การศึกษาการผสมพืชข้ามสกุลย่อยระหว่าง *Paracurcuma*, *Curcuma* และ *Ecomatae*

ศศิริน รัตนโสภณ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชสวน
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2560

การศึกษาการผสมพืชข้ามสกุลย่อยระหว่าง *Paracurcuma*, *Curcuma* และ *Ecomatae*

ศศิริน รัตนโสภณ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชสวน

พิจารณาเห็นชอบโดย **อาจารย์ที่ปรึกษา**

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี)
วันที่ 12 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2560

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์)
วันที่ 12 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2560

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(อาจารย์ ดร.ประนอม ยังคำมั่น)
วันที่ 12 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2560

ประธานอาจารย์ประจำหลักสูตร .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรนุช เจริญกิจ)
วันที่ 12 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2560

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
วันที่ 17 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2560

ชื่อเรื่อง การศึกษาการผสมพืชข้ามสกุลย่อยระหว่าง *Paracurcuma, Curcuma* และ *Ecomatae*

ชื่อผู้เขียน นางสาวศศิริน รัตนโสภณ

ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี

บทคัดย่อ

การศึกษาการผสมข้ามสกุลย่อยระหว่าง *Paracurcuma, Curcuma* และ *Ecomatae* โดยทำการศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสร การศึกษาความงอกของละอองเกสร และการศึกษาความสามารถในการงอกหลอดละอองเกสรภายในท่อนำไข่ของเกสรเพศเมีย จากการทดสอบความมีชีวิตของละอองเกสร พบว่า สกุลย่อย *Paracurcuma* ได้แก่ *C. aurantiaca* (02), *C. aurantiaca* (06), *C. aurantiaca* (08), *C. alismatifolia* (snow white) และ *C. alismatifolia* (big red) สกุลย่อย *Curcuma* ได้แก่ *C. myanmaensis* (บัวเข็มขาว) และ *C. myanmaensis* (บัวเข็มชมพู) และสกุลย่อย *Ecomatae* ได้แก่ *C. supraneeana* มีความมีชีวิตของละอองเกสรสูงตั้งแต่ 86.67-97.67 เปอร์เซ็นต์ *C. aurantiaca* (08) และ *C. aurantiaca* (02) มีความสามารถในการงอกหลอดละอองเกสรมากที่สุดคือ 61.71 และ 59.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การศึกษาความสามารถในการงอกหลอดของละอองเกสรบนยอดเกสรเพศเมียและภายในท่อนำไข่ของการผสมพืชระหว่างสกุลย่อย *Paracurcuma* (*C. aurantiaca, C. alismatifolia*), *Curcuma* (*C. myanmaensis*) และ *Ecomatae* (*C. supraneeana*) ทั้งการผสมตรงและผสมสลับ พบว่า ละอองเกสรงอกได้ดีบนยอดเกสรเพศเมียและสามารถงอกลงไปภายในท่อนำไข่ได้ในทุกคู่ผสม จึงทำการผสมเกสรระหว่าง 3 สกุลย่อย จำนวน 10 คู่ผสม พบว่า คู่ผสมระหว่าง *C. aurantiaca* x *C. myanmaensis* และ *C. aurantiaca* x *C. supraneeana* มีเปอร์เซ็นต์การติดผลมากที่สุด คือ 33.33 และ 16.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ คู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* x *C. myanmaensis*, *C. alismatifolia* x *C. supraneeana*, *C. myanmaensis* x *C. aurantiaca*, *C. supraneeana* x *C. aurantiaca* มีเปอร์เซ็นต์การติดผลอยู่ที่ 1.67-11.67 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลในช่วง 0.67-31.83 เมล็ด คู่ผสมระหว่าง *C. myanmaensis* x *C. alismatifolia* และ *C.supraneeana* x *C. myanmaensis* มีเปอร์เซ็นต์การติดผลอยู่ที่ 1.67 เปอร์เซ็นต์ และเมล็ดลูกผสมไม่งอก ส่วนคู่ผสมระหว่าง *C. supraneeana* x *C. alismatifolia* และ

C. myanmaensis x *C. supraneeana* ไม่มีการติดผล หลังจากนำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเพื่อชักนำให้เกิดเป็นต้น พบว่า คู่ผสมระหว่าง *C. supraneeana x C. aurantiaca* มีความสามารถในการงอกของเมล็ดลูกผสมมากที่สุด คือ 42.75 เปอร์เซ็นต์ ทำการตรวจสอบความเป็นลูกผสมโดยใช้เทคนิค RAPD พบว่า ไพรเมอร์ OPU 7 (5'-CCGTCTCATC-3') และ S29 (5'-GGGTAACGCC-3') สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแม่และพ่อของลูกผสมระหว่าง *C. supraneeana x C. aurantiaca* และสามารถแยกความแตกต่างระหว่างแม่และพ่อของลูกผสมระหว่าง *C. aurantiaca x C. supraneeana* ได้ ตามลำดับ ส่วนลูกผสมระหว่าง *C. aurantiaca x C. myanmaensis* และ *C. myanmaensis x C. aurantiaca* สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแม่และพ่อได้ โดยใช้ไพร-เมอร์ S65 (5'-GATGACCGCC-3') เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูกผสม พบว่า ลักษณะของลูกผสมที่ใช้ *C. aurantiaca* เป็นแม่ ได้แก่ ลูกผสมระหว่าง *C. aurantiaca x C. myanmaensis* และ *C. aurantiaca x C. supraneeana* นั้นจะมีลักษณะทั้งช่อดอก และทรงต้นคล้ายไปทางแม่ (*C. aurantiaca*) โดยลักษณะที่ได้จากพ่อนั้นจะแสดงออกเพียงบางลักษณะ เช่น ความยาวของก้านใบ และการแยกออกจากกันของกลีบดอก เป็นต้น ซึ่งแสดงออกได้ไม่ชัดเจน ส่วนลักษณะของลูกผสมที่ใช้ *C. aurantiaca* เป็นพ่อ ได้แก่ ลูกผสมระหว่าง *C. myanmaensis x C. aurantiaca* และ *C. supraneeana x C. aurantiaca* สามารถแสดงลักษณะของช่อดอก ทรงต้น และดอกจริง ที่ได้มาจากทั้งลักษณะของแม่และลักษณะของพ่อ

คำสำคัญ: ปทุมมา, การผสมข้ามสกุลย่อย, เทคนิค RAPD

Title	A Study on Intersubgeneric Hybridization Amoung Subgenus *Paracurcuma, Curcuma* and *Ecomatae*
Auther	Miss Sasirin Rattanasophon
Degree	Master of Science in Horticulture
Advisor Committee Chairperson	Assistant Professor Dr. Chalermsri Nontaswatsri

ABSTRACT

A study on intersubgeneric hybridization amoung subgenus *Paracurcuma Curcuma* and *Ecomatae* was done by investigating on pollen viability, pollen germination and pollen germination on stigma surface, pollen tube growth into the style and cross ability among plant in subgenus. The result showed that subgenus *Paracurcuma* [*C.* aurantiaca (02), *C. aurantiaca* (06), *C. aurantiaca* (08)], [*C. alismatifolia* (snow white) and *C. alismatifolia* (big red)], subgenus *Curcuma* [*C. myanmaensis* (white) and *C. myanmaensis* (pink)] and subgenus *Ecomatae* (*C. supraneeana*) had high pollen viability at 86.67-97.67 percent. *C. aurantiaca* (08) and *C. aurantiaca* (02) had highest pollen germination percentages at 61.71 and 59.47 percent, respectively. A study of pollen germination on stigma surface and pollen tube growth into the style by reciprocal cross among subgenus *Paracurcuma* (*C. aurantiaca, C. alismatifolia*), *Curcuma* (*C. myanmaensis*) and *Ecomatae* (*C. supraneeana*) showed that pollen tube were germinated well on stigma surface and could penetrate into pistill in all crosses. Intersubgeneric hybridization among 3 subgenus containing 10 cross-combination showed that *C. aurantiaca x C. myanmaensis* and *C. aurantiaca x C. supraneeana* had highest fruit setting percentages (33.33% and 16.67%, respectively), *C. alismatifolia* x *C. myanmaensis*, *C. alismatifolia* x *C. supraneeana*, *C. myanmaensis* x *C. aurantiaca*, *C. supraneeana* x *C. aurantiaca* had low fruit setting percentages 1.67-11.67 percent with 0.67-31.83 seeds per fruit, *C. myanmaensis x C. alismatifolia* and *C. supraneeana*

x C. myanmaensis had low fruit setting percentages (1.67 percent) but seeds were not geminated, *C. supraneeana x C. myanmaensis* and *C. myanmaensis x C. supraneeana* not set any fruit. After that all embryos were cultured in in vitro condition and the result showed that *C. supraneeana x C. aurantiaca* had highest embryo germination percentage (42.57%). The confirmation of hybrids between *C. supraneeana x C. aurantiaca* and *C. aurantiaca x C. supraneeana* were confirmed by RAPD technique using primers OPU 7 primer (5'-CCGTCTCATC-3') and S29 (5'-GGGTAACGCC-3') respectively. The hybrids between *C. aurantiaca x C. myanmaensis* and *C. myanmaensis x C. aurantiaca* could be confirmed by using S65 primer (5'-GATGACCGCC-3'). The characteristics of intersubgeneric hybrid were investigated and found that hybrids between *C. aurantiaca x C. myanmaensis* and *C. aurantiaca x C. supraneeana* had characteristic of inflorescence and stem similar to *C. aurantiaca*, petal and leaf vein characteristics were similar to father (*C. myanmaensis* or *C. supraneeana*). The hybrids between *C. myanmaensis x C. aurantiaca* and *C. supraneeana x C. aurantiaca* showed characteristic of inflorescence stem and flower intermediate from both parents.

Keywords: *Curcuma*, inter subgeneric hybrid, RAPD

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางในการวางแผนทำการทดลอง ตลอดจนสนับสนุนวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี ห้องทดลอง ในการดำเนินการทดลองทั้งหมดจนกระทั่งงานทดลองสำเร็จเสร็จสมบูรณ์ อีกทั้งยังอบรมสั่งสอนให้คำแนะนำในทุก ๆ ด้าน และยังช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้ จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรีสุลักษณ์ ธีรานุพัฒนา ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์ และอาจารย์ ดร.ประนอม ยังคำมั่น กรรมการที่ปรึกษา ที่คอยให้คำแนะนำเพิ่มเติมในการดำเนินงานทดลอง และตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่อง ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อดิษพล คุณแม่นภาพรณ์ รัตนโสภณ ผู้ให้กำเนิด ให้โอกาสทางการศึกษา สนับสนุนค่าใช้จ่ายในการศึกษาเล่าเรียน คอยเป็นกำลังใจ ให้การสนับสนุนทั้งในด้านการเรียนและการดำเนินชีวิตตลอดมา และขอขอบคุณ คุณศรีจันทร์ อำชำฤทธิ์ คุณกัญญา คุณยศยิ่ง เพื่อน ๆ น้อง ๆ นักศึกษาสาขาพืชสวนประดับ และอีกหลายท่านที่ไม่ได้เอ่ยนามในครั้งนี้ ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ศศิริน รัตนโสภณ

กรกฎาคม 2560

สารบัญ

หน้า

สารบัญตาราง

สารบัญภาพ

สารบัญตารางผนวก

สารบัญภาพผนวก

บทที่ 1
บทนำ

พืชวงศ์ขิง (zingiberaceae) เช่น ขิง ขมิ้น กระชาย เป็นต้น เป็นพืชที่คนไทยรู้จักกันมาเป็นเวลานาน และถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น เป็นเครื่องเทศ ใช้ทำอาหาร สีย้อม เครื่องสำอาง และบางชนิดมีดอกสวยงามสามารถปลูกเป็นไม้ดอกไม้ประดับ เช่น ปทุมมา ที่สามารถผลิตออกสู่ตลาดเพื่อเป็นสินค้าส่งออกต่างประเทศได้ (กมลทิพย์, 2550) แต่ในปัจจุบันสายพันธุ์ที่นิยมปลูกเพื่อการค้าในประเทศและส่งออกต่างประเทศนั้นยังมีสีสันและลักษณะที่มีความหลากหลายไม่มากนัก ส่วนใหญ่ที่พบจะมีเพียงสีขาว สีชมพูอ่อนไปจนถึงสีชมพูเข้ม หากสามารถสร้างลูกผสมที่มีความหลากหลายและแปลกใหม่เป็นที่ต้องการของตลาดได้ จะเป็นประโยชน์ทางการค้าและการตลาดของพืชกลุ่มปทุมมาอย่างยิ่ง

การผสมพืชข้ามชนิดหรือข้ามสกุลเป็นการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบหนึ่งซึ่งสามารถเพิ่มลักษณะที่แปลกใหม่ให้แตกต่างไปจากลักษณะที่มีอยู่เดิมได้ ในการปรับปรุงพันธุ์ปทุมมา ธีรนิติ (2555) ได้ทำการผสมพืชในกลุ่ม Paracurcuma และ Eucurcuma พบว่าลูกผสมที่ได้มีลักษณะที่หลากหลายและแตกต่างไปจากต้นพ่อและต้นแม่ การผสมพืชต่างชนิดนั้นมักพบปัญหาหลังการผสมเกสร เช่น เอ็มบริโอไม่สามารถเจริญไปเป็นเอ็มบริโอ หรือเกิดความไม่สมดุลของเอนโดสเปิร์มในเมล็ด (กฤษฎา, 2546 ; รังสฤษดิ์, 2545) ในการศึกษาจึงใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อช่วยชีวิตลูกผสม โดยเทคนิคนี้ถูกนำมาใช้เพื่อช่วยเลี้ยงเมล็ดที่ไม่มีเอนโดสเปิร์ม หรือเลี้ยงเอ็มบริโอของลูกผสมที่ได้จากการผสมพืชต่างชนิดหรือต่างสกุลเพื่อให้สามารถพัฒนาไปเป็นต้นกล้าได้ (บุญยืน, 2544) และลูกผสมที่ได้จะทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค RAPD ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการยืนยันเพื่อให้แน่ใจว่าลูกผสมนั้นเกิดจากการผสมระหว่างพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่แท้จริง (เรือนแก้ว, 2553)

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมข้ามระหว่างสกุลย่อย *Paracurcuma, Curcuma* และ *Ecomatae* เพื่อพัฒนาลักษณะลูกผสมให้มีความหลากหลายของลักษณะและสีสันเพื่อประโยชน์ทางการค้าต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความสามารถในการผสมข้ามระหว่างสกุลย่อย *Paracurcuma*, *Curcuma* และ *Ecomatae*
2. เพื่อสร้างลูกผสมข้ามระหว่างสกุลย่อย *Paracurcuma*, *Curcuma* และ *Ecomatae*
3. เพื่อศึกษาลักษณะของลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามสกุลย่อย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความเป็นไปได้ในการสร้างพืชลูกผสมจากการผสมข้ามระหว่างสกุลย่อย *Paracurcuma*, *Curcuma* และ *Ecomatae*
2. สามารถสร้างลูกผสมที่มีลักษณะแปลกใหม่และหลากหลายจากการผสมระหว่างสกุลย่อย

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาความสามารถในการผสมพืชข้ามระหว่างสกุลย่อย *Paracurcuma*, *Curcuma* และ *Ecomatae*
2. ศึกษาความสามารถในการติดผลและเมล็ดจากการผสมพืชข้ามสกุลย่อย
3. ตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยเทคนิคทางเครื่องหมายโมเลกุล
4. ศึกษาลักษณะของลูกผสมข้ามสกุลย่อย

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

พืชวงศ์ขิง (zingiberaceae) เป็นพืชล้มลุกที่มีอายุหลายปี และสามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่นที่มีความชื้นสูง การกระจายพันธุ์ส่วนใหญ่จะอยู่ในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และสามารถกระจายได้บริเวณกว้าง พืชที่สำคัญ ได้แก่ ขิง ข่า ดาหลา กระชาย ปทุมมา เป็นต้น จากการตรวจสอบหลักฐานพบว่าประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายของพืชวงศ์นี้สูง มีรายงานพบประมาณ 25 สกุล 270 ชนิด (Larsen, 2002) พืชวงศ์นี้เป็นที่รู้จักของคนไทยมานานและได้นำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น นำมาประกอบอาหาร หรือเป็นเครื่องเทศ นำมาเป็นสมุนไพร เนื่องจากลักษณะพิเศษ คือ ทุกส่วนของต้นจะมีกลิ่นของน้ำมันหอมระเหย และมีสรรพคุณเป็นยาสมุนไพร นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็น สีย้อม เครื่องสำอาง และบางชนิดมีดอกสวยงามสามารถปลูกเป็นไม้ดอกไม้ประดับ และผลิตออกสู่ตลาดเพื่อเป็นสินค้าส่งออกต่างประเทศได้ (กมลทิพย์, 2550 ; พวงเพ็ญ, 2008)

ในประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกปทุมมารวมประมาณ 400 ไร่ ส่วนใหญ่ปลูกเพื่อผลิตหัวพันธุ์ส่งออกต่างประเทศ ประมาณไม่ต่ำกว่า 2 ล้านหัวต่อปี รวมมูลค่าการส่งออกประมาณ 20 ล้านบาท โดยจะส่งไปยังประเทศเนเธอร์แลนด์มากที่สุด ตลาดยุโรป สหรัฐอเมริกาและญี่ปุ่น พบว่า มีมูลค่าการส่งออกในปี พ.ศ. 2547 ประมาณ 24,871,170 บาท (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2548) ดังนั้น พืชในกลุ่มปทุมมาและกระเจียวถือเป็นไม้เศรษฐกิจชนิดใหม่ของไทย ซึ่งมีมูลค่าการส่งออกของปทุมมาเป็นอันดับ 2 รองจากกล้วยไม้ โดยมีการปลูกและส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมาเพื่อนำไปเป็นไม้ตัดดอกและไม้กระถางที่เป็นที่นิยมในต่างประเทศ เนื่องจากช่อดอกสวยงาม กลีบประดับมีสีสันสดใส และช่อดอกมีความคงทน มีอายุการใช้งานนาน ช้ำยาก และน้ำหนักเบา จึงง่ายต่อการขนส่ง (อรวรรณ, 2548)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

สกุล *Curcuma* เป็นไม้หัวอายุยืนหลายปีที่ไม่มีเนื้อไม้ (herbaceous perennial) มีการพักตัวในช่วงอากาศแห้งแล้งและช่วงวันสั้น (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2548) พวงเพ็ญ (2008) กล่าวว่า สกุล *Curcuma* เป็นสกุลใหญ่สกุลหนึ่งของพืชวงศ์ขิง และยากต่อการจำแนกเนื่องจากคาดว่ามีไม่ต่ำกว่า 80 ชนิด และในประเทศไทยพบประมาณ 38 ชนิด (Maknoi, 2006)

Curcuma alismatifolia Gagnap. อยู่ในสกุลย่อย *Paracurcuma* ลักษณะเป็นไม้ล้มลุก มีเหง้า สูงประมาณ 60-90 เซนติเมตร ใบเดี่ยว รูปรีขอบขนาน กว้าง 10-15 เซนติเมตร ยาว 18-25

เซนติเมตร ปลายและโคนใบแหลม ช่อดอกหรือกลีบประดับส่วนบนที่พบมีตั้งแต่สีขาว สีชมพูอ่อนไปจนถึงสีชมพูเข้ม กลีบประดับส่วนล่างมีสีเขียว กลีบรองดอกรูปกรวย ยาว 8-12 มิลลิเมตร กลีบดอกเป็นหลอด ยาว 15-18 มิลลิเมตร ปลายแยกเป็น 3 แฉก รูปขอบขนาน ผิวเกลี้ยง กลีบปากยาวประมาณ 2.8 เซนติเมตร กว้างประมาณ 1.5 เซนติเมตร สีขาวหรือม่วง ตรงกลางกลีบบริเวณโคนมีประสีเหลือง เกสรเพศผู้จะมีอันเดียว อับเรณูยาว 7-8 มิลลิเมตร บริเวณโคนมีเดือยสั้น รังไข่ผิวเกลี้ยง ผล รูปไข่ ผิวเกลี้ยง พบได้ทั่วไปตามป่าผลัดใบในที่ราบลุ่มของภาคกลางของประเทศไทยและกัมพูชา นิยมนำมาปลูกและพัฒนาเป็นไม้ประดับ และไม้หัวระดับอุตสาหกรรม (Larsen & Larsen, 2006)

Curcuma aurantiaca เดิมถูกจัดอยู่ในสกุลย่อย *Eucurcuma* ต่อมาถูกเปลี่ยนให้ย้ายไปอยู่สกุลย่อย *Paracurcuma* (Jana *et al.*, 2015) มีลักษณะหัวรูปไข่ ค่อนข้างกลม ขนาดประมาณ 4 x 3 เซนติเมตร เหง้าสั้น ภายในมีสีเหลืองอ่อน ส่วนเหนือดินสูงประมาณ 12-25 เซนติเมตร ใบรูปไข่กลับหรือรูปหอก ฐานใบรูปลิ่มหรือรูปหัวใจ ปลายใบเรียวแหลมหรือยาวคล้ายหาง ขนาด 15- 45 x 10-15 เซนติเมตร ส่วนของช่อดอกจะออกกลางลำต้น ก้านช่อมีขนแน่น ยาว 10-15 เซนติเมตร ส่วนช่อยาว 9-20 เซนติเมตร ใบประดับรูปไข่ ปลายมน สีเขียวหรือเขียวอมส้ม มีขนทั้งสองด้าน ใบประดับส่วนยอด รูปใบหอก สีชมพู มีขนทั้งสองด้าน ปลายมน ขนาด 3-7 x 1-2 เซนติเมตร กลีบดอกสีเหลืองหรือขาว สตามิโนด (staminode) และกลีบปากมีสีเหลืองอมส้ม อับเรณูไม่มีเดือย รังไข่ ขนาดยาวประมาณ 4 มิลลิเมตร ผิวมีขน (จรัญ และพวงเพ็ญ, 2555)

