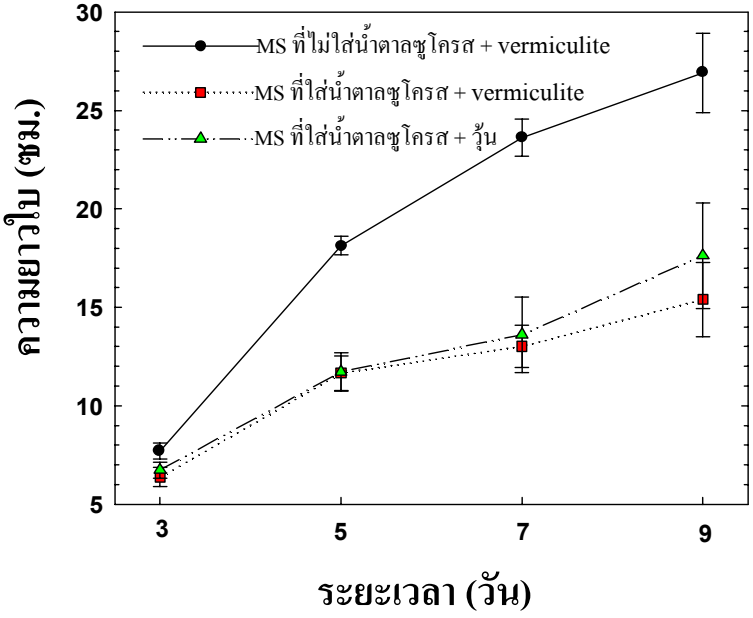
เมื่อเปรียบเทียบค่า RFW และ RDW พบว่าที่ระยะการเจริญเติบโต 3 วัน การใช้ vermiculiteให้ค่า RFW และ RDW สูงกว่าวุ้นแต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ แต่ที่ระยะการเจริญเติบโต 5 วันเป็นต้นไป การใช้วุ้นจะให้ค่า RFW และ RDW สูงกว่าการใช้ vermiculite แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ยกเว้น ค่า RDW ที่ระยะการเจริญเติบโต 7 วัน การใช้วุ้นจะให้ค่า RDW สูงกว่าการใช้ vermiculite อย่างมีนัยสำคัญ 1.4 เท่า (ภาพที่ 7 ก และ 7 ข; ตารางผนวกที่ 5 และ 6)

จากการทดลองพบว่า การใช้วุ้นจะทำให้ต้นข้าวโพดมีลักษณะที่ไม่สมบูรณ์ ใบมีสีซีดกว่าใบม้วนงอ และเหี่ยวที่ปลายใบ นอกจากนี้ยังพบว่า ถึงแม้จะใช้ vermiculite เป็นวัสดุค้ำยึด แต่ถ้าเติมน้ำตาลซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยงจะทำให้การเจริญเติบโตต่ำกว่าการไม่เติมน้ำตาลซูโครส (ภาพที่ 6) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่น้ำตาลซูโครสยับยั้งการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ และการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยยับยั้งการทำงานหรือการสังเคราะห์เอนไซม์ Rubisco หรืออาจเกิดจากการขนถ่ายน้ำตาลออกจากใบไปส่วนต่างๆลดลง ทำให้เกิดการสะสมของคาร์โบไฮเดรตในคลอโรพลาสต์สูง ส่งผลให้ขบวนการสร้าง ribulose bisphosphate (RuBP) เกิดในอัตราที่ต่ำ ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพของขบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเกิดขึ้นได้ไม่เต็มที่ (Azcon-Bieto, 1983; Azcon-Bieto, 1986)

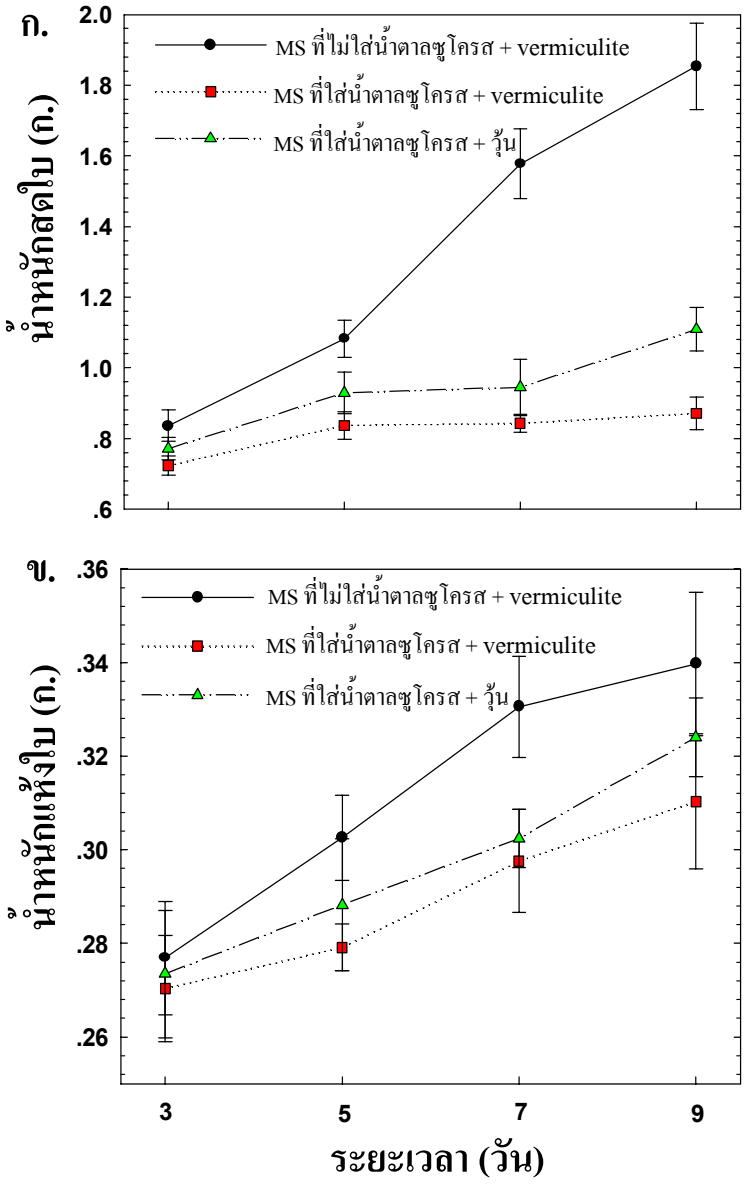
ผลการทดลองนี้คล้ายคลึงกับที่ได้รายงานมาก่อนในการเพาะเลี้ยงไม้ยืนต้น ผัก และไม้ดอกหลายชนิด เช่น ยูคาลิปตัส กาแฟ ผักกาดหอม มันเทศ เยอบีรา ฯลฯ ซึ่งพบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ในสภาพ photoautotrophic และใช้วัสดุค้ำยึดที่โปร่ง ระบายอากาศได้ดีในภาชนะที่ระบายอากาศได้หรือควบคุมให้มีระดับคาร์บอนไดออกไซด์สูง จะให้การเจริญเติบโตสูงกว่าระบบดั้งเดิมที่เป็น photomixotrophic (มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับการสังเคราะห์ด้วยแสง) และใช้วุ้นเป็นวัสดุค้ำยึดในภาชนะปิด (Kozai et al., 1998; Nguyen and Kozai, 1998; Heo and Kozai, 1999) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในระบบดั้งเดิมซึ่งเป็นระบบปิด มีความชื้นสัมพัทธ์สูง มีการแปรผันของความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์สูง และมีการสะสมก๊าซเอทธีลีนและสารพิษอื่น ๆ ทำให้การสังเคราะห์ด้วยแสง การดูดน้ำ อาหาร และคาร์บอนไดออกไซด์ถูกยับยั้ง เป็นผลให้การเจริญเติบโตไม่ดี และต้นอาจมีลักษณะทางสรีระวิทยาและกายภาพผิดปกติ มีปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง มีปากใบที่ทำหน้าที่ผิดปกติ มีปริมาณ wax ลดลง ทำให้มีอัตราการคายน้ำสูงเมื่อย้ายออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกที่มีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ จึงอาจมีการรอดชีวิตต่ำ (Kozai et al., 1997; Zobayed et al., 1999) และพบว่าการใช้วุ้นเป็นวัสดุค้ำยึดอาจยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชเมื่อ

เปรียบเทียบกับการเลี้ยงในอาหารเหลว และอาจให้รากที่มีระบบท่อลำเลียงน้ำและอาหารที่พัฒนาไม่สมบูรณ์ ทำให้ปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมภายนอกได้ไม่ดี (Nguyen and Kozai, 1998) แต่การเพาะเลี้ยงโดยใช้ vermiculite ในภาชนะที่มีช่องระบายอากาศ มีการถ่ายเทแลกเปลี่ยนอากาศ ความชื้นและระดับความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจนรอบ ๆ ลำต้นสะดวกขึ้น ทำให้ความชื้นสัมพัทธ์ในระบบเพาะเลี้ยงลดลง ซึ่งจะกระตุ้นขบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและการคายน้ำให้มากขึ้น ส่งผลให้มีการดูดซึมน้ำและธาตุอาหารเพิ่มมากขึ้น รวมไปถึงกระตุ้นให้มีการสร้าง wax เคลือบที่ใบและปากใบมากขึ้น อีกทั้งยังทำให้พืชมีระบบรากที่แข็งแรง การแตกรากแขนงเพิ่มขึ้น (Aitken-Christie et al., 1995; Kitaya et al., 1997; Nguyen and Kozai, 1998)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพของสูตรอาหาร MS ที่ไม่มีน้ำตาลซูโครส + vermiculite ดีที่สุด ทำให้ต้นข้าวโพดมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วที่สุด เกิดการปนเปื้อนน้อย และโดยเฉพาะความยาวและจำนวนรากที่เพิ่มขึ้น อาจช่วยเพิ่มโอกาสรอดชีวิตของต้นข้าวโพดหลังย้ายปลูกลงดิน ซึ่งเหมาะสมที่จะนำไปเป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโพดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรหรือ callus เพื่อให้มีโอกาสรอดชีวิตหลังย้ายปลูกในสภาพแวดล้อมธรรมชาติมากขึ้นในอนาคต



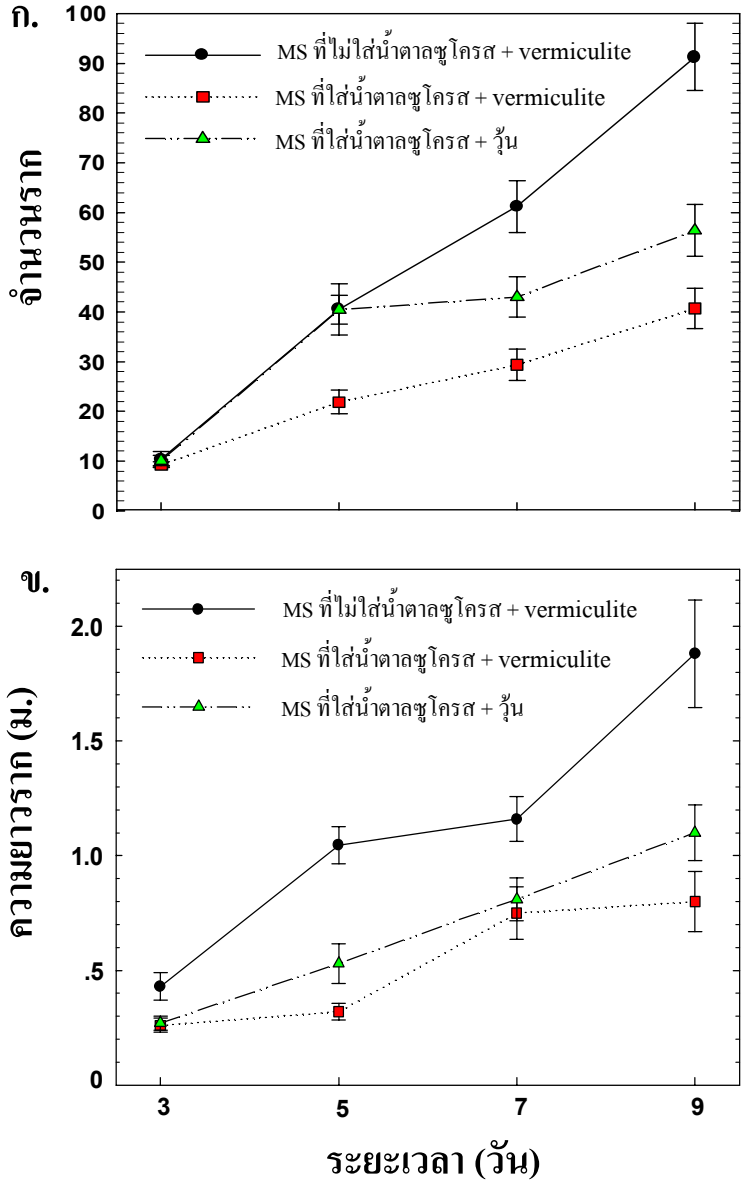
ภาพที่ 4 กราฟแสดงค่าความยาวใบของต้นข้าวโพดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ใส่และไม่ใส่น้ำตาลซูโครส โดยใช้วุ้นและ vermiculite เป็นวัสดุค้ำยึด ต้นในอาหาร MS ที่ไม่ใส่น้ำตาลซูโครสและ vermiculite มีความยาวใบสูงสุด ที่ทุกระยะการเจริญเติบโต



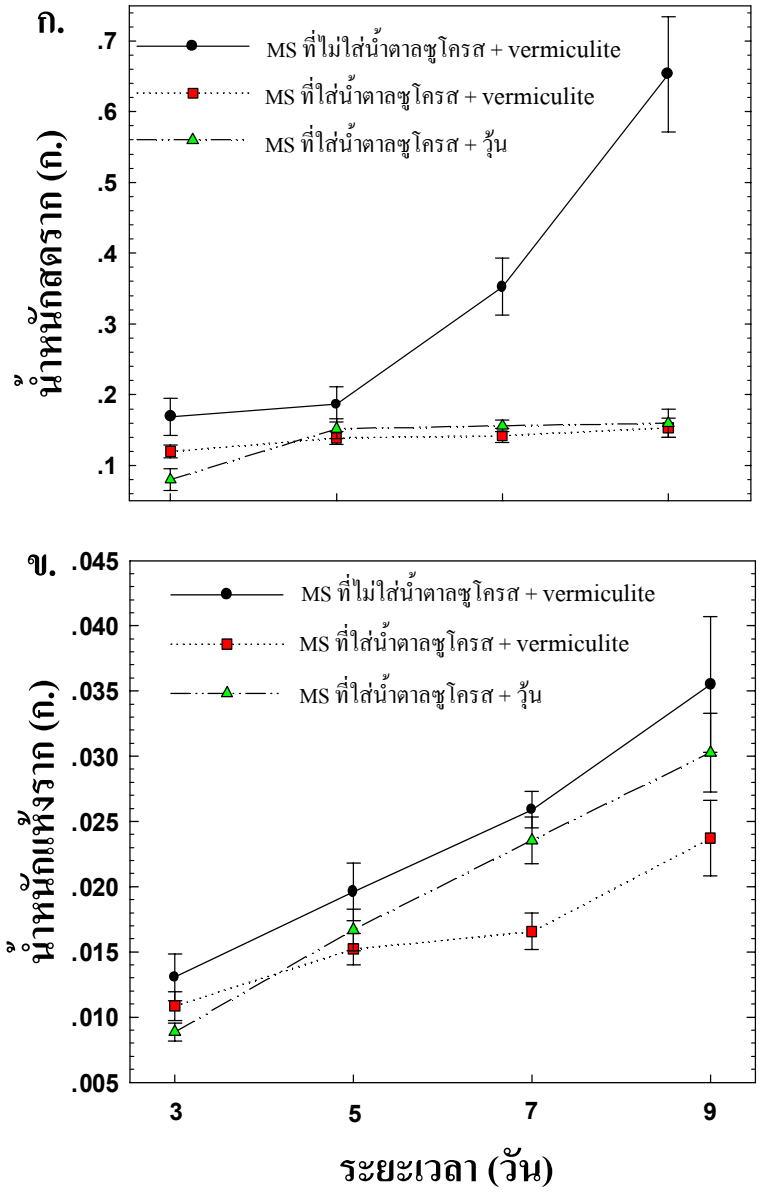
ภาพที่ 5 กราฟแสดงค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งใบของต้นข้าวโพดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ใส่และไม่ใส่น้ำตาลซูโครส โดยใช้วุ้น และ vermiculite เป็นวัสดุค้ำยึด ต้นในอาหาร MS ที่ไม่ใส่น้ำตาลซูโครสและ vermiculite มีน้ำหนักสดของใบ (ก) และน้ำหนักแห้งของใบ (ข) สูงสุด ที่ทุกระยะการเจริญเติบโต

= 6 เซนติเมตร

ภาพที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่างต้นข้าวโพดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ใส่และไม่ใส่น้ำตาลซูโครสโดยใช้วุ้นและ vermiculite เป็นวัสดุค้ำยึดที่ 9



ภาพที่ 7 กราฟแสดงค่าจำนวนและความยาวรากของต้นข้าวโพดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ใส่และไม่ใส่น้ำตาลซูโครส โดยใช้วุ้นและ vermiculite เป็นวัสดุค้ำยึด ต้นในอาหาร MS ที่ไม่ใส่น้ำตาลซูโครสและ vermiculite มีจำนวนรากสูงสุดที่ 7 และ 9 วัน ขณะที่ต้นข้าวโพดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ใส่น้ำตาลซูโครส และใช้วุ้นเป็นวัสดุค้ำยึด มีจำนวนรากสูงกว่า ต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ใส่น้ำตาลซูโครส และใช้ vermiculite เป็นวัสดุค้ำยึด ที่ 5, 7 และ 9 วัน (ก) ความยาวรากของต้นในอาหาร MS ที่ไม่ใส่น้ำตาลซูโครสและ vermiculite มีค่าความยาวรากสูงสุด ที่ทุกระยะการเจริญเติบโต (ข)



