รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาการสร้างสายพันธุ์แท้ โดยการเพาะเลี้ยงเซลหรืออวัยวะสืบพันธุ์ของไม้ดอกล้มลุกบางชนิด

โดย นางสาวเฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี และ คณะ

มิถุนายน 2549

สัญญาเลขที่ MRG4780153

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาการสร้างสายพันธุ์แท้ โดยการเพาะเลี้ยงเซลหรืออวัยวะสืบพันธุ์ของไม้ดอกล้มลุกบางชนิด

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. นางสาวเฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี	มหาวิทยาลัยแม่โจ้
2. นางโสระยา ร่วมรังสี	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ และ สกว ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

การศึกษาการสร้างสายพันธุ์แท้โดยการเพาะเลี้ยงเซลหรืออวัยวะสืบพันธุ์ของไม้ดอกล้มลุกบางชนิดพบว่า ส่วนใหญ่อับละอองเกสรที่มีละอองเกสรส่วนใหญ่อยู่ในระยะ tetrad และ uninucleate เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นอ่อนของพืชส่วนใหญ่ที่ทำการศึกษา อับละอองเกสรของพืชจะมีการตอบสนองต่อชนิดของอาหาร และ ฮอร์โมนที่ แตกต่างกัน อับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงในสภาพมืดจะสามารถเกิดแคลลัสได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาพมีแสง โดยแคลลัส ของ เบญจมาศ ดาวเรือง ดาวเรืองฝรั่งเศส ผีเสื้อชนิด *chinensis* ผีเสื้อชนิด *bulbathu*s พิทูเนีย กาเซเนีย และ คาร์เนชั่น สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ ในขณะที่อับละอองเกสรของพืชบางชนิดสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นจากพืชเหล่านี้ได้ และอับละอองเกสรของพืชบางชนิดไม่สามารถชักนำให้เกิดทั้งแคลลัสและต้นใหม่ได้เลย ต้นพืชที่ได้รับจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรส่วนใหญ่มีโครโมโซมเป็น 2 n และเมื่อทำการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมกับต้นที่ให้อับละอองเกสรด้วยเทคนิค RAPD โดยส่วนใหญ่พบความแตกต่างของรูปแบบ RAPD ระหว่างต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรและต้นที่ให้อับละอองเกสร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงละอองเกสรของพืชชนิดต่าง ๆในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆพบว่าละอองเกสรของพืชบางชนิดแบ่งตัวเป็นกลุ่มเซลและบางชนิดมีการพัฒนาจนได้เอ็มบริโอแต่พบว่าเอ็มบริโอไม่สามารถพัฒนาต่อเป็นต้นพืชได้

Abstract

A study on inbreed line production by reproductive cells and organs culture in some annual flowering plants was found that mainly anthers containing tetrad and uninucleate stage microspores suitable for calli and shoots induction. Anthers were respond to different kinds of culturing medium and plant hormones. Anthers cultured in dark condition produced higher calli and shoots than anthers cultured in light condition. Calli from anthers of chrysanthemum, marigold, french marigold, *Dianthus chinensis*, *D. bulbathus*, petunia, gazania and carnation could produced shoots where as calli from some species could not produced any shoot. Mainly shoots derived from anther culture were diploid. An investigation on genetic variation by RAPD, shoots regenerated from anther showed differ RAPD pattern from donor plants. For microspore culture, the microspores were cultured in liquid medium. After culturing the microspores showed cells division and some embryo like structure but these embryos not developed to shoots.

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	1
ตรวจเอกสาร	3
วิธีการ	6
ผลการทดลอง	11
วิจารณ์ผลการทดลอง	92
เอกสารอ้างอิง	94

คำนำ

ในปัจจุบันเนื่องจากมีความต้องการใช้ไม้ดอกล้มลุกเพื่อการประดับตกแต่งสถานที่เพิ่มมากขึ้น การนำเข้าเมล็ดพันธุ์ไม้ดอกล้มลุกจึงเพิ่มมากขึ้น ซึ่งการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ชั่วที่1ของไม้ดอกล้มลุกจากต่างประเทศนั้นนอกจากจะมีปัญหาการเสียเงินออกสู่ต่างประเทศแล้ว ยังมีปัญหาเรื่องการปรับตัวให้เข้ากับสภาพอากาศของประเทศไทยได้ไม่ดีในพืชที่เกิดจากเมล็ดพันธุ์เหล่านี้ เนื่องจากประเทศไทยมีอากาศร้อนแต่ประเทศที่ทำการปรับปรุงและผลิตเมล็ดพันธุ์ไม้ดอกนั้นเป็นประเทศทางเขตอบอุ่นซึ่งมีสภาพอากาศแตกต่างกับประเทศไทยทำให้พืชเหล่านี้ไม่สามารถปรับตัวได้ดีเท่าที่ควร การสร้างสายพันธุ์แท้ในไม้ดอกล้มลุกนั้นมีความสำคัญอย่างยิ่งในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่1 การสร้างสายพันธุ์แท้จากการผสมตัวเองนั้นต้องใช้เวลานานและแรงงานเป็นจำนวนมาก ซึ่งหากสามารถผลิตสายพันธุ์แท้จากการเพาะเลี้ยงเซลหรืออวัยวะสืบพันธุ์ของพืชได้ จะลดการใช้เวลา, ค่าใช้จ่ายและแรงงานในการสร้างสายพันธุ์แท้ต่ำกว่าการผสมตัวเองหลายๆชั่ว ซึ่งหากเราสามารถหาสายพันธุ์แท้ที่ดีมาทำการผลิตเมล็ดพันธุ์ไม้ดอกลูกผสมชั่วที่1 ก็จะสามารถแก้ปัญหาการขาดแคลนเมล็ดพันธุ์ไม้ดอกลูกผสมที่ดี ขณะนี้บริษัทเมล็ดพันธุ์ของประเทศไทยได้มีการผลิตเมล็ดพันธุ์ไม้ดอกและส่งออกแต่เมล็ดพันธุ์ที่ผลิตนั้นส่วนใหญ่เป็นเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเปิดซึ่งมีราคาต่ำและไม่เป็นที่นิยมมากนัก หากเราสามารถผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่1 ออกจำหน่ายได้ก็น่าจะเป็นประโยชน์ต่อธุรกิจเมล็ดพันธุ์และเกษตรกรผู้ผลิตเนื่องจากจะมีรายได้ต่อพื้นที่ที่สูงขึ้น นอกจากนี้หากสามารถทำการผลิตสายพันธุ์แท้ในพืชเหล่านี้ได้พืชเหล่านี้ยังสามารถนำมาใช้ศึกษาการทำงานของยีนซึ่งต้องอาศัยสายพันธุ์แท้เป็นพืชทดสอบ ซึ่งการผลิตพืชสายพันธุ์แท้เหล่านี้น่าจะเป็นประโยชน์ทางการศึกษาพันธุศาสตร์ของพืชได้อย่างดียิ่ง การย้ายยีนสู่พืชที่มีโครโมโซมลงลงครึ่งหนึ่งและเพิ่มโครโมโซมให้เป็นสายพันธุ์แท้จะช่วยให้ทราบและอธิบายปฏิกิริยาของยีนที่ย้ายสู่พืชได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามข้อมูลวิจัยเกี่ยวกับการสร้างสายพันธุ์แท้ด้วยวิธีการนี้ในไม้ดอกล้มลุกพบว่า

ยังมีน้อยและหากเป็นงานวิจัยของบริษัทเมล็ดพันธุ์(ต่างประเทศ)ที่ทำขึ้นก็จะปิดข้อมูลเป็นความลับ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเซลและอวัยวะสืบพันธุ์ในประเทศไทยเป็นเรื่องใหม่และมีทำการวิจัยกันไม่มากนักแม้ว่าในต่างประเทศจะมีการวิจัยและประสพผลสำเร็จในพืชหลายชนิด การจะชักนำการเกิดยอดในการเพาะเลี้ยงเซลหรืออวัยวะสืบพันธุ์นั้นจะต้องเลือกระยะการเจริญเติบโตของเซลหรืออวัยวะสืบพันธุ์ที่เหมาะสมแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของพืช, การชักนำให้เกิดความเครียดกับเซลและอวัยวะเหล่านี้ก่อนเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม, สภาพทางสรีรวิทยาและการเติบโตของต้นพืชที่นำเซลหรืออวัยวะเหล่านั้นมาทำการเพาะเลี้ยงต้องเหมาะสม นอกจากนี้อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง, อุณหภูมิและแสงสว่างในขณะทำการเพาะเลี้ยงจะต้องเหมาะเช่นกัน จะเห็นได้ว่าความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงและชักนำให้เกิดยอดของเซลและอวัยวะเหล่านี้มีปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องมากมายการจัดการให้สภาพเหล่านี้ให้เหมาะกับความต้องการของพืชแต่ละชนิดนั้นแตกต่างกัน การชักนำที่ถูกต้องเท่านั้นที่จะสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ที่มีจำนวนจำนวนโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่งได้ ฉะนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการที่ศึกษาถึงปัจจัยเหล่านี้ต่อการเกิดยอดใหม่ที่มีจำนวนลดลงครึ่งหนึ่งและทำการเพิ่มจำนวนโครโมโซมยอดใหม่เหล่านี้เพื่อผลิตสายพันธุ์แท้ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาแนวทางในการผลิตสายพันธุ์แท้จากเพาะเลี้ยงเซลสืบพันธุ์ และอวัยวะสืบพันธุ์ ในไม้ดอกล้มลุกบางชนิด

2. ศึกษาการเจริญเติบโต และพัฒนาการของ เซลสืบพันธุ์ ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3. ศึกษาการเกิดยอดหรือต้นอ่อน จากการเพาะเลี้ยงเซลสืบพันธุ์ หรืออวัยวะสืบพันธุ์

4. ศึกษาลักษณะของสายพันธุ์แท้ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่าจากพืชที่มีโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่ง

5. ศึกษาความเป็นไปได้และคุ้มค่าทางธุรกิจในการสร้างสายพันธุ์แท้ด้วยวิธีการเหล่านี้

ตรวจเอกสาร

ได้มีการศึกษาการชักนำให้เกิดยอดในเซลและอวัยวะสืบพันธุ์ของเป็นจำนวนมาก และได้มีผู้รายงานถึงความสำคัญของปัจจัยต่าง ๆที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดดังนี้

6.1 พันธุกรรมของพืชที่ต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเซลและอวัยวะสืบพันธุ์ของพืช Tosca และคณะ (1999) ได้รายงานถึงความแตกต่างของเยอร์บีร่า4สายพันธุ์ในการชักนำให้เกิดแคลลัสและความสามารถในการชักนำให้เกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงไข่ (ovule) ในทานตะวัน Jonard และ Mazzarobba (1990) ได้รายงานถึงความสามรถในการชักนำให้เกิดแคลลัสและสามารถชักนำให้เกิดยอดในทานตะวันสายพันธุ์ป่าแต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ในสายพันธุ์ปลูก