Curcuma myanmarensis เดิมคือ *Smithatris myanmaensis* อยู่ในสกุล *Smithatris* ลักษณะช่อดอกมีกลีบประดับสีขาวและสีชมพู กลีบดอกสีเหลือง ก้านช่อดอกยาวประมาณ 30 – 45 เซนติเมตร สามารถออกดอกได้ตั้งแต่เดือนเมษายนไปจนถึงพฤศจิกายน ประเทศไทยพบในเขตภาคตะวันตก มีการกระจายพันธุ์และพบครั้งแรกในประเทศพม่า (Kress & Htun, 2003; Larsen & Larsen, 2006) ต่อมาถูกย้ายไปอยู่สกุล *Curcuma* ในสกุลย่อย *Curcuma* (Java *et al.*, 2015)

Curcuma supraneeana ซึ่งเดิมใช้ชื่อว่า *Smithatris supraneanae* เป็นอีกชนิดหนึ่งของสกุล *Smithatris* ลักษณะลำต้นเทียม (psudostem) ขึ้นตั้งตรงสูง 120 เซนติเมตร ใบรูปหอก 5-7 ใบต่อต้น กลีบประดับ (bracts) มีสีขาว กลีบดอกมีสีเหลืองดอกจริงมีลักษณะเป็นท่อยาว 2.5 เซนติเมตร พบตามเขาหินปูนแถวจังหวัดสระบุรี ทางเหนือของกรุงเทพฯ การกระจายพันธุ์อยู่ที่แถบตะวันออกทางประเทศพม่าซึ่งมีลักษณะเป็นเขาหินปูนเช่นเดียวกัน (Kress & Larsen, 2001) ต่อมาพบว่าลักษณะดังกล่าวสามารถพบได้ในบางสายพันธุ์ของสกุล *Curcuma* จึงถูกเปลี่ยนให้ไปอยู่สกุล *Curcuma* ในสกุลย่อย *Ecomatae* (Jana *et al.*, 2015)

ความมีชีวิตของละอองเกสรและการงอกของหลอดละอองเกสร

การศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสร ส่วนใหญ่ศึกษาการผสมข้ามของพืชเพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผสม เนื่องจากปัจจัยทางสภาพภูมิอากาศ เช่น อุณหภูมิสูง และความชื้น มีผลต่อความมีชีวิตของละอองเกสร จึงต้องมีวิธีการตรวจดูความมีชีวิตของละอองเกสรก่อนเริ่มทำการผสม (Wendy *et al.*, 2002) อะซีโตคามีนกลีเซอรอลเจลลี่ (acetocarmine glycerol jelly) เป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อการทดสอบความสมบูรณ์ของไซโตพลาสซึม และละอองเกสรจะย้อมติดสีแดงก็ต่อเมื่อเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมนั้นมีความสมบูรณ์ ซึ่งบ่งบอกถึงละอองเกสรที่มีชีวิต ในขณะเดียวกันละอองเกสรที่ไซโตพลาสซึมไม่ย้อมติดสีแดงหรือชมพูแปลว่าละอองเกสรนั้นไม่มีชีวิต (Marks, 1954) เจษฎา และคณะ (2553) กล่าวว่าความมีชีวิตของละอองเกสรและเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสรมีความสำคัญต่อกระบวนการผสมเกสรและการปฏิสนธิมากที่สุด จากการศึกษาการตอบสนองต่ออุณหภูมิสูงของข้าวในกระบวนการสร้างผลผลิต พบว่า อุณหภูมิสูงมีผลในช่วงดอกบานของข้าว ส่งผลทำให้ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสรลดลงซึ่งสอดคล้องกับจำนวนที่ลดลงของละอองเกสรที่ตกและงอกบนยอดเกสรตัวเมียทำให้โอกาสการผสมติดมีน้อยลง

กร และคณะ (2558) ทำการศึกษาความมีชีวิต และการงอกของละอองเกสรพืชดอก 15 ชนิด โดยจากการทดสอบความมีชีวิตด้วยการย้อมสีอะซีโตคาร์มีน 5 % พบว่าละอองเกสรของเฟื่องฟ้ามีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงสุด (98.3 %) และดาวกระจายมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตต่ำที่สุด (16.5 %) และมีพืชเพียง 5 ชนิด ที่สามารถงอกได้ในสารละลายน้ำตาลซูโครส โดยในพุดเศรษฐีสยามมีอัตราการงอกสูงที่สุด (83.4 %) ในขณะที่เข็มแดงมีอัตราการงอกต่ำที่สุด (23.0 %)

วิลาส (2553) กล่าวว่าปัจจัยในการงอกของหลอดละอองเกสรมีหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น อายุของละอองเกสร พันธุกรรม สภาพภูมิอากาศ แสง อุณหภูมิ ความชื้น และน้ำตาล เนื่องจากในธรรมชาติยอดเกสรตัวเมียจะขับสารที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลจากเซลล์ผิวซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถชักนำให้เกิดการงอกของหลอดละอองเกสรได้ โดยจะรักษาสมดุลของน้ำทั้งภายในและภายนอกของเซลล์ละอองเกสร และเป็นอาหารของละอองเกสร ส่วนประกอบในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงละอองเกสรควรจะประกอบด้วยแคลเซียมซึ่งช่วยในการคงสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ให้สมบูรณ์ (Van, 1965) ร่วมด้วยโบรอนซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืชรวมไปถึงปัจจัยในการงอกและเจริญของหลอดละอองเกสร (Qinli *et al.*, 2003 ; Stangoulis *et al.*, 2001) จากการศึกษาของหยกทิพย์ (2550) พบว่าระดับความเข้มข้นของน้ำตาล 10 % ร่วมกับอาหารสังเคราะห์เหมาะสมที่สุดต่อการงอกหลอดละอองเกสรของพืชในสกุล *Curcuma*

Feruzan *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาการงอกหลอดละอองเกสรของพืชที่แตกต่างกัน 7 ชนิด โดยใช้สารละลายซูโครส 10 % ร่วมกับกรดบอริก 0.01 % และเลี้ยงไว้ให้งอกด้วยเทคนิค

hanging drop พบว่าละอองเกสรของ *Anthirrinum majus* มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุด 80 % ใน *Linaria vulgaris'*da มีเปอร์เซ็นต์การงอก 70 % ใน *Cyclamen hederiforum* มีเปอร์เซ็นต์การงอก 30 % ใน *Lonicera fragratissima* มีเปอร์เซ็นต์การงอก 15 % และใน *Ecballium elaterium* มีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำที่สุด 5 % ส่วนใน *Malva sylvestris* และ *Yucca filamentosa* ไม่พบการงอกหลอดละอองเกสร

การผสมเกสรและการติดผล

ในการผสมเกสรปทุมมาจะอยู่ในช่วงเวลา 8.00 – 10.00 น. โดยการนำเอาละอองเกสรจากพันธุ์พ่อไปแตะบนยอดเกสรเพศเมีย (สุรวิช, 2539) โดยอับละอองเกสรจะแตกออกตามแนวยาวในเช้าของวันที่ดอกจริงบานซึ่งจะบานเพียง 1 วัน (อัครา, 2549) ยอดเกสรเพศเมียจะมีลักษณะแตกต่างกันตามแต่ชนิดของพืช สามารถสังเกตได้จากการมีน้ำหวานหรือสารข้นเหนียวที่มีไว้เพื่อล่อแมลงและจับละอองเกสร เมื่อละอองเกสรตกลงบนเกสรเพศเมียแล้วจะสร้างหลอดละอองเกสรลงไปในก้านชูเกสรเพศเมียเพื่อไปผสมกับไข่ (กฤษฎา, 2544) Shinichi (2001) พบว่า ละอองเกสรของขิงเตตราพลอยด์ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 20 องศาเซลเซียส และสามารถงอกหลอดละอองเกสรลงไปในเกสรเพศเมียได้มีประสิทธิภาพมากขึ้นที่อุณหภูมิ 17 องศาเซลเซียส ในสภาพความชื้นสัมพัทธ์ 100 % อายุผลเฉลี่ยที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างชนิดนั้นอยู่ระหว่าง 30 – 31.7 วัน (ประเดิม, 2542)

พรพรรณ (2551) กล่าวว่าเมื่อมีการติดผล พบว่า ผลมีสีเขียวในช่วง 3 วันหลังจากทำการผสม และผลจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ และเริ่มมองเห็นเอ็มบริโอขนาดเล็กในช่วง 15 – 24 วัน และในช่วง 27 – 33 วัน หลังจากทำการผสม เอ็มบริโอจะมีขนาดใหญ่ขึ้น เอนโดสเปิร์มมีสีขาวขุ่น และเยื่อหุ้มเมล็ดเริ่มเปลี่ยนจากสีขาวไปเป็นสีน้ำตาล

ประเดิม (2542) ได้ทำการศึกษาการผสมข้ามชนิดในพืชสกุล *Curcuma* พบว่าคู่ผสมที่อยู่ในกลุ่มปทุมมามีอัตราการผสมติดสูงที่สุดในคู่ผสมระหว่าง เทพลำลึก x ช่อมรกต อยู่ที่ 70 % และในคู่ผสมกลุ่มกระเจียวที่มีอัตราการผสมติดสูงที่สุดคือ กระเจียว x กระเจียวแดง, กระเจียวแดง x พลอยชมพู และฉัตรทิพย์ x พลอยทักษิณ อยู่ที่ 60 % ซึ่งอัตราการผสมติดสามารถบ่งบอกถึงความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมของคู่ผสม และพบว่าคู่ผสมที่มีอัตราการผสมติดสูงจะเป็นพืชในกลุ่มเดียวกัน

การผสมข้าม

ลูกผสมที่เกิดจากการผสมพืชต่างชนิดหรือต่างสกุลในธรรมชาติไม่ค่อยพบหรืออาจพบไม่บ่อยนัก เนื่องจากเหตุผลหลายประการ เช่น ลักษณะทางพันธุกรรม ช่วงเวลาการออกดอกที่ต่างกัน รวมไปถึงจำนวนโครโมโซมที่ต่างกัน ดังนั้น เมื่อนำมาผสมกันละอองเกสรอาจไม่สามารถงอกได้หรืองอกช้าจนไม่สามารถเข้าผสมได้ หรืออาจมีการผสมเกิดขึ้นและไข่เจริญไปเป็นเอ็มบริโอแล้ว แต่เอ็มบริโอไม่สามารถเจริญไปเป็นเอ็มบริโอหรือเจริญเติบโตเป็นพืชปกติได้ ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการผสมพืชข้ามสกุล (กฤษฎา, 2546 ; สุทัศน์, 2552) Kalloo (1988) กล่าวว่าเพื่อให้การผสมข้ามในพืชมีโอกาสประสบผลสำเร็จ ในการผสมพันธุ์ควรใช้พืชหลาย ๆ พันธุ์ เนื่องจากบางพันธุ์อาจจะผสมข้ามชนิดได้ดีกว่าบางพันธุ์ และควรทำการผสมสลับพ่อสลับแม่ เพราะมีพืชหลายชนิดที่ทำการผสมกันได้ โดยใช้เป็นต้นพ่อหรือต้นแม่เพียงอย่างเดียว (unilateral incompatibility) นอกจากนี้ สามารถใช้ละอองเกสรจากต้นแม่เพียงเล็กน้อยผสมตัวเองก่อนนำละอองเกสรจากต้นพ่อเข้าผสม Deyan *et al.* (2010) ได้ทำการศึกษาการผสมข้ามสกุลระหว่าง *Opisthopappus taihangensis* และ *Chrysanthemum lavandulifolium* โดยการผสมแบบสลับพ่อสลับแม่ (reciprocal) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การติดผล 20 %

การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อช่วยชีวิตลูกผสม

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (embryo culture) นั้นถูกนำมาใช้เพื่อช่วยเลี้ยงเมล็ดที่ไม่มีเอนโดสเปิร์ม หรือเลี้ยงเอ็มบริโอของลูกผสมที่ได้จากการผสมพืชต่างชนิดหรือต่างสกุลเพื่อให้เกิดการพัฒนาและสามารถเจริญเป็นต้นกล้าได้ (บุญยืน, 2544) โดยการนำเอาส่วนของเอ็มบริโอออกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ก่อนที่เอ็มบริโอนั้นจะฝ่อหรือหยุดการพัฒนา เนื่องจากเอ็มบริโอของลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามนั้น ส่วนใหญ่ไม่สามารถงอกได้ซึ่งเกิดจากความไม่สมดุลของเอนโดสเปิร์มในเมล็ด และปัญหาที่เกิดจากการเข้ากันไม่ได้ของชุดพันธุกรรมของพืชที่ใช้ผสมกัน นอกจากนั้นลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามชนิด (interspecific) จะมีปัญหาทางพันธุกรรม (genetic barriers) ซึ่งเกิดได้ 2 ระยะ คือ ระยะก่อนการผสมเกสร เช่น การสร้างสารพิษมายับยั้งการงอกของละอองเกสรบนยอดเกสรเพศเมียก่อนที่หลอดละอองเกสรจะงอก ขณะงอกลงไปภายในท่อนำไข่ หรือภายในรังไข่ และระยะหลังการผสมเกสร เช่น การพัฒนาของเอ็มบริโอที่ผิดปกติไป เกิดการยับยั้งการพัฒนาของเอนโดสเปิร์มในระยะแรก ทำให้เอ็มบริโอไม่สามารถพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอและเมล็ดที่สมบูรณ์ได้ (รังสฤษดิ์, 2545) หรือเอ็มบริโอของลูกผสมข้ามไม่สามารถพัฒนาต่อได้ในระยะเริ่มต้น (Tanaka and Watanabe, 1972, Deng *et al.*, 2010 ; Tang *et al.*, 2009) การใช้วิธีการเพาะเลี้ยงรังไข่ (ovary rescue) นั้นสามารถช่วยชีวิตลูกผสมได้ (Deng *et al.*, 2010 ; Tang *et al.*, 2009) เช่น

Fangping *et al.* (2011) ได้ศึกษาการผสมพืชข้ามสกุลระหว่าง *Dendranthema nankingense* และ *Tanacetum vulgare* โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงรังไข่ พบว่า จากการเพาะเลี้ยงทั้งหมด 420 รังไข่ สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ 27 ต้น และทั้งหมดเป็นลูกผสมข้ามสกุล Rahim และคณะ (2012) ศึกษาการผสมข้ามสกุลระหว่าง *Streptocarpella* และ *Saintpaulia ionantha* โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ พบว่าได้ลูกผสมที่มีความหลากหลายของลักษณะกลีบดอกและสีสามารถผลิตเป็นไม้ดอกไม้ประดับได้

การตรวจสอบลูกผสมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

การตรวจสอบด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี (Random amplified polymorphic DNA; RAPD) สามารถนำมาประยุกต์ในการตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์สิ่งมีชีวิต รวมไปถึงการตรวจสอบ พ่อ แม่ และลูกผสม เพื่อทดสอบให้แน่ใจว่าลูกผสมที่ได้เกิดจากการผสมระหว่างพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ที่แท้จริง (เรือนแก้ว, 2553) จากการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) สามารถใช้แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่าง และบอกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างตัวอย่างได้ โดยเปรียบเทียบความเหมือนและแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น (สุรินทร์, 2552) ซึ่งเทคนิคนี้ถูกนำมาใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์อย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน สามารถทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบค่อนข้างต่ำ เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้มีไม่มากเมื่อเทียบกับวิธีการอื่น (สุรีพร, 2546)
โดยมีขั้นตอนดังนี้

Denature คือ การแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90 – 95 องศาเซลเซียส

Annealing คือ การที่ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิประมาณ 36 – 60 องศาเซลเซียส

Extension คือ กระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยการทำงานของดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรสใช้อุณหภูมิประมาณ 70-73 องศาเซลเซียส (อรรัตน์, 2548)

Mia *et al.* (2014) ทำการศึกษาความหลากหลายของลักษณะทางจีโนไทป์ของ *Zingiber officinale* Roscoe. โดยเทคนิค RAPD โดยใช้ทั้งหมด 12 ไพรเมอร์ มีเพียง 3 ไพรเมอร์คือ OPA-05, OPC-01 และ OPE-02 สามารถบ่งบอกความหลากหลายโดยแสดงแถบดีเอ็นเอจากทั้งหมด 16 แถบ พบว่ามี 10 แถบที่แสดงลักษณะ polymorphic

ธีรนิติ (2555) ได้ทำการตรวจสอบลูกผสมระหว่างปทุมมาในกลุ่ม Curcuma และ Eucurcuma ด้วยเทคนิค RAPD โดยการสุ่มไพรเมอร์ทั้งหมด 70 ไพรเมอร์ พบว่ามีเพียง 1 ไพรเมอร์ คือ OPU 14 (5'-TGGGTCCCTC-3') ที่สามารถพิสูจน์ลูกผสมที่เกิดจาก *C. alismatifolia* และ *C. aurantiaca* ได้

Hussain *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของพันธุกรรมใน *Curcuma* โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าไพรเมอร์ OPC-20, OPO-06, OPC-01 และ OPL-03 เหมาะสมในการจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรม

เทคนิค Microsatellites หรือ Simple Sequence Repeats (SSRs) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการศึกษาด้านจีโนม การจำแนกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต เป็นต้น เนื่องจากเป็นการเรียงต่อเนื่องกันของลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำกันประมาณ 1- 4 คู่เบส หรือไม่เกิน 10 คู่เบส ซึ่งมีกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนมและมีความแปรปรวนมากรวมไปถึงจำนวนซ้ำที่แตกต่างกันในพืชต่างสายพันธุ์จึงทำให้สามารถแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เช่นเดียวกัน ซึ่งสามารถบอกความแตกต่างของ heterozygous และ homozygous ได้ (อรรัตน์, 2548)

Sigrist *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของพืชกลุ่มขมิ้นในประเทศบราซิล โดยการเก็บตัวอย่างพันธุกรรมพืชทั้งหมด 39 ตัวอย่างจาก 5 รัฐในประเทศบราซิลมาจำแนกด้วยเครื่องหมาย SSRs ทั้งหมด 17 แบบ พบว่าสามารถจำแนกได้ออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ ซึ่งสามารถบ่งบอกถึงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมในแต่ละสายพันธุ์ได้

Shakeel *et al.* (2006) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชในวงศ์ Zingiberaceae ทั้งหมด 14 จีโนไทป์ จาก 3 สกุล ได้แก่ *Zingiber, Alpinia* และ *Curcuma* ด้วยเครื่องหมาย microsatellite ของข้าว 12 แบบ มีไพรเมอร์ 10 แบบ ที่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของพืชทั้งสามสกุลนี้ได้ และพบว่า แบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม โดย *Curcuma* และ *Alpinia* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 (cluster I) และกลุ่มที่ 2 (cluster II) ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ 3 (cluster III) และกลุ่มที่ 4 (cluster IV) เป็นลักษณะจีโนไทป์ที่ได้จากสกุล *Zingiber*

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การศึกษาละอองเกสรและความสามารถในการผสมเกสร

วัสดุและอุปกรณ์

1. พืชในสกุลย่อย *Paracurcuma* ที่ใช้ทดลอง จำนวน 2 ชนิด คือ *C. alismatifolia*, ใช้ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ Big red และ Snow white (ภาพที่ 1)

Big red (B) Snow white (Sw)

ภาพที่ 1 ลักษณะช่อดอกของ *C. alismatifolia*

C. aurantiaca ใช้ในการศึกษา 5 สายพันธุ์ (ภาพที่ 2) ได้แก่ Auran 02, Auran 06, Auran08, พลอยทักษิณ (PS) และพลอยไพลิน (EPL)

Auran 02 Auran 06 Auran 08

พลอยทักษิณ (PS)

พลอยไพลิน (EPL)

ภาพที่ 2 ลักษณะช่อดอกของ *C. aurantiaca*

2. พืชในสกุลย่อย *Curcuma* (ภาพที่ 3) ได้แก่ *C. myanmaensis* สีขาว (บัวเข็มขาว) และสีชมพู (บัวเข็มชมพู)

บัวเข็มขาว

บัวเข็มชมพู

ภาพที่ 3 ลักษณะช่อดอกของ *C. myanmaensis*

3. พืชในสกุลย่อย *Ecomatae* ได้แก่ *C. supraneeana* (ภาพที่ 4)

สุปราณี

ภาพที่ 4 ลักษณะช่อดอกของ *C. supraneeana*

4. อุปกรณ์ในการทดสอบความมีชีวิต ความงอกของละอองเกสร และความสามารถในการงอกของหลอดละอองเกสรภายในท่อนำไข่ของเกสรตัวเมีย ได้แก่ ละอองเกสร (pollen), จานแก้ว (petri dish), กระจกสไลด์ (slide), หลอดหยด (droper), กระจกปิดสไลด์ (cover slip), ปากคีบปลายแหลม (forceps), กล่องพลาสติก (plastic box), น้ำกลั่น (distilled water), ใบมีดผ่าตัด (razor blade), กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) (Nikon ALPHAPHOT – 2 YS2) และกล้องฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence microscope; Nikon Eclipse 80i Epi-Fl Attachment)