ภาพที่ 8 กราฟแสดงค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งรากของต้นข้าวโพดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ใส่และไม่ใส่น้ำตาลซูโครส โดยใช้วุ้น และ vermiculite เป็นวัสดุค้ำยึดต้นในอาหาร MS ที่ไม่ใส่น้ำตาลซูโครสและ vermiculite จะมีน้ำหนักสดของราก (ก) และน้ำหนักแห้งของราก (ข) สูงสุดที่ทุกระยะการเจริญเติบโต

4.2 ผลการทดลองที่ 2 การศึกษาอิทธิพลของวัสดุค้ำยึด (vermiculite และวุ้น [agar]) และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในระดับต่าง ๆ ที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดที่ได้จากการเพาะเลี้ยง zygotic embryo

การศึกษาการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดอายุ 20 วันที่ได้จากการเพาะเลี้ยง zygotic embryo เมื่อทำการเพาะเลี้ยงด้วยวัสดุค้ำยึด 2 ชนิด (vermiculite และวุ้น) และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสระดับต่าง ๆ (0, 12.5 และ 25 กรัม/ลิตร) โดยจัดวิธีที่นิยมใช้คือ การใช้วุ้นร่วมกับน้ำตาลซูโครส 25 กรัม/ลิตร เป็นกรรมวิธีควบคุม พบว่าเมื่อเปรียบเทียบค่า LL ระหว่างวัสดุค้ำยึดทั้งสองชนิด พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ที่ระดับน้ำตาลซูโครสที่ต่างกันพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าการใช้ vermiculite ร่วมกับการใช้อาหาร GM ที่ใส่น้ำตาล 12.5 กรัม/ลิตร จะให้ค่า LL สูงที่สุด ซึ่งให้ค่าสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 1.7 เท่า (ตารางที่ 1; ตารางผนวกที่ 7)

เมื่อเปรียบเทียบค่า LFW และ LDW พบว่า ทั้งค่า LFW และ LDW มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับน้ำตาลซูโครสต่างกัน แต่เฉพาะค่า LFW เท่านั้นที่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวัสดุค้ำยึดทั้งสองชนิด และพบว่าการใช้ vermiculite ร่วมกับการใช้อาหาร GM ที่ใส่น้ำตาลซูโครส 12.5 กรัม/ลิตร จะให้ค่า LFW และ LDW สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยให้ค่าสูงกว่า 2.09 และ 2.05 เท่าตามลำดับ และพบว่าการใช้น้ำตาลซูโครส 25 กรัม/ลิตร เมื่อใช้วัสดุค้ำยึดทั้ง 2 ชนิด จะให้ค่า LFW และ LDW ต่ำที่สุด ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลซูโครสระดับอื่น ๆ (ตารางที่ 1; ตารางผนวกที่ 7)

สำหรับค่า NR ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างวัสดุค้ำยึดทั้งสองชนิด และระหว่างระดับน้ำตาลซูโครสที่ต่างกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากค่าสัมประสิทธ์ของความปรวนแปรของปัจจัยนี้มีค่าสูงมาก (ตารางผนวกที่ 7) อย่างไรก็ตามพบว่าการใช้ vermiculite ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 12.5 กรัม/ลิตร ให้ค่า NR สูงที่สุด โดยสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม อย่างมีนัยสำคัญถึง 7 เท่า (ตารางที่ 2)

สำหรับค่า RL, RFW และ RDW ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างวัสดุค้ำยึดทั้งสองชนิด แต่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างระดับน้ำตาลซูโครสที่ต่างกัน (ตารางผนวกที่ 7) โดยพบว่าการใช้ vermiculite ร่วมกับอาหาร GM ที่ใส่น้ำตาลซูโครส 12.5 กรัม/ลิตร จะให้ค่า RL, RFW และ RDW สูงกว่ากรรมวิธีควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ 5.8, 6.46 และ 4.86 เท่าตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ผลการทดลองนี้แสดงว่าการใช้ vermiculite เป็นวัสดุค้ำยึดร่วมกับการใช้น้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 12.5 กรัม/ลิตร จะให้ค่าบ่งชี้การเจริญเติบโตทั้งหมดสูงที่สุดเมื่อวัดที่ 20 วัน

เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ 1 พบว่าการไม่ใส่น้ำตาลซูโครสร่วมกับการใช้ vermiculite จะให้การเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดสูงที่สุดทุกระยะการเจริญเติบโต (3, 5, 7 และ 9 วัน) ในการเพาะเลี้ยง zygotic embryo ของข้าวโพดนั้น การไม่ใส่น้ำตาลซูโครสร่วมกับการใช้ vermiculite ให้การเจริญเติบโตต่ำกว่าการใส่น้ำตาลซูโครส 12.5 กรัม/ลิตร ร่วมกับการใช้ vermiculite ซึ่งอาจเนื่องมาจากต้นข้าวโพดที่เจริญมาจากเมล็ดจะใช้อาหารที่สะสมในเมล็ดในช่วงแรก ๆ ของการเจริญเติบโต จึงไม่จำเป็นต้องใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่ออาหารที่สะสมในเมล็ดถูกใช้ในการงอกช่วงแรก ๆ จนเกือบหมด ใบข้าวโพดจะสามารถสังเคราะห์ด้วยแสงเพื่อสร้างสารอาหารและพลังงานที่จำเป็นในการเจริญเติบโตได้ ซึ่งพบว่าใบข้าวโพดที่ได้จากการเพาะเมล็ดมีขนาดใหญ่กว่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยง zygotic embryo ซึ่งอาจเนื่องมาจากการใช้เมล็ดข้าวโพดลูกผสมเดี่ยว (ข้าวโพดไร่) ซึ่งมีความแข็งแรงมากกว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยง zygotic embryo ของข้าวโพดหวาน ดังนั้นใบข้าวโพดจากเมล็ดจะสามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ดีกว่าใบข้าวโพดที่ได้จาก zygotic embryo นอกจากนี้ zygotic embryo ที่ใช้มีอาหารสะสมน้อยกว่าเมล็ด จึงอาจจำเป็นต้องใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน (12.5 กรัม/ลิตร)ในการเจริญเติบโต ภาพที่ 9 แสดงต้นข้าวโพดอายุ 20 วัน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง zygotic embryo พบว่า มีใบขนาดเล็กมาก และรากยังไม่มีการเจริญเติบโตมาก เมื่อเปรียบเทียบกับต้นข้าวโพดอายุ 9 วันที่ได้จากการเพาะเมล็ด (ภาพที่ 6) ทำให้การสังเคราะห์ด้วยแสงเกิดขึ้นได้ไม่เต็มที่ ดังนั้นช่วงแรก ๆ หลังย้ายลงในอาหาร GM ต้นข้าวโพดจึงจำเป็นที่จะต้องใช้น้ำตาลซูโครสเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างพลังงาน เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตาม พบว่าการไม่ใช้น้ำตาลซูโครสทำให้ต้นที่ได้เจริญเติบโตได้ดีกว่าการใช้น้ำตาลซูโครส 25 กรัม/ลิตร เช่นเดียวกับการเพาะเมล็ด

จากการทดลองพบว่า ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ 25 กรัม/ลิตร อาจสูงเกินไปและมีผลยับยั้งการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นผลมาจากการที่น้ำตาลยับยั้งการทำงานหรือการสังเคราะห์เอนไซม์ Rubisco หรืออาจเกิดการขนถ่ายน้ำตาลออกจากใบไปส่วนต่าง ๆ ลดลง และการสะสมของคาร์โบไฮเดรตในคลอโรพลาสต์สูง ทำให้ขบวนการสร้าง ribulose bisphosphate (RuBP) เกิดในอัตราที่ต่ำ ทำให้ประสิทธิภาพของขบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเกิดขึ้นได้ไม่เต็มที่ (Azcon-Bieto, 1983; Azcon-Bieto, 1986) และพบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 25 กรัม/ลิตร ทำให้ต้นที่ได้มีลักษณะที่ไม่สมบูรณ์มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสระดับอื่น (ภาพที่ 9 ค และ 9 ฉ) และการใช้วุ้นจะสังเกตเห็นว่าต้นข้าวโพดมีใบแห้งเหี่ยวที่ปลายมากกว่าใน vermiculite (ภาพที่ 9 ฉ) ซึ่งคล้ายกับผลการทดลองที่ 1 และอาจเป็นผลมาจากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพที่มีอากาศถ่ายเทสะดวก ทำให้เกิดการคายน้ำมาก แต่เนื่องจากใบและระบบรากพัฒนาไม่ดี มีจำนวนน้อย จึงทำให้การดูดน้ำไปทดแทนส่วนที่เสียน้ำเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ ทำให้ส่วนที่สูญเสียน้ำไปเกิดการเหี่ยว แห้งและตายในที่สุด และพบว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสระดับเดียวกัน การใช้ vermiculite เป็นวัสดุค้ำยึดให้ค่า LL, LFW,

LDW, NR, RFW และ RDW สูงกว่าการใช้วุ้น (ตารางที่ 1 และ 2; ภาพที่ 9 ก และ 9 ง; ภาพที่ 9 ข และ 9 จ; ภาพที่ 9 ค และ 9 ฉ) ยกเว้นค่า RL พบว่าเมื่อใช้วุ้นร่วมกับน้ำตาลซูโครส 25 กรัม/ลิตร ให้ค่า RL มากกว่าการใช้ vermiculite แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ซึ่งอาจเนื่องจากในอาหารเหลวนั้นเกิดการแพร่ (diffusion) ของสารและน้ำตาลจากบริเวณที่มีความเข้มข้นสูงกว่าไปยังบริเวณที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าจนถึงจุดสมดุลภายในระบบ (สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2537) ทำให้บริเวณรอบ ๆ รากมีสารและน้ำตาลตลอดเวลา ทำให้พืชไม่จำเป็นที่จะสร้างกลไกในการหาอาหารของรากโดยการเพิ่มความยาวรากให้มากขึ้น แต่ในวุ้นจะเกิดการแพร่ของสารและน้ำตาลที่น้อยและช้ากว่าในอาหารเหลว ทำให้พืชต้องสร้างกลไกในการหาอาหารของรากโดยการเพิ่มความยาวรากให้มากขึ้น จะเห็นได้ว่าการใช้ vermiculite มีแนวโน้มที่จะส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดมากกว่าวุ้น เนื่องจาก vermiculite มีความโปร่ง ทำให้การถ่ายเทแลกเปลี่ยนของก๊าซต่าง ๆ ภายใต้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสะดวก ส่งผลให้ความชื้นสัมพัทธ์ในระบบเพาะเลี้ยงลดลง (Aitken-Christie et al., 1995) จึงกระตุ้นขบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและการคายน้ำให้มากขึ้น ส่งผลให้มีการดูดซึมน้ำและธาตุอาหารเพิ่มมากขึ้น (Kitaya et al., 1997) ซึ่งปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้จะส่งผลให้มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าการใช้วุ้นเป็นวัสดุค้ำยึด จากการวิเคราะห์วาเรียนซ์ พบว่าระดับความเข้มข้นของน้ำตาลเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดที่เพาะเลี้ยงจาก zygotic embryo มากกว่าชนิดของวัสดุค้ำยึด (ตารางผนวกที่ 7)

ผลการทดลองที่ 1 และ 2 แสดงถึงศักยภาพในการนำ vermiculite มาใช้เป็นวัสดุค้ำยึดร่วมกับการใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่ำหรือไม่ใช้น้ำตาลซูโครสในการเพาะเลี้ยงต้นข้าวโพดที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดชีวิตหลังย้ายปลูก

ตารางที่ 1 แสดงค่าความยาวใบ น้ำหนักสดใบ และน้ำหนักแห้งใบของต้นข้าวโพดที่ได้จากการเพาะเลี้ยง zygotic embryo เมื่อใช้วัสดุค้ำยึด 2 ชนิด (vermiculite และ วุ้น) และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสระดับต่าง ๆ (0, 12.5 และ 25 กรัม/ลิตร)

วัสดุค้ำยึด	ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส (กรัม/ลิตร)	ความยาวใบ (ซม.)	น้ำหนักสดใบ (ก.)	น้ำหนักแห้งใบ (ก.)
vermiculite	0	8.96[1/] ± 0.83 ab	0.737 ± 0.05 b	0.181 ± 0.01 ab
vermiculite	12.5	9.50 ± 1.04 a	0.844 ± 0.03 a	0.207 ± 0.01 a
vermiculite	25	6.80 ± 1.35 bc	0.486 ± 0.05 d	0.109 ± 0.02 c
วุ้น	0	8.66 ± 0.26 ab	0.640 ± 0.04 c	0.165 ± 0.01 b
วุ้น	12.5	8.96 ± 0.98 ab	0.767 ± 0.03 ab	0.186 ± 0.02 ab
วุ้น (กรรมวิธีควบคุม)	25	5.62 ± 0.56 c	0.404 ± 0.04 d	0.101 ± 0.01 c

[1/] **แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย 5 ซ้ำ ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE)**

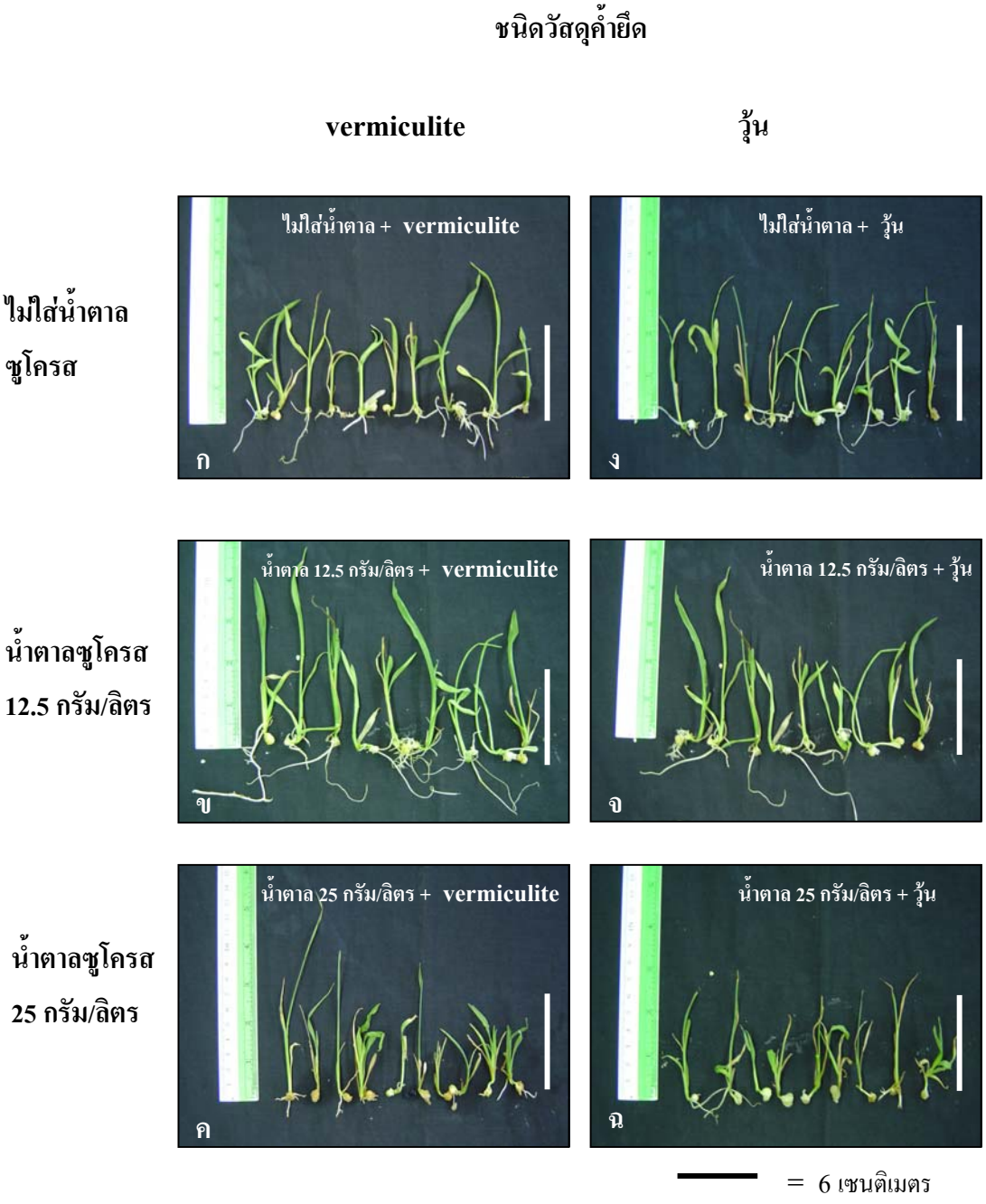
ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยการทดสอบแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ 2 แสดงค่าจำนวนราก ความยาวราก น้ำหนักสดราก และน้ำหนักแห้งรากของต้นข้าวโพดที่ได้จากการเพาะเลี้ยง zygotic embryo เมื่อใช้วัสดุค้ำยึด 2 ชนิด (vermiculite และ วุ้น) และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสระดับต่าง ๆ (0, 12.5 และ 25 กรัม/ลิตร)