6.2 ระยะในการเจริญเติบโตของเซลหรืออวัยวะเหล่านี้ต้องเหมาะสมในการชักนำการเกิดแคลัสและ/หรือยอด สำหรับการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู แม้ว่าจะมีรายงานถึงความแตกต่างของความสามารถในการชักนำให้เกิดต้นในระยะการเจริญที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของพืช แต่ระยะการเจริญที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจะอยู่ในช่วงกลาง ๆของระยะ uninucleate จนถึงกลางระยะ binucleate ในพืชตระกูล *Brassica* ระยะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดอยู่ในช่วงlate-uninucleate จนถึง early-binucleate (Telmer และคณะ 1993) ส่วน Binarova และคณะ (1997)กล่าวว่าใน*Brassica napus* ระยะที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วงmid-uninucleate Sajiและ Sujatha (1998) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของทานตะวันในระยะ mid-uninucleate จนถึง late-uninucleate Amaury และคณะ (1997)พบว่าการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรที่อยู่ในระยะ early-uninucleate จนถึง mid-uninucleateสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดในลิลลี่ได้ สำหรับการเพาะเลี้ยงovuleนั้นมักทำการเพาะเลี้ยงovuleที่โตเต็มที่แต่ไม่ได้รับการผสม ในเยอร์บีร่าToscaและคณะ (1999) และ

Miyoshiและ Asakura, (1996) สามารถชักนำการเกิดแคลลัสและยอดในการเลี้ยง ovule โตเต็มที่แต่ไม่ได้รับการผสม Musial และคณะ(2001) รายงานความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงovule ของหอมในระยะที่ดอกเจริญมากที่สุดแต่ยังไม่บานและสามารถผลิตต้นหอมที่มีโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่งได้

6.3 การชักนำให้เกิดความเครียด การให้อุณหภูมิสูงหรือต่ำก่อนทำการเพาะเลี้ยง หรือช่วงแรกในการเพาะเลี้ยงสามารถเพิ่มความสำเร็จในการเกิดต้นที่มีจำนวนโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่ง ในพืชตระกูล *Brassica* การเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิสูง 30-35 °C ระยะหนึ่งก่อนนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิปกติ25 °Cสามารถชักนำการเกิดยอดที่มีโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่งได้ Telmer และคณะ (1993) ได้ชักนำการเกิดต้นจากละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงที่ 32.5°C เป็นเวลา24 ชั่วโมงก่อนย้ายไปสู่อุณหภูมิปกติ (25°C) Wang และคณะ (1999) ประสพความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงละอองเกสรของบล็อกโคลี่ที่อุณหภูมิ 32°C เป็นเวลา48ชั่วโมงก่อนย้ายมาเลี้ยงที่อุณหภูมิปกติ Hamaokaและคณะ (1991) รายงานความสำเร็จในการชักนำการเกิดยอดของละอองเกสรของ *Brassica compestris* ที่อุณหภูมิ35°C เป็นเวลา1-3วันก่อนเลี้ยงที่อุณหภูมิปกติ Nurhidayah และคณะ (1996) ได้รายงานถึงความสำเร็จในการชักนำให้เกิดยอดในการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูทานตะวันในสภาพอุณหภูมิสูง30°C/35 °C แต่อย่างไรก็ตามมีงานทดลองจำนวนมากซึ่งใช้การให้อุณหภูมิต่ำในระยะหนึ่งเพื่อชักนำการเกิดยอดในการเพาะเลี้ยงเซลหรืออวัยวะสืบพันธุ์ Cegielska-Taras และคณะ (2002)รายงานว่าการเลี้ยงละอองเกสรของ Brassica napus ที่อุณหภูมิ 1°C ภายใต้ 8ชั่วโมงของการให้แสงและ16ชั่วโมงความมืดเป็นเวลา14วันก่อนย้ายไปเลี้ยงที่ 24 °C 16ชั่วโมงแสงและ8ชั่วโมงความมืดพบว่าการเกิดยอดสูงมาก Delalonde และคณะ (1996) กล่าวว่าการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพดที่อุณหภูมิ7 °C นาน14 วันจำเป็นสำหรับการชักนำให้เกิดยอด การชักนำให้เกิดความเครียดก่อนทำการเพาะเลี้ยงก็มีผลต่อความสำเร็จในการชักนำให้เกิดยอดได้เช่นกัน Kumar และคณะ (2003)ได้รายงานว่าการนำดอกของ*Cucumis sativa* ไปไว้ในอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 วันก่อนทำการ

เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรจะชักนำให้เกิดยอดได้ดี นอกจากความเครียดที่เกิดจากอุณหภูมิแล้ว ความเครียดเนื่องจากสาเหตุอื่นๆเช่น การงดอาหารในการเพาะเลี้ยงละอองเกสรของยาสูบ ระยะหนึ่งสามารถชักนำการเกิดยอดหลังจากย้ายลงปลูกในอาหารที่มีธาตุอาหารต่างๆสมบูรณ์ (Zarsky และคณะ 1992) Pechan และ Keller (1989) พบว่าการชักนำให้เกิดความเครียดในละอองเกสรของ *Brassica napus* ด้วยรังสีแกมมาและ แอลกอฮอล์สามารถเพิ่มอัตราการเกิดยอดได้

6.4 สภาพทางสรีรวิทยาของพืชที่นำเซลหรืออวัยวะมาทำการเพาะเลี้ยง Afele และคณะ 1992 กล่าวว่าการขาดธาตุอาหารในขณะที่พืชได้รับอุณหภูมิที่ต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตจะช่วยชักนำให้เกิดยอด Puddephat และคณะ (1999) ประสพความสำเร็จในการชักนำให้เกิดต้นในการเพาะเลี้ยงไข่ ของหอมโดยนำต้นแม่ไปปลูกที่อุณหภูมิ 10-15 °C นอกจากนี้ Agarwal และ Bhojwani คณะ 1993 รายงานว่าการให้ ethrel กับต้น *Brassica juncea* สามารถเพิ่มการเกิดยอดในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรได้ Takahata และคณะ (1991) กล่าวว่าอายุของต้นพืชที่นำละอองเกสรมาเลี้ยงมีผลต่อการเกิดยอดของละอองเกสรโดยการนำละอองเกสรจากต้น *Brassica napus* ที่มีอายุมากมาเพาะเลี้ยงจะสามารถชักนำให้เกิดยอดในละอองเกสรได้ดีกว่า

6.5 อาหารที่ทำการเพาะเลี้ยง องค์ประกอบของธาตุอาหารและฮอร์โมนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลและอวัยวะสืบพันธุ์ของพืชนั้นเป็นปัจจัยมีผลต่อความสำเร็จในการชักนำให้เกิดยอดในการเพาะเลี้ยงเซลและเนื้อเยื่อเหล่านี้เป็นอย่างมาก การเพาะเลี้ยงเซลและอวัยวะเหล่านี้มักนิยมใช้ อาหารสูตร MS นอกจากอาหารสูตร MS แล้ว Laurain และคณะ (1993) สามารถชักนำการเกิดยอดในการเพาะเลี้ยงละอองเกสรของ*Ginkgo biloba* ในอาหารเหลวสูตร Bourginand Nitch Muren 1989 สามารถชักนำพืชที่มีโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่งจากการเลี้ยงโอวุลของหอมบนอาหาร B5 เป็นต้น นอกจากนี้ฮอร์โมนที่ใส่ในอาหารที่ทำการเพาะเลี้ยงก็มีผลต่อความสำเร็จเช่นกัน Agarwal และ Bhojwani (1993) ได้เพิ่มการเกิดยอดในการเพาะเลี้ยง

อับละอองเกสรของ*Brassica juncea* ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ด้วย ABA ในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของ สตอรเบอรี่ Owenและ Miller(1996) ได้พบว่าการเกิดยอดมากที่สุดเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย2 มก/ลิตร IAA 1 มก/ลิตร BA และ 0.2 โมล glucose นอกจากนี้พวกเขายังพบว่าการใช้ธาตุเหล็กในรูป Fe-EDTA สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่า Fe-Metalosate เป็นต้นจะเห็นได้ว่าสูตรอาหาร, ธาตุต่างๆและฮอร์โมนที่เป็นส่วนประกอบในอาหารมีความสำคัญต่อความสำเร็จในการเกิดยอดของเซลหรืออวัยวะเหล่านี้

จากปัจจัยเหล่านี้หากเราทำการชักนำและให้สภาพที่เหมาะสมได้ก็จะสามารถชักนำให้เกิดยอดที่มีจำนวนโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่งแล้วทำการเพิ่มโครโมโซมเพื่อสร้างสายพันธุ์แท้ได้ต่อไป หากการสร้างสายพันธุ์แท้ด้วยวิธีเหล่านี้ได้ผลก็จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืช, การศึกษาทางพันธุศาสตร์, การย้ายยีน และนอกจากนี้ยังสามารถนำเทคนิคเหล่านี้ไปปรับใช้ในการปรับปรุงพืชอื่นที่มีวงจรชีวิตที่ยาวนานและซับซ้อนกว่าพืชเหล่านี้ได้

วิธีการ

การพัฒนาของละอองเกสร

การศึกษาระยะการพัฒนาของละอองเกสรภายในดอกไม้ชนิดต่างๆจะดำเนินการโดยเก็บดอกไม้ชนิดต่างๆในเวลาเดียวกันมาแยกเป็นกลุ่มตามขนาดดอกกลุ่มละ50 ดอก นำละอองเกสรออกจากอับละอองเกสรและย้อมด้วยสี จากนั้นตรวจสอบเพื่อหาขนาดดอกที่เริ่มมีการพบละอองเกสรในระยะ tetrad ขนาดดอกที่พบละอองเกสรอยู่ในระยะ tetrad และ uninucleate และขนาดดอกที่มีละอองเกสรส่วนใหญ่อยู่ในระยะmicrospore ที่เจริญเต็มที่ ซึ่งจะแบ่งกลุ่มของดอกเป็นดอกขนาดเล็กคือ ขนาดดอกที่เริ่มมีการพบละอองเกสรในระยะ tetrad ดอกขนาดกลางคือขนาดดอกที่พบละอองเกสรอยู่ในระยะ tetrad และ uninucleate และดอกขนาดใหญ่คือขนาดดอกที่มีละอองเกสรส่วนใหญ่อยู่ในระยะmicrospore ที่เจริญเต็มที่

การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

ในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรจะทำการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาความสามารถในการตอบสนองต่ออาหารชนิดต่างๆของอับละอองเกสรของดอกไม้ชนิดต่างๆ โดยจะทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรจากดอกทั้ง3 ขนาดจำนวน 20 อับละอองเกสรต่อจาน โดยจะทำการ

เพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตรต่างๆชนิดละ 1 จาน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ตรวจสอบความสามารถในการตอบสนองต่ออาหาร โดยอาหารที่ใช้ในการตรวจสอบเบื้องต้นมี3 ชนิดคือ อาหารสูตร MS อาหารสูตร NN และอาหารสูตร B5 โดยในอาหารแต่ละชนิดจะประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆดังนี้คือ

- 1 มก/ล TDZ
- 5 มก/ล TDZ
- 1 มก/ล 2,4-D
- 5 มก/ล 2,4-D
- 1 มก/ล BA
- 5 มก/ล BA
- 1 มก/ล TDZ + 0.1มก/ล NAA
- 5 มก/ล TDZ + 0.1มก/ล NAA
- 1 มก/ล 2,4-D + 0.1มก/ล NAA
- 5 มก/ล 2,4-D + 0.1มก/ล NAA
- 1 มก/ล BA + 0.1มก/ล NAA
- 5 มก/ล BA + 0.1มก/ล NAA

ดอกไม้แต่ละชนิดจะทำการเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาความสามารถในการตอบสนองต่ออาหารเพาะเลี้ยงเบื้องต้นจำนวน 36 จาน เมื่อพบว่าอับละอองเกสรตอบสนองต่ออาหารชนิดใดได้ดี จะทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรทั้งในสภาพมีแสงและในสภาพมืดโดยทำการเพาะเลี้ยงสภาพละ 5 ซ้ำ โดยใน 1 ซ้ำจะประกอบด้วย อับละอองเกสรจากดอกขนาดต่างๆจำนวนขนาดละ 30 อับละอองเกสร เมื่ออับละอองเกสรเกิดแคลลัสและแคลลัสพัฒนาจนมีขนาดใหญ่พอสมควรจะทำการย้ายปลูกลงสู่อาหารสูตรต่างๆ ที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เก็บข้อมูล การเกิดแคลลัส การเกิดต้นจากแคลลัส

การเพาะเลี้ยงละอองเกสร

ดอกไม้แต่ละชนิดจะทำการแยกเป็นดอกที่มีขนาดดอกใหญ่ ดอกขนาดกลาง และดอกขนาดเล็ก(ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น) มาตัดกลีบเลี้ยงและก้านดอกออก จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวในสารละลาย Clorox 20 % โดยเติม tween-20 2-3 หยด ฟอกทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นจึงนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที หลังจากที่ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ใช้ปากคีบที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วคีบเอาดอกลิ้นมังกรมาวางบนกระดาษที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วในจานแก้ว ซับน้ำที่ติดอยู่ที่ผิว ใช้มีดผ่าตัดและปากคีบแยกเอากลีบดอกที่ไม่ต้องการออกมา และตัดส่วนก้านชูอับละอองเกสรออก นำส่วนของอับละอองเกสร (anther) ประมาณ 40-50 อับละอองเกสร ลงในจานแก้วที่มีสารละลาย 0.4 M mannitol อยู่ประมาณ 5-10 ml เพื่อทำการแยกละอองเกสรเป็นอิสระจากอับละอองเกสร

จากนั้นใช้หลอดดูด ดูด mannitol ที่มีละอองเกสรอยู่ ลงในขวดที่มีสารละลาย mannitol อยู่ประมาณ 10 ml จากนั้นนำไปไว้ในอุณหภูมิต่างๆดังนี้คืออุณหภูมิ 4 ºC อุณหภูมิ 25 ºC และ อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วนำมาย้ายลงในอาหารสูตร Medium B 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำมาย้ายลงในอาหารสูตร IMI (isolated microspore induction) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วนำมาย้ายลงในอาหารสูตร IMI + 0.4% gelrite (อาหารแข็ง) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ และย้ายลงในอาหารสูตร IMR (isolated microspore regeneration) ซึ่งเป็นอาหารที่ชักนำให้เกิดเป็นต้น เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (Li และ Devaux, 2003) แต่ละการทดลองจะทำจำนวน 5 ซ้ำ

สูตรอาหาร Medium B

สารเคมี	ปริมาณ (mg/l)
KCl	1,490
$MgSO_4$	120
$CaCl_2$	110
KH_2PO_4	140
Mannitol	60,000
pH	7.0

สูตรอาหาร (IMI) และ (IMR)

	IMI[a]	**IMR**
Inorganic components		
KNO_3	1900	950
NH_4NO_3	165	82.5
$CaCl_2.2H_2O$	440	220
$MgSO_4.7H_2O$	370	185
KH_2PO_4	170	85
KI	0.83	0.42
H_3BO_3	6.2	3.1
$MnSO_4.4H_2O$	22.3	11.2
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	4.3
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.13
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.013
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.013
EDTA-Ferric salt	43.0	21.5
Organic components[b]		
Inositol	300	100
Nicotinic acid	1	1
Pyridoxine HCl	1	1
Thiamine HCl	10	10
Ascorbic acid	25	0
Casein hydrolysate	500	100
Glutamine	500	146
Maltose	60,000	30,000
BAP	1	0.2
IAA	0	0.2
Gelrite	0	4,000
pH	5.8	5.8

[a] IMI is modified from FWIB [15] and IMR modified from MS [27].

[b] BAP, 6-benzylaminopurine; IAA, indoleacetic acid.

การปลูกเลี้ยงต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นพืชที่พัฒนาจากอับละอองเกสร

ต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรจะถูกนำไปทำให้เคยชินกับอากาศโดยการนำไปปลูกเลี้ยงในสภาพการพ่นฝอย เมื่อต้นพืชสามารถปรับตัวกับสภาพแวดล้อมได้ดีและมีความแข็งแรงพอสมควรจะนำไปย้ายปลูกในกระถาง และปลูกเลี้ยงตามธรรมชาติที่เหมาะสมจนกระทั่งเกิดดอกเพื่อเปรียบเทียบลักษณะของพืช

การตรวจสอบระดับโครโมโซมของต้นพืชที่พัฒนามาจากอับละอองเกสร

ใบของต้นที่ให้อับละอองเกสรและต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรจะนำมาสับด้วยใบมีดโกนในบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดนิวคลียส (solution A of the high resolution for plant DNA, Partec, Münster, Germany)ในสภาพเย็นและบ่มเป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นทำการกรองด้วยตะแกรงไนรอนขนาด30 µm จากนั้นนำมาย้อมด้วยสารละลายย้อมนิวเคลียส (10mM sodium citrate, 2 mM $MgCl_2$, 1%(w/v) PVP K-30 (Wako Chemical, Tokyo), 0.1% (v/v) Triton X-100, and 2mg L^{-1} 4′,6-diamidino-2 phenylindole (DAPI), pH 7.5) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ Ploidy Analyzer PA (Partech, Münster, Germany) ซึ่งใช้โปรแกรม PAS software (Partec) ในการวิเคราะห์ โดยแต่ละครั้งของการวิเคราะห์จะทำการวิเคราะห์มากกว่า 3,000 นิวเคลียส

การสกัดดีเอ็นเอ

ใบพืชปริมาณ 1 กรัมจะถูกเก็บในช่วงเวลาเช้าจากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้สาร C-TAB ตามวิธีการของ Murray and Thompson, 1980

การตรวจสอบพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค RAPD

ในการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมพืชโดยเทคนิค RAPD จะใช้ Primer OPU-3,OPU-5, OPU6, OPU-7, OPU-12, OPU-13, OPU-14 และ OPU-1 ปฏิกิริยา PCR จะมีบัพเฟอร์ปริมาตร 20 µl ซึ่งประกอบด้วย 1 U Taq polymerase, 2 µl of 10x PCR buffer, 100 µM dNTP ของเบสแต่ละชนิด, 400 nM ของไพรเมอร์ และ 0.5 µl ของดีเอ็นเอ(50-100ng)ปฏิกิริยา PCR จะดำเนินการโดยใช้ Perkin Emmer PCR machine จำนวน 35

รอบของวงจร โดย1วงจรจะประกอบด้วย 95°C นาน 1 นาที 35 °C เป็นเวลา 2 นาที และ 72 °C นาน 1นาที

ผลการทดลอง

การทดลองที่1 การศึกษาการพัฒนาของละอองเกสรภายในอับละอองเกสรในดอกขนาดต่าง ๆ

จากการศึกษาการพัฒนาการของดอกและเซลสืบพันธุ์ของไม้ดอกชนิดต่าง ๆ พบว่าการพัฒนาของเกสรเพศผู้นั้นไม่ได้ขึ้นกับขนาดหรืออายุของดอกเพียงอย่างเดียวยังขึ้นกับอายุของต้นพืชและอายุของช่อดอกด้วย ในพืชที่ปลูกเลี้ยงเป็นเวลานานจนเกิดดอกจำนวนมาก และดอกบานเป็นจำนวนมาก ถึงแม้ว่าดอกที่เกิดใหม่มีอายุน้อยแต่เก็บจากต้นที่มีอายุมาก เหล่านี้ พบว่าละอองเกสรเพศผู้เจริญเป็นละอองเกสรที่โตเต็มที่หมดแล้วในขณะที่ดอกที่มีอายุเท่ากันในต้นที่อายุน้อยและเริ่มออกดอกได้ไม่นาน เมื่อเก็บดอกที่มีขนาดเท่ากับดอกจากต้นที่มีอายุมากพบว่าดอกเหล่านี้มีเกสรเพศผู้จะอยู่ในระยะ tetrad สำหรับตำแหน่งของดอกบนช่อดอกก็มีผลต่อการพัฒนาช่อดอกเช่นกันในดอกที่มีอายุและ ขนาดเดียวกันแต่อยู่คนละตำแหน่งจะมีการพัฒนาของเกสรเพศผู้ต่างกัน แต่ดอกที่มีอายุเท่ากันและอยู่บนตำแหน่งเดียวกันของช่อดอกที่มีการเจริญเติบโตเท่ากันถึงแม้อยู่คนละต้นก็มีการพัฒนาของเกสรเพศผู้เหมือน หรือใกล้เคียงกัน ซึ่งการศึกษาการนำเอาอวัยวะหรือเซลสืบพันธุ์มาเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นนั้น ระยะ การพัฒนาของเซลสืบพันธุ์มีความสำคัญต่อความสำเร็จในการชักนำให้เกิดยอดใหม่ที่มีโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่งเป็นอย่างมาก ได้มีรายงานความสำเร็จในการชักนำให้เกิดต้นของอับละอองเกสรหรือละอองเกสรที่อยู่ในระยะ tetrad และหลังระยะนี้เล็กน้อยเป็นจำนวนมาก การทราบ ตำแหน่งของดอกบนช่อดอก ชนิดและการพัฒนาของช่อดอก ขนาดดอก รวมทั้งอายุของพืช จึงมีความสำคัญต่อการประมาณระยะการพัฒนาของละอองเกสรเพศผู้ ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความสำเร็จในการชักนำให้เกิดต้นพืชที่มีโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่งได้