5. สารเคมีในการทดลอง ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 4 โมลลาร์, สีย้อม Aniline blue ความเข้มข้น 0.01 โมลลาร์, สีย้อม Acetone carmine ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และสารเคมีที่ใช้สำหรับเลี้ยงละอองเรณู (Baloch *et al.*, 2001) ประกอบด้วย $(CaNO_3)_2$ 0.3 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4$ 0.14 กรัมต่อลิตร, H_3BO_3 0.05 กรัมต่อลิตร และน้ำตาล 100 กรัมต่อลิตร

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสร

พืชที่ใช้ในการผสมจะถูกนำมาศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสร โดยใช้ปลายมีดผ่าตัดเขี่ยละอองเกสรมาไว้บนสไลด์หยดด้วย Acetone carmine ความเข้มข้น 1 % ประมาณ 5 – 10 นาที จากนั้นนำสไลด์มาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope; Nikon ALPHAPHOT – 2 YS2) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 10 สายพันธุ์ (สิ่งทดลอง) ได้แก่ Big red, Snow white, Auran 02, Auran 06, Auran 08, พลอยทักษิน (PS), พลอยไพลิน (EPL), สุปราณี, บัวเข็มขาว และบัวเข็มชมพู โดยทำการทดลองสิ่งทดลองละ 3 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำทำการสุ่มนับความมีชีวิตของละอองเกสรจำนวน 5 ตำแหน่งต่อ 1 สไลด์

การบันทึกข้อมูล

เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต โดยคำนวณจาก

$$\frac{\text{จำนวนละอองเกสรที่ติดสี}}{\text{จำนวนละอองเกสรที่ทำการนับทั้งหมด}} \times 100$$

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (statistical analysis system) โดยใช้ Model CRD และแสดงผลในรูปของตาราง ANOVA ถ้าการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจึงจะทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละค่าสังเกตโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

2. การศึกษาความงอกของละอองเกสร

โดยใช้ปลายมีดผ่าตัดเขี่ยละอองเกสรมาไว้บนสไลด์จากนั้นหยดด้วยอาหารสังเคราะห์ที่ผสมกับสารละลายน้ำตาลความเข้มข้น 10% ตามการทดลองของหยกทิพย์ (2550) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นทำวิธีการ hanging drop technique นำมาไว้ในกล่องที่มีสภาพความชื้นสูงเป็นเวลา 3 – 5 ชั่วโมง จากนั้นนำสไลด์ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope; Nikon ALPHAPHOT – 2 YS2) เพื่อดูการงอกของหลอดละอองเกสร วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) โดยใช้สายพันธุ์เป็นสิ่งทดลองทั้งหมด 10 สิ่งทดลอง ได้แก่ Big red, Snow white, Auran 02, Auran 06, Auran 08, พลอยทักษิน (PS), พลอยไพลิน (EPL), สุปราณี, บัวเข็มขาว และบัวเข็มชมพู สิ่งทดลองละ 3 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำทำการสุ่มนับการงอกของละอองเกสรจำนวน 5 ตำแหน่งต่อ 1 สไลด์

การบันทึกข้อมูล

เปอร์เซ็นต์ความงอกของละอองเกสร โดยคำนวณจาก

$$\frac{\text{จำนวนละอองเกสรที่งอก}}{\text{จำนวนละอองเกสรที่ทำการนับทั้งหมด}} \times 100$$

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (statistical analysis system) โดยใช้ Model CRD และแสดงผลในรูปของตาราง ANOVA ถ้าการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจึงจะทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละค่าสังเกตโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3. การศึกษาความสามารถในการงอกหลอดละอองเกสรภายในท่อนำไข่ของเกสรเพศเมีย

ทำการผสมเกสรของดอกเป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนของเกสรเพศเมีย คือ ส่วนตั้งแต่ยอดเกสรไปจนถึงรังไข่ มาแช่ใน โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 4 โมลลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ทำการย้อมด้วยสี Aniline blue ความเข้มข้น 0.01 โมลลาร์ เป็นเวลา 5-10 นาที หลังจากนั้นนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (fluoresence microscope; Nikon Eclipse 80i Epi-Fl Attachment)

การบันทึกข้อมูล

ตรวจสอบความสามารถในการงอกหลอดละอองเกสรบนยอดเกสรและภายในท่อนำไข่ของเกสรเพศเมีย แล้วทำการบันทึกภาพ

การทดลองที่ 2 การศึกษาการติดผลและเมล็ดของลูกผสม

วัสดุและอุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในการผสมเกสร ได้แก่ วัสดุปลายแหลม, ดินสอ (pencil), สมุดบันทึกคู่ผสม (notebook) , ป้าย (tag) คู่ผสมที่ศึกษาทั้งหมด 10 คู่ผสม ได้แก่
C. aurantiaca x *C. myanmaensis*, *C. alismatifolia* x *C. myanmaensis*,
C. aurantiaca x *C. supraneeana*, *C. alismatifolia* x *C. supraneeana*,
C. myanmaensis x *C. aurantiaca*, *C. myanmaensis* x *C. alismatifolia*,
C. supraneeana x *C. aurantiaca*, *C. supraneeana* x *C. alismatifolia*,
C. supraneeana x *C. myanmaensis* และ *C. myanmaensis* x *C. supraneeana*

2. อุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหารสังเคราะห์เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอและเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง, เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH - meter), หม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ (autoclave), เครื่องคนสาร (magnetic stirrer), บีกเกอร์ (beaker), ไปเปท (pipette), ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ (laminar flow), จานแก้ว (petri-dish), มีดผ่าตัด (razor blade), ปากคีบปลายแหลม (forceps) และตะเกียงแก๊ส (gas burner)

3. สารเคมีในการทดลองได้แก่ แอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และ 90 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใช้สำหรับฆ่าเชื้อในพืชก่อนนำมาเพาะเลี้ยง สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในระยะเอ็มบริโอของพืช ได้แก่ 6- Benzylaminopurine (BAP), Naphthaleneacetic acid (NAA) และ Gibberellin acid (GA_3) ใช้อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962) ในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอและเนื้อเยื่อพืช (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 สูตรอาหารของ Murashige and Skoog (1962)

สารเคมี	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
KH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	16.9
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6
KI	0.83
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
$CoCl_2. \cdot 6H_2O$	0.025
Na_2 - EDTA	37.25
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.85
Glycine	2.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine-HCl	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Sucrose	30,000

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) จำนวน 10 คู่ผสม (สิ่งทดลอง) ในแต่ละสิ่งทดลองทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำทำการผสมเกสรจำนวน 20 ดอก โดยทำการผสมข้ามชนิดกันระหว่างสกุลย่อย *Paracurcuma, Curcuma* และ *Ecomatae* โดยการผสมแบบสลับพ่อสลับแม่ (reciprocal cross) คู่ผสมที่ศึกษาทั้งหมด 10 กลุ่มคู่ผสม ได้แก่ *C. aurantiaca* x *C. myanmaensis*, *C. alismatifolia* x *C. myanmaensis*, *C. aurantiaca* x *C. supraneeana*, *C. alismatifolia* x *C. supraneeana*, *C. myanmaensis* x *C. aurantiaca*, *C. myanmaensis* x *C. alismatifolia*, *C. supraneeana* x *C. aurantiaca*, *C. supraneeana* x *C. alismatifolia* *C. supraneeana* x *C. myanmaensis* และ *C. myanmaensis* x *C. supraneeana*

2. หลังจากที่พืชมีการติดผลจะนำเมล็ดที่ได้มาฟอกด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 1 % เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วอีก 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ซับเมล็ดด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วและผึ่งไว้ในตู้ laminar flow ประมาณ 30 นาที แล้วทำการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (embryo culture) โดยนำเอ็มบริโอมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ให้เกิดการพัฒนาภายในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

การบันทึกข้อมูล

1. เปอร์เซ็นต์การติดผล โดยคำนวณจาก

$$\frac{\text{จำนวนผลที่ได้}}{\text{จำนวนดอกที่ผสมทั้งหมด}} \times 100$$

2. จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล โดยคำนวณจาก

$$\frac{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมดในแต่ละคู่ผสม}}{\text{จำนวนผลทั้งหมดในแต่ละคู่ผสม}}$$

3. เปอร์เซ็นต์การงอกของลูกผสม โดยคำนวณจาก

$$\frac{\text{จำนวนลูกผสมที่ได้}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะเลี้ยงทั้งหมดในแต่ละคู่ผสม}} \times 100$$

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (statistical analysis system) โดยใช้ Model CRD และแสดงผลในรูปของตาราง ANOVA ถ้าการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจึงจะทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละค่าสังเกตโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 3 การตรวจสอบลูกผสมด้วยเทคนิค RAPD

วัสดุและอุปกรณ์

1. พืชที่ใช้เป็นแม่ พ่อ ทั้ง 3 สกุลย่อย และลูกผสมที่ได้จากคู่ผสมที่ศึกษาทั้งหมด 10 คู่ผสม ได้แก่ *C. aurantiaca* x *C. myanmaensis*, *C. alismatifolia* x *C. myanmaensis*, *C. aurantiaca* x *C. supraneeana*, *C. alismatifolia* x *C. supraneeana*, *C. myanmaensis* x *C. aurantiaca*, *C. myanmaensis* x *C. alismatifolia*, *C. supraneeana* x *C. aurantiaca*, *C. supraneeana* x *C. alismatifolia*, *C. supraneeana* x *C. myanmaensis* และ *C. myanmaensis* x *C. supraneeana*

2. อุปกรณ์สำหรับสกัดดีเอ็นเอ เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction) และเจลอิเลคโตรโฟเรซิส (gel electrophoresis) ได้แก่ ถุงมือ (rubber gloves), แอลกอฮอล์ (alcohol), เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge), เครื่อง Spin down, เครื่องพีซีอาร์, เครื่องให้กระแสไฟฟ้า (power supply), อ่างรันเจล (chamber), หลอด (eppendrof tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร, หลอด ขนาด 0.2 มิลลิลิตร, ไมโครไปเปท (micropipette), จานแก้ว (petri-dish), มีดผ่าตัด (razor blade), ปากคีบปลายแหลม (forceps) และเครื่องส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (UV) (geldoc transluminator)

3. สารเคมีต่างๆ ที่ใช้สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

3.1. 2x Extraction buffer ประกอบด้วย

- 0.6 โมลลาร์ NaCl
- 0.1 โมลลาร์ Tris-HCl (pH 7.5)
- 40 มิลลิโมลลาร์ EDTA (pH 8.0)
- 1% SDS

3.2. 1x Extraction buffer ประกอบด้วย

- 1 เท่าของปริมาตร 2x Extraction buffer
- 5 โมลลาร์ Urea
- 10 มิลลิโมลลาร์ 2-Mercaptoethanol
- 10% Phenol
- น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วสำหรับปรับปริมาตร

3.3. 24:1 Chloroform : Iso-amyl alcohol ประกอบด้วย

- 24 เท่าของปริมาตร Chloroform
- 1 เท่าของปริมาตร Iso-amyl alcohol

3.4. TE buffer ประกอบด้วย

- 10 มิลลิโมลลาร์ Tris-HCl (pH 7.6-8.0)
- 1 มิลลิโมลลาร์ EDTA (pH 8.0)

4. ไพรเมอร์ที่ใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างสกุลย่อย ได้แก่ S21 (5'-CAGGCCCTTC-3'), S26 (5'-GGTCCCTGAC-3'), S27 (5'-GAAACGGGTG-3'), S29 (5'-GGGTAACGCC-3'), S33 (5'-CAGCACCCAC-3'), S62 (5'-GTGAGGCGTC-3'), S65 (5'-GATGACCGCC-3'), S67 (5'-GTCCCGACGA-3'), S68 (5'-TGGACCGGTG-3'), S77 (5'-TTCCCCCCAG-3'), S80 (5'-ACTTCGCCAC-3'), OPU 3 (5'-CTATGCCGAC-3'), OPU 5 (5'-TTGGCGGCCT-3'), OPU 6 (5'-ACCTTTGCGC-3'), OPU 7 (5'-CCTGCTCATC-3'), OPU 12 (5'-TCACCAGCCA-3'), OPU 13 (5'-GGCTGGTTCC-3'), OPU 14 (5'-TGGGTCCCTC-3'), OPU 16 (5'-CTGCCCTGGA-3'), OPA 1 (5'-CAGGCCCTTC-3'), OPA 5 (5'-AGGGGTCTTG-3'), OPA 8 (5'-GTGACGTAGG-3'), OPA 9 (5'-GGGTAACGCC-3'), HB 12 (5'-CACCACCACGC-3'), HB 13 (5'-GAGGAGGAGGC-3'), HB 14 (5'-CTCCTCCTCGC-3') และ HB 15 (5'-GTGGTGGTGGC-3')

5.ตรวจสอบความเป็นลูกผสม

วิธีการดำเนินงานวิจัย

ทำการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะแถบ DNA ของลูกผสมกับสายพันธุ์แม่และสายพันธุ์พ่อ โดยทำการเก็บตัวอย่างใบอ่อนและนำมาสกัดดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่ และลูกผสมข้ามสกุลย่อยที่ศึกษาทั้งหมด 10 คู่ผสม ได้แก่ *C. aurantiaca* x *C. myanmaensis*, *C. alismatifolia* x *C. myanmaensis*, *C. aurantiaca* x *C. supraneeana*, *C. alismatifolia* x *C. supraneanae*, *C. myanmaensis* x *C. aurantiaca*, *C. myanmaensis* x *C. alismatifolia*, *C. supraneeana* x *C. aurantiaca*, *C. supraneeana* x *C. alismatifolia*, *C. supraneeana* x *C. myanmaensis* และ *C. myanmaensis* x *C. supraneeana*

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

นำใบอ่อนของพืชที่ต้องการตรวจสอบมาทำการบดร่วมกับ extraction buffer จนชิ้นส่วนใบอ่อนของพืชละเอียด เติม 24 : 1 Chloroform : Iso-amyl alcohol ลงไป 3-4 เท่าของปริมาตร เขย่าแรงๆ 20 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 12,000 - 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายใสด้านบน (supernatant) ด้วย tip ที่ตัดปลายออกเพื่อป้องกันสายดีเอ็นเอขาด ใส่ลงในหลอด (tube) อันใหม่ เติม Ethanol 95 % ที่อุณหภูมิ 4 องศา-เซลเซียส 2 เท่าของปริมาตร supernatant ทำการกลับหลอดขึ้นลง (up side down) ช้าๆ 2-3 ครั้ง และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงอีกรอบด้วยความเร็ว 12,000 - 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารที่เป็นน้ำทิ้งให้หมด ทำการล้างด้วย Ethanol 95% ตามด้วย Ethanol 70% แล้วจึงนำหลอดมาคว่ำบนกระดาษที่นึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อให้ดีเอ็นเอแห้ง หลังจากนั้นจึงทำการละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer ขั้นตอนสุดท้ายทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส หลังจากนั้นจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ต่าง ๆ เพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการคัดเลือกลูกผสมข้ามสกุลย่อย

เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction)

ผสมดีเอ็นเอตัวอย่างกับบัฟเฟอร์และไพรเมอร์ นำไปใส่ในเครื่องพีซีอาร์ โดยใช้ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1. ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (predenaturing)

ขั้นตอนที่ 2. ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (denaturing)

ขั้นตอนที่ 3. ที่อุณหภูมิ 34-37 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (annealing)

ขั้นตอนที่ 4. ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที (extension)

ขั้นตอนที่ 5. ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (extension)

โดยจะให้ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 จนถึงขั้นตอนที่ 4 เป็นจำนวน 40-45 รอบ จากนั้นตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ โดยการทำ เจลอิเล็คโตรโฟรีซิส

การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอโดยการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (UV) (geldoc transluminator) บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอของพ่อ แม่ และลูกผสม

การทดลองที่ 4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูกผสม

วัสดุและอุปกรณ์

1. พืชที่ใช้เป็นแม่ พ่อ ทั้ง 3 สกุลย่อย และลูกผสมที่ได้จากคู่ผสมที่ศึกษาทั้งหมด 10 คู่ผสม ได้แก่ *C. aurantiaca* x *C. myanmaensis*, *C. alismatifolia* x *C. myanmaensis*, *C. aurantiaca* x *C. supraneeana*, *C. alismatifolia* x *C. supraneeana*, *C. myanmaensis* x *C. aurantiaca*, *C. myanmaensis* x *C. alismatifolia*, *C. supraneeana* x *C. aurantiaca*, *C. supraneeana* x *C. alismatifolia*, *C. supraneeana* x *C. myanmaensis* และ *C. myanmaensis* x *C. supraneeana*

2. อุปกรณ์สำหรับการนำมาปรับสภาพต้นกล้าให้เข้ากับสภาพแวดล้อม (acclimatization) ได้แก่ ถาดหลุม (tray), แกลบดำ (rice husk ash) และทราย (sand)

3. อุปกรณ์สำหรับปลูก ได้แก่ กระถาง (pot) ขนาด 8 นิ้ว และ 12 นิ้ว, ดิน (soil), ทราย (sand), แกลบ (rice husk), แกลบดำ (rice husk ash), มูลวัว (manure), ปุ๋ยละลายช้า (controlled release fertilizer) และ ปุ๋ยเคมี (chemical fertilizer)

4. อุปกรณ์ในการเก็บข้อมูล ได้แก่ กล้อง (camera), ไม้บรรทัด (ruler) และผ้าสีดำ (backdrop)

วิธีการดำเนินการวิจัย

นำต้นกล้าลูกผสมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอมาทำการปรับสภาพให้เข้ากับสภาพแวดล้อมโดยให้น้ำแบบพ่นฝอยเป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายลงในกระถาง 8 นิ้ว ที่มีส่วนผสมของวัสดุปลูก ลูกผสมที่แข็งแรงและเจริญเติบโตดีจะถูกย้ายลงกระถาง 12 นิ้ว เพื่อให้เจริญเติบโตต่อจนออกดอก แล้วจึงทำการบันทึกข้อมูล

การบันทึกข้อมูล

บันทึกภาพเพื่อนำมาศึกษาลักษณะของ ความสูง ช่อดอก ดอก และใบ ของต้นแม่ ต้นพ่อ และลูกผสม

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การศึกษาละอองเกสรและความสามารถในการผสมเกสร

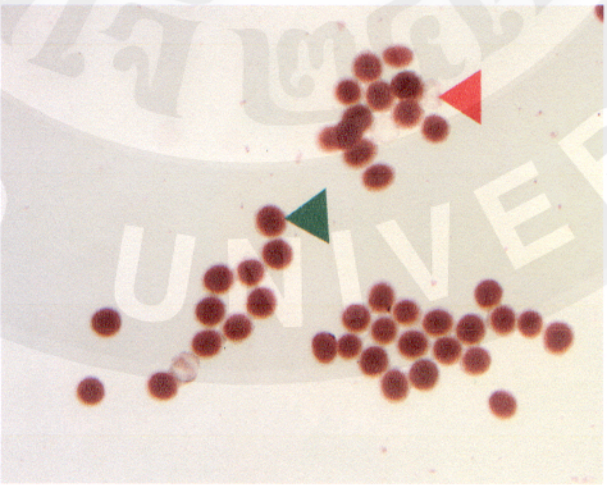
1.1 การศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสร

จากการศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสรของพืชในสกุล *Curcuma* จำนวน 3 สกุลย่อยคือ

สกุลย่อย *Paracurcuma* มี 2 ชนิด ได้แก่ *C. alismatiforlia* จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ Big red (B) และ Snow white (Sw) และ *C. aurantiaca* จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ Auran 02, Auran 06, Auran08, พลอยทักษิณ (PS) และพลอยไพลิน (EPL)

สกุลย่อย *Curcuma* คือ *C. myanmaensis* 2 สายพันธุ์ คือ บัวเข็มขาว และบัวเข็มชมพู

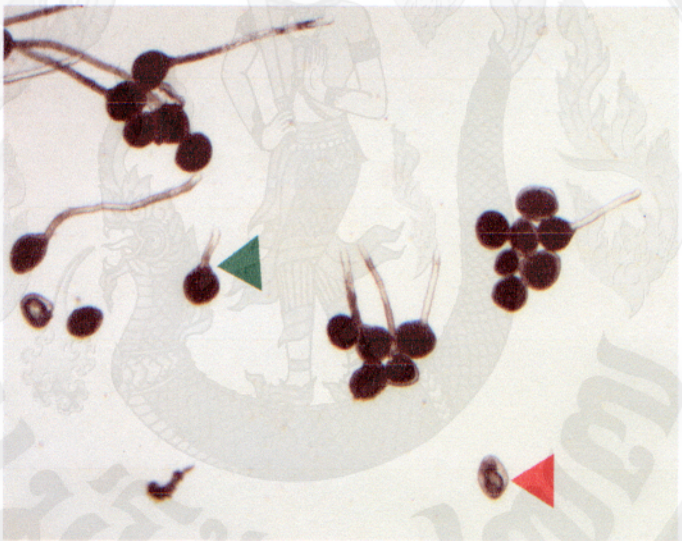
สกุลย่อย *Ecomatae* คือ *C. supraneeana* (สุปราณี) พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยสายพันธุ์ที่มีความมีชีวิตของละอองเกสรสูง ได้แก่ บัวเข็มขาว, สุปราณี, Auran 02, Auran 08, Snow white, Big red, บัวเข็มชมพู และ Auran 06 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของละอองเกสร 97.67, 96.19, 95.61, 92.53, 88.67, 88.21, 86.67 และ 86.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ พลอยทักษิณ (PS) และพลอยไพลิน (EPL) มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของละอองเกสรต่ำ โดยมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของละอองเกสร 27.20 และ 20.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2)