วัสดุค้ำยึด	ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส (กรัม/ลิตร)	จำนวนราก	ความยาวราก (ซม.)	น้ำหนักสดราก (ก.)	น้ำหนักแห้งราก (ก.)
vermiculite	0	5.7[1/] ± 2.14 ab	5.9 ± 1.29 ab	0.058 ± 0.01 b	0.016 ± 0 b
vermiculite	12.5	7.0 ± 3.03 a	9.9 ± 3.49 a	0.155 ± 0.01 a	0.034 ± 0 a
vermiculite	25	1.7 ± 0.79 ab	1.0 ± 0.42 b	0.029 ± 0.01 b	0.008 ± 0 b
วุ้น	0	3.3 ± 1.67 ab	4.1 ± 1.57 b	0.049 ± 0.02 b	0.013 ± 0 b
วุ้น	12.5	4.1 ± 3.29 ab	5.8 ± 2.18 ab	0.130 ± 0.06 a	0.033 ± 0.02 a
วุ้น (กรรมวิธีควบคุม)	25	1.0 ± 0.63 b	1.7 ± 1.06 b	0.024 ± 0.01 b	0.007 ± 0 b

[1/] **แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย 5 ซ้ำ ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE)**

ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยการทดสอบแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)



ภาพที่ 9 แสดงลักษณะต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยง zygotic embryo เมื่อใช้ vermiculite (ก, ข และ ค) และ วุ้น (ง, จ และ ฉ) เป็นวัสดุค้ำยึดร่วมกับอาหารที่ไม่ใส่น้ำตาลซูโครส (ก, ง) ใส่น้ำตาลซูโครส 12.5 กรัม/ลิตร (ข, จ) และ ใส่น้ำตาลซูโครส 25 กรัม/ลิตร (ค, ฉ) การใช้ vermiculite และวุ้นร่วมกับการใส่น้ำตาลซูโครส 12.5 กรัม/ลิตร จะให้การเจริญเติบโตที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลซูโครสระดับอื่นๆ และการใส่น้ำตาลซูโครส 25 กรัม/ลิตร จะให้การเจริญเติบโตที่ต่ำที่สุด ใบไม่สมบูรณ์และแห้งเหี่ยว

4.3 การทดลองที่ 3 : การเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มชุดโครโมโซมของโพรนามีด

งานวิจัยนี้ดำเนินการที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตต้น DH ของกรรมวิธีเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรที่ใช้และไม่ใช้ SC ของข้าวโพดจีโนไทป์ต่าง ๆ ซึ่งประกอบด้วยข้าวโพดสายพันธุ์แท้ 5 สายพันธุ์ และลูกผสม 9 คู่ผสม แต่ประสบปัญหาในการผลิตต้น DH จากการขาดความพร้อมด้านแปลงทดลอง ได้แก่ ความเหมาะสมของดินในการปลูกข้าวโพดต่ำ ฯลฯ และด้านห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ปัญหาไฟดับและเครื่องปรับอากาศเสีย ซึ่งเกิดขึ้นอย่างบ่อยครั้งและต่อเนื่อง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องดำเนินการปลูก donor plants และทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเพิ่มเติมที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา

4.3.1 การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.3.1.1 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 8) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้าวโพดสายพันธุ์แท้ทั้ง 5 สายพันธุ์ (Agron 1, Agron 18, Agron 20, Pa 91 และ M 72) พบว่า Pa 91 ให้ค่า EI สูงที่สุดเท่ากับ 1.76 เปอร์เซ็นต์ และ 1.18 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้และไม่ใช้ SC ตามลำดับ รองลงมาคือ M 72 (1.11 เปอร์เซ็นต์ และ 0.70 เปอร์เซ็นต์), Agron 1 (0.98 เปอร์เซ็นต์ และ 0.79 เปอร์เซ็นต์), Agron 18 (0.83 เปอร์เซ็นต์ และ 0.66 เปอร์เซ็นต์) และ Agron 20 (0.80 เปอร์เซ็นต์ และ 0.60 เปอร์เซ็นต์) เมื่อใช้และไม่ใช้ SC ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม EI ของทั้ง 5 สายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 3) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในสภาวะการปลูกเขตร้อนและความอุดมสมบูรณ์ของดินต่ำ สายพันธุ์เขตอบอุ่น Pa 91 และ M 72 มีศักยภาพในการชักนำให้เกิด ELS ไม่แตกต่างจากสายพันธุ์ไทยที่ได้รับการคัดเลือกแล้ว แม้จะมีรายงานว่าสายพันธุ์ Pa 91 และ M 72 เมื่อปลูกในเขตอบอุ่น และเพาะเลี้ยงโดยไม่ใช้ SC ในสภาวะที่ใกล้เคียงสามารถให้ค่า EI สูงถึง 8.7 เปอร์เซ็นต์ และ 40 เปอร์เซ็นต์ 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 ซึ่งอาจเป็นผลมาจากอุณหภูมิต่ำทำให้ microspore พัฒนาอย่างช้า ๆ และมีระยะการพัฒนาที่ใกล้เคียงกัน จึงยืดช่วงเวลาที่ microspore สามารถตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงหรืออุณหภูมิต่ำอาจมีอิทธิพลต่อระดับฮอร์โมนในเนื้อเยื่อ จึงทำให้เกิดการกระตุ้น microspore ก่อนการเพาะเลี้ยง

สำหรับลูกผสมทั้ง 9 คู่ผสม พบว่าลูกผสม Ki 3 x M 24 ให้ค่า EI (3.73 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าพันธุ์อื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อใช้ SC และลูกผสมที่เหลือ ส่วนใหญ่ให้ค่า EI ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าตั้งแต่ 0.48 เปอร์เซ็นต์ ในลูกผสม Agron 41 x W 1 ที่ไม่ใช้ SC ถึง 1.86 เปอร์เซ็นต์ในลูกผสม Agron 1 x Pa 91 ที่ใช้ SC และพบว่าลูกผสม Agron 1 x Pa 91 มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงที่ดีกว่าพ่อแม่โดยให้ค่า EI และการเกิดต้นที่สูงกว่า แม้จะไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อแม่ (ตารางที่ 3) 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 พบว่าถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บนโครโมโซม 1, 2, 3, 6 และ 8 อย่างไรก็ตามเนื่องจากลูกผสม Agron 1 x Pa 91 เมื่อปลูกในแปลงจะมีลักษณะลำต้นใหญ่ ฝักใหญ่ มีความแข็งแรงมาก และอับละอองเกสรมีความสมบูรณ์มากกว่าสายพันธุ์แท้ จึงอาจเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้มีความสามารถในการชักนำให้เกิด ELS สูงกว่าพันธุ์พ่อแม่ เมล็ดที่ได้จากต้น DH ของพันธุ์นี้อาจมียีนที่ควบคุมลักษณะดีเหล่านี้อยู่ด้วย จึงมีศักยภาพที่จะใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ที่ดีในการผลิตลูกผสม ควรมีการทดสอบต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตามลูกผสมบางคู่ผสมให้ค่า EI ที่ต่ำกว่าหรือไม่แตกต่างจากพันธุ์พ่อและแม่ ความปรวนแปรนี้อาจเกิดจากสาเหตุอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ลักษณะพันธุกรรมที่ควบคุมการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยง แต่อาจเกิดจากสภาพแวดล้อม เช่น ลูกผสมดังกล่าวเจริญเติบโตไม่ค่อยดี เนื่องจากสภาพดินไม่ดี ความอุดมสมบูรณ์ต่ำ และการให้น้ำไม่สม่ำเสมอ ในช่วงฤดูหนาวต้นจะโตช้า และพบการระบาดของโรคราสนิม และใบไหม้ และสภาพห้องเพาะเลี้ยงในช่วงนั้นอาจเกิดไฟดับและเครื่องปรับอากาศเสีย ซึ่งสาเหตุต่าง ๆ เหล่านี้จะส่งผลให้ลูกผสมระหว่างข้าวโพดเขตร้อนและเขตอบอุ่นแสดงศักยภาพของพันธุ์ได้ไม่เต็มที่

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างลูกผสมที่เป็น 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 อย่างไรก็ตาม Pa 91 มีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในประเทศไทยไม่ค่อยดี มักมีต้นแคระแกร็น อ่อนแอต่อโรคและแมลง ทำให้ไม่ประสบผลสำเร็จในการใช้เป็น พันธุ์แม่ในลูกผสม Pa 91 x Agron 18 นอกจากนี้พบว่าเมล็ดของลูกผสม Pa 91 x Agron 1 มีขนาดเล็กกว่า และไม่สมบูรณ์เท่า reciprocal cross ซึ่งอาจเป็นเหตุให้ลูกผสม Agron 1 x Pa 91 มีแนวโน้มให้ค่า EI (1.86 เปอร์เซ็นต์ และ 1.83 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าลูกผสม Pa 91 x Agron 1 (0.95 เปอร์เซ็นต์ และ 0.72 เปอร์เซ็นต์) เมื่อใช้และไม่ใช้ SC ตามลำดับ ดังนั้น Pa 91 จึงเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นพันธุ์พ่อ

มากกว่าเป็นพันธุ์แม่สำหรับผลิตพันธุ์ลูกผสมเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรในประเทศไทย (ตารางที่ 3; ตารางผนวกที่ 8)

การใช้ SC ให้ค่า EI แตกต่างจากการไม่ใช้ SC อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 8) การใช้ SC ชักนำให้เกิด ELS เพิ่มขึ้น 2.9 เท่า ($p < 0.05$) ในลูกผสม Ki 3 x M 24 อย่างไรก็ตามการใช้ SC ในพันธุ์อื่น ๆ มีแนวโน้มในการเพิ่มค่า EI แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้ SC และพบว่าการไม่ใช้ และใช้ SC ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS ที่ 2 สัปดาห์เฉลี่ยทั้ง 14 พันธุ์ เท่ากับ 66.64 และ 70.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งระยะเวลาการเกิด ELS อาจแตกต่างกันในแต่ละจีโนไทป์ (ภาพที่ 14 ก และ 14 ข ตามลำดับ) จากการสังเกตลักษณะ ELS ที่เกิดขึ้น พบว่า ELS ส่วนมากมีลักษณะเป็นก้อนขนาดเล็ก มีสีเหลืองใส อมน้ำตาล คุณภาพไม่ดีพอที่จะพัฒนาเป็นต้นได้ แต่จะแบ่งตัวเพิ่มปริมาณไปเรื่อย ๆ โดยไม่พัฒนาไปเป็นใบหรือราก (ภาพที่ 10 ก และ 10 ข) พบว่าการใช้ SC เพิ่มอัตราส่วนการเกิด ELS ขนาดเล็กที่มีจำนวนมากกว่า 1 ELS / อับละอองเกสร (ภาพที่ 10 ค) แต่ ELS ส่วนใหญ่มักไม่สมบูรณ์ (ELS ที่สมบูรณ์ จะมีสีขาวขุ่น เจริญเติบโตขยายขนาดอย่างรวดเร็ว พบเนื้อเยื่อสีเขียวที่จะพัฒนาไปเป็นต้นภายใน 4 สัปดาห์หลังจากย้ายลง RM) (ภาพที่ 10 ง)

ในสูตรอาหาร IM นั้น ได้มีการใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง (9 เปอร์เซ็นต์) L-proline (0.0125 เปอร์เซ็นต์) และผงถ่าน (0.5 เปอร์เซ็นต์) น้ำตาลซูโครสใช้เป็นแหล่งให้พลังงานและรักษาความดันออสโมติก ซึ่งความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่สูงจะมีผลต่อความดันออสโมติก และทำให้เกิดขบวนการ dehydration ส่งผลให้องค์ประกอบภายในละอองเกสรมีความแห้งมากขึ้น ทำให้ง่ายต่อการที่จะกระตุ้นให้มีการพัฒนาไปเป็น embryo ต่อไป (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2538) L-proline ที่ใช้ในอาหารเพาะเลี้ยงจะช่วยกระตุ้นให้ microspore ทนต่อความเย็นในการเพาะเลี้ยงได้ (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 ผงถ่านอัตรา 0.5 เปอร์เซ็นต์ ช่วยให้ระดับการตอบสนองดีขึ้น และยังช่วยดูดซับสารพิษที่ปลดปล่อยออกมาจากผนังอับละอองเกสร เช่น abscisic acid หรือองค์ประกอบของอาหารที่เป็นพิษ และสารพิษที่เกิดจาก matabolism รวมไปถึงสารต่าง ๆ ในวุ้นที่มีผลยับยั้งการพัฒนาของ microspore

4.3.1.2 การเกิดต้น

จากการทดลองทั้งหมดพบการเกิดต้นในกรรมวิธีที่ใช้ SC ของลูกผสม Agron 1 x Pa 91 เพียง 1 ต้น (เป็นต้น 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; H 2 ต้น [ต้นเผือก 1 ต้น]), 1 ต้น (DH) และ 1 ต้น (H) ตาม

ลำดับ (ตารางที่ 3) ต้นทั้งหมดที่ได้ในการทดลองตายในระหว่างการเพาะเลี้ยง เนื่องจากสาเหตุหลายประการ เช่น 1) การปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียที่อยู่ภายในอับละอองเกสร ซึ่งทำให้สูญเสียอับละอองเกสรไปส่วนหนึ่ง หากเป็นไปได้ควรปลูกต้นข้าวโพดในโรงเรือนเพาะชำ ที่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช เพื่อให้ได้ช่อดอกที่สะอาด และไม่มีแมลงพาหะนำโรค อาจทำให้การทดลองประสบผลสำเร็จมากขึ้น 2) เครื่องปรับอากาศเสียและไฟดับบ่อย ๆ ทำให้อุณหภูมิระหว่างการเพาะเลี้ยงสูง (32-34 °ซ) เป็นเหตุให้อับละอองเกสรตายเป็นจำนวนมาก (สังเกตจากอับละอองเกสรเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล) ภายใน 2-3 สัปดาห์หลังย้ายลงอาหาร RM 3) เกิดการควบแน่นของน้ำที่ฝาภาชนะเพาะเลี้ยง ทำให้น้ำบางส่วนไหลไปยังอับละอองเกสร ทำให้อับละอองเกสรตายในที่สุด และเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน

คุณภาพของ ELS นั้นมีความสำคัญต่อการพัฒนาไปเป็นต้นอย่างมาก ซึ่ง ELS ที่มีคุณภาพดีนั้นต้องมาจากต้นที่ให้ช่อดอกที่สมบูรณ์ ซึ่งต้นข้าวโพดที่ปลูกในฟาร์มมหาวิทยาลัย มีการเจริญเติบโตไม่ค่อยดี ต้นไม่สูงและไม่สม่ำเสมอกัน เนื่องจากคุณภาพดินมีความเหมาะสมต่อการปลูกข้าวโพดต่ำ แม้ว่าจะให้ปุ๋ยธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารเสริมอย่างสม่ำเสมอตลอดการเจริญเติบโตก็ตาม นอกจากนี้การให้น้ำก็ไม่สม่ำเสมอ จึงส่งผลให้การเพาะเลี้ยงไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร โดยสังเกตจากเมื่อนำอับละอองเกสรมาส่องหาระยะนิวเคลียสที่เหมาะสมใต้กล้องจุลทรรศน์ พบละอองเกสรที่มีความสมบูรณ์ต่ำ (รูปร่างวงรี บุบ เบี้ยว ขนาดเล็ก และบริเวณผนังเซลล์ด้านนอกของละอองเกสร (exine) มีการเรืองแสงที่น้อยมาก และสีไม่สดใส (สีน้ำตาล เหลืองซีด ฯลฯ) (ภาพที่ 11) ในอัตราส่วนที่สูงมาก (ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่ละอองเกสรที่สามารถพัฒนาเป็น ELS มีรูปร่างกลม ขนาดใหญ่ และผนังเซลล์ด้านนอกมีการเรืองแสงอย่างสดใส (สีแดง เขียว ฯลฯ) (ภาพผนวกที่ 3 ก, 3 ข และ 3 ค) 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) Wassom et al. (2001) ได้ศึกษาปัจจัยของสภาพแวดล้อมและสารเคมีที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงพบว่า การใช้ 10 µM ancymidol และ 50 µM gibberillic acid (GA_3) พ่นช่อดอก 3 วัน ก่อนเก็บช่อดอก ในปี 1996 เกิด ELS 35 และ 12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่ในปี 1997 เกิด ELS 7.8 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อปลูกข้าวโพดให้ได้รับแสง 12 และ 16 ชั่วโมง/วัน ร่วมกับการใช้ 10 µM ancymidol พบว่าการให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิด ELS สูงกว่า การให้ได้รับแสง 12 ชั่วโมง/วัน ถึง 151 เท่า Saisingtong (1998) ได้ศึกษาการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงของ

ข้าวโพดพันธุ์ ETH-M24 เมื่อเก็บช่อดอกในเดือนต่าง ๆ ตั้งแต่ปี 1993-1996 พบว่า ค่าเฉลี่ยการเกิด ELS และ RP/ 100 อับละอองเกสรอยู่ระหว่าง 20-270 และ 3-50 ตามลำดับ และพบว่าพันธุ์ ETH-M24 ที่ปลูกวันเดียวกัน แต่ละช่อมีการเกิด ELS และ RP/100 อับละอองเกสร ตั้งแต่ 0-562.5 และ 0-68.8 ตามลำดับ ซึ่งคล้ายกับผลการทดลองของ Satarova and Chernousova (2002)