การพัฒนาของดอกและเซลสืบพันธุ์ในดอกไม้แต่ละชนิดที่ทำการศึกษามีดังต่อไปนี้

<u>แววมยุรา</u>

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Torenia fournieri*

วงศ์ Scrophulariaceae

สามัญ Wishbone flower

ช่อดอกหลักเป็นแบบกระจะ (raceme) โดยมีช่อดอกย่อยเป็นแบบกระจุก (cyme) ดอกออกเป็นช่อที่ปลายกิ่ง ช่อดอกย่อยจะเกิดจากยอดสู่โคนต้น โดยดอกจะบานจากช่อดอกย่อยด้านบนที่เกิดจากยอดของต้นก่อน
แต่ในแต่ละช่อดอกย่อยดอกจะบานโคนสู่ปลายของช่อดอกย่อย (acropetalous inflorescence)
จะพบละอองเกสรที่พัฒนาอยู่ในระยะ Tetrad เมื่อทั้งต้นมีดอกบาน 1-2 ดอก
ซึ่งตำแหน่งของดอกที่พบระยะ tetrad คือ

1. ดอกคู่แรกจากปลายยอด ของช่อดอกย่อย (ดอกคู่ที่มีขนาดเล็กที่สุด) และ ดอกเดี่ยวที่อยู่ตรงปลายสุดของ ช่อดอกย่อยที่อยู่ต่ำที่สุด
2. ดอกคู่แรกจากปลายยอด ของช่อดอกย่อย (ดอกคู่ที่มีขนาดเล็กที่สุด) ของช่อดอกย่อยที่ 2-4 จากโคนต้น
3. ช่อดอกจากลำต้นหลัก ดอกคู่ที่ 1 และ 2 จากปลายยอดของช่อดอกย่อย
ขนาดดอกที่พบระยะ Tetrad คือ ดอกที่มีขนาด 0.5-1.0 ซม

<u>บลูซัลเวีย</u>

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Salvia* spp.
วงศ์ Labiatae
สามัญ Salvia

ช่อดอกกระจุกรอบ (verticillaster) ช่อดอกอยู่เป็นคู่ตรงข้ามซอกใบ (dichasium cyme) มีการเรียงตัวแบบตรงข้าม (opposite) ช่อดอกบานจากด้านล่างขึ้นบน (indeterminate) แต่ละช่อดอกย่อยจะมี 5-9 ดอก ช่อดอกย่อยที่อยู่ตรงกลางของช่อดอกหลักจะมีขนาดใหญ่และเกิดเพียงช่อเดียว ส่วนดอกอื่นๆในตำแหน่งถัดลงมาจะเกิดเป็นคู่ตรงข้ามกัน
ช่อดอกที่พบดอกที่มีการพัฒนาของละอองเกสรในระยะ tetrad คือช่อดอกที่มีดอกกำลังบาน 2 ดอกของช่อดอกหลัก (ดอกที่มีขนาดใหญ่ที่สุด อยู่ตำแหน่งล่างสุดของช่อดอก)
ตำแหน่งของดอกที่พบละอองเกสรที่พัฒนาเข้าสู่ ระยะ tetrad คือ

1. ช่อดอกคู่ที่ 2 นับจากด้านล่าง ดอกย่อยทีมีขนาดใหญ่เป็นอันดับที่ 3
2. ช่อดอกคู่ที่ 3 นับจากด้านล่าง ดอกย่อยที่มีขนาดใหญ่เป็นอันดับที่ 3
3. ช่อดอกคู่ที่ 4 นับจากด้านล่าง ดอกย่อยที่มีขนาดใหญ่เป็นอันดับที่ 2
4. ช่อดอกคู่ที่ 5 นับจากด้านล่าง ดอกย่อยที่มีขนาดใหญ่เป็นอันดับที่ 2
5. ช่อดอกคู่ที่ 6 นับจากด้านล่าง ดอกย่อยที่มีขนาดใหญ่เป็นอันดับที่ 2
6. ช่อดอกคู่ที่ 7 นับจากด้านล่าง ดอกย่อยที่มีขนาดใหญ่ที่สุด

โดยจะพบการพัฒนาของละอองเกสรในระยะ tetrad ในดอกที่มีขนาด 0.1 - 0.3 ซม.

<u>ลิ้นมังกร</u>

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Antirrhinum majus*

วงศ์ Scrophulariaceae

สามัญ snapdargon

ช่อดอกกระจะ (raceme) ดอกออกแบบสลับกันไป (alternate) โดยดอกบานจากด้านล่างของช่อดอกขึ้นไป (indeterminate) ช่อดอกที่พบดอกที่มีการพัฒนาของละอองเกสรอยู่ในระยะ tetrad คือช่อดอกที่ ดอกที่กลีบเลี้ยงเริ่มเปิดออก เห็นสีของกลีบดอกเพียงเล็กน้อยจำนวน3ดอก (ดอกที่ 1-3 นับจากด้านล่างของช่อดอก) โดยดอกที่พบระยะ tetrad ของละอองเกสร จะเป็นตำแหน่งดอกที่ 6-8 นับจากด้านล่างของช่อดอก

โดยดอกมีขนาด 0.4-0.5 ซม.

<u>เบญจมาศ</u>

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *chrysanthemum morifolium*

วงศ์ Compositae

สามัญ Chrysanthemum

ช่อดอกกระจุกแน่น (capitulum: head) ดอกบานจากด้านนอกเข้าสู่ใจกลางช่อดอก (indeterminate)

ช่อดอกที่พบดอกที่มีการพัฒนาของละอองเกสรอยู่ในระยะ Tetrad คือ ช่อดอกยังตูมอยู่ โดยดอกย่อยชั้นนอก(ray flowers) ยังไม่เปิด โดยช่อดอกมีขนาด ประมาณ 0.4-0.6

ชั้นของดอกย่อยที่พบระยะ tetrad

1. ดอกขนาด กว้าง 0.4 ซม. พบใน ดอกย่อย (disc flowers) ชั้นในสุดที่อยู่กลางดอก
2. ดอกขนาด กว้าง 0.5 ซม. พบใน ดอกย่อย (disc flowers) ชั้นในสุดที่อยู่กลางดอก และชั้นที่ 2 จากกลางดอก
3. ดอกขนาด กว้าง 0.6 ซม. พบใน ดอกย่อย (disc flowers) ชั้นในสุดที่อยู่กลางดอก

<u>เยอร์บีร่า</u>

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Gerbera jamesonii*

วงศ์ Compositae

สามัญ Gerbera

ช่อดอกกระจุกแน่น (capitulum: head) โดยดอกบานจากด้านนอกเข้าสู่ใจกลางช่อดอก (indeterminate)

ช่อดอกที่พบละอองเกสรพัฒนาอยู่ในระยะTetrad คือช่อดอกที่ยังตูมอยู่ ดอกย่อยชั้นนอก(ray flowers) ยังไม่เปิด โดยช่อดอกที่มีความกว้าง 1.2- 1.5 ซม.

ชั้นของดอกย่อยที่พบระยะ tetrad

1. กว้าง 1.3 ซม. ยาว 0.7 ซม พบในดอกย่อย (disc flowers) ชั้นที่ 1-3 จากด้านนอกของช่อดอก

2. กว้าง 1.2 ซม. ยาว 0.9 ซม พบในดอกย่อย (disc flowers) ชั้นในสุด ที่อยู่กลางดอก และชั้นที่ 2-3 จากกลางดอก
3. กว้าง 1.5 ซม. ยาว 2.0 ซม. พบในดอกย่อย (disc flowers) ชั้นในสุด ที่อยู่กลางดอก
4. กว้าง 1.5 ซม. ยาว 2.7 ซม. พบในดอกย่อย (disc flowers) ชั้นในสุด ที่อยู่กลางดอก

<u>รักเร่</u>

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Dahlia spp.*

วงศ์ Compositae

สามัญ Dahlia

ช่อดอกกระจุกแน่น (capitulum: head) ดอกบานจากด้านนอกเข้าสู่ใจกลางช่อดอก (indeterminate)

ดอกที่พบดอกย่อยที่มีละอองเกสรพัฒนาในระยะ Tetrad คือ ช่อดอกที่ตูม ดอกย่อยชั้นนอก(ray flowers) ยังไม่เปิด โดยช่อดอกมีขนาดความกว้างของช่อดอกตั้งแต่ 0.5-1.0 ซม.

ชั้นของดอกย่อยที่พบระยะ tetrad

1. กว้าง 0.5 ซม. พบใน ดอกย่อย (disc flowers) ชั้นนอกสุด
2. กว้าง 0.8 ซม. พบใน ดอกย่อย (disc flowers) ชั้นในสุดที่อยู่กลางดอก
3. กว้าง 1.0 ซม. พบใน ดอกย่อย (disc flowers) ชั้นในสุดที่อยู่กลางดอก

<u>แอสเตอร์</u>

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Callistephus chinensis*

วงศ์ Compositae

สามัญ Aster

ช่อดอกเป็นแบบกระจุกแน่น (capitulum: head) ดอกย่อยบานจากด้านนอกเข้าสู่ใจกลางช่อดอก (indeterminate)

ต้นที่พบดอกที่มีการพัฒนาของละอองเกสรอยู่ในระยะ Tetrad คือต้นมีดอกบาน 1 ดอก ที่ปลายยอดของลำต้น

โดยจะใช้ช่อดอกที่ตูม ดอกชั้นนอก (ray flowers) ยังไม่บาน มีขนาดความกว้างข่อดอกตั้งแต่ 1.0-1.1 ซม. ตำแหน่งของช่อดอกที่พบ ละอองเกสรอยู่ในระยะ tetrad คือ

1. ช่อดอกที่เกิดจากปลายกิ่งของกิ่งข้างที่ 7 นับจากยอดของต้น ดอกย่อย (disc flowers) ชั้นที่ 2 และ 3 จากกลางช่อดอก
2. ดอกที่เกิดจากปลายกิ่งของกิ่งข้างที 8 นับจากยอดของต้น ดอกย่อย (disc flowers) ชั้นที่ 4 และ 5 จากกลางช่อดอก

ปทุมมา

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Curcuma altiatima*

วงศ์ Zingiberaceae

ช่อดอกแบบช่อดอกแน่น (compact spike) ช่อดอกย่อยเรียงตัวแบบ เวียน (spiral) ช่อดอกบานจากโคนสู่ปลายช่อดอก (indeterminate) ในแต่ละช่อดอกย่อยจะมีจำนวน3-4 ดอก โดยดอกที่มีขนาดใหญ่ที่สุดตรงกลางในแต่ละช่อดอกย่อยเริ่มบานก่อน

ช่อดอกที่พบระยะTetrad คือช่อดอกที่มีดอกตูมทั้งช่อ ใบประดับล่างยังไม่เปิดดอก ความยาวช่อดอกรวม 7.5-9.0 ซม, ตำแหน่งของดอกที่พบระยะ tetrad ในช่อดอกที่ทำการศึกษาคือ