ภาพที่ 5 การติดสีแดงของละอองเกสรที่มีชีวิต (สามเหลี่ยมสีเขียว) และไม่มีชีวิต (สามเหลี่ยมสีแดง)

1.2 การศึกษาความงอกของละอองเกสร

จากการศึกษาการงอกหลอดละอองเกสรของพืชในสกุล *Curcuma* ทั้ง 10 สายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงละอองเกสรที่ประกอบด้วยน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยสายพันธุ์ Auran 08 และ Auran 02 มีการงอกของหลอดละอองเกสรสูง คือ 61.71 และ 59.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมา คือ Snow white, บัวเข็มขาว และบัวเข็มชมพู มีเปอร์เซ็นต์การงอกหลอดละอองเกสร 33.51, 32.99 และ 32.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสรต่ำที่สุดคือ พลอยทักษิณ (PS) พลอยไพลิน (EPL) และสุปราณี มีเปอร์เซ็นต์การงอกหลอดละอองเกสร 2.04, 3.45 และ 10.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2)



ภาพที่ 6 ลักษณะของละอองเกสรที่ถือว่างอก (สามเหลี่ยมสีเขียว) และละอองเกสรที่ฝ่อไม่งอก (สามเหลี่ยมสีแดง)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและความสามารถในการงอกของละอองเกสรของพืชสกุล *Curcuma* จำนวน 10 สายพันธุ์

สายพันธุ์	ความมีชีวิตของละอองเกสร (%)	ความสามารถในการงอกของละอองเกสร (%)
C. aurantiaca (02)	95.61[a]	59.47[a]
C. aurantiaca (06)	86.65[a]	29.24[bc]
C. aurantiaca (08)	92.53[a]	61.71[a]
C. aurantiaca (PS)	27.20[b]	3.04[d]
C. aurantiaca (EPL)	20.23[b]	2.45[d]
C. alismatifolia (Big red)	88.21[a]	29.45[bc]
C. alismatifolia (Snow white)	88.63[a]	33.50[b]
C. myanmaensis (บัวเข็มขาว)	97.67[a]	32.99[b]
C.myanmaensis (บัวเข็มชมพู)	86.67[a]	32.85[b]
C. supraneeana	96.19[a]	10.10[cd]
Sig.	**	**
C.V. (%)	**8.95**	**40.92**

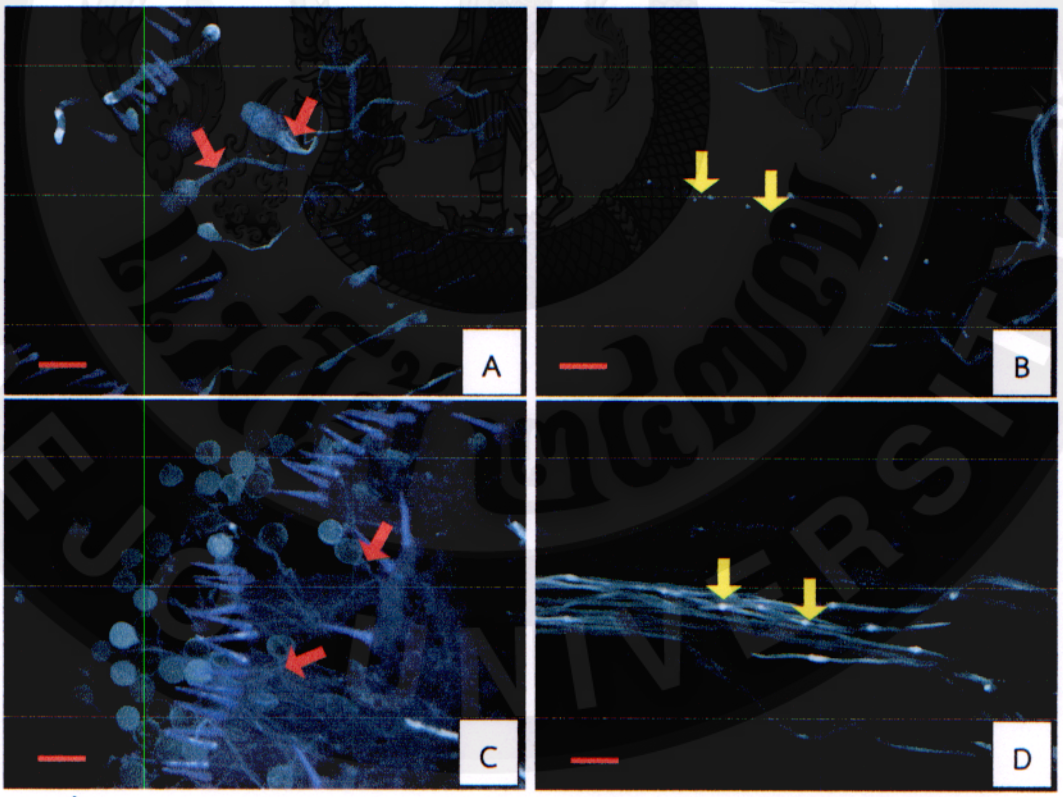
หมายเหตุ ** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกัน (สดมภ์เดียวกัน) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ตามการเปรียบเทียบแบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

1.3 การศึกษาความสามารถในการงอกหลอดละอองเกสรภายในท่อนำไข่ของเกสรเพศเมีย

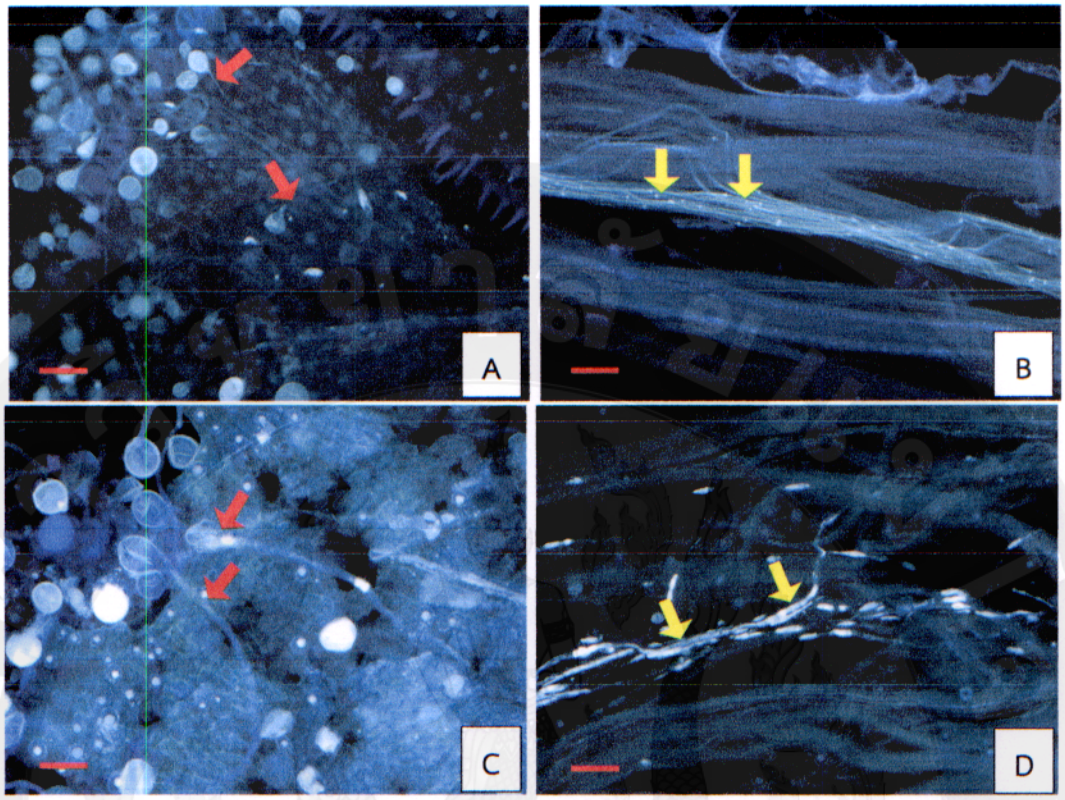
การศึกษาความสามารถในการงอกของหลอดละอองเกสรบนยอดเกสรเพศเมียและภายในท่อนำไข่ ของพืชในสกุลย่อย *Paracurcuma, Curcuma* และ *Ecomatae* ทั้งในการผสมตรงและผสมสลับ สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มการผสม ดังนี้

การผสมระหว่างสกุลย่อย *Paracurcuma* และ *Curcuma*

ในการผสมระหว่างสกุลย่อย *Paracurcuma* และ *Curcuma* พบว่า ละอองเกสรของพืชในสกุลย่อย *Paracurcuma* ได้แก่ *C. aurantiaca* และ *C. alismatifolia* สามารถงอกได้บนยอดเกสรเพศเมียของพืชในสกุลย่อย *Curcuma* ได้แก่ *C. myanmaensis* และลงไปในท่อนำไข่ได้ (ภาพที่ 7 A-D) เมื่อทำการผสมสลับโดยเอา *C. myanmaensis* เป็นพ่อ พบว่า ละอองเกสรสามารถงอกได้บนยอดเกสรเพศเมียและสามารถงอกลงไปภายในท่อนำไข่ของ *C. aurantiaca* และ *C. alismatifolia* ได้เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 8 A-D)



ภาพที่ 7 การงอกหลอดละอองเกสรบนยอดเกสรเพศเมีย (ลูกศรสีแดง) และภายในท่อนำไข่ของเกสรเพศเมีย (ลูกศรสีเหลือง) ภายหลังการผสมเกสรเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ของคู่ผสม *C. myanmaensis x C. aurantiaca* (A-B) และ *C. myanmaensis x C. alismatifolia* (C-D)

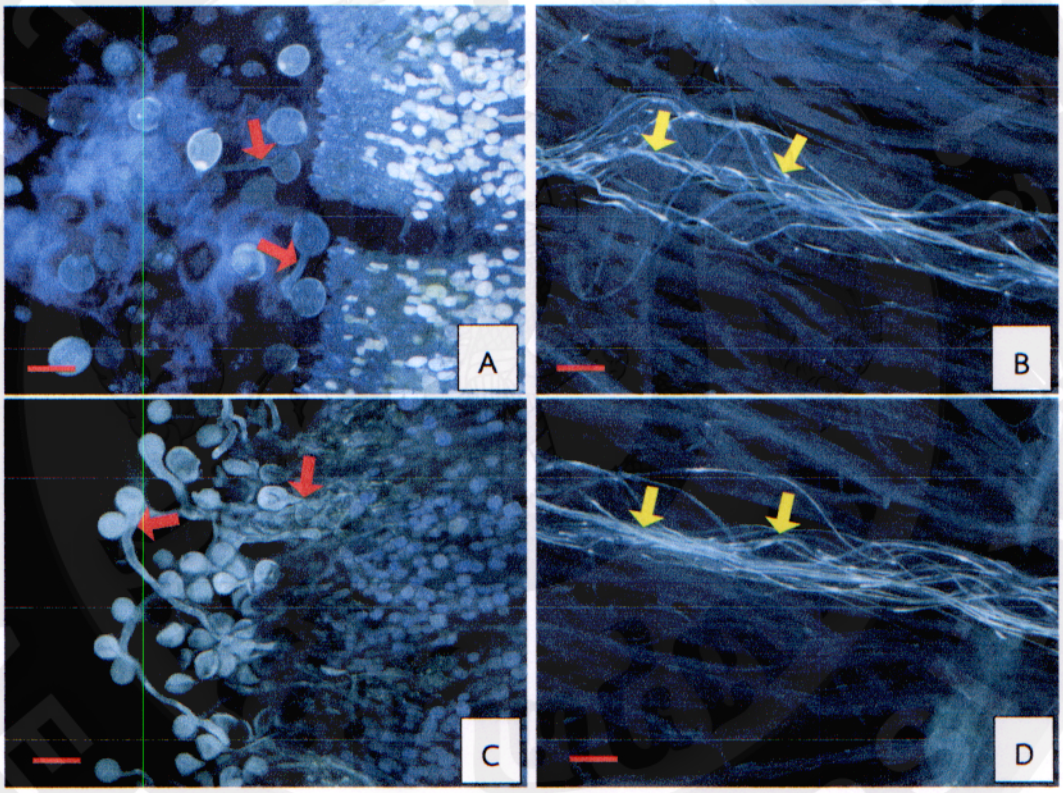


ภาพที่ 8 การงอกหลอดละอองเกสรบนยอดเกสรเพศเมีย (ลูกศรสีแดง) และภายในท่อนำไข่ของเกสรเพศเมีย (ลูกศรสีเหลือง) ภายหลังการผสมเกสรเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ของคู่ผสม *C. aurantiaca. x C. myanmaensis* (A-B) และ *C. alismatifolia x C. myanmaensis* (C-D)

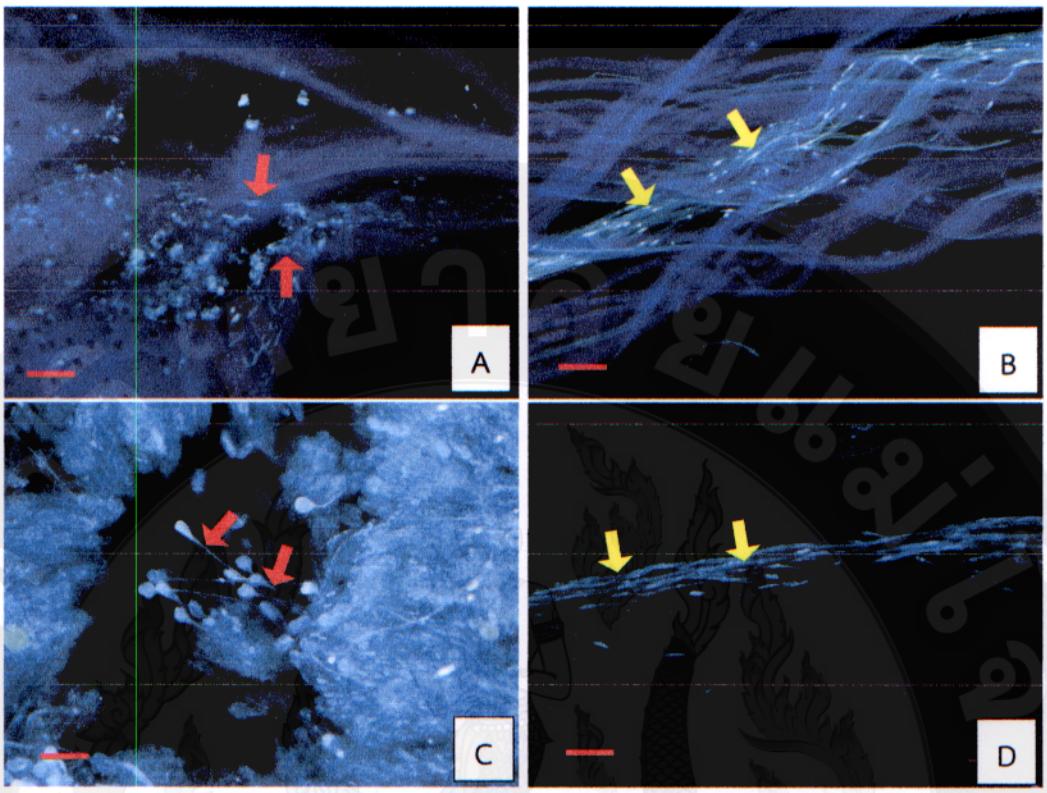
หมายเหตุ กำลังขยาย 200 เท่า, scale bar = 100 μm

การผสมระหว่างสกุลย่อย *Paracurcuma* และ *Ecomatae*

ในการผสมระหว่างสกุลย่อย *Paracurcuma* และ *Ecomatae* พบว่า เมื่อใช้พืชในสกุลย่อย *Paracurcuma* ได้แก่ *C. aurantiaca* และ *C. alismatifolia* เป็นพ่อ ละอองเกสรสามารถงอกได้บนยอดเกสรเพศเมียและลงไปภายในท่อนำไข่ของ *C. supraneeana* ที่อยู่ในสกุลย่อย *Ecomatae* ได้ (ภาพที่ 9 A-D) เมื่อทำการผสมสลับโดยเอา *C. supraneeana* เป็นพ่อ พบว่า ละอองเกสรสามารถงอกได้บนยอดเกสรเพศเมียและสามารถงอกลงไปภายในท่อนำไข่ของ *C. aurantiaca* และ *C. alismatifolia* ได้เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 10 A-D)



ภาพที่ 9 การงอกหลอดละอองเกสรบนยอดเกสรเพศเมีย (ลูกศรสีแดง) และภายในท่อนำไข่ของเกสรเพศเมีย (ลูกศรสีเหลือง) ภายหลังการผสมเกสรเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ของคู่ผสม *C. supraneeana x C. aurantiaca* (A-B) และ *C. supraneeana x C. alismatifolia* (C-D)

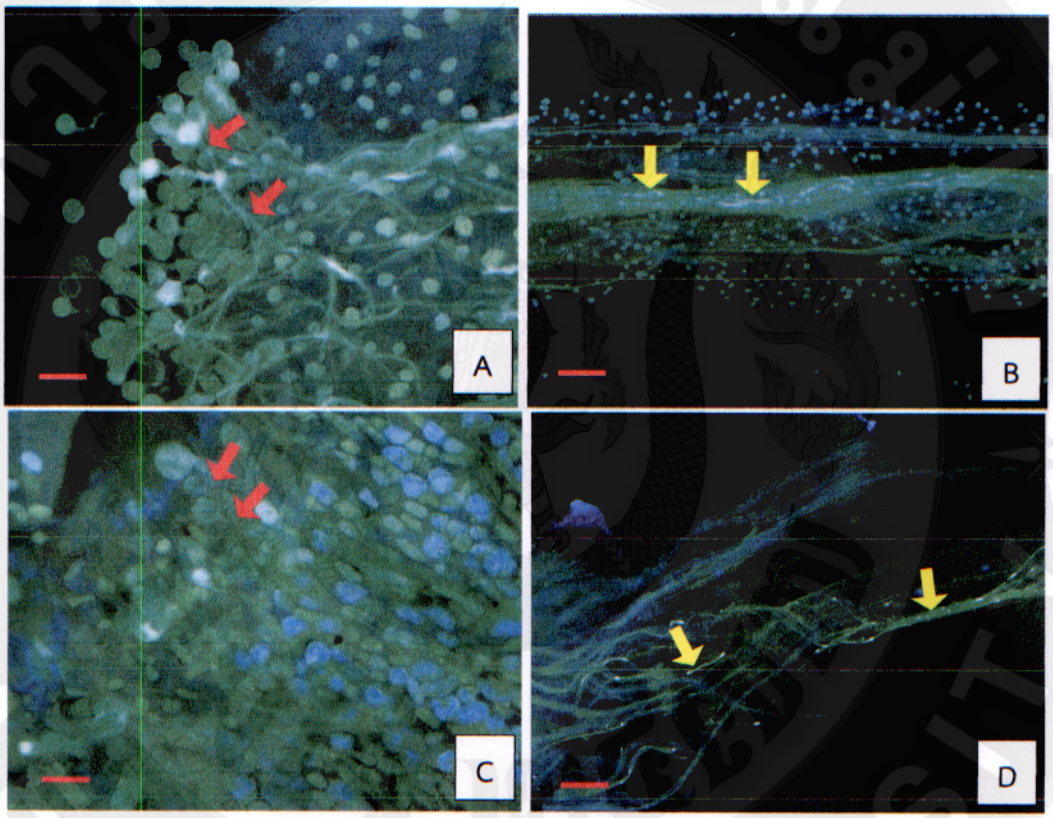


ภาพที่ 10 การงอกหลอดละอองเกสรบนยอดเกสรเพศเมีย (ลูกสรสีแดง) และภายในท่อนำไข่ของเกสรเพศเมีย (ลูกศรสีเหลือง) ภายหลังการผสมเกสรเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ของคู่ผสม *C. aurantiaca* x *C. supraneeana* (A-B) และ *C. alismatifolia* x *C. supraneeana* (C-D)

หมายเหตุ กำลังขยาย 200 เท่า, scale bar = 100 μm

การผสมระหว่างสกุลย่อย *Curcuma* และ *Ecomatae*

ในการผสมเกสรโดยใช้พืชในสกุลย่อย *Curcuma* คือ *C. myanmaensis* เป็นพ่อ พบว่า ละอองเกสรสามารถงอกได้บนยอดเกสรเพศเมียและละอองเกสรสามารถงอกลงไปภายในท่อนำไข่ของพืชในสกุลย่อย *Ecomatae* ได้ ซึ่งการทดลองนี้ใช้ *C. supraneeana* (ภาพที่ 11 A-B) และเมื่อทำการสลับโดยนำ *C. supraneeana* มาเป็นพ่อ พบว่า ละอองเกสรสามารถงอกบนยอดเกสรเพศเมียและหลอดลงไปในท่อนำไข่ของ *C. myanmaensis* ได้เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 11 C-D)