จากเหตุผลดังกล่าวจึงจำเป็นต้องไปทำการวิจัยเพิ่มเติมที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ ซึ่งดินมีความเหมาะสมต่อการปลูกข้าวโพดมากกว่าที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จากการวิเคราะห์ดินพบว่า ดินบริเวณแปลงปลูกที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติเป็นดินชุดปากช่องมี pH อยู่ระหว่าง 7-7.5 มี P_2O_5 200 ppm, K_2O 325 ppm และมีอินทรีย์วัตถุ 3.5 เปอร์เซ็นต์ 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 เปอร์เซ็นต์ ดินเหนียว ระบายน้ำไม่ค่อยดี มีรูพรุนต่ำ (ฐิติพร มะชิโกวา, 2546)โดยเลือกใช้พันธุ์ลูกผสมที่ให้ EI สูงที่สุด 3 ลูกผสมคือ Agron 1 x Pa 91, Agron 38 x M 72 และ Agron 43 x M 72 สำหรับเมล็ดพันธุ์ Ki 3 x M 24 ที่ให้ค่า EI สูงสุดเมื่อใช้ SC เสื่อมความงอก จึงไม่สามารถนำมาใช้ทดลองต่อได้

4.3.2 การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ

4.3.2.1 การเกิด ELS

จากการศึกษาพันธุ์ลูกผสมทั้งสามพบว่าลูกผสมที่แตกต่างกันให้ค่า EI แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 9) โดยพบว่าลูกผสม Agron 1 x Pa 91 ให้ค่า EI สูงที่สุดในทั้ง 2 กรรมวิธี (4.40 เปอร์เซ็นต์ และ 3.79 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้และไม่ใช้ SC ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อื่น ๆ และพบว่าค่า EI ของข้าวโพดพันธุ์นี้สูงกว่าข้าวโพดพันธุ์เดียวกันที่ปลูกและทดลองที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีประมาณ 2.2 เท่า (ตารางที่ 3 และ 4)

การใช้ SC ให้ค่า EI แตกต่างจากกรรมวิธีที่ไม่ใช้ SC อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 9) จากการเปรียบเทียบภายในลูกผสมเดียวกันพบว่าลูกผสม Agron 38 x M 72 ในกรรมวิธีที่ใช้ SC ให้ค่า EI เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 1.4 เท่า ส่วนลูกผสมอื่น การใช้ SC มีแนวโน้มในการเพิ่มการเกิด ELS แต่ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้ SC (ตารางที่ 4)

เมื่อส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์พบละอองเกสรที่มีรูปร่างกลม ใหญ่ และมีการเรืองสีที่ขอบผนัง (ภาพผนวกที่ 3)ในอัตราส่วนที่สูงกว่าการทดลองที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ซึ่งส่งผลให้เกิดจำนวน ELS โดยเฉลี่ยมากกว่า จากการสังเกตลักษณะของ ELS พบว่าส่วนมากมีสีขาวขุ่น (มีคุณภาพดี) (ภาพที่ 10 ง) ซึ่งพบการเกิดมากที่สุด

ในช่วง 2 สัปดาห์แรกหลังจากย้ายลงอาหาร RM (5 สัปดาห์หลังเริ่มเพาะเลี้ยง) แล้วจะค่อย ๆ ลดลงในสัปดาห์ที่ 4 และ 6 ตามลำดับ ซึ่งพบว่า การไม่ใช้ และใช้ SC ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS ที่ 2 สัปดาห์เฉลี่ยทั้ง 3 พันธุ์เท่ากับ 70.53 และ 67.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งระยะเวลาในการพัฒนา ELS อาจแตกต่างกันในแต่ละจีโนไทป์ (ภาพที่ 15 ก และ 15 ข ตามลำดับ) ซึ่งคล้ายคลึงกับผลการวิจัยของ Saisingtong (1998) ที่ทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวโพดเขตอบอุ่นโดยวิธีเดียวกัน และไม่ใช้ SC พบการเกิด ELS มากที่ประมาณ 4-5 สัปดาห์หลังเริ่มเพาะเลี้ยง แล้วลดลงเรื่อย ๆ ระยะเวลาในการพัฒนา ELS อาจแตกต่างกันในแต่ละจีโนไทป์

ปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งที่ทำให้ microspore พัฒนาไปเป็น ELS และต้นได้ คือระยะการพัฒนาของ microspore ซึ่งระยะที่เหมาะสมที่สุดคือ ระยะ late-uninucleate ถึง early-binucleate จากการทดลองพบว่าการเก็บเกี่ยวช่อดอกข้าวโพดจากแปลงปลูกก่อนช่อดอกโผล่พ้นใบธงประมาณ 7 วัน ไม่สามารถเก็บเกี่ยวได้พร้อมกัน (ลูกผสมเดียวกันที่ปลูกพร้อมกัน) เนื่องจากการเจริญเติบโตของต้นไม่เท่ากัน และการพัฒนาของดอกในช่อเดียวกันไม่พร้อมกัน บริเวณปลายช่อดอกจะบานก่อน แล้วทยอยบานเรื่อยลงมาที่โคนช่อดอก ทำให้ microspore บริเวณปลายช่อดอกพัฒนาไปก่อนบริเวณโคนช่อดอก แต่การคัดเลือกระยะของ microspore ที่เหมาะสม โดยสุ่มดอกมาตรวจสอบและคัดเลือกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทำได้ล่าช้า เนื่องจากช่อดอกที่เก็บมามีจำนวนมาก ดังนั้นจึงเก็บช่อดอกโดยการประเมินด้วยสายตาและอาศัยความชำนาญเท่านั้น ซึ่งถ้ามีการคัดเลือกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในทุก ๆ ส่วนของช่อดอกข้าวโพดทุกครั้งอาจทำให้ได้ microspore ที่มีระยะการพัฒนาของนิวเคลียสที่เหมาะสมอย่างแท้จริง และอาจทำให้การตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงในทุก ๆ พันธุ์มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

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

4.3.2.2 การเกิดต้น

ลูกผสมที่แตกต่างกันให้ค่าความสามารถในการเกิดต้นต่อ 100 ELS (regeneration ability; RA) และความสามารถในการผลิตต้นต่อ 100 อับละอองเกสร (plant production; PP) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรรมวิธีที่ใช้และไม่ใช้ SC พบว่าไม่มีความแตกต่าง

กันทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 9) ลูกผสม Agron 1 x Pa 91 ให้ค่า RA (8.55 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์) และ PP (0.38 เปอร์เซ็นต์ และ 0.39 เปอร์เซ็นต์) 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 4) ซึ่งอาจเป็นเพราะการใช้ SC ทำให้ได้อับละอองเกสรที่มีมากกว่า 1 ELS (ภาพที่ 10 ค) ในอัตราส่วนที่มากกว่าการไม่ใช้ SC ทำให้ได้ ELS ขนาดเล็กลง อาจทำให้มีคุณภาพไม่ดี หรือเกิดการแย่งอาหารกัน ทำให้แต่ละ ELS ได้รับสารอาหารไม่เพียงพอที่จะพัฒนาต่อไปเป็นต้น ซึ่ง Murigneux et al. (1994) สังเกตพบความสัมพันธ์เชิงลบนี้เช่นเดียวกัน และจากการสังเกตพบว่า ELS ที่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้นั้น ส่วนมากมีขนาดใหญ่ และมีเพียง 1 ELS / อับละอองเกสร นอกจากนี้แนวโน้มลดลงของค่า RA อาจเป็นผลมาจากอุณหภูมิต่ำมาก (2-4 °ซ) ทำให้ศักยภาพในการพัฒนาเป็นต้นลดลง อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาสาเหตุดังกล่าวต่อไป

4.3.2.3 ต้นดับเบิลแฮพลอยด์ (doubled haploid; DH)

ต้นข้าวโพดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เป็นต้น H (n = 10; ภาพที่ 13) และกลุ่มที่เป็นต้น DH (2n = 20; ภาพที่ 12) ทำการแบ่งกลุ่มโดยดูจากการตรวจสอบจำนวนโครโมโซมปลายรากโดยวิธี acetocarmine staining technique ซึ่งวิธีนี้จะมองเห็นโครโมโซมเป็นสีชมพูเข้มถึงแดง (ภาพที่ 12 จ และ 13 ข) เนื่องจากสี acetocarmine ย้อมติดเฉพาะเซลล์ที่กำลังมีชีวิตหรือเซลล์ที่กำลังมีการเจริญเติบโต (กรณีนี้คือโครโมโซม) ในช่วงแรก ๆ ของการตรวจสอบจำนวนโครโมโซมมีปัญหาค่อนข้างมาก เนื่องจากในขั้นตอนการเตรียมสไลด์จะต้องมีการเคาะแผ่น สไลด์เบา ๆ ให้โครโมโซมออกมาจากเซลล์ราก เพื่อสะดวกในการนับจำนวนโครโมโซม ซึ่งในช่วงแรก ๆ ผู้ทดลองยังไม่ทราบว่าต้องใช้แรงเคาะแผ่นสไลด์มากน้อยเพียงใด ทำให้การนับจำนวนโครโมโซมค่อนข้างลำบาก เนื่องจากถ้าออกแรงเคาะมากไปจะทำให้โครโมโซมขาดเป็นชิ้น ๆ และไม่ทราบว่าโครโมโซมที่เห็นมาจากกี่เซลล์ และถ้าออกแรงน้อยไปโครโมโซมก็จะไม่แตกกระจายออกมาจากเซลล์ ดังนั้นเทคนิคสำคัญที่จะมองเห็นโครโมโซมชัดที่สุดและโครโมโซมไม่แตกกระจายจนเกินไป โดยใช้ยางลบที่ปลายด้ามดินสอเคาะเบา ๆ ประมาณ 4 - 5 ครั้ง ให้เนื้อเยื่อรากแบนราบแนบแผ่นสไลด์แล้วหยุด และควรเคาะขณะที่สไลด์กำลังร้อนเพื่อให้เซลล์แตกได้ง่ายขึ้น โดยในการตรวจนับโครโมโซมทำการตรวจนับ 3 ครั้ง บริเวณแผ่นสไลด์เพื่อความแน่ใจว่าเป็นพืช H หรือ DH

นับจำนวนต้น DH ที่ได้ 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 แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง

การใช้และไม่ใช้ SC พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 10) ลูกผสม Agron 1 x Pa 91 ให้ค่า DPP (0.13 เปอร์เซ็นต์ และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ 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 5)

สำหรับค่า DRA และ DI ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างลูกผสมและระหว่างกรรมวิธี ซึ่งอาจเป็นผลมาจากค่าสัมประสิทธิ์ของความปรวนแปรของทั้ง 2 ปัจจัยนี้มีค่าสูงมาก (ตารางผนวกที่ 10) อย่างไรก็ตาม การใช้ SC มีแนวโน้มในการให้ค่า DRA และ DI สูงกว่าการไม่ใช้ โดยให้ค่า DI สูงกว่าการไม่ใช้ SC ประมาณ 1.65 เท่า ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก SC สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีการแบ่งตัวแบบ mitosis ในระยะที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เพิ่มชุดโครโมโซมโดยใช้โพรนามีด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rotarenco (2000) ซึ่งพบว่าการใช้โคลชิซิน 0.02 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ SC (2-4 ^{o}ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง) สามารถผลิตต้น DH ได้ 12.7 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การไม่ใช้ SC ไม่สามารถผลิตต้น DH ได้เลย

4.3.2.4 การรอดชีวิต

ปัญหาสำคัญที่พบในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรคือ ต้นตายในระหว่างการเพาะเลี้ยงและย้ายปลูก พบว่าต้นข้าวโพดที่ได้ส่วนใหญ่มักตายช่วงที่อยู่ในอาหาร GM เช่น พบว่า 19 ใน 21 ต้นของลูกผสม Agron 38 x M 72 ตายในอาหาร GM และ ลูกผสม Agron 1 x Pa 91 ให้เปอร์เซ็นต์ต้นตายในระหว่างการเพาะเลี้ยง (death in culture; DC) ต่ำสุดเท่ากับ 59.25 เปอร์เซ็นต์ และ 50.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้และไม่ใช้ SC ตามลำดับ (ตารางที่ 6) การตายมีหลายลักษณะ เช่น ต้นซีดเหลือง ใบแห้ง ลำต้นลีบ ต้นไม่เจริญเติบโต และการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากต้นมีการพัฒนาระบบรากที่ไม่ดี รากน้อยและสั้น เปราะบาง ทำให้ระบบรากทำงานได้ไม่ดีหลังจากย้ายออกปลูก และจากการตรวจสอบขนาดและจำนวนปากใบของต้น DH และ H ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงพบว่าต้นข้าวโพด DH มีขนาดปากใบใหญ่กว่าต้นข้าวโพด H โดยมีขนาดปากใบเฉลี่ย 40.80 และ 28.62 ไมครอน ตามลำดับ (ภาพที่ 12 ฉ และ 13 ค; ตารางที่ 9 และ 10 ตามลำดับ) จึงอาจใช้ขนาดปากใบเป็นตัวบ่งชี้จำนวนชุดโครโมโซมเบื้องต้นแทนการนับจำนวนโครโมโซม ซึ่งวิธีการนี้ใช้เวลาและค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการย้อมสีโครโมโซม และเป็นวิธีการที่ใช้ในการจำแนกพืชที่เป็น tetraploid และ diploid ในพืชหลายชนิด เช่น *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) และ *Cymbidium kanran* (Kim et al., 1997, Vilhar et al., 2002) นอกจากนี้พบว่าต้นข้าวโพด DH มีจำนวนปากใบน้อยกว่าต้นข้าวโพด Hโดยมีจำนวนปากใบเฉลี่ยต่อพื้นที่เท่ากับ 61.83 และ 74.23 ต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 12 ฉ และ 13 ค; ตารางที่ 9 และ 10 ตามลำดับ) ดังนั้นสาเหตุอีกประการหนึ่งที่อาจทำให้ต้นข้าวโพด H ที่ได้ตายในระหว่างเพาะเลี้ยงและหลังย้ายปลูกลงดินเป็นจำนวนมาก คือการมีปากใบขนาดเล็กและทำงานได้

ไม่เต็มที่ ต้นเหล่านี้จึงไม่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงที่มีการเจาะรูระบายอากาศและสภาพภายนอกได้ดีเท่าที่ควร ถึงแม้จะมีการทำ hardening โดยการนำต้นที่ได้ไปใส่ในสารละลายธาตุอาหาร Hoagland และครอบด้วยขวดพลาสติกใสเจาะรูเพื่อช่วยลดการคายน้ำ เป็นเวลา 7 วัน ก่อนย้ายลงกระถางดินในโรงเรือนทดลอง ซึ่งเป็นกรรมวิธีที่ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุดจากการทดลองของ ประภา ศรีพิจิตต์ และคณะ (2542) ลูกผสม Agron 1 x Pa 91 ให้เปอร์เซ็นต์ต้นที่รอดชีวิตต่อต้นที่ชักนำได้ (Survivability; S) สูงที่สุด (25.93 เปอร์เซ็นต์ และ 28.57 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ ลูกผสม Agron 43 x M 72 (14.29 เปอร์เซ็นต์ และ 12.5 เปอร์เซ็นต์) เมื่อใช้และไม่ใช้ SC ตามลำดับ ส่วนลูกผสม Agron 38 x M 72 ไม่พบต้นรอดชีวิต (ตารางที่ 6) อย่างไรก็ตาม ข้อมูลที่ได้อาจไม่เที่ยงตรงเท่าที่ควร เนื่องจากจำนวนต้นที่ได้ในแต่ละกรรมวิธีมีจำนวนน้อย

การตายของต้นเมื่อย้ายปลูกลงดินในโรงเรือนทดลอง อาจเนื่องมาจากว่าต้นพืชนั้นอยู่ในสภาพห้องเพาะเลี้ยงมาเป็นเวลานาน เมื่อนำมาปลูกในโรงเรือนทดลองจึงทำให้ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมภายนอกที่อุณหภูมิเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาไม่ได้ และตายในที่สุด เหตุผลอีกประการหนึ่งอาจเป็นเพราะ ต้น DH ที่ได้มีลักษณะเป็น โฮโมไซกัส ทำให้ต้นข้าวโพดเกิด inbreeding depression อย่างมาก จนไม่สามารถอยู่รอด หรือมีความอุดมสมบูรณ์ในการพัฒนาฝักและช่อดอกตัวผู้ได้

การเพาะเลี้ยงมักประสบปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียจำนวนมากที่อยู่ภายในอับละอองเกสร โดยสังเกตจากเชื้อแบคทีเรียเริ่มเกิดบริเวณรอบอับละอองเกสร แล้วลุกลามทั่วทั้งจานเพาะเลี้ยง ซึ่งทำให้สูญเสียอับละอองเกสรไปเป็นจำนวนมาก

4.3.2.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นที่รอดชีวิต

ต้นข้าวโพดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรในครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เป็นต้น H (n = 10) และกลุ่มที่เป็นต้น DH (2n = 20) ทำการแบ่งกลุ่มโดยการตรวจนับจำนวนโครโมโซมปลายราก 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 7) ต้น DH ที่ได้มีความสูงเฉลี่ย 59.33 ซม. ซึ่งเป็นความสูงเพียง 1 ใน 3 ของข้าวโพดเขตร้อนปกติ ความสูงเฉลี่ยของฝักวัดจากผิวดิน 26.93 ซม. วันแตกอับละอองเกสร (ภาพที่ 12 ค) เฉลี่ยประมาณ 55 วันหลังการย้ายปลูกลงดิน วันออกไหม (ภาพที่12 ง) เฉลี่ยประมาณ 64 วัน จำนวนใบเฉลี่ยประมาณ 9 ใบ ขนาดใบกว้างกว่าต้น H เล็กน้อย (สังเกตจากสายตา) และขนาดเส้นรอบวงของลำต้นโดยเฉลี่ย 4.14 ซม. (ตารางที่ 7; ภาพที่ 12 ก) และสังเกตเห็นการเกิดเมล็ดบนช่อดอกตัวผู้ (tassel seed; ภาพที่ 12 ข) จำนวน 2 ต้น ไม่มีฝักจำนวน 1 ต้น ฝักไม่มี