1. ช่อดอกย่อยชั้นที่ 1 จากด้านล่าง ดอกย่อยที่มีขนาดใหญ่เป็นอันดับที่ 2
2. ช่อดอกย่อยชั้นที่ 2 จากด้านล่าง ดอกย่อยที่มีขนาดใหญ่เป็นอันดับที่ 2
3. ช่อดอกย่อยชั้นที่ 3 จากด้านล่าง ดอกย่อยที่มีขนาดใหญ่เป็นอันดับที่ 2
4. ช่อดอกย่อยชั้นที่ 6 จากด้านล่าง ดอกย่อยที่มีขนาดใหญ่เป็นอันดับที่ 2
5. ช่อดอกย่อยชั้นที่ 7 จากด้านล่าง ดอกย่อยที่มีขนาดใหญ่ที่สุด
6. ช่อดอกย่อยชั้นที่ 7 จากด้านล่าง ดอกย่อยที่มีขนาดใหญ่เป็นอันดับที่ 2

ซึ่งขนาดของดอกที่พบระยะ tetrad จะมีความยาวดอก ตั้งแต่ 0.6-0.9 ซม แต่พบว่าในช่อดอกที่มีการพัฒนาไปมากกว่าช่อดอกเหล่านี้แม้ดอกจะมีขนาด0.6-0.9 ซม ก็มีละอองเกสรที่พัฒนาไปเป็น ละอองเกสรที่โตเต็มที่ทั้งหมด

กล๊อกซิเนีย

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Sinniagia speciosa*

วงศ์ Gesneriaceae

สามัญ Gloxinia

ดอกที่พบการพัฒนาของละอองเกสรเพศผู้อยู่ในระยะ Tetrad คือ ดอกตูม กลีบเลี้ยงยังไม่เปิดออก

โดยดอกมีขนาด 0.6-0.8 ซม

ผีเสื้อช่อ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Dianthus bulbathus*

วงศ์ Caryophyllaceae

สามัญ Dianthus

ช่อดอกเป็นแบบ กระจุกเชิงประกอบ (compound cyme) ดอกบานจากปลายช่อดอกกลางช่อดอก การบานของดอกเป็นแบบdeterminate

ช่อดอกที่พบดอกที่มีการพัฒนาของละอองเกสรในระยะ Tetrad คือ ช่อดอกที่มีเริ่มดอกบานเพียง 1 ดอก

ขนาดของดอกที่พบระยะ tetrad คือดอกย่อยที่มีขนาด0.7-0.9 ซม.

ผีเสื้อ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Dianthus chinesis*

วงศ์ Caryophyllaceae

สามัญ Dianthus

ดอกที่ทำการศึกษา- ดอกตูม ดอกจะบานจากบนสุดช่อดอก

ขนาดดอกที่พบ tetrad

1. กว้าง 0.1 ซม. ยาว 0.7 ซม.
2. กว้าง 0.3 ซม. ยาว 0.9 ซม.
3. กว้าง 0.2 ซม. ยาว 0.8 ซม.

ฟล๊อก

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Phlox drummondii* Hook.

วงศ์ Polemoniaceae

สามัญ Phlox

ช่อดอกเป็นแบบ กระจุกเชิงประกอบ (compound cyme) ดอกบานจากปลายช่อดอก (determinate)

ช่อดอกที่พบละอองเกสรอยู่ในระยะ Tetrad คือ ช่อดอกที่มีดอกเริ่มบานบาน 1 ดอก ขนาดของดอกที่พบระยะ tetrad คือดอกที่มีขนาด 0.1-0.2 ซม.

ดาวเรือง

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Tagetes spp.*

วงศ์ Compositae

สามัญ Marigolds

ช่อดอกกระจุกแน่น (capitulum: head) ดอกบานจากด้านนอกเข้าสู่ใจกลางช่อดอก (indeterminate)

ดอกที่พบการพัฒนาของละอองเกสรอยู่ในระยะTetrad คือ ช่อดอกตูม ดอกย่อยชั้นนอก(ray flowers) ยังไม่เปิด

ขนาดของช่อดอกดอกที่พบระยะดอกที่มีละอองเกสรในระยะ tetrad คือ ช่อดอกที่มีขนาด 0.6-1.0 ซม.

ชั้นของดอกย่อยที่พบระยะ Tetrad

1.ดอกขนาด 0.6 ซม.พบใน ดอกย่อย (disc flowers) ชั้นในสุดที่อยู่กลางดอก

2.ดอกขนาด 0.75 ซม.พบใน ดอกย่อย (disc flowers) ชั้นในสุดที่อยู่กลางดอก ,ชั้นที่ 2 และ 3 จากกลางดอก

3.ดอกขนาด 0.9 ซม.พบใน ดอกย่อย (disc flowers) ชั้นในสุดที่อยู่กลางดอก

4. ดอกขนาด 1.0 ซม.พบใน ดอกย่อย (disc flowers) ชั้นที่ 3 จากกลางดอก

<u>กาเซเนีย</u>

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Gazania rignes*

วงศ์ Compositae

สามัญ Gazania

ช่อดอกกระจุกแน่น (capitulum: head) ดอกบานจากด้านนอกเข้าสู่ใจกลางช่อดอก (indeterminate)

ช่อดอกที่พบดอกที่มีละอองเกสรอยู่ในระยะ Tetrad คือ ระยะที่ช่อดอกยังตูม ดอกย่อยชั้นนอก (ray flowers) ยังไม่เปิด โดยช่อดอกมี 0.8-1.1 ซม. ดอกที่อยู่ในชั้นในสุดของช่อดอกจะมีการพัฒนาของละอองเกสรอยู่ในระยะ Tetrad

<u>เทียนญี่ปุ่น</u>

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Impatiens wallerana*

วงศ์ Balsaminaceae

สามัญ : Impatiens

ดอกเป็นดอกเดียวโดยดอกจะเกิดบริเวณปลายยอดของกิ่งแขนง ดอกที่พบละอองเกสรที่อยู่ในระยะ tetrad คือ ดอกตูม ที่มีขนาด 0.4-0.5 ซม.

<u>เทียนไทย</u>

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Impatients balsamina*

วงศ์ Balsaminaceae

สามัญ Garden Balsan

ดอกจะเกิดตามลำต้นโดยดอกจะเกิดจากโคนลำต้นจนถึงปลาย (indeterminate) โดยดอกที่มีขนาด 0.4 – 0.6 ซม. จะมีละอองเกสรอยู่ในระยะ tetrad

<u>พิทูเนีย</u>

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Petunia hybrida*

วงศ์ Solanaceae

สามัญ Petunia

ดอกที่พบการพัฒนาของละอองเกสรอยู่ในระยะ tetrad คือดอกที่กำลังตูมมีขนาด 0.2-0.4 ซม. แต่อย่างไรก็ตามต้นของพิทูเนียจะต้องมีดอกที่เริ่มบานไม่มาก หากมีดอกที่บานเต็มต้นแล้ว ดอกที่ยังไม่บานและมีขนาด 0.2-0.4 ซม. ก็มีละอองเกสรที่โตเต็มที่หมดแล้ว

<u>กุหลาบหิน</u>

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Kalanchoe blossfeldiana*

วงศ์ Crassulaceae

สามัญ Kalanchoe

ช่อดอกเป็นแบบ กระจุกเชิงประกอบ (compound cyme) ดอกบานที่ปลายยอดช่อดอกก่อน (determinate) ช่อดอกที่พบว่ามีดอกที่ละอองเกสรพัฒนาอยู่ในระยะ tetrad คือช่อดอกที่มีดอกตูมทั้งช่อ ตำแหน่งของดอกที่พบว่ามีดอกที่ละอองเกสรที่พัฒนาอยู่ในระยะ tetrad คือดอกย่อยคู่แรกของกิ่งแขนง คู่ที่ 2จากปลายช่อดอก ขนาดดอกที่พบ tetradคือดอกที่มีขนาด 0.3-0.5 ซม.

<u>เสี้ยนฝรั่ง</u>

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Cleome spinosa*

วงศ์ Capparaceae

สามัญ Spider flower

ช่อดอกแบบซี่ร่ม (umbel) ช่อดอกบานจากดอกย่อยที่อยู่ข้างนอกไปสู่กลางช่อดอก (indeterminate) ช่อดอกที่พบดอกที่มีระยะการพัฒนาของละอองเกสรอยู่ในระยะ tetrad คือช่อดอกที่มีดอกบาน 3-5 ดอก โดยขนาดดอกที่พบ tetrad คือดอกที่มีขนาด 0.4-0.7 ซม.

<u>มอร์นิ่งกลอรี่</u>

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Impomoea purpurea*

วงศ์ Convoluvlaceae

สามัญ Morning Glory Vine

ดอกจะเกิดตามลำต้นบริเวณซอกใบโดยจะบานจากโคนต้นไปหายอด (indeterminate) ดอกเป็นดอกเดี่ยว ดอกที่พบว่าละอองเกสรพัฒนาอยู่ในระยะ tetrad คือดอกที่ยังตูมอยู่มีขนาดดอก 0.1-0.4 ซม.

<u>แพงพวย</u>

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Vinca rosa*

วงศ์ Apocyanceae

สามัญ Vinca

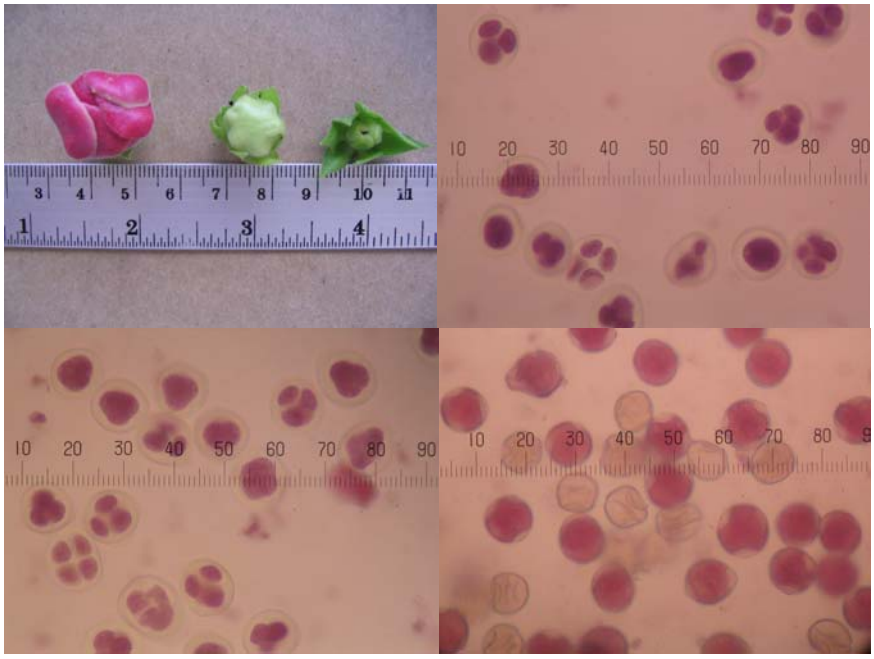
ช่อดอกเป็นแบบกระจุก (simple cyme) ช่อดอกจะเกิดบริเวณปลายช่อของกิ่งแขนง ช่อดอกที่พบดอกที่มีการพัฒนาของเกสรเพศผู้อยู่ในระยะ tetrad คือ ช่อดอกที่ทุกดอกยังไม่บานและดอกตูมที่ปลายช่อ มีขนาดเล็กมาก ยาวประมาณ 0.1-.03 ซม.