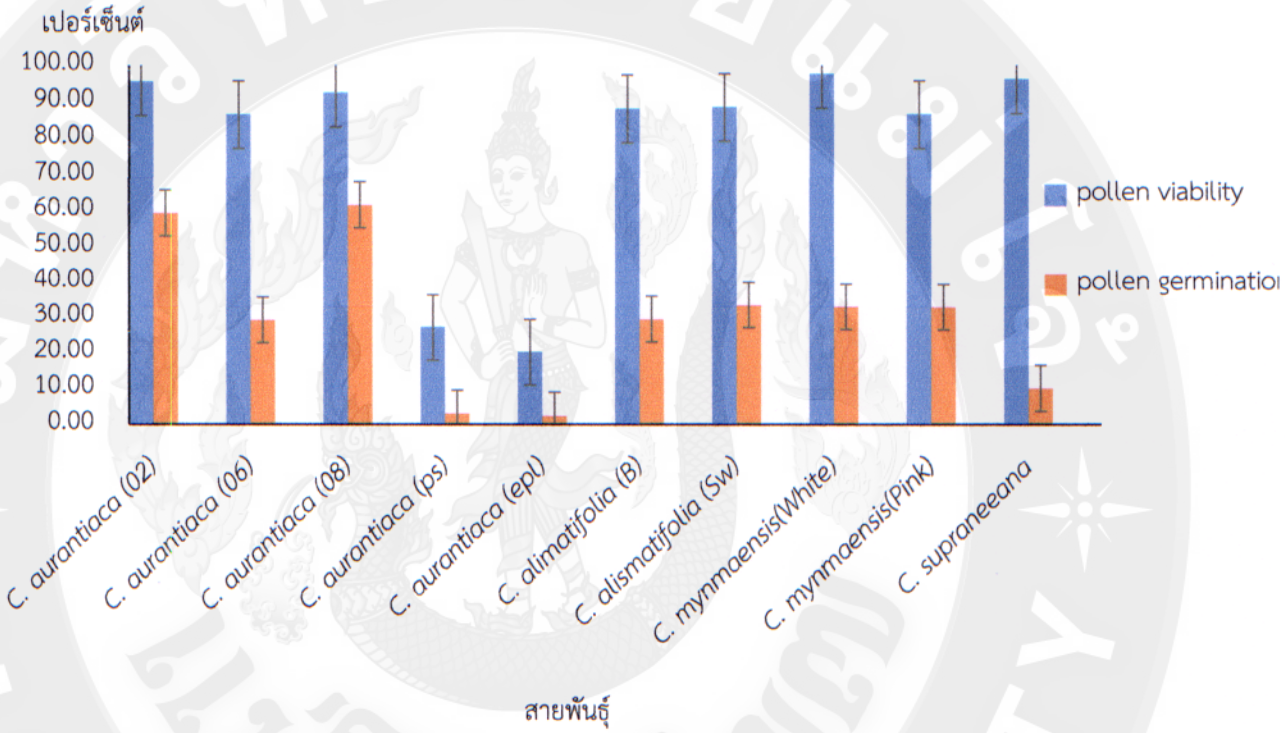
ภาพที่ 11 การงอกหลอดละอองเกสรบนยอดเกสรเพศเมีย (ลูกศรสีแดง) และภายในท่อนำไข่ของเกสรเพศเมีย (ลูกศรสีเหลือง) ภายหลังการผสมเกสรเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ของคู่ผสม *C.supraneeana x C. myanmaensis* (A-B) และ *C. myanmaensis x C. supraneeana* (C-D)

หมายเหตุ กำลังขยาย 200 เท่า, scale bar = 100 μm

จากการศึกษาความมีชีวิตของพืชในสกุล *Curcuma* จำนวน 3 สกุลย่อย พบว่า ละอองเกสรพืชทั้ง 3 สกุลย่อย เกือบทั้งหมดมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูง โดย สกุลย่อย *Curcuma* ได้แก่ *C. myanmaensis* สกุลย่อย *Ecomatae* ได้แก่ *C. supraneeana* สกุลย่อย *Paracurcuma* ได้แก่ *C. alismatifolia* และ *C. aurantiaca* สายพันธุ์ Auran 02, Auran 06 และ Auran 08 มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของละอองเกสรอยู่ในช่วง 86.67-97.67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในรายงานของธีรนิติ (2555) ที่ทำการศึกษาความมีชีวิตของพืชสกุล *Curcuma* จำนวน 8 ชนิด คือ *C. alismatifolia, C. paviflora, C. rhabdota, C. aurantiaca, C. angustifolia, C. cordata, C. roscoeana* และ *C. rubrobracteata* นั้นได้ผลใกล้เคียงกับการศึกษาในครั้งนี้ โดยพบว่า *C. alimatifolia* มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของละอองเกสรอยู่ที่ 94.74 เปอร์เซ็นต์ และ *C. aurantiaca* มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของละอองเกสร 61.04 เปอร์เซ็นต์ แต่ในการศึกษาได้ใช้ *C. aurantiaca* หลายสายพันธุ์ และพบว่า สายพันธุ์พลอยทักษิณและพลอยไพลินมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของละอองเกสรต่ำคือ 27.20 และ 20.23 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

การศึกษาการงอกหลอดของละอองเกสรในอาหารเลี้ยงละอองเกสร พบว่า สายพันธุ์ในแต่ละสกุลย่อยมีความสามารถในการงอกที่แตกต่างกันอยู่ในช่วง 2.45-61.71 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าสายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสรสูงจะอยู่ในสกุลย่อย *Paracurcuma* ได้แก่ *C. aurantiaca* สายพันธุ์ Auran 08 และ Auran 02 มีความสามารถในการงอกหลอดของละอองเกสร 61.71 และ 59.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างความมีชีวิตของละอองเกสรกับเปอร์เซ็นต์การงอกหลอดของละอองเกสรในพืชสกุล *Curcuma* ทั้ง 10 สายพันธุ์ (ภาพที่ 12) จะเห็นได้ว่ามีแนวโน้มไปในทางเดียวกันโดยสายพันธุ์ที่มีความมีชีวิตสูงจะมีเปอร์เซ็นต์ความงอกที่มากกว่า ในสายพันธุ์ที่ความมีชีวิตต่ำเปอร์เซ็นต์การงอกหลอดของละอองเกสรก็ต่ำลงด้วยเช่นกัน เมื่อพิจารณาสายพันธุ์ที่มีความมีชีวิตสูงซึ่งมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีความสามารถในการงอกของละอองเกสรที่ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีเพียงสายพันธุ์ *C. aurantiaca* (02) และ *C. aurantiaca* (08) ที่มีเปอร์เซ็นต์การงอกหลอดของละอองเกสรที่สูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นถึงความไม่สัมพันธ์กันของความมีชีวิตและความสามารถในการงอกของละอองเกสร กล่าวคือ การติดสีแดงจากการย้อมด้วย aceto-carmine ที่แสดงถึงความมีชีวิตของละอองเกสรนั้นไม่สามารถเป็นตัวบ่งชี้ถึงความสามารถในการงอกของละอองเกสรหรือความสามารถในการผสมเกสรได้ ซึ่งความไม่สัมพันธ์กันระหว่างความมีชีวิตและความสามารถในการงอกของละอองเกสรนี้ยังพบการรายงานในพืชอื่น เช่น ลิ้นจี่ ที่พบว่าเมื่อทำการทดสอบความมีชีวิตโดยการย้อมด้วย tetrazolium นั้นพบว่ามีความมีชีวิตของละอองเกสรสูง แต่เมื่อ

นำมาเลี้ยงในอาหารสูตร B&B's ที่มีน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ พบว่า ละอองเกสรมีเปอร์เซ็นต์ความงอกที่ลดลง (วรินทร์ และคณะ, 2545) และยังสอดคล้องกับการรายงานการศึกษาความมีชีวิตและความงอกของละอองเกสรฝรั่ง 9 สายพันธุ์ พบว่า ฝรั่งแต่ละพันธุ์มีแนวโน้มของความมีชีวิตมากกว่าความงอก ซึ่งอาจเนื่องมาจากละอองเกสรบางส่วนไม่สมบูรณ์เพียงพอที่จะสามารถงอกได้ แต่ยังมีองค์ประกอบทางเคมีภายในที่เพียงพอต่อการส่งผลให้ย้อมติดสีได้ (นพวรรณ และคณะ, 2558)



ภาพที่ 12 กราฟแท่งแสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและความสามารถในการงอกของละอองเกสรของพืชสกุล *Curcuma* จำนวน 10 สายพันธุ์

จากนั้นศึกษาความสามารถในการงอกของหลอดละอองเกสรบนเกสรเพศเมียและภายในท่อนำไข่ของการผสมข้ามสกุลย่อยของพืชทั้ง 3 สกุลย่อย ได้แก่ *Paracurcuma* (*C. aurantiaca, C. alismatifolia*), *Curcuma* (*C. myanmaensis*) และ *Ecomatae* (*C. supraneeana*) โดยการผสมแบบสลับพ่อสลับแม่ พบว่า ละอองเกสรของพืชทุกชนิดสามารถงอกบนยอดเกสรตัวเมียและงอกลงไปภายในท่อนำไข่ของพืชที่อยู่คนละสกุลย่อยได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการผสมข้ามชนิดในพืชสกุล *Curcuma* โดยพบว่าละอองเกสรของพืชในกลุ่ม Eucurcuma ได้แก่ *C. angustifolia, C. aurantiaca, C. cordata, C. roscoeana* และ *C. rubrobracteata* สามารถงอกบนยอดเกสรเพศเมียและงอกผ่านก้านชูเกสรเพศเมียของพืชในกลุ่ม Paracurcuma ได้เมื่อใช้ *C. alismatifolia* และ *C. parviflora* เป็นแม่ (ธีรนิติ, 2555) โดยวิธีการดูการงอกของละอองเกสรผ่านกล้องฟลูออเรส-เซนต์นั้นใช้ในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับอุปสรรคก่อนการผสมเกสร เช่น การยับยั้งการงอกของละอองเกสรบนยอดเกสรเพศเมีย ความสามารถในการงอกบนยอดเกสรเพศเมีย รวมไปถึงการดูความสามารถของการงอกลงไปภายก้านชูเกสรเพศเมียและเข้าไปยังไมโครไพล์ได้ จากการศึกษาครั้งนี้จึงแสดงให้เห็นว่าไม่พบอุปสรรคก่อนการผสมเกสรในการผสมข้ามสกุลย่อยระหว่าง *Paracurcuma, Curcuma* และ *Ecomatae* นอกจากนี้มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาโดยวิธีเดียวกันนี้ในพืชอื่นๆ เช่น การประสบความสำเร็จในการผสมข้ามชนิดในพืชสกุล *Corymbia* โดยสามารถสร้างลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่างสกุลย่อย *Blakella* กับ *C. citriodora* ชนิดย่อย *citriodora, C. citriodora* ชนิดย่อย *variegata, C. henryi* (กลุ่ม *Maculatae*) และ *C. tessellaris* (กลุ่ม *Abbreviatae*) และลูกผสมระหว่างสกุลย่อย *Corymbia* กับ *C. clarksoniana* และ *C. erythrophloia* (กลุ่ม *Septentrionales*) (Geoffrey *et. al.*, 2012)

การทดลองที่ 2 การศึกษาการติดผลและเมล็ดของลูกผสม

เปอร์เซ็นต์การติดผลจากการศึกษาการผสมเกสรโดยทำการผสมข้ามระหว่างสกุลย่อย *Paracurcuma, Curcuma* และ *Ecomatae* จำนวน 10 คู่ผสม (ตารางที่ 3) พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยคู่ผสมระหว่าง *C. aurantiaca. x C. myanmaensis* และ *C. aurantiaca x C. supraneeana* มีเปอร์เซ็นต์การติดผลมากที่สุด คือ 33.33 และ 16.67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ รองลงมาคือคู่ผสมระหว่าง *C. supraneeana x C. aurantiaca* มีเปอร์เซ็นต์การติดผล 11.67 เปอร์เซ็นต์ คู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia x C. supraneeana, C. alismatifolia x C. myanmaensis, C. myanmaensis x C. aurantiaca, C. myanmaensis x C. alismatifolia, C. supraneeana x C. myanmaensis* มีเปอร์เซ็นต์การติดผลต่ำคือ 6.67, 5.00, 1.67, 1.67 และ1.67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนคู่ผสมระหว่าง *C. supraneeana x C. alismatifolia* และ *C.myanmaensis x C. supraneeana* นั้นไม่สามารถผสมติด (ภาพที่ 13)

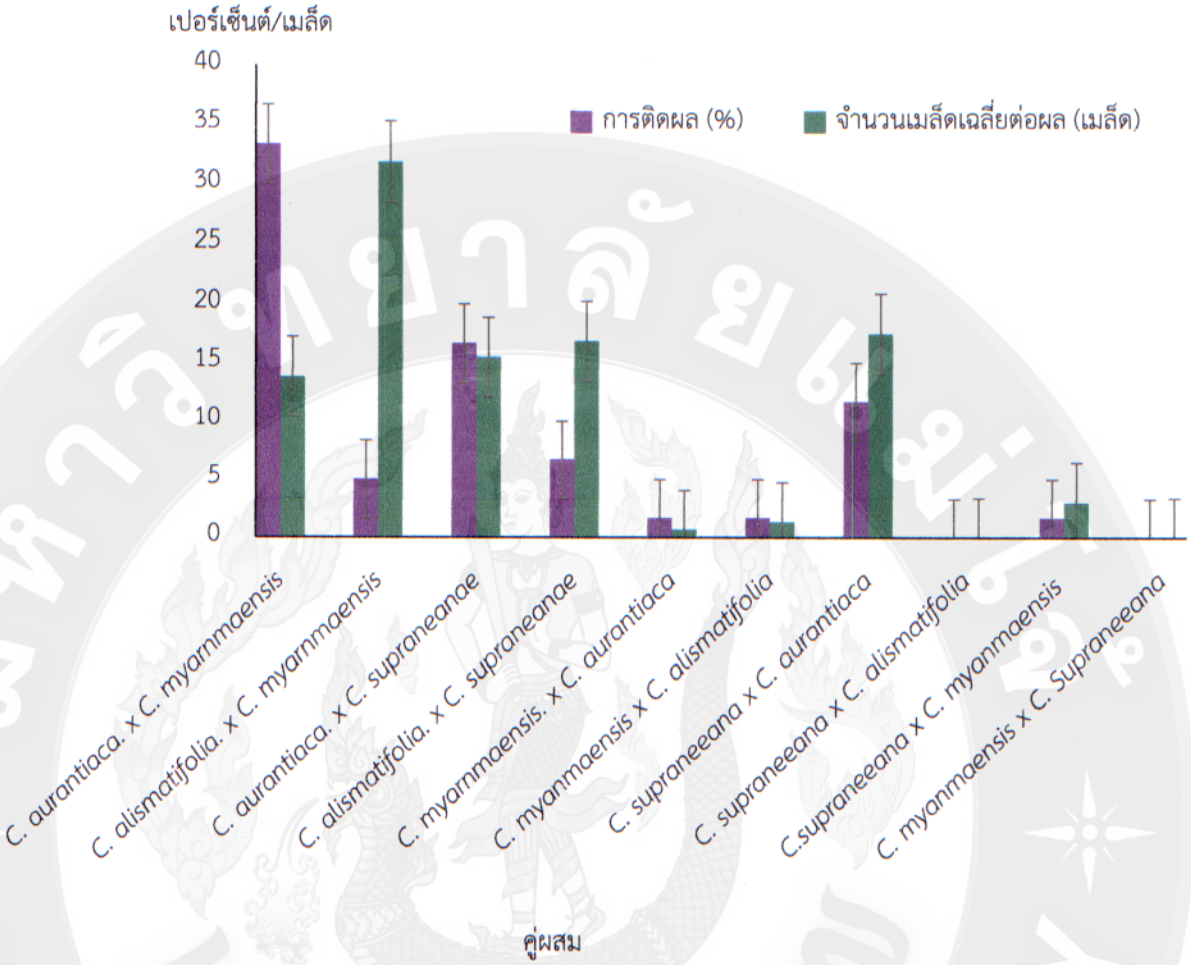
จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลจากการผสมข้ามระหว่างสกุลย่อย พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยคู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia x C. myanmaensi* และ *C. supraneeana x C. aurantiaca* มีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลมากที่สุด คือ 31.83 และ 17.44 เมล็ด ตามลำดับ รองลงมาคือคู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia x C. supraneeana, C. aurantiaca x C. supraneeana, C. aurantiaca x C. myanmaensis* มีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลคือ 16.83, 15.50 และ 13.81 เมล็ด ตามลำดับ คู่ผสมระหว่าง *C.supraneeana x C. myanmaensis, C. myanmaensis x C. alismatifolia, C. myanmaensis x C. aurantiaca* มีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลน้อยที่สุด คือ 3.00, 1.33 และ 0.67 เมล็ด ตามลำดับ ส่วนคู่ผสมระหว่าง *C. supraneeana x C. alismatifolia* และ *C. myanmaensis x C. supraneeana* ไม่ติดเมล็ด (ตารางที่ 3, ภาพที่ 13)

เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดลูกผสมจากการผสมข้ามระหว่างสกุลย่อย จะได้จากเมล็ดของผลที่มีการผสมติด พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 3) โดยคู่ผสมระหว่าง *C. supraneeana x C. aurantiaca* มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดลูกผสมสูงที่สุด คือ 42.75 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือคู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia x C. myanmaensis, C. myanmaensis x C. aurantiaca, C. aurantiaca x C. supraneeana, C. aurantiaca x C. myanmaensis, C. alismatifolia x C. supraneeana* มีเปอร์เซ็นต์การงอกของลูกผสม 24.03, 16.67, 14.79, 11.41 และ 9.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนคู่ผสมระหว่าง *C. myanmaensis x C. alismatifolia* และ *C. supraneeana x C. myanmaensis* เมล็ดลูกผสมไม่สามารถงอกได้

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การติดผล จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล และเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดลูกผสมของการผสมข้ามระหว่างสกุลย่อย *Paracurcuma, Curcuma* และ *Ecomatae* จำนวน 10 คู่ผสม

คู่ผสม	การติดผล (%)	จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล	การงอกของเมล็ดลูกผสม (%)
C. aurantiaca. x C. myanmaensis	33.33[a]	13.81[ab]	11.41[bc]
C. alismatifolia x C. myanmaensis	5.00[bcd]	31.83[a]	24.03[ab]
C. aurantiaca x C. supraneeana	16.67[a]	15.50[ab]	14.79[abc]
C. alismatifolia x C. supraneeana	6.67[bc]	16.83[ab]	9.02[bc]
C. myanmaensis x C. aurantiaca	1.67[cd]	0.67[c]	16.67[bc]
C. myanmaensis x C. alismatifolia	1.67[cd]	1.33[c]	0.00[c]
C. supraneeana x C. aurantiaca	11.67[ab]	17.44[a]	42.75[a]
C. supraneeana x C. alismatifolia	0.00[d]	0.00[c]	0.00[c]
C.supraneeana x C. myanmaensis	1.67[cd]	3.00[bc]	0.00[c]
C. myanmaensis x C. supraneeana	0.00[d]	0.00[c]	0.00[c]
Sig.	**	**	**
C.V. (%)	**31.89**	**46.96**	**54.75**

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกัน (สดมภ์เดียวกัน) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ตามการเปรียบเทียบแบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)



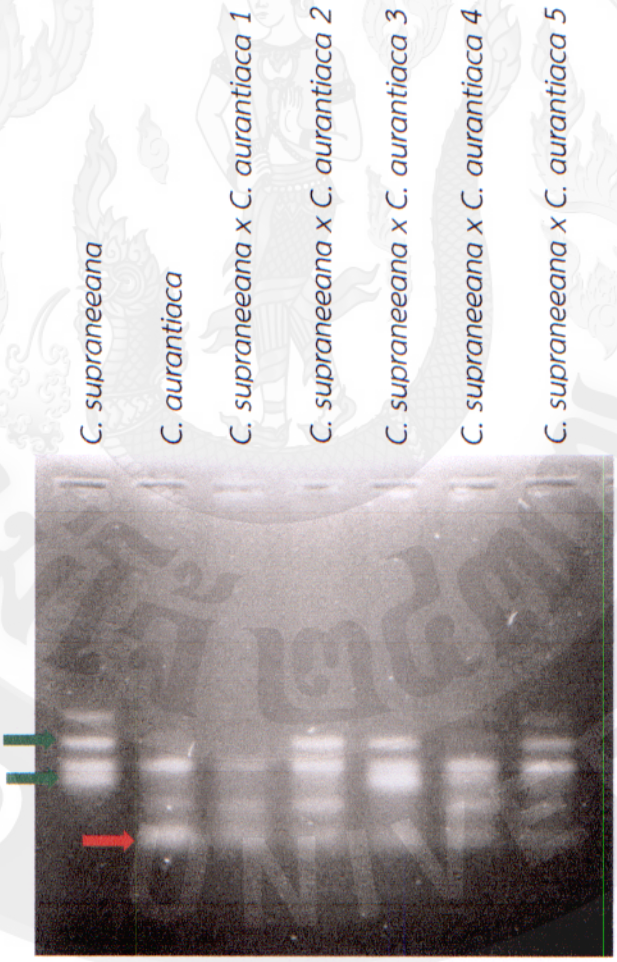
ภาพที่ 13 เปอร์เซ็นต์การติดผลและจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลของการผสมข้ามสกุลย่อยระหว่าง *Paracurcuma, Curcuma* และ *Ecomatae*