ไหมจำนวน 1 ต้น และแตกละอองเกสรก่อนออกไหม จึงไม่สามารถผสมตัวเองได้ จำนวน 3 ต้น จึงทำการผสมข้ามในพันธุ์เดียวกัน (sib-mating) โดยทั่วไปต้นที่รอดชีวิตจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรส่วนใหญ่มีอาการผิดปกติเช่นเดียวกันนี้ (ชะบา จำปาทอง และ คณะ, 2537; ประภา ศรีพิจิตต์ และคณะ, 2542; Petolino and Jones, 1986; Genovesi, 1990; Saisingtong, 1998) จากการทดลองของ Wan et al. (1989) พบว่าต้น DH ที่ได้ทั้งหมด 29 ต้นไม่สามารถผสมตัวเองได้ เนื่องจากวันแตกอับละอองเกสรและวันออกไหมห่างกันมาก (asynchronous) และบางต้นฝักไม่พัฒนาและต้นแคระแกร็น Petolino and Jones (1986) สามารถชักนำต้นข้าวโพดจาก callus ได้ทั้งสิ้น 107 ต้น และพบว่าต้นส่วนมากมีลักษณะผิดปกติ คือ วันแตกอับละอองเกสรและวันออกไหมห่างกันมากจนไม่สามารถทำการผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ดได้ และสามารถได้ฝักจากการผสมตัวเองเพียง 15 ต้นเท่านั้น Saisingtong (1998) สามารถชักนำต้นข้าวโพดได้ทั้งสิ้น 59 ต้น พบว่าต้นส่วนมากมีวันแตกอับละอองเกสรและวันออกไหมห่างกันมากจนไม่สามารถทำการผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ดได้ และสามารถได้ฝักจากการผสมตัวเองเพียง 15 ต้นเท่านั้น

สำหรับต้นปกติที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ (fertile) จำนวน 2 ต้น ทำการผสมตัวเอง (ภาพผนวกที่ 2 ฌ) อย่างไรก็ตามเมล็ดที่ได้ไม่สามารถพัฒนาจนเป็นเมล็ดที่สุกแก่สมบูรณ์และมีชีวิตได้

จากการทดลองนี้ได้ต้น 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. จะเห็นได้ว่าต้น H มีความสูงต้นและขนาดเส้นรอบวงลำต้นต่ำกว่าต้น DH (ตารางที่ 7 และ 8; ภาพที่ 13 ก) แสดงให้เห็นว่าต้น H มีการเจริญเติบโตและความแข็งแรงต่ำกว่าต้น DH และต้น H ที่ได้ไม่มีละอองเกสร บางต้นให้ละอองเกสรน้อยมากต้องเอามือขยี้อับละอองถึงจะเห็นละอองเกสร บางต้นไม่มีการบานของดอกตัวผู้ตามธรรมชาติ และบางต้นพบอับละอองเกสรเหี่ยวไม่มีละอองเกสร เช่นเดียวกันนี้ Wan et al. (1989) พบว่าต้น H ไม่มีละอองเกสรหรือมีน้อยมาก ต้นมีขนาดเล็ก ใบแคบ และความแข็งแรงต่ำกว่าต้น DH

ตารางที่ 3 ความสามารถในการชักนำให้เกิด ELS จำนวนต้นที่ชักนำได้ และค่าดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซม ของข้าวโพดจีโนไทป์ต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกรรมวิธีที่ใช้และไม่ใช้ SC ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

พันธุ์	กรรมวิธี	จำนวนอับละอองเกสร	การชักนำให้เกิด ELS (%)	จำนวนต้นที่ได้จากการชักนำ	ดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซม
Agron 1	Pronamide	5,100	0.79[1/] ± 0.16 bc		
	Pronamide + SC	6,180	0.98 ± 0.43 bc		
Agron 18	Pronamide	5,430	0.66 ± 0.14 bc		
	Pronamide + SC	3,870	0.83 ± 0.10 bc		
Agron 20	Pronamide	3,930	0.60 ± 0.10 bc		
	Pronamide + SC	3,060	0.80 ± 0.09 bc		
Pa 91	Pronamide	5,430	1.18 ± 0.18 bc		
	Pronamide + SC	5,970	1.76 ± 0.26 b		
M 72	Pronamide	1,380	0.70 ± 0.42 bc		
	Pronamide + SC	1,320	1.11 ± 0.39 bc		

[1/] **แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย 4 ซ้ำ ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE)**

(มีต่อหน้า 66)

ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยการทดสอบแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ลูกผสม	กรรมวิธี	จำนวน อับละอองเกสร	การชักนำให้เกิด ELS (%)	จำนวนต้นที่ ได้จากการ ชักนำ	ดัชนีการ เพิ่มชุด โครโมโซม
Agron 1 x Pa 91	Pronamide	5,730	1.83[1/] ± 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		
	Pronamide + SC	1,200	1.22 ± 0.19 bc		
Agron 20 x Pa 91	Pronamide	3,600	0.62 ± 0.05 bc		
	Pronamide + SC	3,030	0.71 ± 0.08 bc		
Pa 91 x Agron 1	Pronamide	1,260	0.72 ± 0.01 bc		
	Pronamide + SC	1,290	0.95 ± 0.32 bc		
Pa 91 x Agron 20	Pronamide	1,200	0.60 ± 0.10 bc		
	Pronamide + SC	1,320	0.69 ± 0.35 bc		
Agron 38 x M 72	Pronamide	2,790	0.73 ± 0.12 bc		
	Pronamide + SC	2,730	0.97 ± 0.24 bc		
Agron 43 x M 72	Pronamide	3,540	1.47 ± 0.36 bc	1	1
	Pronamide + SC	3,300	1.79 ± 0.30 b		
Agron 41 x W 1	Pronamide	1,320	0.48 ± 0.09 c		
	Pronamide + SC	1,350	0.71 ± 0.10 bc		
Ki 3 x M 24	Pronamide	1,830	1.30 ± 0.60 bc	1	0
	Pronamide + SC	1,260	3.73 ± 0.85 a		

[1/] **แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย 4 ซ้ำ ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE)**

ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยการทดสอบแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ 4 ความสามารถในการชักนำให้เกิด ELS ในการเกิดต้น และในการผลิตต้นของข้าวโพดลูกผสมเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกรรมวิธีที่ใช้และไม่ใช้ SC ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ

ลูกผสม	กรรมวิธี	จำนวนอับละอองเกสร	การชักนำให้เกิด ELS (%)	การเกิดต้น (%)	การผลิตต้น (%)	จำนวนต้นที่ได้จากการชักนำ
Agron1 x Pa 91	Pro	7,200	3.79[1/] ± 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
Agron 38 x M 72	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

[1/] แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย 4 ซ้ำ ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE)

ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยการทดสอบแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ 5 ความสามารถในการผลิตต้น DH ในการเกิดต้น DH และค่าดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซมของข้าวโพดลูกผสมเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกรรมวิธีที่ใช้และไม่ใช้ SC ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ

ลูกผสม	กรรมวิธี	จำนวนอับละอองเกสร	จำนวนต้นที่ได้จากการชักนำ	การผลิตต้น DH (%)	การเกิดต้น DH (%)	ดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซม
Agron 1 x Pa 91	Pro	7,200	28	0.10 [1/] ± 0.04 ab	2.40 ± 0.83 a	0.23 ± 0.05 a
	Pro+SC	7,200	27	0.13 ± 0.01 a	2.90 ± 0.42 a	0.34 ± 0.06 a
Agron 38 x M 72	Pro	7,200	11	0.045 ± 0.01 ab	1.40 ± 0.51 a	0.25 ± 0.08 a
	Pro+SC	7,200	10	0.045 ± 0.00 ab	1.52 ± 0.11 a	0.52 ± 0.17 a
Agron 43 x M 72	Pro	7,200	8	0.03 ± 0.02 b	1.09 ± 0.63 a	0.21 ± 0.13 a
	Pro+SC	7,200	7	0.04 ± 0.03 b	1.44 ± 0.92 a	0.29 ± 0.17 a

[1/] แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย 4 ซ้ำ ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE)

ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยการทดสอบแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การตายในระหว่างการเพาะเลี้ยงและหลังจากย้ายปลูกลงดิน และเปอร์เซ็นต์ต้นที่รอดชีวิตต่อต้นที่ชักนำได้ของข้าวโพดลูกผสม เมื่อเพาะเลี้ยง ด้วยกรรมวิธีที่ใช้และไม่ใช้ SC ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ

ลูกผสม	กรรมวิธี	จำนวนต้นที่ชักนำได้	การตายในระหว่างเพาะเลี้ยง (%)	จำนวนต้นที่ย้ายปลูกลงดิน	การตายภายหลังย้ายปลูกลงดิน (%)	จำนวนต้นที่รอดชีวิต	ต้นที่รอดต่อต้นที่ชักนำได้ (%)	จำนวนต้น DH	จำนวนต้น H
Agron 1 x Pa 91	Pro	28	50.00	14	21.43	8	28.57	3	5
	Pro+SC	27	59.25	11	14.81	7	25.93	5	2
Agron 38 x M 72	Pro	11	81.82	2	18.18	0	0	-	-
	Pro+SC	10	100.00	0	-	0	0	-	-
Agron 43 x M 72	Pro	8	62.50	3	25.00	1	12.50	-	1
	Pro+SC	7	71.43	2	14.29	1	14.29	1	-

ตารางที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นข้าวโพด DH ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

ลูกผสม	กรรมวิธี	ความสูงต้น (ซม.)	ความสูงฝัก (ซม.)	วันแตกอับละอองเกสร (หลังย้ายออกปลูกลงดิน)	วันออกไหม	จำนวนใบ	เส้นรอบวงลำต้น (ซม.)	หมายเหตุ
Agron 1 x Pa 91	Pro+SC	50.0	8.0	50	65	8	2.9	อับละอองเกสรแตกก่อนออกไหม
Agron 1 x Pa 91	Pro+SC	60.0	18.0	50	65	9	3.5	อับละอองเกสรแตกก่อนออกไหม
Agron 1 x Pa 91	Pro+SC	80.0	40.0	67	71	12	5.4	ต้นปกติ มีละอองเกสรมาก
Agron 1 x Pa 91	Pro+SC	45.0	NSE[1/]	49	-	8	3.9	มีละอองเกสรน้อย ฝักไม่มีไหม
Agron 1 x Pa 91	Pro+SC	45.0	45.0	54	55	5	4.9	tassel seed [3/]
Agron 1 x Pa 91	Pro	80.0	NE[2/]	51	-	9	3.1	ไม่มีฝัก
Agron 1 x Pa 91	Pro	75.0	23.0	55	66	9	4.3	ต้นปกติ
Agron 1 x Pa 91	Pro	42.0	42.0	63	65	7	4.0	tassel seed
Agron 43 x M 72	Pro+SC	57.0	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 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นข้าวโพด H ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

ลูกผสม	กรรมวิธี	ความสูงต้น (ซม.)	ความสูงฝัก (ซม.)	วันแตกอับละอองเกสร (หลังย้ายออกปลูก)	วันออกไหม	จำนวนใบ	เส้นรอบวงลำต้น (ซม.)	หมายเหตุ
Agron 1 x Pa 91	Pro	63.0	5.0	46	56	6	2.0	ไหมสั้นมาก ไม่มีละอองเกสร อับละอองเกสรเหี่ยว
Agron 1 x Pa 91	Pro	87.0	15.0	60	69	9	3.3	ไหมสั้นมาก ไม่มีละอองเกสร อับละอองเกสรเหี่ยว
Agron 1 x Pa 91	Pro	40.0	NE [2/]	-	-	6	3.0	อับละอองเกสรไม่แตก
Agron 1 x Pa 91	Pro	60.0	30.0	-	62	11	4.6	ไหมสั้นมาก ละอองเกสรน้อยมาก
Agron 1 x Pa 91	Pro	40.0	NSE [1/]	-	-	7	2.9	ฝักไม่มีไหม ไม่มีละอองเกสร
Agron 1 x Pa 91	Pro+SC	40.0	NE	-	-	7	2.6	ดอกตัวผู้เป็นหมันและไม่บาน ไม่มีละอองเกสร
Agron 1 x Pa 91	Pro+SC	45.0	NE	65	-	8	3.3	ไม่มีฝัก
Agron 43 x M 72	Pro	42.0	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)**

ตารางที่ 9 แสดงขนาดและจำนวนปากใบของต้น DH ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

ลูกผสม	กรรมวิธี	ขนาดปากใบ (ไมครอน)	จำนวนปากใบ / ตร.ซม.
Agron 1 x Pa 91	Pro+SC	41.66[1/]	58.82[2/]
Agron 1 x Pa 91	Pro+SC	46.97	51.81
Agron 1 x Pa 91	Pro+SC	37.62	78.45
Agron 1 x Pa 91	Pro	36.11	65.84
Agron 1 x Pa 91	Pro	41.41	49.03
Agron 1 x Pa 91	Pro	41.41	63.03
Agron 1 x Pa 91	Pro	40.40	65.84
เฉลี่ย		40.80	61.83

[1/] แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย 10 ซ้ำ

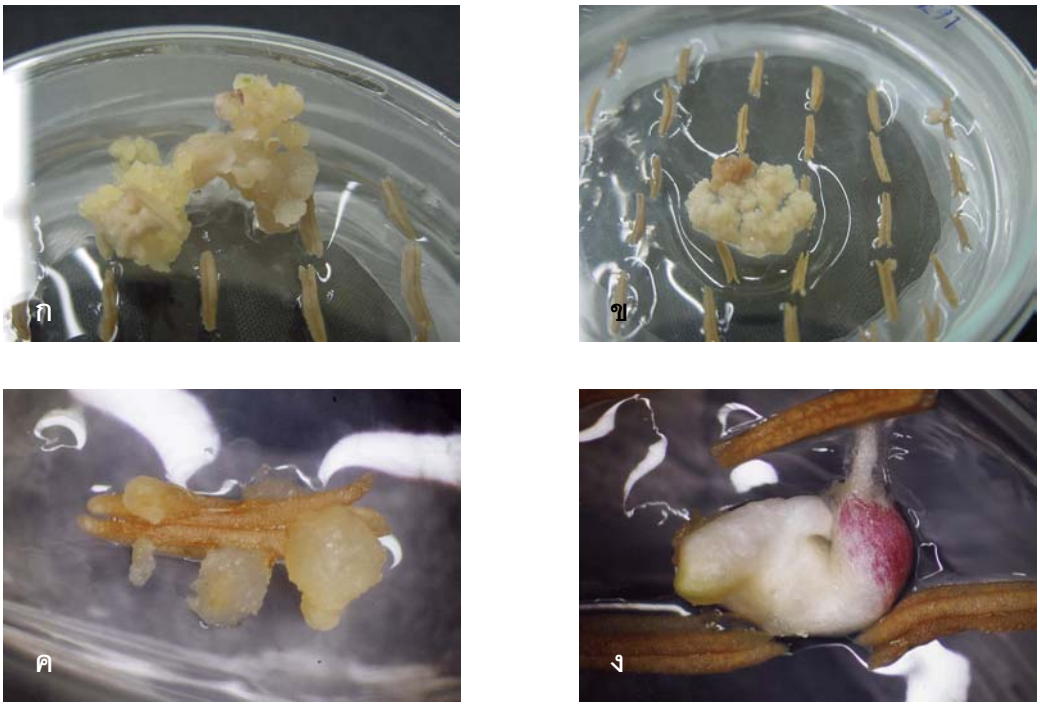
[2/] แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

ตารางที่ 10 แสดงขนาดและจำนวนปากใบของต้น H ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

ลูกผสม	กรรมวิธี	ขนาดปากใบ (ไมครอน)	จำนวนปากใบ / ตร.ซม.
Agron 1 x Pa 91	Pro	28.03[1/]	78.45[2/]
Agron 1 x Pa 91	Pro	29.04	72.82
Agron 1 x Pa 91	Pro+SC	28.79	71.43
เฉลี่ย		28.62	74.23

[1/] แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย 10 ซ้ำ

[2/] แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ



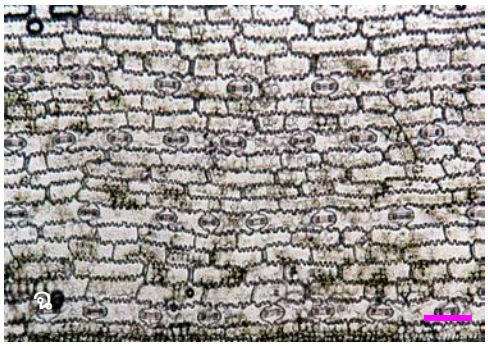
ภาพที่ 10 แสดงลักษณะ ELS ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