เมื่อได้ข้อมูลจาการศึกษาเบื้องต้นแล้ว จะทำการแบ่งขนาดดอกเพื่อที่จะนำไปทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรดังนี้คือ ทำการเก็บดอกของพืชชนิดต่างๆโดยจะวัดขนาดดอกและแบ่งเป็นกลุ่ม ทำการทดสอบขนาดละ 50 ดอก จากนั้นทำการย้อมสีละอองเกสรโดยใช้ สี สี acetone carmine และสีย้อม Hemetoxin' ตรวจสอบระยะการพัฒนาของละอองเกสรภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกระยะพัฒนาของละอองเกสร หาความสัมพันธ์ของขนาดดอกและการพัฒนาของอับละอองเกสร ซึ่งจะแบ่งดอกไม้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ ดอกเล็ก ดอกขนาดกลาง และดอกขนาดใหญ่ ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มได้ดังตารางที่1

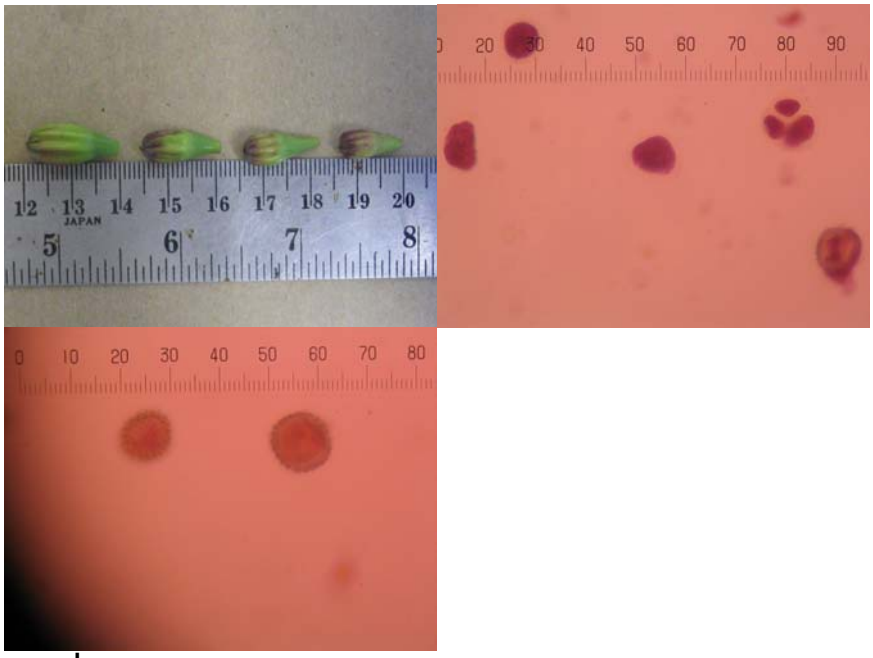
ตารางที่ 1 การพัฒนาของละอองเกสรในดอกไม้ชนิดต่าง ๆ

ชนิดพืช	กลุ่มดอกขนาดเล็ก ขนาดดอก(ซม.)ที่มีละอองเกสรอยู่ในระยะ tetrad 10-30%	กลุ่มดอกขนาดกลาง ขนาดดอก(ซม.)ที่มีละอองเกสรอยู่ในระยะ tetrad	กลุ่มดอกขนาดใหญ่ ขนาดดอก(ซม.)ที่มีละอองเกสรอยู่ในระยะ uni nucleate
1. พิทูเนีย	0.5-0.6 ซม.	0.7-0.8 ซม.	0.8-0.9 ซม.
2. เบญจมาศ	ดอก disc floret ชั้นในกว่าชั้นที่4 ของดอกขนาด 0.8 ซม.	ดอก disc floret ชั้นที่ 3-4 ของดอกขนาด 0.7-0.8 ซม.	ดอก disc floret ชั้นที่ 1-2 ของดอกขนาด 0.7-0.8 ซม.
3. ดาวเรือง	ดอก disc floret ชั้นในกว่าชั้นที่4 ของดอกขนาด 0.8 ซม.	ดอก disc floret ชั้นที่ 3-4 ของดอกขนาด 0.7-0.8 ซม.	ดอก disc floret ชั้นที่ 1-2 ของดอกขนาด 0.7-0.8 ซม.
4. ดาวเรืองฝรั่งเศส	ดอก disc floret ชั้นในกว่าชั้นที่3 ของดอกขนาด 0.8 ซม.	ดอก disc floret ชั้นที่ 3-4ของดอกขนาด 0.7-0.8 ซม.	ดอก disc floret ชั้นที่ 1-2 ของดอกขนาด 0.7-0.8ซม.
5. กาเซเนีย	ดอก disc floret ชั้นในกว่าชั้นที่ 3 ของดอกขนาด 0.8 ซม.	ดอก disc floret ชั้นที่ 3ของดอกขนาด 0.7-0.8 ซม.	ดอก disc floret ชั้นที่ 1-2 ของดอกขนาด 0.7-0.8 ซม.
6. ลิ้นมังกร	0.4	0.5	0.6
7. ผีเสื้อ	0.8	0.9	1.0
8. ผีเสื้อซ่อ	0.7	0.8	0.9

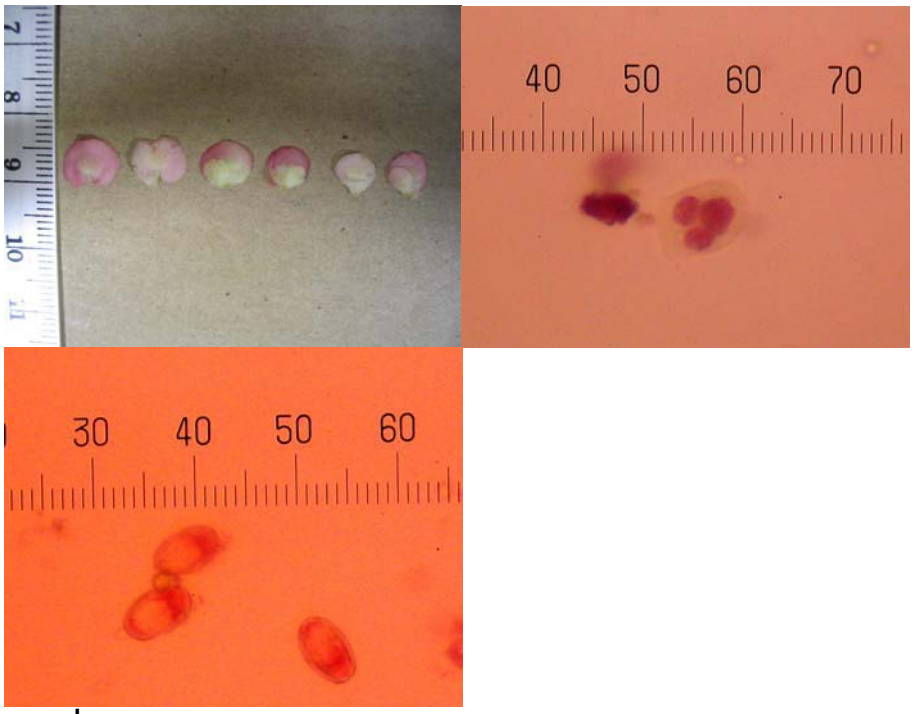
9. คาร์เนชั่น	0.7-0.8	0.9-1.0	1.0-1.1
10. เจอร์เรเนียม	0.3	0.4	0.5
11. รักเร่	ดอก disc floret ชั้นในกว่าชั้นที่4 ของดอกขนาด 0.8 ซม.	ดอก disc floret ชั้นที่ 3-4 ของดอกขนาด 0.7-0.8 ซม.	ดอก disc floret ชั้นที่ 1-2 ของดอกขนาด 0.7-0.8 ซม.
12. บานชื่น	ดอก disc floret ชั้นในกว่าชั้นที่4 ของดอกขนาด 0.8 ซม.	ดอก disc floret ชั้นที่ 3-4 ของดอกขนาด 0.7-0.8 ซม.	ดอก disc floret ชั้นที่ 1-2 ของดอกขนาด 0.7-0.8 ซม.
13. แวววยุรา	0.2-0.4	0.5-0.0.7	0.8-1.0
14. แพงพวย	0.1-0.3	0.4-0.6	0.7-0.9
15. บลูซัลเวีย	0.7	0.8	0.9
16. บีโกเนีย	0.6	0.7	0.8
17. เทียนญี่ปุ่น	0.1-0.2	0.3-0.4	0.5-0.6
18. ฟร๊อก	0.1	0.2-0.3	0.4-0.5
19. เยอร์บีร่า	ดอก disc floret ชั้นในกว่าชั้นที่7 ของดอกขนาด 1.2 ซม.	ดอก disc floret ชั้นที่ 4-7 ของดอกขนาด 0.7-0.8 ซม.	ดอก disc floret ชั้นที่ 1-3ของดอกขนาด 0.7-0.8 ซม.