การผสมข้ามสกุลย่อย ทั้ง 10 คู่ผสม พบว่า คู่ผสมระหว่าง *C. aurantiaca* x *C. myanmaensis* และ *C. aurantiaca* x *C. supraneeana* มีการติดผลมากที่สุด รองลงมาคือคู่ผสมระหว่าง *C. supraneeana x C. aurantiaca* คู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia x C. supraneeana, C. alismatifolia x C. myanmaensis, C. myanmaensis x C. aurantiaca, C. myanmaensis x C. alismatifolia* และ *C. supraneeana x C. myanmaensis* มีเปอร์เซ็นต์การติดผลต่ำ ส่วนคู่ผสมระหว่าง *C. supraneeana x C. alismatifolia* และ *C. myanmaensis x C. supraneeana* นั้นไม่มีการผสม จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลในคู่ผสมที่มีการติดผลจะอยู่ระหว่าง 0.67- 31.83 เมล็ดต่อผล ซึ่งเปอร์เซ็นต์การติดผลที่ต่ำ อาจเกิดจากการไม่เท่ากันของจำนวนโครโมโซม โดยสกุลย่อย *Paracurcuma* ได้แก่ *C. alismatifolia* มีโครโมโซม 2n=32 และ *C. aurantiaca* มีจำนวนโครโมโซม 2n=42 (Jana Leong-Škorničková *et. al.*, 2007) สกุลย่อย *Curcuma* ในการศึกษาใช้ *C. myanmaensis* ซึ่งยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับจำนวนโครโมโซมของพืชชนิดนี้ Jana Leong-Škorničková *et al.* (2007) ได้รายงานความหลากหลายของพันธุกรรมพืชในสกุลย่อย *Curcuma* ว่ามีจำนวนโครโมโซมตั้งแต่ 2n=42 ไปจนถึง 2n=84 สกุลย่อย *Ecomatae* ในการศึกษานี้ได้ใช้ *C. supraneeana* ซึ่งยังไม่มีรายงานถึงจำนวนโครโมโซมที่แน่ชัดเช่นเดียวกัน มีเพียงข้อมูลของพืชในสกุลย่อยเดียวกันซึ่งสามารถนับจำนวนโครโมโซมสูงสุดได้ 2n=42 และอาจเกิดจากความห่างไกลทางพันธุกรรมโดยเมื่อแยกจากลักษณะความแตกต่างจะพบว่าพืชทุกชนิดถูกจัดอยู่คนละกลุ่ม (Eliška Záveská *et. al.*, 2012) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า สามารถได้ต้นลูกผสมจากคู่ผสมระหว่าง *C. aurantiaca* และ *C. myanmaensis, C. aurantiaca* และ *C. supraneeana* แสดงให้เห็นถึงความใกล้เคียงกันของจำนวนโครโมโซม คู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* และ *C. myanmaensis* สามารถได้ต้นลูกผสม แต่ต้นลูกผสมไม่แข็งแรงและตายในระหว่างทำการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (ภาพภาคผนวกที่ 4) ส่วนคู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* และ *C. supraneeana, C. supraneeana* และ *C. myanmaensis* นั้นผสมไม่ติด และผลเกิดการฝ่อ อาจเนื่องจากจำนวนโครโมโซมที่ต่างกันมาก จึงเกิดการเข้าคู่กันไม่ได้ของโครโมโซม หรือปัญหาของการเข้ากันไม่ได้ของคู่ผสม (cross incompatibility) ทำให้เอ็มบริโอของลูกผสมข้ามไม่สามารถพัฒนาต่อได้ในระยะเริ่มต้น (Tanaka and Watanabe, 1972; Deng *et al.*, 2010 ; Tang *et al.*, 2009)

เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดลูกผสมจากการผสมข้ามระหว่างสกุลย่อย พบว่า คู่ผสมระหว่าง *C. supraaneeana x C. aurantiaca* มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดลูกผสมสูงที่สุด คือ 42.75 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ในคู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia x C. myanmaensis, C. myanmaensis x C. aurantiaca, C. aurantiaca x C. supraneeana, C. aurantiaca x C. myanmaensis, C. alismatifolia x C. supraneeana* มีเปอร์เซ็นต์การงอกของลูกผสมต่ำ ส่วนคู่ผสมระหว่าง *C. myanmaensis x C. alismatifolia* และ *C. supraneeana x C. myanmaensis* เมล็ดลูกผสมไม่สามารถงอกได้ อาจเกิดจากความไม่สมดุลของเอนโดสเปิร์มในเมล็ด จึงต้องใช้เทคโนโลยีชีวภาพมาช่วยโดยพบว่าลูกผสมข้ามสามารถรอดชีวิตได้จากการช่วยชีวิตลูกผสมโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอหรือเพาะเลี้ยงรังไข่ (ovary) (Deng *et al*., 2010 ; Tang *et al*., 2009) หยกทิพย์ (2550) ได้รายงานเกี่ยวกับการศึกษาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ พบว่า ที่ระยะเวลา 28 วันหลังทำการผสมเอ็มบริโอสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้มากที่สุดคือ 60 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นหลังจากการผสมเป็นเวลา 28 วันจึงต้องนำไปทำการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาหลังจากการผสม แต่ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าเมล็ดของลูกผสมบางเมล็ดมีลักษณะฝ่อ หรือยังไม่เจริญในระยะที่สามารถนำมาเลี้ยงเอ็มบริโอได้ตามปกติ (28 วันหลังทำการผสม) ซึ่งอาจเกิดจากการที่เอ็มบริโอไม่สามารถเจริญไปเป็นต้นพืชปกติได้ (กฤษฎา, 2546) ถึงแม้ว่าละอองเกสรจะสามารถงอกหลอดละอองเกสรบนยอดเกสรเพศเมียและงอกลงไปภายในท่อนำไข่ได้ก็ตาม นอกจากนี้การที่เอ็มบริโอไม่เจริญไปเป็นต้น หรือเกิดการตายภายหลังที่มีการพัฒนาเป็นต้นแล้ว อาจเกิดจากสาเหตุทางพันธุกรรม เช่น การมี lethal gene และเอนโดสเปิร์มสร้างสารพิษหรือขาดสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญ (เฉลิมศรี, 2549)

การทดลองที่ 3 การตรวจสอบลูกผสมด้วยเทคนิค RAPD

การใช้เทคนิค RAPD ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของการผสมข้ามระหว่างสกุลย่อย 4 คู่ผสมจากทั้งหมด 10 คู่ผสม โดยการสุ่มไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ OPU 7 (5'-CCGTCTCATC-3') (ภาพที่ 14) สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *C. supraneeana, C. aurantiaca* และสามารถบ่งบอกความเป็นลูกผสมได้ โดยแถบดีเอ็นเอของแม่ *C. supraneeana* ที่ปรากฏจะอยู่สูงกว่าแถบดีเอ็นเอของพ่อ *C. aurantiaca* และจากการตรวจสอบ ลูกผสมแสดงแถบดีเอ็นเอที่อยู่ในตำแหน่งเดียวกันกับทั้งแถบดีเอ็นเอของแม่และแถบดีเอ็นเอของพ่อ



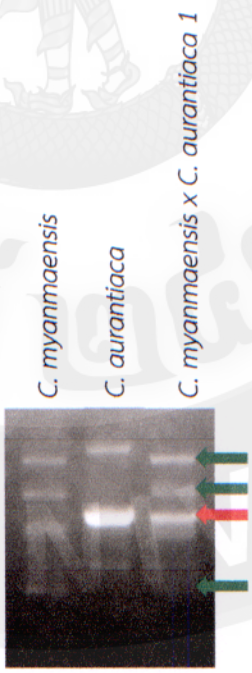
ภาพที่ 14 แถบดีเอ็นเอจาก RAPD-PCR ไพรเมอร์ OPU 7 (5'-CCGTCTCATC-3') แสดงแถบดีเอ็นเอ็นของแม่ (ลูกศรสีเขียว) และแถบดีเอ็นของพ่อ (ลูกศรสีแดง)

นอกจากนี้จากการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของคู่ผสมระหว่าง *C. aurantiaca* เป็นแม่ และ *C. supraneeana* เป็นพ่อ พบว่า ไพรเมอร์ S29 (5'-GGGTAACGCC-3') (ภาพที่ 15) สามารถแยกความแตกต่างได้โดยแถบดีเอ็นเอของแม่ที่ปรากฏจะอยู่สูงกว่าแถบดีเอ็นเอที่เป็นของพ่อ และลูกผสมแสดงแถบดีเอ็นเอที่อยู่ในตำแหน่งเดียวกับทั้งแถบดีเอ็นเอของพ่อและแถบดีเอ็นเอของแม่

ภาพที่ 15 แถบดีเอ็นเอจาก RAPD-PCR ไพรเมอร์ S29 (5'-GGGTAACGCC-3') แสดงแถบดีเอ็นเอ็นของแม่ (ลูกศรสีเขียว) และแถบดีเอ็นของพ่อ (ลูกศรสีแดง)

และไพรเมอร์ S65 (5'-GATGACCGCC-3') สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *C. aurantiaca, C. myanmaensis* และบ่งบอกความเป็นลูกผสมได้ทั้งการผสมตรงและสลับ (ภาพที่ 16 และภาพที่ 17) โดย พบว่า ลูกผสมแสดงแถบดีเอ็นที่อยู่ในตำแหน่งเดียวกับทั้งแถบดีเอ็นเอของแม่และแถบดีเอ็นเอของพ่อ

ภาพที่ 16 แถบดีเอ็นเอของลูกผสมระหว่าง *C. aurantiaca* (แม่) และ *C. myanmaensis* (พ่อ) ด้วย RAPD-PCR ไพรเมอร์ S65 (5'-GATGACCGCC-3') แสดงแถบดีเอ็นเอ็นของแม่ (ลูกศรสีเขียว) และแถบดีเอ็นของพ่อ (ลูกศรสีแดง)



ภาพที่ 17 แถบดีเอ็นเอของลูกผสมระหว่าง *C. myanmaensis* (แม่) และ *C. aurantiaca* (พ่อ) ด้วย RAPD-PCR ไพรเมอร์ S65 (5'-GATGACCGCC-3') แสดงแถบดีเอ็นเอ็นของแม่ (ลูกศรสีเขียว) และแถบดีเอ็นของพ่อ (ลูกศรสีแดง)

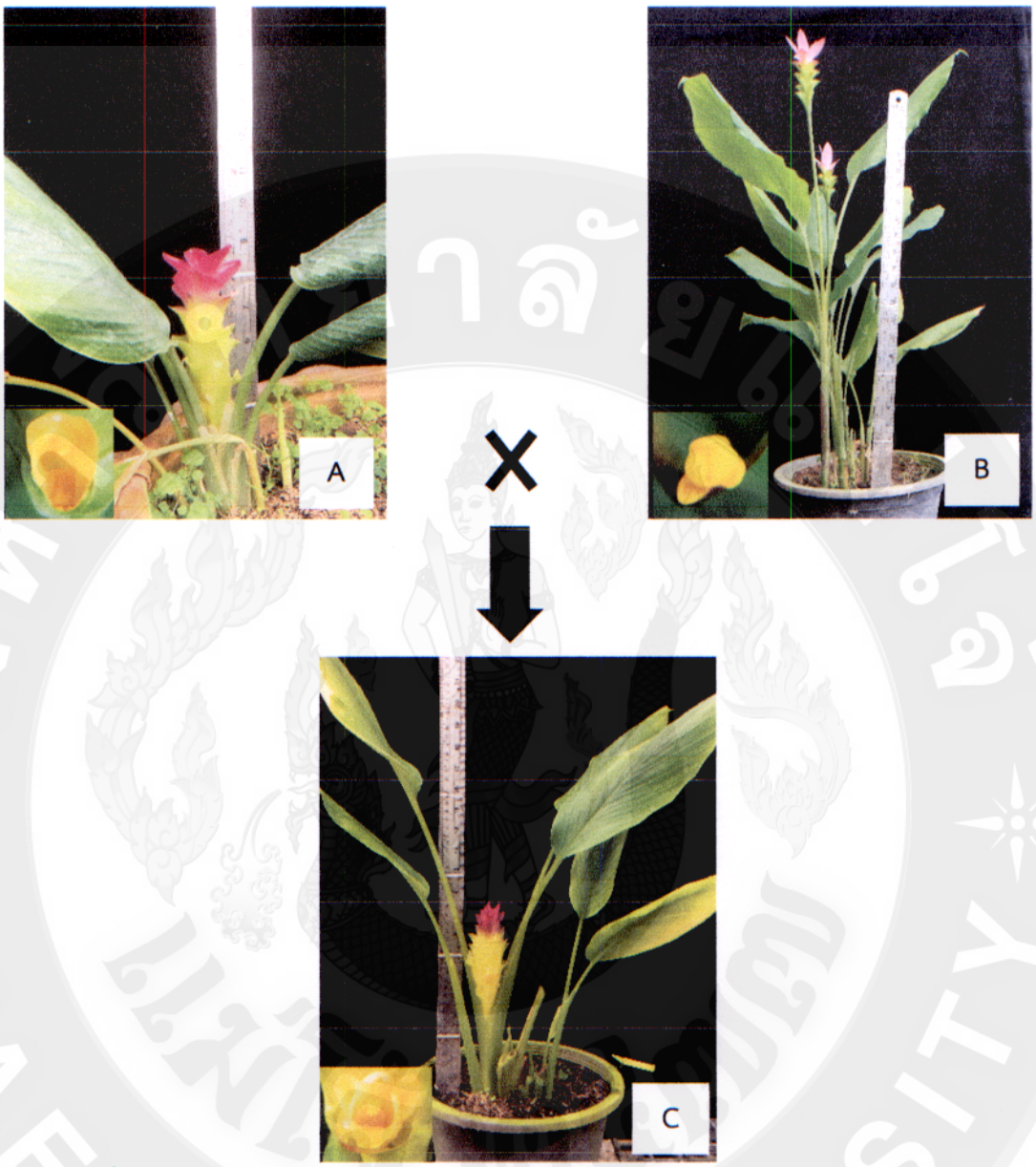
จากการตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยเทคนิค RAPD พบว่า ไพรเมอร์ OPU 7 (5'CCTGCTCATC-3') (ภาพที่ 14) สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *C. supraneeana*, *C. aurantiaca* และบ่งบอกความเป็นลูกผสมระหว่าง *C. supraneeana x C. aurantiaca* ได้ โดยที่แถบดีเอ็นเอของแม่และแถบดีเอ็นเอของพ่อที่แสดงออกนั้นจะอยู่ในตำแหน่งที่ต่างกัน และแถบดีเอ็นเอของลูกผสมมีการแสดงแถบดีเอ็นเอทั้งสองแถบที่ตำแหน่งเดียวกับแถบดีเอ็นเอของแม่และพ่อ และลูกผสมระหว่าง *C. aurantiaca x C. supraneeana* สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอของแม่และพ่อได้โดยใช้ ไพรเมอร์ S29 (5'-GGGTAACGCC-3') (ภาพที่ 15) ซึ่งลูกผสมสามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่อยู่ในตำแหน่งเดียวกันกับทั้งแถบดีเอ็นเอของแม่และพ่อได้ และไพรเมอร์ S65 (5'-GATGACCGCC-3') สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *C. aurantiaca* และ *C. myanmaensis* และบ่งบอกความเป็นลูกผสมระหว่าง *C. aurantiaca x C. myanmaensis* และ *C. myanmaensis x C. aurantiaca* ได้ ข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบและยืนยันความเป็นลูกผสมในพืชสกุล *Curcuma* เช่นเดียวกับ ธีรนิติ (2555) ที่ใช้เทคนิค RAPD ในการยืนยันความเป็นลูกผสม พบว่า ไพรเมอร์ OPU 14 (5'-TGGGTCCCTC-3') สามารถตรวจสอบความเป็นลูกผสมระหว่าง Paracurcuma และ Eucurcuma ได้ นอกจากนี้มีการรายงานเกี่ยวกับการใช้เทคนิค RAPD ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมในพืชอื่น ๆ ด้วย Chundet *et al.* (2007) รายงานเกี่ยวกับการตรวจสอบลูกผสมที่ได้จากการผสมแบบเปิดของลิ้นจี่ด้วยเทคนิค RAPD พบว่า ไพรเมอร์ OPL 11 (5'-TGGTGGACCA-3') สามารถแยกความแตกต่างลูกผสมระหว่างพันธุ์จักรพรรดิ์และกิมเจ็งได้ และมีรายงานการจำแนกพันธุ์และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลำไยจำนวน 22 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD ทำการคัดเลือกไพรเมอร์มาใช้จำนวน 26 ไพรเมอร์ จากไพรเมอร์ทั้งหมด 87 ไพรเมอร์ พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 190 แถบ ซึ่งมีแถบดีเอ็นที่แตกต่างกันถึง 102 แถบ และมีขนาดตั้งแต่ 480 ถึง 2,300 คู่เบส (Yonemoto *et al.* 2006) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิสของ *Phalaenopsis schilleriana*, เขากวางอ่อน (*Phalaenopsis cornu-cervi*) และลูกผสมระหว่าง *P. schilleriana x P. cornu-cervi* ด้วยเทคนิค RAPD พบว่า มี 6 ไพรเมอร์ จากทั้งหมด 80 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPA 06, OPC 02, OPC 05, OPC 06, OPG 14 และ OPN 07 ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 76 แถบ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วย ทำให้สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม (เบญจวรรณ และคณะ, 2557) แสดงให้เห็นว่านอกจากสามารถตรวจสอบความเป็นลูกผสมได้แล้ว เทคนิค RAPD ยังสามารถนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายหรือการจัดจำแนกพันธุ์ได้

การทดลองที่ 4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูกผสม

การศึกษาลักษณะของลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างสกุลย่อยทั้งหมด 3 สกุลย่อย โดยสกุลย่อยแรก *Paracurcuma* ได้แก่ *C. aurantiaca* และ *C. alismatifolia* สกุลย่อยที่สอง *Curcuma* ได้แก่ *C. myanmaensis* และสกุลย่อยที่สาม *C. supraneeana* พบว่าได้ลูกผสม 4 คู่ผสมจากการผสมทั้งหมด 10 คู่ผสม ดังนี้

ลักษณะของลูกผสมข้ามสกุลย่อยระหว่าง *C. aurantiaca. x C. myanmaensis*

การผสมข้ามระหว่าง *C. aurantiaca* และ *C. myanmaensis* พบว่าลูกผสม (ภาพที่ 18 C) มีลักษณะของทั้งแม่ (ภาพที่ 18 A) และพ่อ (ภาพที่ 18 B) ช่อดอกและสีของกลีบประดับมีลักษณะคล้ายไปทางแม่คือ กลีบประดับส่วนล่างมีสีเขียว และกลีบประดับส่วนบนมีสีชมพูแต่สีเข้มกว่าเล็กน้อยและปลายกลีบประดับมีลักษณะเรียวแหลมกว่าต้นแม่ ส่วนของก้านใบยาวกว่าแม่แต่สั้นกว่าพ่อ ดอกจริงมีสีเหลือง ลักษณะของดอกจริงมีกลีบดอกที่แยกออกจากกันชัดเจนซึ่งอาจได้มาจากลักษณะดอกจริงของพ่อ โดยรวมแล้วลูกผสมมีลักษณะคล้ายไปทางแม่มากกว่า แต่ก็ยังมีบางลักษณะที่แตกต่างไปจากเดิมที่ได้มาจากลักษณะของพ่อ



ภาพที่ 18 ลักษณะของ *C. aurantiaca* (A), *C. myanmaensis* (B) และลูกผสมระหว่าง *C. aurantiaca* x *C. myanmaensis* (C)

ลักษณะของลูกผสมข้ามสกุลย่อยระหว่าง *C. aurantiaca x C. supraneeana*

การผสมข้ามระหว่าง *C. aurantiaca* และ *C. supraneeana* พบว่าลูกผสม (ภาพที่ 19 C) มีลักษณะของทั้งแม่ (ภาพที่ 19 A) และพ่อ (ภาพที่ 19 B) ช่อดอกและสีของกลีบประดับมีลักษณะคล้ายไปทางแม่คือ กลีบประดับส่วนล่างมีสีเขียว และกลีบประดับส่วนบนมีสีชมพูแต่สีเข้มกว่าและออกสีม่วงเล็กน้อย ส่วนลักษณะของใบจะคล้ายไปทางพ่อ โดยมีขนาดของใบกว้างกว่าแต่ก้านใบจะสั้นกว่าพ่อ ดอกจริงมีสีเหลืองและปากกลีบดอกตรงปลายมีลักษณะเป็นแฉกแยกออกจากกันเล็กน้อยซึ่งอาจได้มาจากลักษณะดอกจริงของพ่อ โดยรวมแล้วลูกผสมมีลักษณะคล้ายไปทางแม่มากกว่า แต่มีก้านใบยาวขึ้นและลักษณะใบที่ได้มาจากพ่อ

ภาพที่ 19 ลักษณะของ *C. aurantiaca* (A), *C. supraneeana* (B) และลูกผสมระหว่าง *C. aurantiaca* x *C. supraneeana* (C)