ก. ลักษณะ ELS ที่ไม่สมบูรณ์ ข. ลักษณะ ELS ที่ไม่สมบูรณ์

ค. ลักษณะอับละอองเกสรที่เกิดมากกว่า 1 ELS ง. ลักษณะ ELS ที่สมบูรณ์

= 30 ไมครอน

ภาพที่ 11 เปรียบเทียบลักษณะ microspore ที่สมบูรณ์ (ใหญ่) และไม่สมบูรณ์



= 2 ไมครอน = 57 ไมครอน

ภาพที่ 12 แสดงลักษณะต้น จำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายราก และลักษณะปากใบของต้นข้าวโพด DH

. ลักษณะของต้นข้าวโพด DH

. ลักษณะต้นข้าวโพดที่เกิด tassel seed

. การแตกของอับละอองเกสรของต้นข้าวโพด DH

. ลักษณะการเกิดไหมของต้นข้าวโพด DH

. จำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายรากจากต้นข้าวโพด DH (2n = 20)

. ลักษณะปากใบของต้นข้าวโพด DH

= 2 ไมครอน

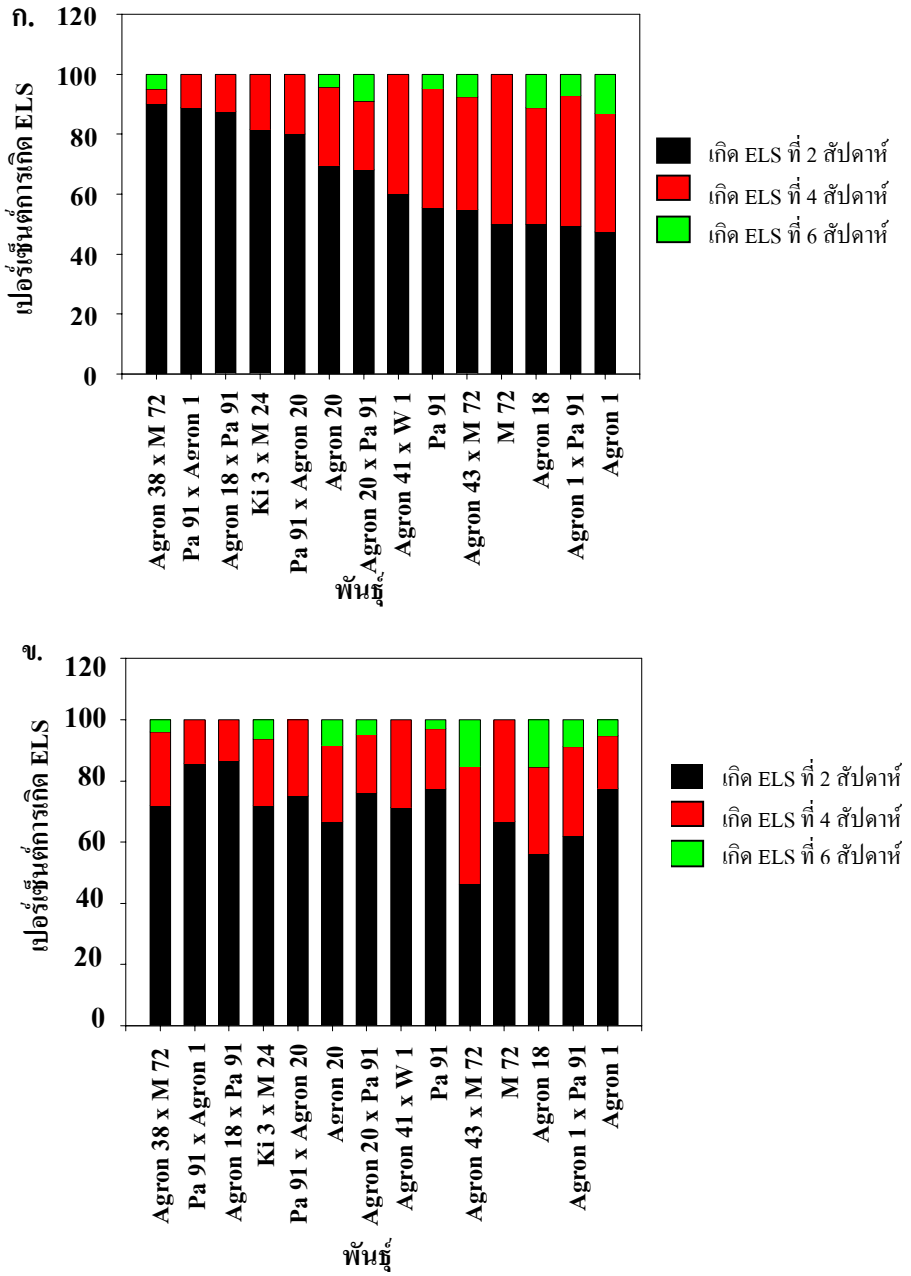
= 57 ไมครอน

ภาพที่ 13 แสดงลักษณะต้น จำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายราก และลักษณะปากใบของต้นข้าวโพด H

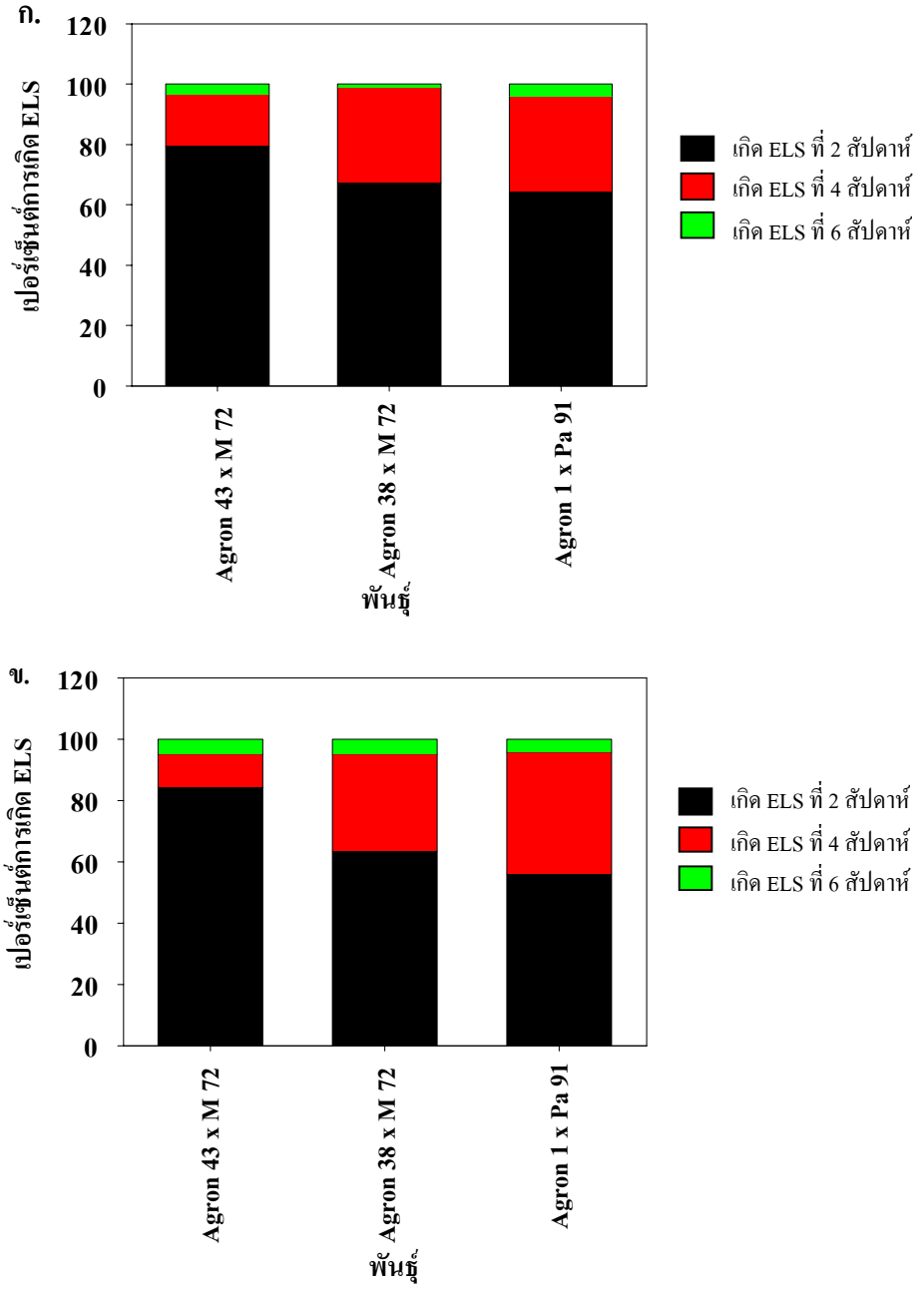
. ลักษณะของต้นข้าวโพด H

. จำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายรากจากต้นข้าวโพด H (n = 10)

. ลักษณะปากใบของต้นข้าวโพด H



ภาพที่ 14 ระยะเวลาการเกิด ELS ของข้าวโพดพันธุ์ต่าง ๆ ในกรรมวิธีที่ใช้โพรนามีดร่วมกับการไม่ใช้ SC (ก) และ การใช้ SC (ข) ณ มหาวิทยาเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 15 ระยะเวลาการเกิด ELS ของข้าวโพดลูกผสมต่าง ๆ ในกรรมวิธีที่ใช้โพรนามีดร่วมกับการไม่ใช้ SC (ก) และ การใช้ SC (ข) ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงต้นข้าวโพดภายใต้สภาพ photoautotrophic (การไม่ใช้น้ำตาลซูโครสในอาหาร) ส่งผลให้ต้นข้าวโพดมีการเจริญเติบโตและมีลักษณะที่สมบูรณ์ที่สุด โดยพบว่า ที่ระยะการเจริญเติบโต 9 วัน ให้ค่า LL, LFW, LDW, NR, RL, RFW และ RDW สูงกว่า กรรมวิธีควบคุม 1.5, 1.7, 1.05, 1.6, 1.7, 4.1 และ 1.2 เท่า ตามลำดับ
2. การเพาะเลี้ยง zygotic embryo ข้าวโพด เมื่อใช้ vermiculite ร่วมกับอาหาร GM ที่ใส่น้ำตาลซูโครส 12.5 กรัม/ลิตร จะส่งผลให้ต้นข้าวโพดมีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด ซึ่งให้ค่า LL, LFW, FDW, NR, RL, RFW และ RDW สูงกว่าการใช้วุ้นร่วมกับอาหาร GM ที่ใส่น้ำตาลซูโครส 25 กรัม/ลิตร (กรรมวิธีควบคุม) 1.70, 2.09, 2.05, 7.00, 5.80, 6.46 และ 4.86 เท่า ตามลำดับ
3. การทำ SC โดยให้อุณหภูมิต่ำ (2-4 ^{o}ซ) กับอับละอองเกสรเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วย้ายไปยังอุณหภูมิ 27 ^{o}ซ 7 ชั่วโมงก่อนให้โพรนามีด มีศักยภาพในการชักนำให้เกิด ELS เพิ่มขึ้นในข้าวโพดสายพันธุ์แท้และลูกผสมจีโนไทป์ต่าง ๆ โดยไม่พบปฏิกิริยาระหว่างกรรมวิธี (การใช้และไม่ใช้ SC) กับจีโนไทป์ แม้ว่า SC มีแนวโน้มในการลดความสามารถในการชักนำต้นเล็กน้อย แต่พบว่าความสามารถในการชักนำต้น DH ความสามารถในการผลิตต้น DH และดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซม มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อใช้ SC ซึ่งแสดงว่าการทำ SC นั้นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของโพรนามีดได้
4. จีโนไทป์มีอิทธิพลต่อการเกิด ELS การเกิดต้น และการรอดชีวิตของต้นที่ชักนำได้ โดยพบว่าลูกผสม Agron 1 x Pa 91 ให้ค่าความสามารถในการชักนำ ELS ในการเกิดต้น DH ในการผลิตต้น DH และดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซมสูงที่สุด
5. สภาพแวดล้อมในการปลูก donor plants เป็นปัจจัยที่สำคัญมากในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร ควรปลูกพืชในสภาพที่มีความเหมาะสมและความอุดมสมบูรณ์ของดินสูง มีน้ำเพียงพอ และปลอดโรคและแมลงศัตรูพืช เพื่อให้ได้อับละอองเกสรที่สมบูรณ์และมีศักยภาพในการเกิด ELS และการเกิดต้นสูง

ข้อเสนอแนะ

1. ในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพด การลดลงของความสามารถในการชักนำต้นเมื่อทำ SC อาจเนื่องมาจากผลกระทบเชิงลบของอุณหภูมิต่ำ จึงควรมีการพัฒนาวิธีการทำ SC ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เช่น ใช้อุณหภูมิต่ำในช่วงเวลาที่สั้นลง เหลือประมาณ 1 วัน เพราะว่าช่อดอกที่เก็บมานั้น จะเก็บระยะที่มี 1 นิวเคลียส (late-uninucleate) ซึ่งเป็นช่วงก่อนที่จะเริ่มมีการแบ่งนิวเคลียสแบบ mitosis ครั้งแรก (pre-mitotic หรือ interphase) ระยะนี้จะใช้เวลาประมาณ 10 ชั่วโมงเท่านั้น (Lewin, 1990) เมื่อเซลล์ได้รับอุณหภูมิที่สูงขึ้นก็จะเข้าสู่ขบวนการ mitosis ได้ตามปกติ จึงไม่จำเป็นต้องใช้เวลานานถึง 3 วัน (ในการทดลอง) หรืออาจใช้สารเคมี เช่น hydroxyurea ในการทำให้เซลล์มีระยะของวัฏจักรที่คล้ายกันแทน (Adrian et al., 1999)

2. การเพาะเลี้ยงต้นที่ชักนำได้จากอับละอองเกสร ควรลดความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารลง หรือไม่ใช้น้ำตาลซูโครสในอาหาร GM เพราะน้ำตาลซูโครสจะยับยั้งการเจริญเติบโต ดังนั้นควรที่จะเพิ่มความเข้มแสงในการเพาะเลี้ยงให้สูงขึ้น เพื่อให้พืชมีการปรับตัวทางสรีระและสัณฐานวิทยาที่ดีตั้งแต่อยู่ในภาชนะเพาะเลี้ยง และอาจช่วยเพิ่มโอกาสในการรอดชีวิตหลังย้ายปลูกลงดิน

รายการเอกสารอ้างอิง

กาญจนา รุจิพจน์. (2540). การตอบสนองของจีโนไทป์ข้าวโพดต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่นา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. (2531). พืชไร่. ไทยวัฒนาพานิช: กรุงเทพฯ. หน้า 26.

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. (2541). พฤกษศาสตร์พืชเศรษฐกิจ. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 159 หน้า.

คำนูญ กาญจนภูมิ. (2542). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. บริษัทด่านสุทธาการพิมพ์ จำกัด: กรุงเทพฯ. 162 หน้า.

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

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

นิตย์ศรี แสงเดือน. (2536). พันธุศาสตร์พืช. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 309 หน้า.

นพดล ภักดีสุภผล และ สันติ ลีลาทิพย์กุล. (2530). การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูและเรณู. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร วิทยาเขตกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. นครปฐม. 27 หน้า.

บุญยืน กิจวิจารณ์. (2540). เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. คลังนานาวิทยา: ขอนแก่น. 207 หน้า.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. (2543). พันธุศาสตร์. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 398 หน้า.

ประภา ศรีพิจิตต์, วาสนา วงษ์ใหญ่, นิตย์ศรี แสงเดือน และ จรีภรณ์ ดำรง. (2542). Breeding early maturing maize by conventional methods and biotechnology. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

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: กรุงเทพฯ. 158 หน้า.

ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. (2534). หลักการและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 109 หน้า.

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

ราเชนทร์ ถิรพร. (2539). ข้าวโพด: การผลิต การใช้ประโยชน์ การวิเคราะห์ปัญหา และการถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่เกษตรกร. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 274 หน้า.

ราเชนทร์ ถิรพร, นิตย์ศรี แสงเดือน, ชะบา จำปาทอง, วิเชียร กีรตินิจกาล, สรรเสริญ จำปาทอง, โชคชัย เอกทัศนาวรรณ, นวรัตน์ อุดมประเสริฐ, ประศาสตร์ เกื้อมณี, สุรพล เช้าฉ้อง และ พิทยาภรณ์ บุญใหญ่. (2538). การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดให้ทนต่อสภาพแห้งแล้งจากการชักนำและการใช้ doubled haploids โดยวิธี anther culture. ใน รายงานการวิจัยพัฒนาและวิศวกรรม (ฉบับสมบูรณ์). 82 หน้า.

ราเชนทร์ ถิรพร, นิตย์ศรี แสงเดือน, วิเชียร กีรตินิจกาล, นวรัตน์ อุดมประเสริฐ, ชะบา จำปาทอง, สรรเสริญ จำปาทอง, ประศาสตร์ เกื้อมณี, สุรพล เช้าฉ้อง, กิ่งกาล กองจันทึก และ พิทยาภรณ์ บุญใหญ่. (2537). การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดให้ทนต่อสภาพแห้งแล้งโดยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพ, ใน เอกสารประกอบการประชุมทางวิชาการข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ ครั้งที่ 25, 23-26 พฤษภาคม 2537. โรงแรมระยองรีสอร์ท, ระยอง. หน้า 7.

เรวัติ เลิศฤทัยโยธิน. (2536). การปรับปรุงพันธุ์พืชชั้นสูง I. ภาควิชาพืชไร่นา คณะ เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 205 หน้า.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. (2540). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 219 หน้า.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, เรวัติ เลิศฤทัยโยธิน, ชูศักดิ์ จอมพุก และ จุฑามาศ ร่วมแก้ว. (2541). พฤกษศาสตร์พืชเศรษฐกิจ. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 189 หน้า.