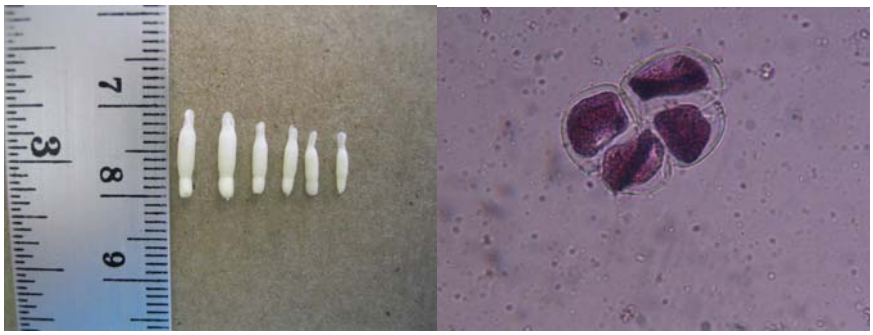
ภาพที่ 1-A กล็อกซิเนียและละอองเกสรในระยะต่างๆ



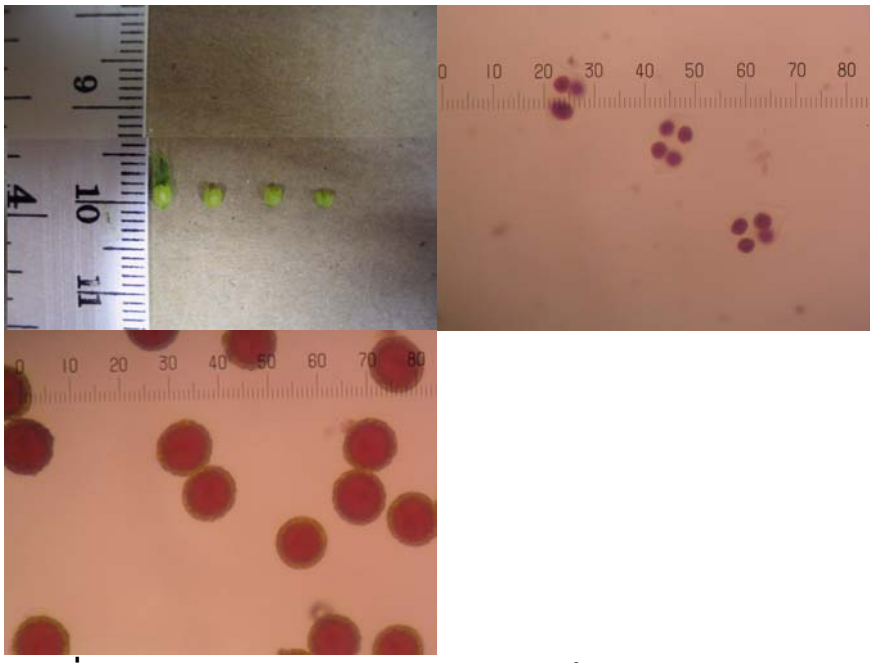
ภาพที่ 1-B ดอกดาวเรืองขนาดต่าง ๆและละอองเกสรในระยะต่าง ๆ



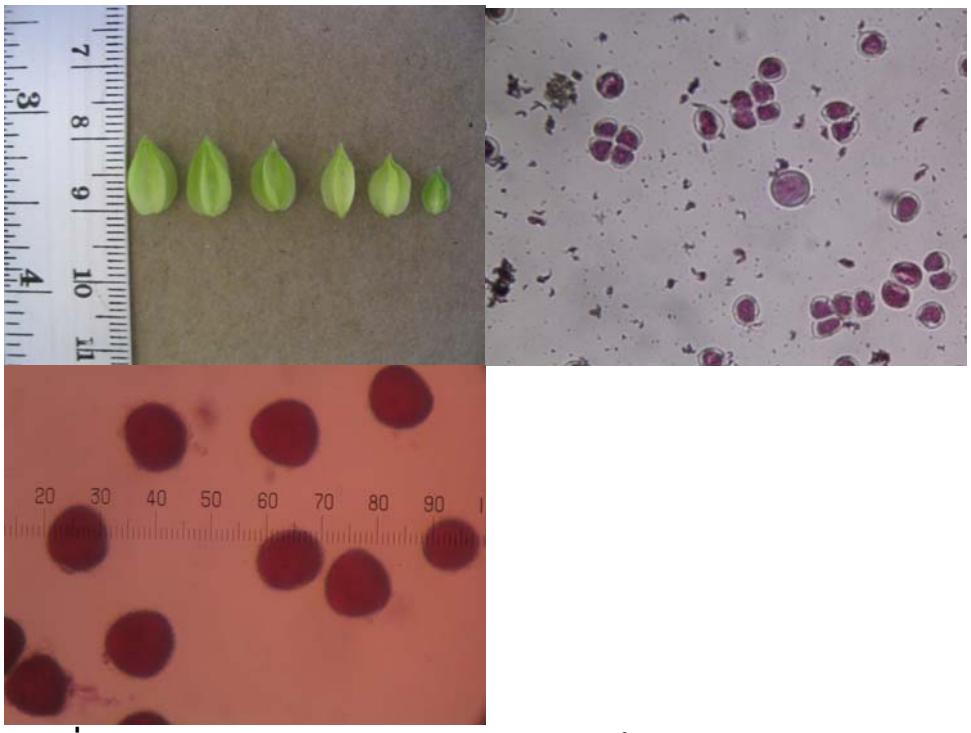
ภาพที่ 1-C ดอกบีโกเนียขนาดต่าง ๆและละอองเกสรในระยะต่าง ๆ



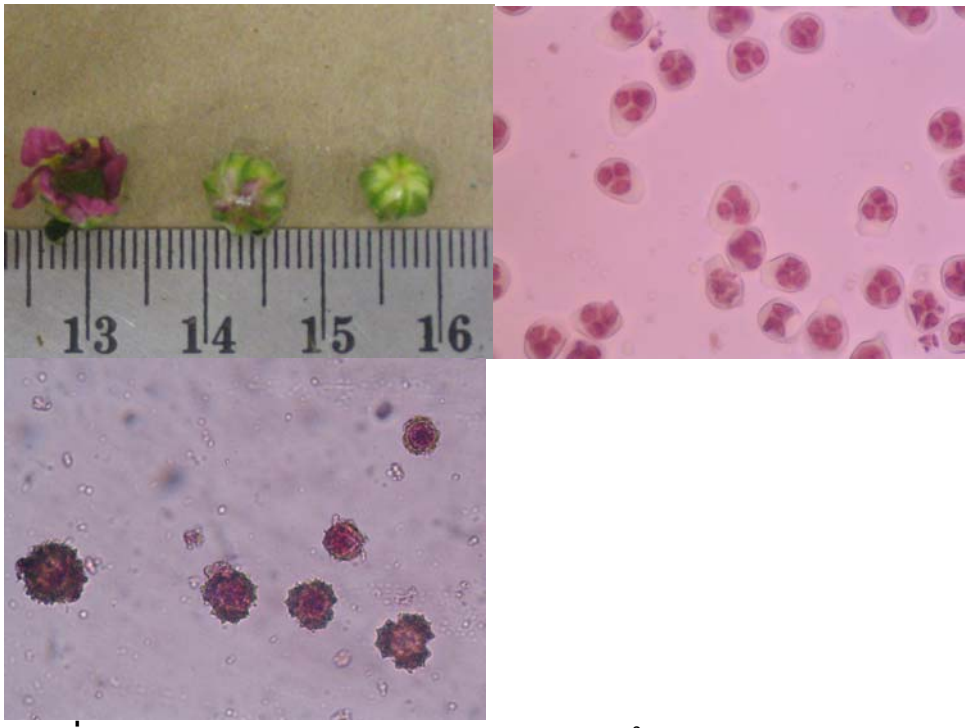
ภาพที่ 1-D ดอกปทุมมาขนาดต่าง ๆและละอองเกสรในระยะต่าง ๆ



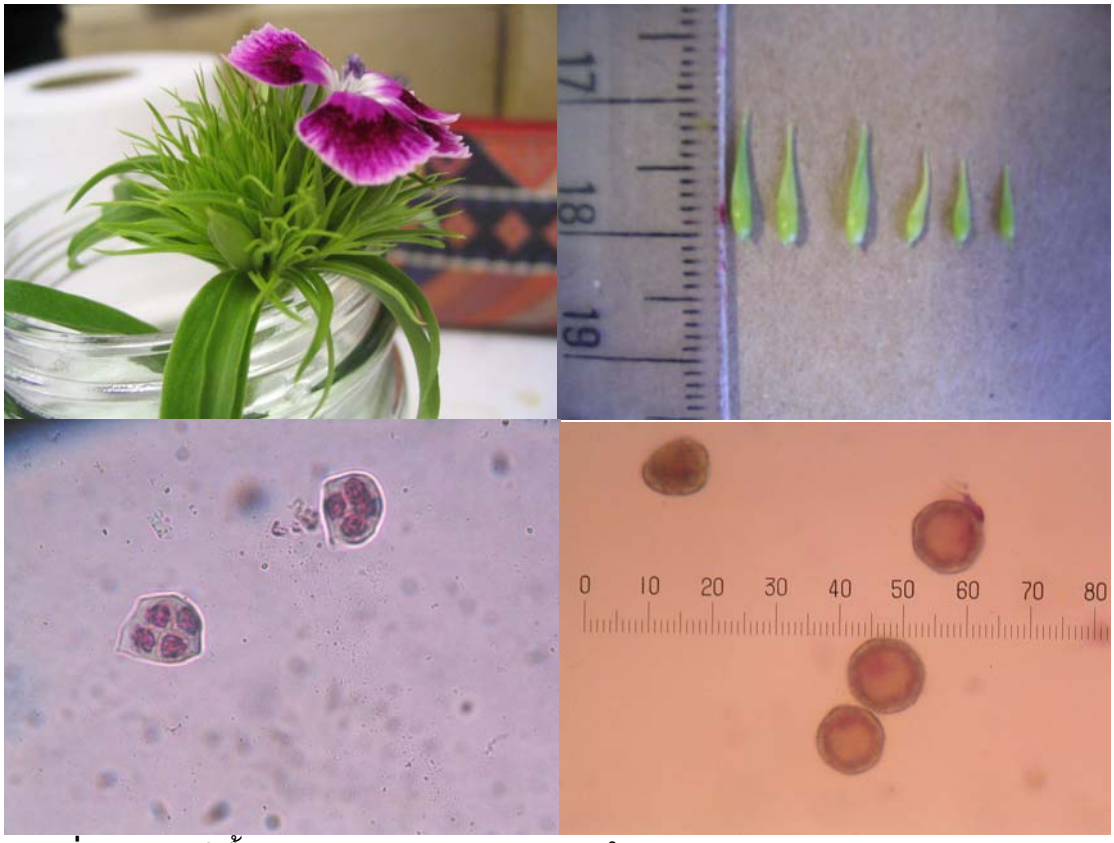
ภาพที่ 1-E ดอกรักเร่ขนาดต่าง ๆและละอองเกสรในระยะต่าง ๆ