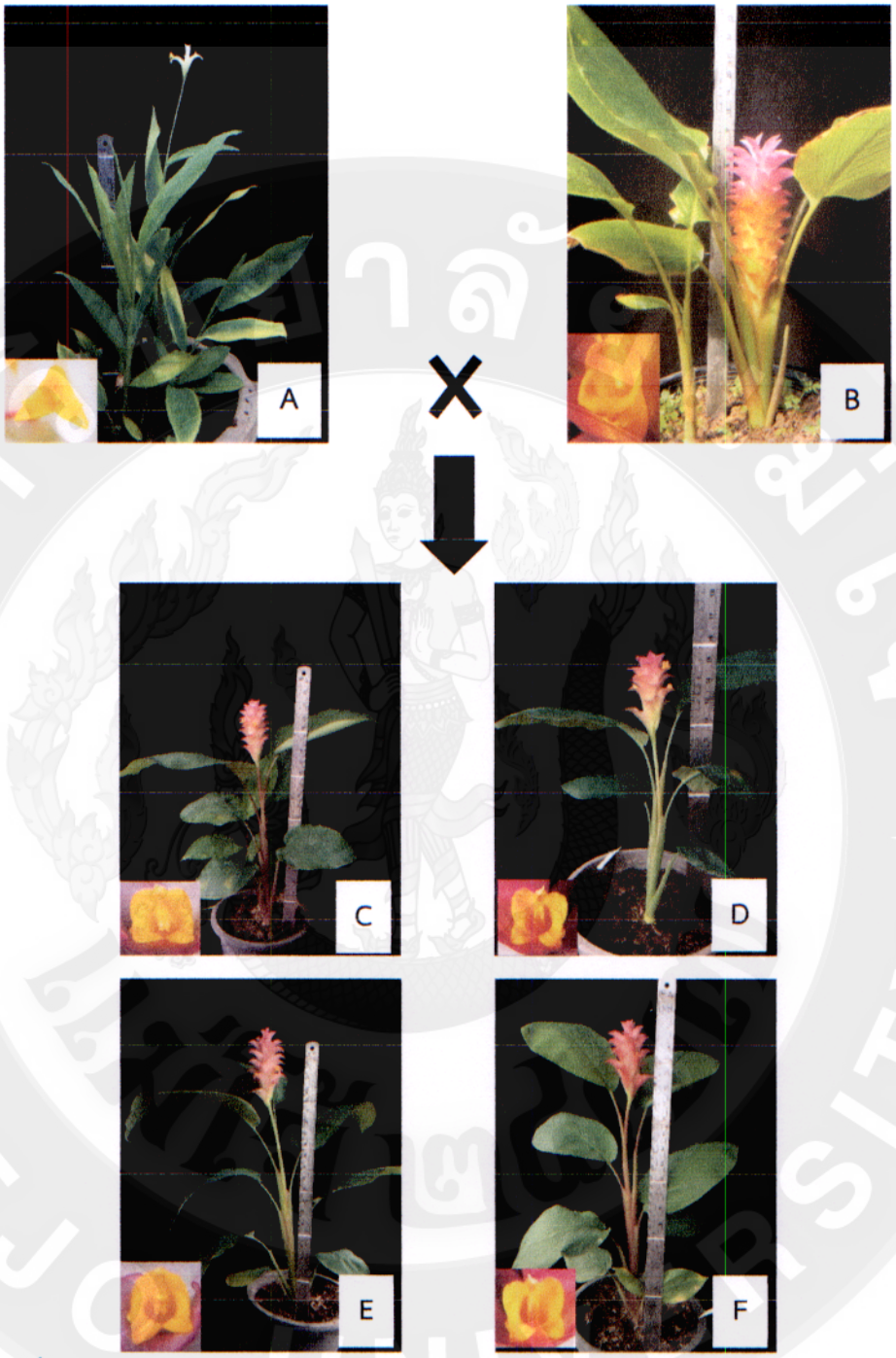
ลักษณะของลูกผสมข้ามสกุลย่อยระหว่าง *C. myanmaensis x C. aurantiaca*

ลูกผสมระหว่าง *C. myamaensis* และ *C. aurantiaca* (ภาพที่ 20 C) มีก้านช่อดอก ลักษณะของช่อดอก ใบ และก้านใบเป็นกึ่งกลางระหว่างแม่และพ่อ สีของกลีบประดับส่วนล่างมีสีเขียว และกลีบประดับส่วนบนมีสีชมพูบานเย็น ลักษณะช่อดอกโดยรวมคล้ายไปทางพ่อ (ภาพที่ 20 B) แต่ยังมีลักษณะของปลายกลีบประดับเรียวแหลมของแม่อยู่ (ภาพที่ 20 A) ก้านช่อดอกและก้านใบสั้นกว่าแม่แต่ยาวกว่าพ่อ ดอกจริงมีลักษณะคล้ายไปทางแม่ มีสีเหลือง มีขนาดกึ่งกลางระหว่างแม่และพ่อ โดยรวมลูกผสมมีลักษณะกึ่งกลางระหว่างพ่อและแม่ ถึงแม้ก้านช่อดอกจะสั้นลงเมื่อเทียบกับแม่แต่ก็ไม่สั้นมากจนเกินไป

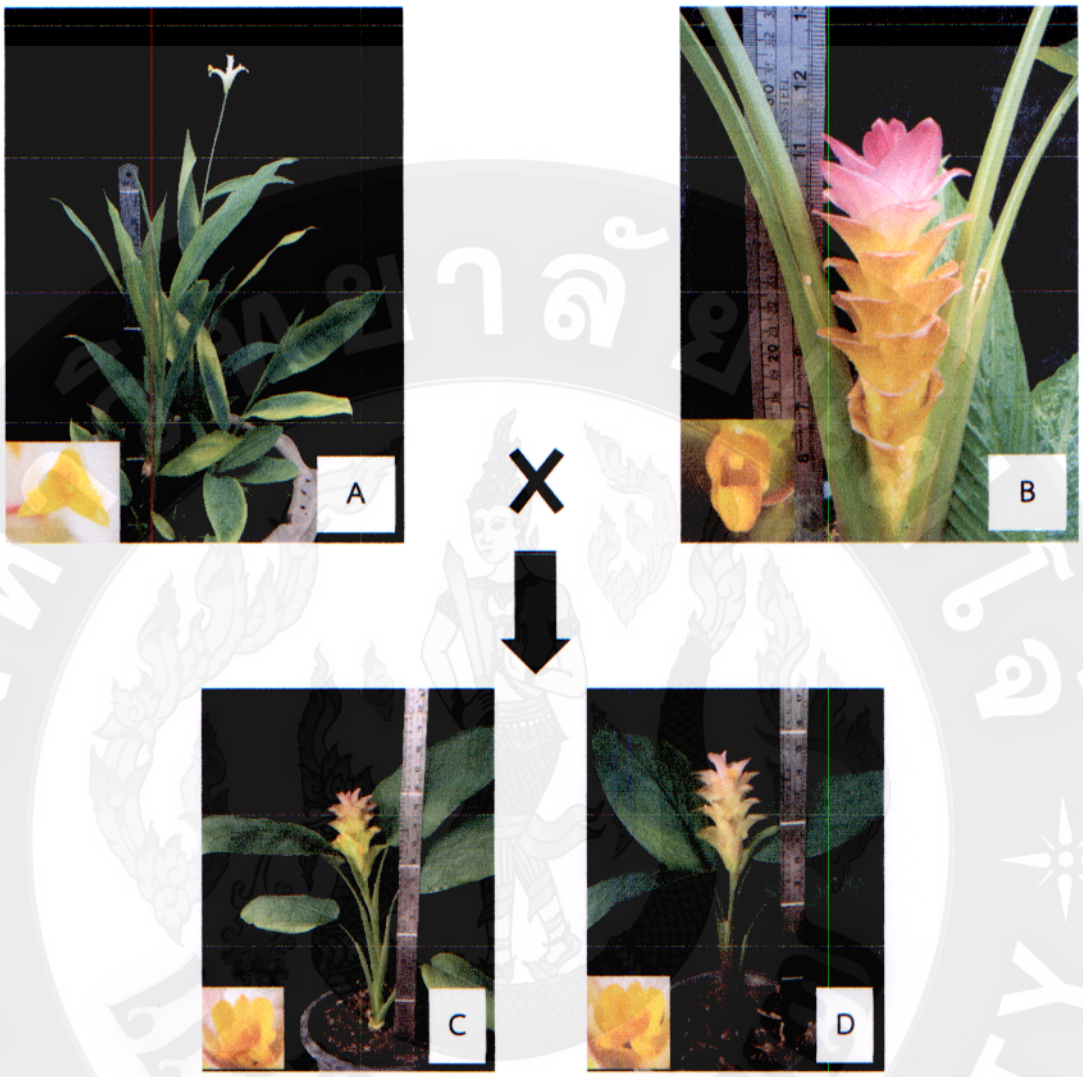
ภาพที่ 20 ลักษณะของ *C. myanmaensis* (A), *C. aurantiaca* (B) และลูกผสมระหว่าง *C. myanmaensis* x *C. aurantiaca* (C)

ลักษณะของลูกผสมข้ามสกุลย่อยระหว่าง *C. supraneeana x C. aurantiaca*

ลูกผสมระหว่าง *C. supraneeana* และ *C. aurantiaca* (ภาพที่ 21 C-F และภาพที่ 22 C-D) มีลักษณะดอกจริง ช่อดอก ก้านช่อดอก และทรงต้นเป็นกึ่งกลางระหว่างแม่และพ่อ ช่อดอกของลูกผสม มีจำนวนกลีบประดับมากกว่าแม่ (ภาพที่ 21 A และภาพที่ 22 A) ลักษณะของช่อดอกคล้ายไปทางแม่แต่ได้สีของกลีบประดับจากพ่อ (ภาพที่ 21 B และภาพที่ 22 B) ตั้งแต่สีชมพูอ่อนไปจนถึงสีชมพูเข้ม และมีสีชมพูอมส้มในบางต้น (ภาพที่ 21 C-F) ก้านช่อดอกและใบยาวกว่าพ่อแต่สั้นกว่าแม่ ลักษณะใบแคบกว่าพ่อแต่กว้างกว่าแม่ บางต้นมีลำต้นเทียมสีแดงซึ่งเป็นลักษณะที่ได้จากพ่อ ดอกจริงมีสีเหลืองลักษณะดอกคล้ายไปทางแม่แต่มีขนาดใหญ่กว่าแม่ โดยรวมลักษณะของลูกผสมมีช่อดอกยาวขึ้นและได้สีของกลีบประดับจากพ่อ จึงทำให้ได้ลักษณะที่แปลกใหม่ไปจากเดิม



ภาพที่ 21 ลักษณะของ *C. supraneeana* (A), *C. aurantiaca* (B) และลูกผสมระหว่าง *C. supraneeana* x *C. aurantiaca* (C-F)

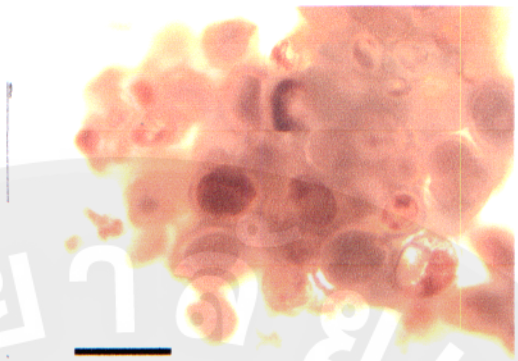


ภาพที่ 22 ลักษณะของ *C. supraneeana* (A), *C. aurantiaca* (B) และลูกผสมระหว่าง *C. supraneeana* x *C. aurantiaca* (C-D)

จากการศึกษาลักษณะของลูกผสม พบว่า ได้ลูกผสมที่ได้มีลักษณะอยู่ระหว่างพ่อและแม่ แต่ส่วนใหญ่ลูกผสมจะมีลักษณะคล้ายไปทางแม่มากกว่าพ่อ (ภาพที่ 16-20) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการผสมข้ามในพืชชนิดอื่นๆ เช่น *sulvia* (Kintzios, 2005) *Hibicus* (Kuligowska *et al*., 2016) และ *Asparagus* (Ito *et al*., 2011) เป็นต้น ลูกผสมที่ได้มีความหลากหลายของเฉดสีที่ต่างกันออกไปในแต่ละต้น มีตั้งแต่ ชมพูอมเขียว ชมพูอ่อนไปจนถึงชมพูเข้ม ชมพูอมส้ม และชมพูอมม่วง ซึ่งสอดคล้องกับ Afkhami-Sarvestani และคณะ (2012) ที่ทำการศึกษาการผสมข้ามสกุลระหว่าง *Streptocarpella* และ *Saintpaulia ionantha* พบว่า ได้ลูกผสมที่มีความหลากหลายของลักษณะกลีบดอกและสี จึงสามารถคัดเลือกและผลิตเป็นไม้ดอกไม้ประดับได้ ดอกจริงของลูกผสมระหว่าง *C. supraneeana x C. aurantiaca* พบว่ามีลักษณะกลีบดอกคล้ายกับแม่แต่มีขนาดใหญ่กว่า Tang และคณะ (2011) สามารถสร้างลูกผสมข้ามสกุลระหว่าง *Dendranthema nankingense* และ *Tanacetum vulgare* ลูกผสมที่ได้มีลักษณะของดอกจริงเหมือนแม่แต่มีกลีบดอกที่มากกว่า เช่นเดียวกับการทดลองนี้ เมื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะของลูกผสมระหว่าง *C. aurantiaca x C. myanmaensis* กับ *C. myanmaensis x C. aurantiaca* (ภาพที่ 23) พบว่า ลูกผสมแสดงลักษณะช่อดอกและลำต้นคล้ายไปทางแม่มากกว่าพ่อ และเมื่อทำการศึกษาความสามารถในการสืบพันธุ์ของลูกผสม พบว่า ละอองเกสรของลูกผสมนั้นไม่มีชีวิตและหลอดของละอองเกสรไม่สามารถงอกได้ในอาหารเลี้ยงละอองเกสรเมื่อนำมาทดสอบ (ภาพที่ 24-26) ซึ่งการแสดงอาการเป็นหมันในเกสรตัวผู้ ที่อาจพบละอองเกสรแต่ละอองเกสรไม่สามารถงอกได้ เป็นการแสดงออกอย่างหนึ่งที่ได้จากลูกผสมข้ามชนิดในพืช ซึ่งสามารถแก้ได้โดยการเพิ่มชุดโครโมโซมด้วยการใช้สารโคลชิซีน (อดิศร, 2539) ลูกผสมที่ได้จากการผสมระหว่าง *C. myanmaensis* กับ *C. aurantiaca* และ *C. supraneeana* กับ *C. aurantiaca* พบว่า บางต้นแสดงลักษณะที่สวยงามเหมาะสำหรับใช้ประโยชน์เชิงการค้าได้ แต่บางต้นยังมีลักษณะบางประการที่ต้องแก้ไข เช่น ช่อดอกสั้น ใบใหญ่เกินไป ซึ่งยังคงต้องมีการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป เพื่อให้มีลักษณะที่ดีเพิ่มขึ้น ในบางต้นอาจต้องทำการแก้ความเป็นหมัน และผสมกลับไปยังต้นแม่เพื่อให้ก้านช่อดอกยาวมากขึ้น และใบเล็กลงได้

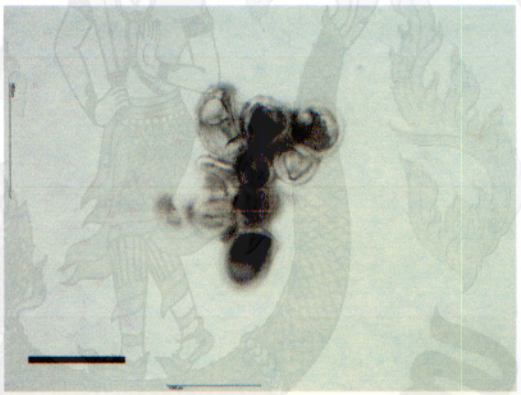
ภาพที่ 23 ต้นลูกผสมระหว่าง *C. aurantiaca* x *C. myanmaensis* (ซ้าย) และต้นลูกผสมระหว่าง *C. myanmaensis* x *C. aurantiaca* (ขวา)

ภาพที่ 24 ลักษณะของอับละอองเกสรที่ไม่สมบูรณ์ ของ ลูกผสมระหว่าง *C. aurantiaca* x *C. supraneeana* , scale bar = 2000 μm



ภาพที่ 25 ละอองเกสรที่ไม่ติดสีเมื่อย้อมด้วย acetone carmine ความเข้มข้น 1 %

scale bar = 1000 μm



ภาพที่ 26 ละอองเกสรที่ไม่มีการงอกเมื่อเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ร่วมกับน้ำตาลความเข้มข้น 10 %

scale bar = 1000 μm

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการผสมข้ามสกุลย่อยระหว่าง *Paracurcuma, Curcuma* และ *Ecomatae* พบว่า

1. จากการศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสรในพืชสกุล *Curcuma* ทั้ง 10 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่มีความมีชีวิตค่อนข้างสูง ยกเว้นพลอยทักษิณและพลอยไพลินมีความมีชีวิตต่ำ ซึ่งในการทดสอบความงอกบนอาหารสังเคราะห์พบว่าไปในทิศทางเดียวกับการทดสอบความมีชีวิตของละอองเกสรโดยในสายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงจะมีเปอร์เซ็นต์ความงอกของละอองเกสรที่สูงกว่าในสายพันธุ์ที่มีความมีชีวิตต่ำ ต่อมาทำการทดสอบความสามารถในการงอกหลอดของละอองเกสรบนยอดเกสรเพศเมีย (stigma surface) และความสามารถในการงอกของละอองเกสรลงไปในท่อนำไข่ (pistil) พบว่า ละอองเกสรของพืชทุกชนิดสามารถงอกบนยอดเกสรตัวเมียและงอกลงไปภายในท่อนำไข่ของพืชที่อยู่คนละสกุลย่อยได้ ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการผสมเกสรข้ามระหว่างสกุลย่อยทั้ง 3 สกุล

2. เมื่อทำการผสมเกสร พบว่า สามารถติดผลได้ 8 คู่ผสม ได้แก่ *C.aurantiaca x C. myanmaensis, C. alismatifolia x C. myanmaensis, C. aurantiaca x C. supraneeana, C. alismatifolia x C. supraneeana, C. myanmaensis x C. aurantiaca, C. myanmaensis x C. alismatifolia, C. supraneeana x C. aurantiaca* และ *C. supraneeana x C. myanmaensis* โดยมีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลอยู่ในช่วง 0.65-33.33 เมล็ดต่อผล แต่ความสามารถในการงอกของเมล็ดลูกผสมในคู่ผสมระหว่าง *C. myanmaensis x C. alismatifolia* และ *C. supraneeana x C. myanmaensis* พบว่า เมล็ดไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ และบางเมล็ดไม่มีการสร้างเอ็มบริโอ

3. ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยเทคนิค RAPD พบว่า ลูกผสมระหว่าง *C. supraneeana* เป็นแม่และ *C. aurantiaca* เป็นพ่อ สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแม่ พ่อ และบ่งบอกความเป็นลูกผสมได้โดยการใช้ ไพรเมอร์ OPU 7 ในการแยกความแตกต่างแม่ พ่อ และบ่งบอกความเป็นลูกผสมระหว่าง *C. aurantiaca* เป็นแม่และ *C. supraneeana* เป็นพ่อ สามารถแยกได้โดยการใช้ไพรเมอร์ S29 ส่วนในคู่ผสมของ *C. aurantiaca* และ *C. myanmaensis* ทั้งผสมตรงและผสมสลับสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อ แม่ และลูกผสมได้โดยใช้ ไพรเมอร์ S65

4. จากการศึกษาลักษณะของลูกผสม ในคู่ผสมที่ใช้ *C. aurantiaca* เป็นแม่ จะพบว่า ลูกผสมส่วนใหญ่มีลักษณะช่อดอก และทรงต้นคล้ายไปทาง *C. aurantiaca* มากกว่า แต่เมื่อใช้ *C. aurantiaca* เป็นพ่อ พบว่า ลูกผสมแสดงลักษณะกึ่งกลางระหว่างพ่อและแม่ โดยลูกผสมมีก้านช่อดอกสั้นกว่า *C. myanmaensis* และ *C. supraneeana* และได้สีช่อดอกมาจาก *C. aurantiaca* ซึ่งทำให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะที่ดีในบางคู่ผสม และสามารถนำไปพัฒนาต่อเป็นไม้ตัดดอกได้ หรืออาจนำไปปรับปรุงพันธุ์ต่อให้มีก้านช่อดอกที่ยาวขึ้นโดยการผสมกลับไปหาต้นแม่ที่มีก้านช่อดอกยาว สำหรับบางต้นที่ลูกผสมเป็นหมัน อาจแก้ไขโดยการดับเบิ้ลจำนวนโครโมโซมก่อน แล้วจึงนำไปผสมกับต้นที่มีลักษณะตามต้องการ

บรรณานุกรม

กมลทิพย์ สุวรรณเดช และ ดวงใจ ศุขเฉลิม. 2550. การศึกษาอนุกรมวิธานของพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ในพื้นที่ป่าทองผาภูมิจังหวัดกาญจนบุรี. น. 197-208. ใน รายงานวิจัยในโครงการ BRT **ชุดโครงการทองผาภูมิตะวันตก.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กรณ์ กรภัทรชัยกุล, ไชหนับ ยู่โซะ, ทิพวรรณ คงอินทร์ และรูซีลา สะลูโว๊ะ. 2558. สัณฐานวิทยา ความมีชีวิต และการงอกของเรณูพืชดอก 15 ชนิด. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี,** 23(4), 622-632.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2548. **ข้อมูลการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมาปี 2547**. กรุงเทพฯ: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2544. **ปรับปรุงพันธุ์พืช : ความหลากหลายของแนวคิด.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____. 2546. **ปรับปรุงพันธุ์พืช : พื้นฐาน วิธีการ และแนวคิด.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จรัญ มากน้อย และพวงเพ็ญ ศิริรักษ์. 2555. **พืชสกุลขมิ้นในประเทศไทย : The genus *Curcuma* L. (Zingiberaceae) inThailand.** เชียงใหม่: องค์การสวนพฤกษศาสตร์.