ลาวัลย์ รักสัตย์. (2539). ละอองเรณู. โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์. กรุงเทพฯ. 145 หน้า.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2545). สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2544/45. กรุงเทพฯ. 318 หน้า.

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. (2537). พฤกษศาสตร์. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 277 หน้า.

Adrian, P., Ferhan, A., Krisztina, N, Crisanto, G., Gabor, V.H., Denes, D. and Attila, F. (1999). Partial synchronization of cell division in cultured maize (*Zea mays* L.) cells: differential

cyclin, cdc2, histone, and retinoblastoma transcript accumulation during the cell cycle. **J. Exp. Bot**. 50: 1373-1379.

Afele, J.C. and Kannenberg, L. W. (1990). Genetic studies of corn (*Zea mays* L.) anther culture response. **Theor. Appl. Genet.** 80: 459-464.

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.

Aitken-Christie, J., Kozai, T. and Smith, M.A.L. (1995). Automation and Environment Control in Plant Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 574 p.

Alisher, T., Oscar, V. and Erwin, H.B. (1997). Initiation of microspore embryogenesis by stress. **Trends in Plant Science Reviews**. 2: 297-302.

Anonymous, 401 Research Group. (1975). Primary study on induction of pollen plants of *Zea mays* L. **Acta. Genet. Sin**. 2: 143.

Armstrong, C.L. and Green, C.E. (1985). Establishment and maintenance of friable, embryogenic callus and the involvement of L-proline. **Planta** 164: 207-214.

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.

Barnabas, B., Fransz, P.F. and Schel, J.H.N. (1987). Ultrastructural studies on pollen embryogenesis in maize (*Zea mays* L.). **Plant Cell Rep.** 6: 212-215.

Beaumont, V.H., Rocheford T.R. and Widholm, J.M. (1995). Mapping the anther culture response genes in maize (*Zea mays* L.). **Genome** 38: 968-975.

Bedinger, P. (1992). The remarkable biology of pollen. **Plant Cell** 4: 879-887.

Biddington, N.L. (1992). The influence of ethylene in plant tissue culture. **Plant Growth Regul**. 11: 173-187.

Brettel, R.I.S., Thomas, E. and Wernicke, W. (1981). Production of haploid maize plants by anther culture. **Maydica** 26: 101-111.

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.

Campbell, C.T. and Tomes, D.T. (1984). Establishment and multiplication of red clover plants by *in vitro* shoot tip culture. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 3: 49-57.

Chang, M.T. and Neuffer, M.T. (1989). Maize microsporogenesis. **Genome** 32: 232-244.

Chu, C.C. (1966). The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. In: Proc. Symp. Plant Tiss. Cult. Science Press, Beijing. pp. 43-50.

Chung-Shen, K. (1982). Progress of anther culture of maize in China. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 25: 563-564.

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.

Dillen, W. and Buysens, S. (1989). A simple technique to overcome vitrification in *Gypsophila paniculata* L. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 19: 181-88.

Fournioux, J.C. and Bessis, S. (1986). Influence dela teneur en gaz carbonique sur la morphogenese de la vigne en culture *in vitro.* **Can. J. Bot**. 64: 2608-2616. Quoted in : National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. (2000). Workshop on contamination and acclimatization management in plant cell and tissue culture. 69 p.

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.

Fujiwara, K., Aitken-Christie, J. and Kozai, T. (1993). Water potential of radiata pine shoots cultured *in vitro* under different relative humidities. **Plant Tiss. Cult. Lett**. 10: 144-150.

Fujiwara, K. and Kozai T. (1995). Physical microenvironment and its effects. In: Aitken-Christie, J., Kozai, T. and Smith, M.A.L. (eds.). Automation and environmental control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 301-369.

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.

Genovesi, A.D. and Collins, G.B. (1982). *In vitro* production of haploid plants of corn via

anther culture. **Crop Sci**. 22: 1137-1144.

Heo, J. and Kozai, T. (1999). Forced ventilation micropropagation system for enhancing photosynthesis, growth, and development of sweet potato plantlets. **Environ. Control Biol.** 37(1): 83-92.

Hongchang, M., Wassom, C.E. and Liang, G.H. (1991). Direct generation of maize haploids via anther culture. **Cytologia** 56: 103-106.

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.

Jensen, C.J. (1974). Chromosome doubling techniques in haploids, In: Kasha, K.J. (ed.) Haploids in Higher Plants: Advances and Potentials. Univ. Press, Guelph, pp. 153-190.

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

Keller, W.A., Annison, P.G. and Cardy, B.J. (1987). Haploids from gametophytic-cells: Recent development and future prospects. Plant Tissue and Cell Culture, Alan R. Liss, Inc., pp. 223-241.

Ke, S. (1987). Genetic totipotency of plant cells and control of morphogenesis in *in vitro* cultures. **J. Wuhan Bot. Res**. 5: 303-331.

Kim, M.S., Won, J.Y., Song, C.H., Eun, J.S, and Lee, D.W. (1997). Polyploidy induction of *Cymbidium kanran* by treatment of colchicine in vitro. R.D.A. J. Hort. Sci. 39(1): 73-76.

Kirdmanee, C., Kitaya, Y. and Kozai, T. (1995). Effect of CO_2 enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*. ***In Vitro*** **Cell Dev. Biol**. 31: 144-149.

Kitaya, Y., Ohmura, Y. and Kozai, T. (1997). Visualization and analysis of air currents on plant tissue vessel. **Environ. Control Biol**. 35(2): 139-141.

Kozai, T., Kubota, C. and Joeng, B.R. (1997). Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 51: 49-56.

Kozai, T., Nguyen, Q.T., Kubota, C., Nguyen, U.V. and Hasegawa, O. (1998). Growth

promotion of coffee (*Coffea arabusta*) plantlets *in vitro* by use of fibrous supports containing no sugar and vessels with high number of air exchanges. **Jap. J. Trop. Agr.** 42 (Extra issue1): 27-28.

Kozai, T. and Smith, M.A.L. (1994). Environmental control in plant tissue culture - General introduction an overview. In: Aitken-Christie, J., Kozai, T. and Smith, M.A.L. (eds). Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 301-318.

Ku, M.K., Cheng, W.C., Kuo, L.C., Kuan, Y.L., An, H.P. and Huang, C.H. (1981). Induction factors and morpho-cytological characteristics of pollen-derived plants in maize (*Zea mays* L.). In: Proc. Symp. Plant Tiss. Cult. pp. 35-42.

Kuo, C.D. and Lu, W.L. (1984). Studies on embryogenesis of anther culture of maize. In: Int. Symp. Genet. Manipulation Crop, China. pp. 6.

Kuo, C.D., Lu, W.L. and Kui, Y.L. (1985). Corn (*Zea mays* L.): Production of purelines through anther culture. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 2 Crops I. Springer, New York pp. 152-164.

Kvaalen, H., Arnold, V. and Von, S. (1991). Effects of various partial pressures of oxygen and carbondioxide on different stages of somatic embryogenesis in *Picea abies*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 27: 49-57.

Lee, C.W.T. and Shuler, M. (1991). Different shake flask closures alter gas phase composition and ajmalicine production in *Catharathus roseus* cell suspensions. **Biotechnol.** 5: 173-178.

Lewin, B. (1990). Driving the cell cycle: M Phase kinase, its partners and substrate. **Cell.** 61: 743-752.

Linsmaier, E.M. and Skoog, F. (1965). Organic growth factor requirement of tobacco tissue culture. **Physiol. Plant**. 18: 100-127.

McClelland, M.T. and Smith, M.A.L. (1990). Vessel type, closure, and explant orientation influence *in vitro* performance of five woody species. **Hort Sci.** 25: 797-800.

McCormick, S. (1993). Male gametophyte development. **Plant Cell** 5: 1265-1275.

Miao, S.H. (1980). Effect of different ammonium salts on the formation of maize pollen embryoids. **Acta. Bot. Sin**. 22: 356-359.

Miao, S.H., Kuo, C.S., Kwei, Y.L., Sun, S.Y., Ku, W.L., Lu, Y.Y., Wang, M.L., Chen, M. L., Wu, M.K. and Hang, L. (1981). Induction of pollen plants of maize and observations on their progeny. In: Proc. Symp. Plant Tiss. Cult. Pitman, Boston. pp. 23-34.

Miller, L.R. (1963). Tissue culture propagation of tropical foliage plants. ***In Vitro***. 12: 797-813.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant**. 15: 473-497.

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.

Nguyen, Q.T. and Kozai, T. (1998). Environment effects on the growth of plantlets in micropropagation. **Environ. Control Biol.** 36(2): 59-75.

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.

Pereddy, D.R. and Petolino, J.F. (1990). Maturation of maize pollen *in vitro*. **Plant Cell Rep**. 10 : 535-539.

Pescitelli, S.M., Johnson, C.D. and Petolino, J.F. (1990). Isolated microspore culture of maize: effect of isolation technique, reduce temperature, and sucrose level. **Plant Cell Rep**. 8: 628-631.

Pescitelli, S.M., Mitchell, J.C., Jones, A.M., Pareddy, D.R. and Petolino, J.F. (1989). High frequency androgenesis from isolated microspore of maize. **Plant Cell Rep**. 7: 673-676.

Pescitelli, S.M. and Petolino, J.F. (1988). Microspore development in cultured maize anthers. **Plant Cell Rep**. 7: 441-444.

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

Petolino, J.F., Jones, A.M and Thompson, S.A. (1988). Selection for increased anther culture response in maize. **Theor. Appl. Genet**. 76: 157-159.

Petolino, J.F. and Thompson, S.A. (1987). Genetic analysis of anther culture response in maize. **Theor. Appl. Genet**. 74: 284-286.

Raghava, V. (1986). Embryogenenesis in Angiosperms: A developmental and experimental study. Cambridge University Press, New York. Quoted in Thomas, L.R. (1997). Pollen embryogenesis. **Plant Mol. Biol**. 33: 1-10.

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 double haploid maize (*Zea mays* L.) plant. Ph .D. Dissertation, Institute of Plant Sciences of the Swiss Federal Institute of Technology (ETH) Zurich: Switzerland. 81 p.

Satarova, T.N. and Chernousova, N.M. (2002). The role of weather conditions in donor plant cultivation in corn anther culture [Online]. Available: http://www.agron.missouri.edu/mnl/76/35satarova.html

Schmid, J.E. (1988). Application of gametocides and different chemical agents to anther culture donor plants and their effects on the induction of androgenesis. Abstr. International Congress Genetic Manipulation in Plant Breeding, Sep. 11-16, Helsingor: 80. 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.

Shackel, K.A., Novello, V. and Sutter, E.G. (1990). Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue-cultured apple shoots. **J. Amer. Soc. Hort. Sci**. 115: 486-472.

Shaw, G.W. (1973). Chromosome Studies. The Whitefriars Press, Ltd., London and Tonbrigde. 86 p.

Smith, M.A.L. and McClelland, M.T. (1991). Gauging the influence of *in vitro* conditions on *in vivo* quality and performance of woody plants. ***In Vitro* Cell Dev. Biol**. 27: 52-56.

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.

Sunderland, N. (1971). Anther culture: a progress report. **Sci. Prog. London** 59: 527-549.

Sunderland, N. (1973). Pollen and anther culture. In: Street H.E. (ed.) Plant Tissue and Cell Culture, 1st ed. University of California Press, Berkeley. pp. 205-239.
Quoted in Thomas, L.R. (1997). Pollen embryogenesis. **Plant Mol. Biol**. 33: 1-10.

Ting, Y.C., Yu, M. and Zeng, W.Z. (1981). Improved anther culture of maize (*Zea mays* L.). **Plant Sci. Lett**. 23: 139-145.

Tsay, H. S., Miao, S.H. and Widholm, J.M. (1986). Factors affecting haploid plant regeneration from maize anther culture. **J. Plant Physiol**. 125: 33-40.

Vasil, I.K. (1980). Androgenic haploids. Int. Rev. Cytol. Supp. IIA. pp. 195-223.

Vaughan, M.A. and Vaughn, K.C. (1987). Pronamide disrupts mitosis in a unique manner. **Pestic. Biochem**. **Physiol**. 28: 182-193.

Vaughn, K.C. and Lehnen, L.P. (1991). Mitotic disrupter herbicides. **Weed Sci**. 39: 450-457.

Vilhar, B., Vidic, T., Jogan, N. and Dermastia, M. (2002). Genome size and the nucleolar number as estimators of ploidy level in *Dactylis Glomerata*. **Plant Syst. Evol**. 234: 1-13.

Wan, Y., Duncan, D.R., Rayburn, A.L., Petolino, J.F. and Widholm, J.M. (1991). The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. **Theor. Appl. Genet**. 81: 205-211.

Wan, Y., Petolino, J.F. and Widholm, J.M. (1989). Efficient production of doubled haploid plant through colchicine treatment of anther-derived maize callus. **Theor. Appl. Genet**. 77: 899-892.

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.

Watanabe, K., Kozai, T. and Jeong, B.R. (1993). Growth response of *Solanum tuberosum* and *Mentha rotundifolia in vitro* to PPFD, photoperiod and differences in day and night temperatures. Abstr. 1st Asia-Pacific Conference Plant Cell Tiss. Cult., Taejon, Korea. pp. 34.

White, P.R. (1943). Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. **Plant Physiol**. 9: 585.

Withers, L.A.and King, P.J. (1979). Proline : a novel cryoprotectant for the freeze

preservation of cultured cells of *Zea mays* L. **Plant Physiol**. 64: 675-678.

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.

Ziv, M. (1995). *In vitro* acclimatization. In: Aitken-Christie, J., Kozai, T. and Smith, M.A.L. (eds). Automation and Environment Control in Plant Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 493-516.

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 องค์ประกอบของอาหารสูตร MS โดย Murashige and Skoog (1962)

	องค์ประกอบ	มิลลิกรัมต่อลิตร
Macro - nutrients	NH_4NO_3	165
	KNO_3	190
	$CaCl_2 . 2H_2O$	44
	$MgSO_4 .7H_2O$	37
	KH_2PO_4	17
Micro - nutrients	H_3BO_3	0.06200
	$MnSO_4 .H_2O$	0.15600
	$ZnSO_4 . 7H_2O$	0.08600
	KI	0.00830
	$Na_2MoO_4 .2H_2O$	0.00250
	$CuSO_4 .5H_2O$	0.00025
	$CoCl_2 .6H_2O$	0.00025
	Na_2EDTA (Titriplex III)	41.000
	$FeSO_4 . 7H_2O$	27.800
Organic supplements	Glycine	0.020
	Thiamine-HCl	0.001
	Nicotinic acid	0.005
	Pyridoxine-HCl	0.005
	inositol	1.000
อื่นๆ	Sucrose	30×10^3 (= 30 ก.)
	Agar	7×10^3 (= 7 ก.)

ตารางผนวกที่ 2 องค์ประกอบของอาหารสูตร N6 โดย Chu (1966)

	องค์ประกอบ	มิลลิกรัมต่อลิตร
Macro - nutrients	KNO_3	2830
	$(NH_4)_2SO_4$	463
	$CaCl_2 .2H_2O$	166
	KH_2PO_4	400
	$MgSO_4 .7H_2O$	185
Micro - nutrients	$MnSO_4 .H_2O$	3.3
	$ZnSO_4 .7H_2O$	1.5
	H_3BO_3	1.6
	KI	0.8
	Na_2EDTA (Titriplex III)	37.3
	$FeSO_4 .7H_2O$	27.8
Growth regulators	NAA	0.5
	2,4-D	2.0
Organic supplements	Glycine	2.0
	Thiamine-HCl	1.0
	Pyridoxine-HCl	0.5
	Nicotinic acid	0.5
	L-proline	0.69×10^3 (= 0.69 ก.)
	Casein hydrolysate	0.1×10^3 (= 0.1 ก.)
อื่นๆ	Sucrose	20×10^3 (= 20 ก.)
	Phytagel	2.6×10^3 (= 2.6 ก.)

ตารางผนวกที่ 3 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	$MnSO_4.H_2O$	4.40	4.40	4.40
	$ZnSO_4.7H_2O$	1.50	1.50	1.50
	H_3BO_3	1.60	1.60	1.60
	KI	0.80	0.80	0.80
	Na_2EDTA (Titriplex III)	41.00	41.00	41.00
	$FeSO_4.7H_2O$	27.80	27.80	27.80
Organic supplements	Thiamine-HCl	0.25	0.25	-
	Nicotinic acid	1.30	25.00	-
	Succinic acid	-	1.50	-
	L-Proline	125.00	-	-
	L-Glutamine	125.00	125.00	-
	L-Asparagine	15.00	-	-
	Inositol	-	100.00	-
Growth regulators	Triiodobenzoic acid	0.10	-	-
	Kinetin	-	2.50	-
	NAA	-	-	1.00
	IBA	-	-	1.00
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.)	2.5×10^3(= 2.5ก.)	2.5×10^3(= 2.5 ก.)

ตารางผนวกที่ 4 องค์ประกอบของสารละลายธาตุอาหาร Hoagland โดย Buter et al. (1991)

	องค์ประกอบ	มิลลิกรัมต่อลิตร
Macro - nutrients	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	1181.000
	$MgSO_4.7H_2O$	493.000
	KNO_3	60.670
	KH_2PO_4	13.600
	Sequestrene330 Fe	232.700
Micro - nutrients	H_3BO_3	1.546
	$MnSO_4.H_2O$	0.338
	$CuSO_4.5H_2O$	0.125
	$ZnSO_4.7H_2O$	0.575
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.121
	KCl	18.610

ตารางผนวกที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยความยาวใบ จำนวนราก ความยาวราก น้ำหนักสดใบและราก และน้ำหนักแห้งใบและราก ของต้นข้าวโพดที่ระยะการเจริญเติบโต 3, 5, 7 และ 9 วัน

3 วัน

กรรมวิธี	ความยาวใบ (ซม.)	จำนวนราก	ความยาวราก (ม.)	น้ำหนักสด (ก.)		น้ำหนักแห้ง (ก.)	
				ใบ	ราก	ใบ	ราก
ไม่ใส่น้ำตาลซูโครส + vermiculite	7.70 ± 0.34[1/] a	10.4 ± 0.76 a	0.430 ± 0.04 a	0.836 ± 0.01 a	0.169 ± 0.02 a	0.277 ± 0.01 a	0.013 ± 0.00 a
ใส่น้ำตาลซูโครส + vermiculite	6.38 ± 0.23 b	9.3 ± 0.12 a	0.260 ± 0.02 b	0.723 ± 0.02 b	0.120 ± 0.01 b	0.270 ± 0.00 a	0.011 ± 0.00 ab
ใส่น้ำตาลซูโครส + วุ้น	6.74 ± 0.22 b	10.1 ± 0.81 a	0.270 ± 0.03 b	0.771 ± 0.03 b	0.080 ± 0.01 b	0.274 ± 0.01 a	0.009 ± 0.00 b

5 วัน

กรรมวิธี	ความยาวใบ (ซม.)	จำนวนราก	ความยาวราก (ม.)	น้ำหนักสด (ก.)		น้ำหนักแห้ง (ก.)	
				ใบ	ราก	ใบ	ราก
ไม่ใส่น้ำตาลซูโครส + vermiculite	18.13 ± 0.31 a	40.5 ± 1.93 a	1.065 ± 0.04 a	1.082 ± 0.04 a	0.186 ± 0.01 a	0.303 ± 0.01 a	0.020 ± 0.00 a
ใส่น้ำตาลซูโครส + vermiculite	11.66 ± 0.56 b	21.9 ± 1.56 b	0.320 ± 0.03 c	0.837 ± 0.03 b	0.139 ± 0.00 b	0.280 ± 0.00 a	0.015 ± 0.00 b
ใส่น้ำตาลซูโครส + วุ้น	11.72 ± 1.33 b	39.5 ± 4.09 a	0.530 ± 0.03 b	0.929 ± 0.03 b	0.152 ± 0.01 b	0.288 ± 0.01 a	0.017 ± 0.00 ab

[1/] ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ± SE

(มีต่อหน้า 97)

ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยการทดสอบแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางผนวกที่ 5 (ต่อ)

7 วัน

กรรมวิธี	ความยาวใบ (ซม.)	จำนวนราก	ความยาวราก (ม.)	น้ำหนักสด (ก.)		น้ำหนักแห้ง (ก.)	
				ใบ	ราก	ใบ	ราก
ไม่ใส่น้ำตาลซูโครส + vermiculite	23.62[1/] ± 0.91 a	61.2 ± 4.68 a	1.160 ± 0.05 a	1.577 ± 0.08 a	0.353 ± 0.04 a	0.331 ± 0.01a	0.026 ± 0.00 a
ใส่น้ำตาลซูโครส + vermiculite	13.02 ± 0.74 b	29.4 ± 2.55 c	0.750 ± 0.08 b	0.843 ± 0.01b	0.142 ± 0.01 b	0.298 ± 0.00 b	0.017 ± 0.00 b
ใส่น้ำตาลซูโครส + วุ้น	13.61 ± 1.10 b	43.0 ±2.07 b	0.810 ± 0.07 b	0.945 ± 0.01 b	0.156 ± 0.00 b	0.302 ± 0.01 b	0.024 ± 0.00 a

9 วัน

กรรมวิธี	ความยาวใบ (ซม.)	จำนวนราก	ความยาวราก (ม.)	น้ำหนักสด (ก.)		น้ำหนักแห้ง (ก.)	
				ใบ	ราก	ใบ	ราก
ไม่ใส่น้ำตาลซูโครส + vermiculite	26.91 ± 1.65 a	91.3 ± 4.80 a	1.880 ± 0.21 a	1.853 ± 0.10 a	0.653 ± 0.08 a	0.340 ± 0.01 a	0.035 ± 0.00 a
ใส่น้ำตาลซูโครส + vermiculite	15.40 ± 1.55 b	40.7 ± 3.91 c	0.800 ± 0.09 b	0.871 ± 0.03 c	0.153 ± 0.01 b	0.310 ± 0.01 b	0.024 ± 0.00 b
ใส่น้ำตาลซูโครส + วุ้น	17.63 ± 4.22 b	56.4 ±14.23 b	1.100 ± 0.28 b	1.109 ± 0.27 b	0.159 ± 0.04 b	0.324 ± 0.08 ab	0.030 ± 0.01 ab

[1/] ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ± SE

ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยการทดสอบแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางผนวกที่ 6 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ค่าความยาวใบ ความยาวราก จำนวนราก น้ำหนักสดใบและราก และน้ำหนักแห้งใบและราก ของต้นข้าวโพดที่ระยะ 3, 5, 7 และ 9 วัน ที่เพาะเลี้ยงภายใต้การใช้และไม่ใช้น้ำตาลซูโครส และวัสดุค้ำยึด 2 ชนิด (vermiculite และ วุ้น)

3 วัน

Source of variation	df	MS						
		ความยาวใบ	ความยาวราก	จำนวนราก	น้ำหนักสด		น้ำหนักแห้ง	
					ใบ	ราก	ใบ	ราก
กรรมวิธี (T)	2	2.328*	0.046**	1.617 ns	0.016**	0.010**	0.000 ns	0.000*
ความคลาดเคลื่อน	12	0.359	0.004	2.100	0.002	0.001	0.000	0.000
CV(%)		8.6	19.8	14.6	5.4	25.6	6.7	19.1

** = ความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01 * = ความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

5 วัน

Source of variation	df	MS						
		ความยาวใบ	ความยาวราก	จำนวนราก	น้ำหนักสด		น้ำหนักแห้ง	
					ใบ	ราก	ใบ	ราก
กรรมวิธี (T)	2	67.020**	0.738**	547.300**	0.077**	0.003**	0.001 ns	0.000 ns
ความคลาดเคลื่อน	12	17.320	0.017	38.100	0.006	0.000	0.000	0.000
CV(%)		14.1	20.6	18.2	8.3	10.2	6.8	16.4

** = ความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01 ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

(มีต่อหน้า 99)

ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

7 วัน

Source of variation	df	MS						
		ความยาวใบ	ความยาวราก	จำนวนราก	น้ำหนักสด		น้ำหนักแห้ง	
					ใบ	ราก	ใบ	ราก
กรรมวิธี (T)	2	177.070**	0.252**	1272.900**	0.792**	0.069**	0.002*	0.000**
ความคลาดเคลื่อน	12	4.340	0.023	54.500	0.011	0.003	0.000	0.000
CV(%)		12.4	16.8	16.6	9.5	23.9	5.1	12.5

** = ความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01 * = ความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

9 วัน

Source of variation	df	MS						
		ความยาวใบ	ความยาวราก	จำนวนราก	น้ำหนักสด		น้ำหนักแห้ง	
					ใบ	ราก	ใบ	ราก
กรรมวิธี (T)	2	186.310**	1.554**	3354.100**	1.312**	0.411**	0.001 ns	0.000 ns
ความคลาดเคลื่อน	12	12.960	0.107	98.400	0.022	0.010	0.000	0.001
CV(%)		18	25.9	15.8	11.7	31.5	5.2	25.2

** = ความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01 ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 7 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของค่าความยาวใบ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งใบ จำนวนราก ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งรากของต้นข้าวโพดที่ได้จากการเพาะเลี้ยง zygotic embryo เมื่อใช้วัสดุค้ำยึด 2 ชนิด ที่ระดับน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ

Source of variation	MS		
	ความยาวใบ (LL)	น้ำหนักสดใบ (LFW)	น้ำหนักแห้งใบ (FDW)
กรรมวิธี	11.59**	0.146**	0.009**
vermiculite และวุ้น (A)	3.40 ns	0.055**	0.002 ns
น้ำตาลซูโครส (B)	26.76**	0.338**	0.022**
A X B	0.52 ns	0.000 ns	0.000 ns
ความคลาดเคลื่อน	2.9	0.060	0.001
CV %	21.1	11.5	16.1

** = ความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01 ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

(มีต่อหน้า 101)

ตารางผนวกที่ 7 (ต่อ)

Source of variation	MS			
	จำนวนราก (NR)	ความยาวราก (RL)	น้ำหนักสดราก (RFW)	น้ำหนักแห้งราก (RDW)
กรรมวิธี	26 ns	52.73**	0.015**	0.009**
vermiculite และวุ้น (A)	30 ns	22.53 ns	0.001 ns	0.002 ns
น้ำตาลซูโครส (B)	48 ns	106.16**	0.037**	0.022**
A X B	3 ns	14.41 ns	0.000 ns	0.000 ns
ความคลาดเคลื่อน	16	12.78	0.001	0.001
CV %	56.6	35.50	38.7	32.0

** = ความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01 ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 8 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิด ELS ของข้าวโพด 14 พันธุ์ เมื่อใช้โพรนามีดร่วมกับการใช้และไม่ใช้ SC ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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

** = ความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01 ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 9 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิด ELS เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น และเปอร์เซ็นต์การผลิตต้นของข้าวโพดลูกผสม 3 พันธุ์เมื่อใช้โพรนามีดร่วมกับการใช้และไม่ใช้ SC ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ

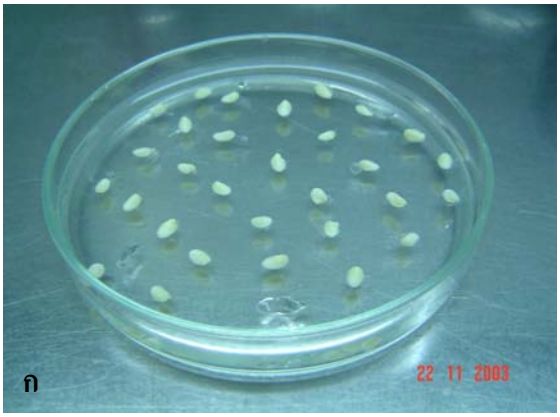
Source of variation	df	MS		
		การชักนำให้เกิด ELS	การเกิดต้น	การผลิตต้น
กรรมวิธี	5	5.9**	41.0**	2.410**
พันธุ์ (A)	2	9.5**	93.0**	6.000**
Pro และ Pro + SC (B)	1	9.4**	18.0 ns	0.040 ns
A X B	2	0.5 ns	0.3 ns	0.007 ns
ความคลาดเคลื่อน	18	0.6	5.0	0.200
CV (%)		7.22	16.25	17.92

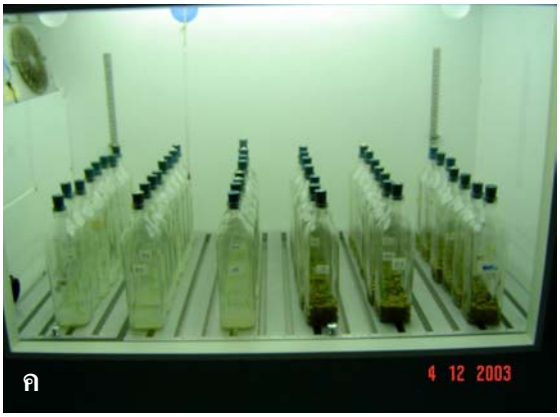
** = ความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01 ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 10 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การผลิตต้น DH เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น DH และดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซมของข้าวโพดลูกผสมทั้ง 3 พันธุ์เมื่อใช้โพรนามีด ร่วมกับการใช้และไม่ใช้ SC

Source of variation	df	MS		
		การผลิตต้น DH	การเกิดต้น DH	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	0.0 ns	0.25 ns	0.02 ns
ความคลาดเคลื่อน	18	0.5	13.77	0.06
CV (%)		55.26	55.26	78

*** = ความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ**



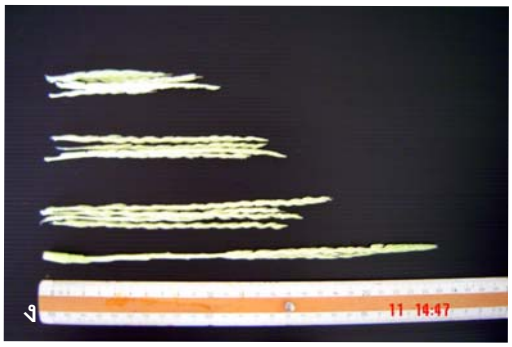


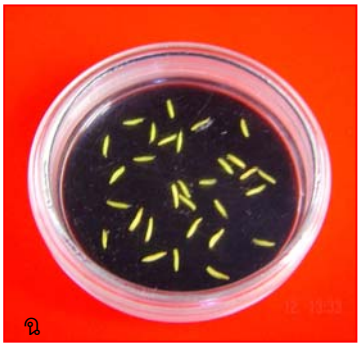
ภาพผนวกที่ 1 แสดงการเพาะเลี้ยง zygotic embryo ของข้าวโพด

ก. ลักษณะ zygotic embryo ในอาหารเพาะเลี้ยง

ข. zygotic embryo อายุ 10 วันหลังย้ายออกชั้นเพาะเลี้ยง

ค. การเพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ





ภาพผนวกที่ 2 แสดงขั้นตอนการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพด

. ลักษณะต้นข้าวโพดสำหรับเก็บช่อดอก (donor plants)

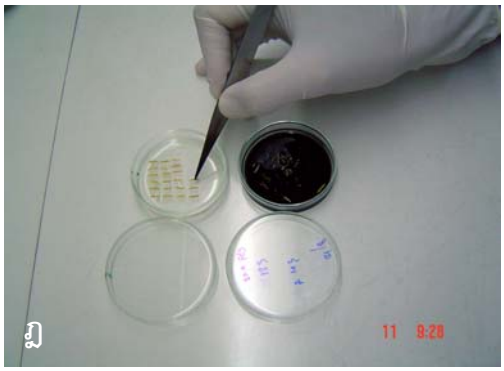
. การเตรียมช่อดอกเพื่อทำ pre-treatment

. การทำ pre-treatment ช่อดอก

. การแบ่งช่อดอกเพื่อหาระยะนิวเคลียสที่เหมาะสม

. แสดงลักษณะอับละอองเกสรขนาดใหญ่ทั้ง 3 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร IM

. อับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงในอาหาร IM



ภาพผนวกที่ 2 (ต่อ) แสดงขั้นตอนการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพด

. การใช้โพรนามีดเพื่อเหนี่ยวนำการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม

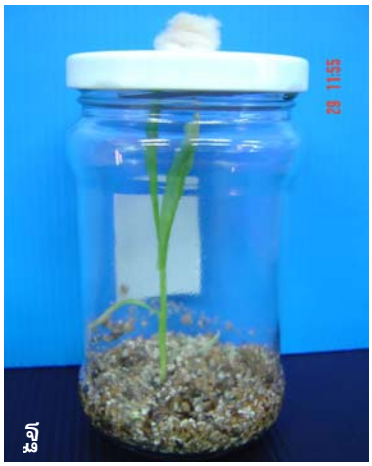
. การทำ synchronization of cell cycle

. การเก็บอับละอองเกสรในที่มืดก่อนย้ายออกชั้นเพาะเลี้ยง

. อับละอองเกสรในอาหาร IM ที่อยู่บนชั้นเพาะเลี้ยง

. การย้ายอับละอองเกสรจากอาหาร IM ลง RM

. อับละอองเกสรในอาหาร RM ที่อยู่บนชั้นเพาะเลี้ยง



ภาพผนวกที่ 2 (ต่อ) แสดงขั้นตอนการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพด

. ต้นข้าวโพดจาก ELS ในอาหาร GM

. ต้นข้าวโพดที่อยู่ในสารละลาย Hoagland

. ลักษณะต้นข้าวโพดที่ย้ายลงปลูกในดิน

. การผสมข้าวโพดเพื่อเก็บเมล็ด

= 30 ไมครอน = 30 ไมครอน = 30 ไมครอน

ภาพผนวกที่ 3 แสดงระยะนิวเคลียสของ microspore

. Microspore ที่นิวเคลียสอยู่ในระยะ mid-uninucleate

. Microspore ที่นิวเคลียสอยู่ในระยะ late-uninucleate

. Microspore ที่นิวเคลียสอยู่ในระยะ early-binucleate

ภาพผนวกที่ 4 แสดงพัฒนาการของ ELS

ก. ลักษณะการเกิด ELS

ข. ภาพขยายลักษณะการเกิด ELS

ค. ลักษณะการพัฒนาไปเป็นต้น

ง. ลักษณะต้นข้าวโพดที่มีทั้งยอดและราก

ประวัติผู้เขียน

นายปริญญา ขจัดพาล เกิดเมื่อวันที่ 6 มิถุนายน พ.ศ. 2521 ที่ อ. ภูเขียว จ.ชัยภูมิ ในปี พ.ศ. 2536 – 2538 ได้ศึกษาและสำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลายจากโรงเรียนแก่นนครวิทยาลัย อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น ในปี 2539 เริ่มเข้าศึกษาระดับปริญญาตรีที่สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำเร็จการศึกษาเมื่อปี พ.ศ. 2542 และได้ศึกษาต่อระดับปริญญาโทที่สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในปี พ.ศ. 2543