เจษฎา จงใจดี, สาวิกา กอนแสง, ศันศนีย์ จำจด, เบญวรรณ ฤกษ์เกษม และ สิทธิชัย ลอดแก้ว. 2553. ผลของอุณหภูมิสูงต่อความมีชีวิตของละอองเรณูและการปฏิสนธิในพันธุ์ข้าวไทย. **วารสารเกษตร**, 26(พิเศษ), 29-35.

เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี. 2549. **เอกสารประกอบการสอน วิชา พส 522 การปรับปรุงพันธุ์พืชสวนขั้นสูง 2.** เชียงใหม่ : คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ธีรนิติ พวงกฤษ. 2555. **การศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ปทุมมาโดยการผสมข้ามชนิดระหว่างพืชในกลุ่ม *Eucurcuma* และ *Paracurcuma*.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

นพวรรณ หนองใหญ่ ดรุณี ถาวรเจริญ และ เกรียงศักดิ์ ไทยพงษ์. 2558. สัณฐานวิทยา ความมีชีวิต และความงอกของละอองเกสรฝรั่งพันธุ์ต้นแคระ. **วารสารวิทยาศาสตร์และเกษตรศาสตร์,** 46(3) (พิเศษ), 117-120.

บุญยืน กิจวิจารณ์. 2544. **เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. กรุงเทพฯ: คลังนานาวิทยา.

เบญจวรรณ สิทธิเวช, วีณัน บัณฑิตย์ และ ณัฐา โพธาภรณ. 2557. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ลูกผสมสกุล ฟาแลนอปซิสด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี. **วารสารแก่นเกษตร,** 42(3) (พิเศษ), 512-517.

ประเดิม วณิชชนานันท์. 2542. **การผสมภายในชนิด และการผสมพืชข้ามชนิดของพืชสกุล *Curcuma*.** ปัญหาพิเศษปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พวงเพ็ญ ศิริรักษ์. 2008. การศึกษาพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ในประเทศไทย. **Nu Science Jounal 2008**, 5(2), 119 – 128.

พรพรรณ ทองสุทธิ. 2551. **การศึกษาการผสมเกสร การพัฒนาของเมล็ดและและการทำลายการพักตัวของเมล็ดปทุมมา (Curcuma).** รายงานผลการปฏิบัติงานการเรียนรู้อิสระ. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2545. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เรือนแก้ว ประพฤติ. 2553. **คู่มือปฏิบัติงาน เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และการตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปลงพันธุกรรม.** เชียงใหม่: ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพและสถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

วรินทร์ สุทนต์, พาวิน มะโนชัย, วินัย วิริยะ อลงกรณ์, ปฏิภาณ สุทธิกุลบุตร, เสกสันต์ อุตสาหตานนท์ และนพดล จรัสสัมฤทธิ์. 2545. การศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสรลิ้นจี่. ใน **รายงานการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่2**. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วิลาส รัตนานุกูล. 2553. **การงอกของหลอดเรณู.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://biology.ipst.ac.th/ (10 กันยายน 2558).

สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์. 2552. **การปรับปรุงพันธุ์พืช.** พิมพ์ครั้งที่ 2, กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2539. **ปทุมมาและกระเจียวไม้ดอกไม้ประดับ**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บ้านและสวน.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐาน สู่การประยุกต์**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. **วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี**, 5(2), 37- 56.

หยกทิพย์ สุดารีย์. 2550. **การศึกษาการผสมเกสร การติดเมล็ด และการงอกขอเมล็ดพืชในกลุ่มขมิ้น (*Curcuma*) ที่ผสมภายในชนิดเดียวกันและต่างชนิดกัน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

อรวรรณ วิชัยลักษณ์. 2548. **ปทุมมา**. กรุงเทพมฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

อัครา สุนทรารมณ์ลักษณ์. 2549. **การเก็บรักษาละอองเกสร และการผสมพันธุ์พืชกลุ่มกระเจียวและกลุ่มประทุมมา.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อดิศร กระแสชัย. 2539. **บทปฏิบัติการวิชา Cytogenetics in Agriculture (359704).** เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อรรัตน์ มงคลพร. 2548. **เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช.** นครปฐม: ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

Afkhami-Sarvestani R., Serek, M. & Winkelmann, T. 2012. Interspecific crosses within the *Streptocarpus* subgenus *Streptocarpella* and intergeneric crosses between *Streptocarpella* and *Saintpaulia ionantha* genotypes. **Scientia Horticulturae,** 148, 215–222.

Baloch, M.J., Lakho, A.R. & Solangi, M.Y. 2001. Impact of Sucrose Concentration on in vitro Pollen Germination of Okra. *Hibiscus esculentus.* **Journal of Biological Science,** 4, 402-403.

Chundet, R., Cutler, R.W., Tasanon, M. & Anuntalabhochai, S. 2007. Hybrid Detection in Lychee *(Litchee chinensis* Sonn.) Cultivars Using HAT-RAPD Markers. **ScienceAsia,** 33, 307-311.

Deng, Y.M., Teng, N.J., Chen, S.M., Chen, F.D., Guan, Z.Y., Song, A.P. & Chang, Q.S. 2010. Reproductive barriers in the intergeneric hybridization between *Chrysanthemum grandiflorum* (Ramat.) Kitam. and *Ajania przewalskii* Poljak. (Asteraceae). **Euphytica,** 174, 41–50.

Deyan, Y., Xiao, H., Zhaohui, L. & Huien, Zhao. 2010. Intergeneric hybridizations between *Opisthopappus taihangensis* and *Chrysanthemum lavandulifolium*. **Scientia Horticulturae**, 125, 718–723.

Eliška, Z., Tomáš, F., Otakar, Š., Karol, K., Karol, M. & Jana, L.Š. 2012. Phylogeny of *Curcuma* (Zingiberaceae) based on plastid and nuclear sequences: Proposal of the new subgenus *Ecomata*. **TAXON**, 61(4), 747–763.

Fangping, T., Haibin, W., Sumei, C., Fadi, C., Zhaolei, Liu. & Weimin, F. 2011. Intergeneric hybridization between *Dendranthema nankingense* and *Tanacetum vulgare.* **Scientia Horticulturae**, 132, 1–6.

Feruzan, D., Göksel, O. & Özlem, D. 2004. In vitro pollen germination of some plant species in basic culture medium. **Journal of Cell and Molecular Biology**, 3, 71-76.

Geoffrey, R. D., David, J. L. & Helen, M. W. 2012. The influence of pre- and post-zygotic barriers on interspecific *Corymbia* hybridization. **Annals of Botany**, 109, 1215–1226.

Hussain, Z., Tyagi, R.K., Sharma, R. & Agrawal, A. 2008. Genetic diversity in *in vitro*-conserved germplasm of *curcuma* L. as revealed by RAPD marker. **Biologia Plantarum,** 52(4), 627-633.

Ito, T., Agrawal, I., Kubota, S., Ochiai, T., Sonoda, T., Hayashi, Y., Fukuda, T., Yokoyama, J., Nakayama, H., Kameya, T. & Kanno, A. 2011. Production and characterization of interspecific hybrids between *Asparagus kiusianus* Makino and *A. officinalis* L.. **Euphytica**, 182, 285–294.

Jana, L.Š., Otakar, Š., Vlasta, J., Mamyil, S., Tomas, F., Pavel, T. & Jan, S. 2007. Chromosome Numbers and Genome Size Variation in Indian Species of *Curcuma* (*Zingiberaceae*). **Annals of Botany**, 100, 505–526.

Jana Leong-Škorničková, Otakar Šída, Eliška Záveská and Karol Marhold. 2015. History of infrageneric classification, typification of supraspecific names and outstanding transfers in Curcuma (Zingiberaceae). **TAXON**, 64(2), 362–373.

Kalloo. 1988. **Vegetable Breeding.** Vol.1. Florida: CRC Press.

Kintzios, S.E. 2005. **SAGE The Genus Salvia. Department of plant physiology**. Singapore: Harwood Academic Publishers.

Kress, W.J. & Htun, T. 2003. A Second species of *Smithatris* (Zingiberaceae) from Myanma. **Novon,** 13, 68-71.

Kress, W.J. & Larsen, K. 2001. *Smithatris*, a New Genus of Zingiberaceae from Southeast Asia. **Systematic Botany**, 26(2), 226-230.

Kuligowska, K., Lütken H., Christensen, B. & Müller, R. 2016. Interspecific hybridization among cultivars of hardy Hibiscus species section Muenchhusia. **Breeding Science,** 66, 300–308.

Larsen, K. 2002. **The Zingiberaceae in flora of Thailand. In the 3 rd Symposium on the Family Zingiberaceae.** Khon Kaen: Khon Kaen University.

Larsen, K. and Larsen, S. S. 2006. **Gingers of Thailand**. Chiamg Mai: Queen Sirikit Botanic Garden.

Maknoi, C. 2006. **Taxonomy and phylogeny of the genus *Curcuma* L. (Zingiberaceae) with particular Reference to its occurrence in Thailand: Thesis for the degree of Doctor of Philosophy in Biology.** Songkhla: Prince of Songkla University.

Marks, G.E. 1954. An aceto-carmine glycerol jelly use in pollen fertility counts. **Stain Technol,** 29:5, 277.

Mia, M. S., Patwary, A. K., Hassan, L., Hasan, M. M., Amirul, M. Alam, M. A. Latif, M. Monjurul, A. M. & Adam, B. P. 2014. Genetic Diversity Analysis of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe.) Genotypes Using RAPD Markers. Life **Science Journal**, 11(8), 90 -94.

Murashigi, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with Tobacco tissue culture. **Physiology Plant,** 15, 473-474

Qinli, W., Longdouu, Lu., XiaoQin, Wu., Yiqin, Li. & Jinxing, Lin. 2003. Boron influences pollen germination and pollen tube growth in *picea meyeri.* **Tree Physiology,** 23, 345 – 351.

Rahim, A.S., Margrethe, S., & Winkelmann, T. 2012. Interspecific crosses within the Streptocarpus subgenus Streptocarpella and intergeneric crosses between Streptocarpella and Saintpaulia ionantha genotypes. **Scientia Horticulturae,** 148, 215–222.

Shakeel, A. J., Akira, K., San San, Yi., Khaw, W. N., Shinsuke, Y., Junko, A. W. & Kazuo, N. W. 2006. Use of rice SSR markers as RAPD markers for genetic diversity analysis in *Zingiberaceae.* **Breeding Science**, 56, 107 – 111.

Shinichi, A. 2001. Optimal pollination environment of tetraploid ginger (*Zingiberaceae officinale* Roscoe) evaluated by in vitro pollen germination and pollen tube growth in styles. **Science Horticulture,** 90, 219-226.

Sigrist, M.S., Pinheiro, J.B., Azevedo Filho, J.A. & Zucchi, M.I. 2011. Genetic diversity of turmeric germplasm (*Curcuma longa*; Zingiberaceae) identified by microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, 10(1), 419-428.

Stangoulis, J.C.R., Reid, R.J. Brown, P.H. & Graham, R.D. 2001. Kinetic analysis of boron transport in *Chara*. **Planta**, 213, 142 – 146.

Tanaka, R., & Watanabe, K. 1972. Embryological studies in Chrysanthemum makinoi and its hybrid crossed with hexaploid *Ch. japonense*. **J. Sci. Hiroshima Univ. Ser. B. Div.**, 14, 75–84.

Tang, F.P., Chen, F.D., Chen, S.M., Teng, N.J. & Fang, W.M. 2009. Intergeneric hybridization and relationship of genera within the tribe Anthemideae Cass. (*I. Dendranthema crassum* (Kitam.) Kitam. × *Crossostephium chinense* (L.) Makino). **Euphytica**, 169, 133–140.

Tang, F., Wang, H. Chen, S., Chen, F., Liu, Z. & Fang, W. 2011. Intergeneric hybridization between *Dendranthema nankingense* and *Tanacetum vulgare*. **Scientia Horticulturae**, 132, 1–6.

Van Steveninck, R.F.M. 1965. The significance of calcium on the apparent permeability of cell membrane and the effects of substitution with divalent ions. **Physiol. Plant,** 18, 54 – 69.

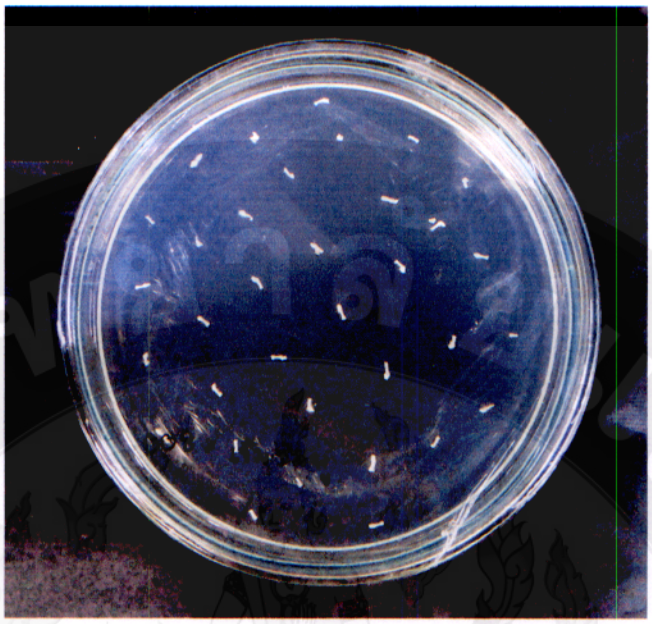
Wendy, A., Pline, K., Edmisten, L., Tim, O., John, W. Wilcut, R. W. & Nina, S. A. 2002. Use of digital image analysis, Viability stains and germination assay to estimate conventional and glyphosate-resistant cotton pollen viability. **Crop Sci,** 42, 2193 – 2200.

Yonemoto, Y., Chowdhury, A.K., Kato, H. & Macha, M.M. 2006. Cultivars identification and their genetic relationships in Dimocarpus longan subspecies based on RAPD markers. **Sci. Hortic,** 109, 147-152.

ภาคผนวก

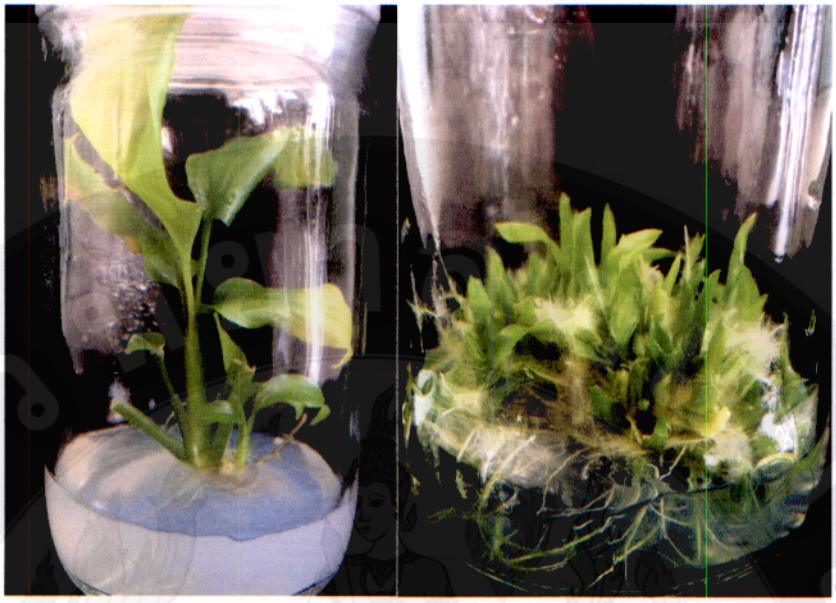
ภาคผนวก ก

ภาพการทดลอง

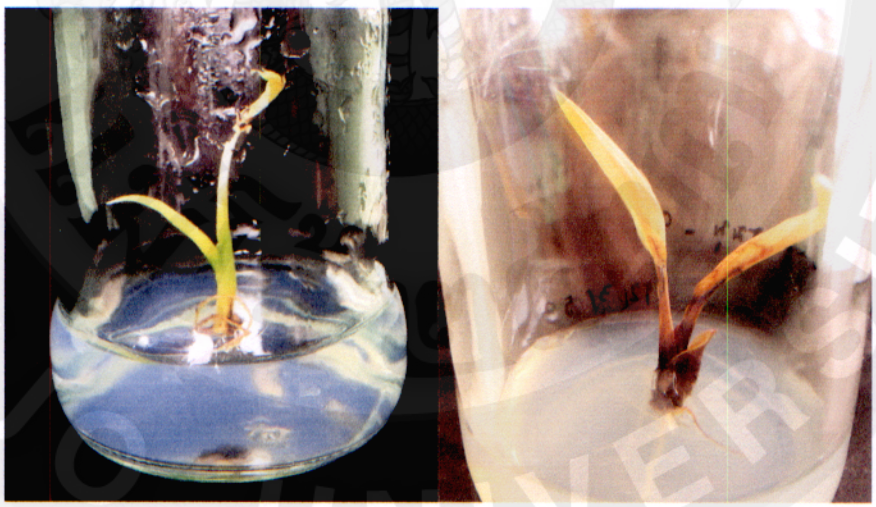


ภาพผนวกที่ 1 การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ประกอบด้วย 1 mg/l BAP 1 mg/l GA_3 และ 0.1 mg/l NAA

ภาพผนวกที่ 2 ต้นลูกผสมในสภาพปลอดเชื้อระยะที่สามารถนำไปปรับสภาพโรงเรือนได้



ภาพผนวกที่ 3 ลักษณะของต้นลูกผสมที่เจริญเติบโตปกติในสภาพปลอดเชื้อ (ซ้าย) ลักษณะของลูกผสมที่เจริญเติบโตผิดปกติในสภาพปลอดเชื้อ (ขวา)



ภาพผนวกที่ 4 ลูกผสมระหว่าง *C. alismatifolia* x *C. myanmaensis* ที่ไม่สมบูรณ์และตายไปในระหว่างทำการทดลอง

ภาพผนวกที่ 5 การพัฒนาของเอ็มบริโอไปเป็นต้นในสภาพปลอดเชื้อ

ภาพผนวกที่ 6 ผลที่ไม่มีการพัฒนาและเมล็ดที่มีการเจริญเติบโตช้า (ซ้าย) และเมล็ดที่ยังไม่พัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอ (ขวา) หลังการผสมเกสรเป็นเวลา 26 วัน

ภาคผนวก ข

ตารางผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของละอองเกสรของพืชในสกุล *Curcuma*

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	9	22576.80	2508.53	51.52**	2.39	3.46
Error	20	973.78	48.69			
Total	29	23550.58				
C.V. (%)	8.95					

หมายเหตุ ** หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ตารางผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการงอกของละอองเกสรของพืชในสกุล *Curcuma*

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	9	11352.82	1261.42	8.67**	2.39	3.46
Error	20	2910.54	145.53			
Total	29	14263.35				
C.V. (%)	40.92					

หมายเหตุ ** หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ตารางผนวกที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์การติดผลของการผสมข้ามสกุลย่อยระหว่าง *Paracurcuma, Curcuma* และ *Ecomatae*

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	9	50.70	5.63	9.62**	2.39	3.46
Error	20	11.71	0.59			
Total	29	62.41				

C.V. (%) 31.89

หมายเหตุ ** หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ตารางผนวกที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของจำนวนจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผลของการผสมข้ามสกุลย่อยระหว่าง *Paracurcuma, Curcuma* และ *Ecomatae*

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	9	69.35	7.71	4.59**	2.39	3.46
Error	20	33.56	1.68			
Total	29	102.91				

C.V. (%) 46.96

หมายเหตุ ** หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ตารางผนวกที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ของเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดลูกผสมของการผสมข้ามสกุลย่อยระหว่าง *Paracurcuma, Curcuma* และ *Ecomatae*

SOU	df	SS	MS	F-test	F .05	F .01
Treatment	9	95.45	10.61	4.33**	2.39	3.46
Error	20	49.03	2.45			
Total	29	144.48				
C.V. (%)	54.75					

หมายเหตุ ** หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ภาคผนวก ค

ประวัติผู้วิจัย

ประวัตินักศึกษา

ชื่อ – สกุล	นางสาวศศิริน รัตนโสภณ	
เกิดเมื่อ	6 กรกฎาคม 2534	
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2555	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชศาสตร์) พืชสวนประดับ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
	พ.ศ. 2549 – 2551	มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนลำปางกัลยาณี จังหวัดลำปาง
	พ.ศ. 2546 – 2548	มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนสตรีวิทยา 2 จังหวัดกรุงเทพฯ
อีเมล์	sasirin.rattanasophon@gmail.com	