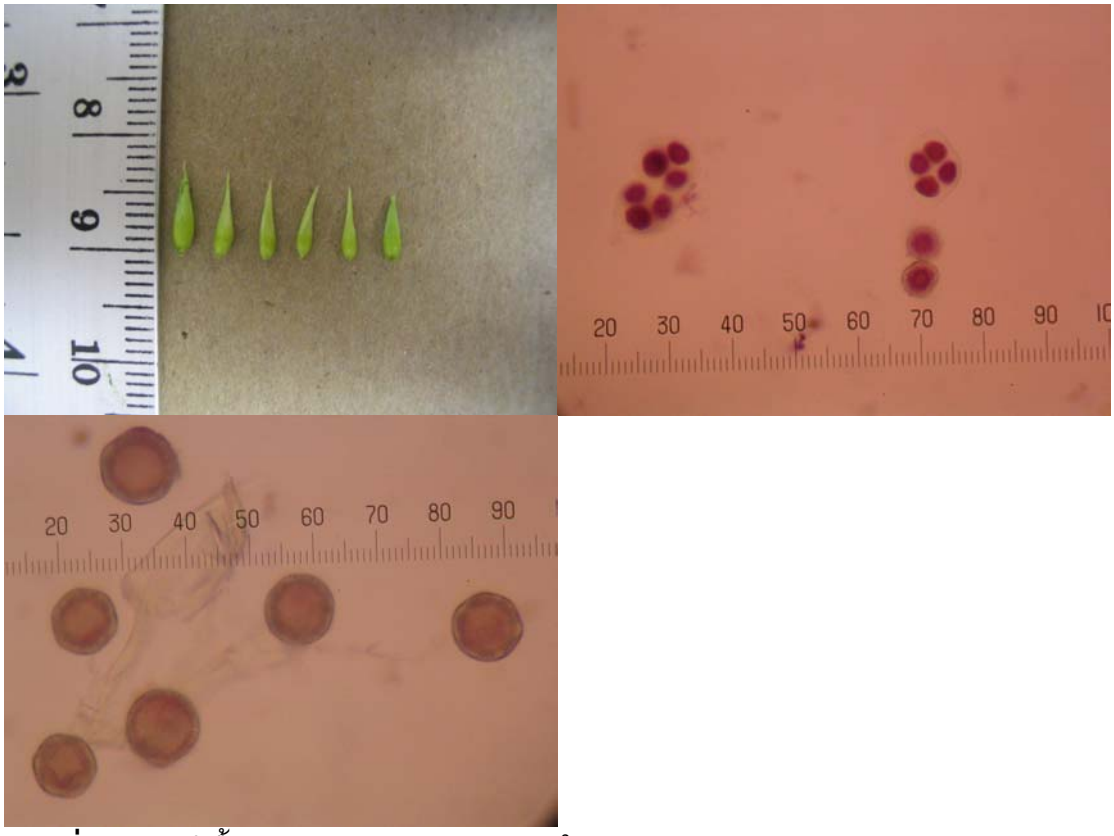
ภาพที่ 1-F ดอกแววมยุราขนาดต่าง ๆและละอองเกสรในระยะต่าง ๆ



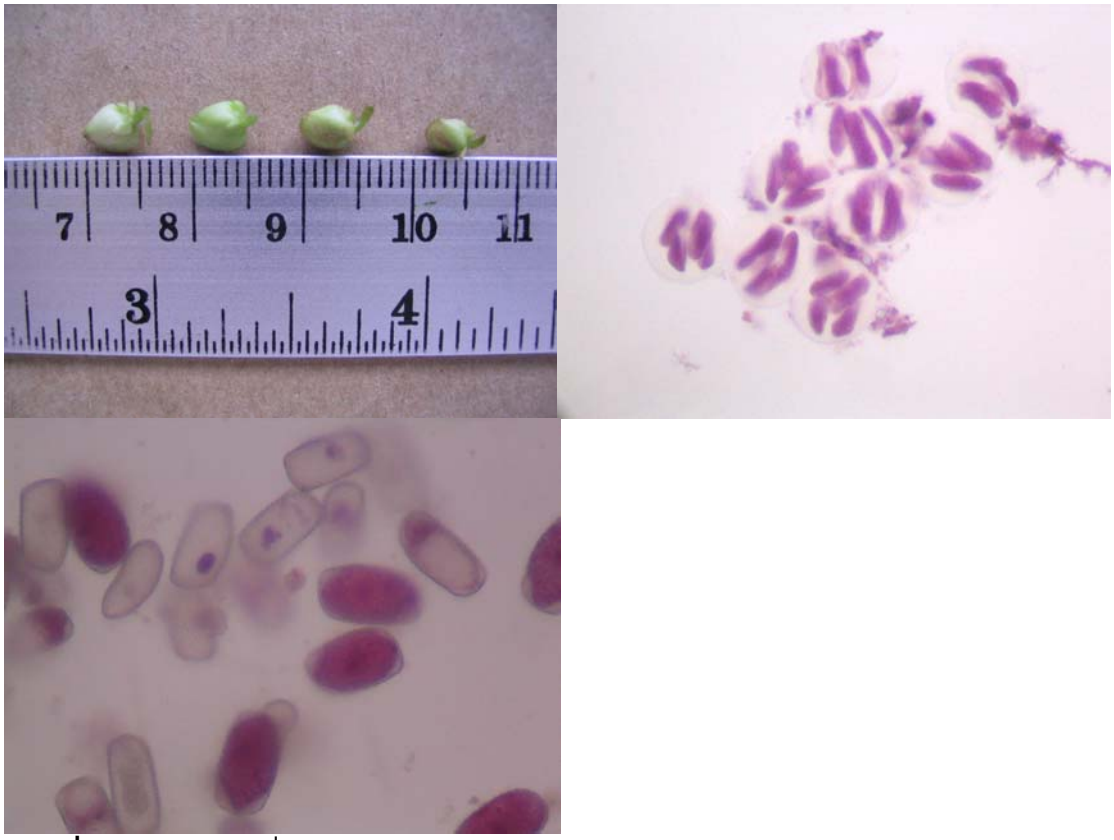
ภาพที่ 1-G ดอกเบญจมาศขนาดต่าง ๆและละอองเกสรในระยะต่าง ๆ



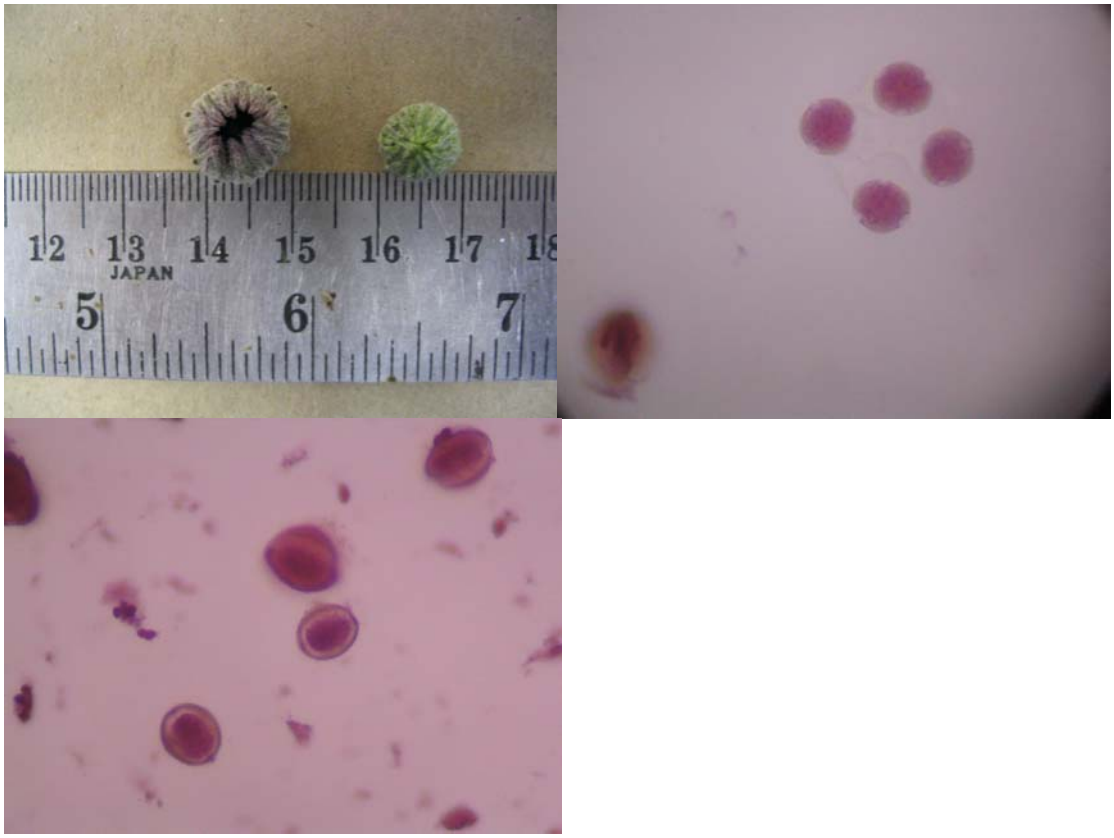
ภาพที่ 1-H ดอกผีเสื้อช่อขนาดต่าง ๆและละอองเกสรในระยะต่าง ๆ



ภาพที่ 1-I ดอกผีเสื้อขนาดต่าง ๆและละอองเกสรในระยะต่าง ๆ



ภาพที่ 1-J ดอกเทียนญี่ปุ่นขนาดต่าง ๆและละอองเกสรในระยะต่าง ๆ



ภาพที่ 1-K ดอกเยอร์บีร่าขนาดต่าง ๆและละอองเกสรในระยะต่าง ๆ

การทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

ผีเสื้อดอกเดี่ยว

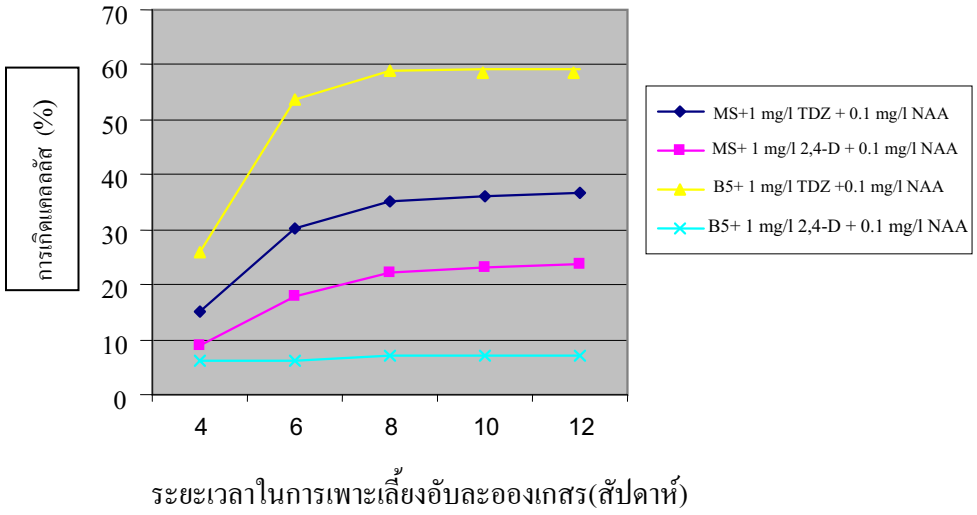
จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของผีเสื้อพบว่าอับละอองเกสรสามารถตอบสนองต่อ อาหารสูตร MS และ B5 ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ 2, 4-D โดยได้ทำการศึกษาขนาดดอก 3 กลุ่มคือ 0.7-0.8, 0.9-1.0 และ 1.1-1.2 เซนติเมตร ได้ผลการทดลองดังนี้

การเกิดของแคลลัส

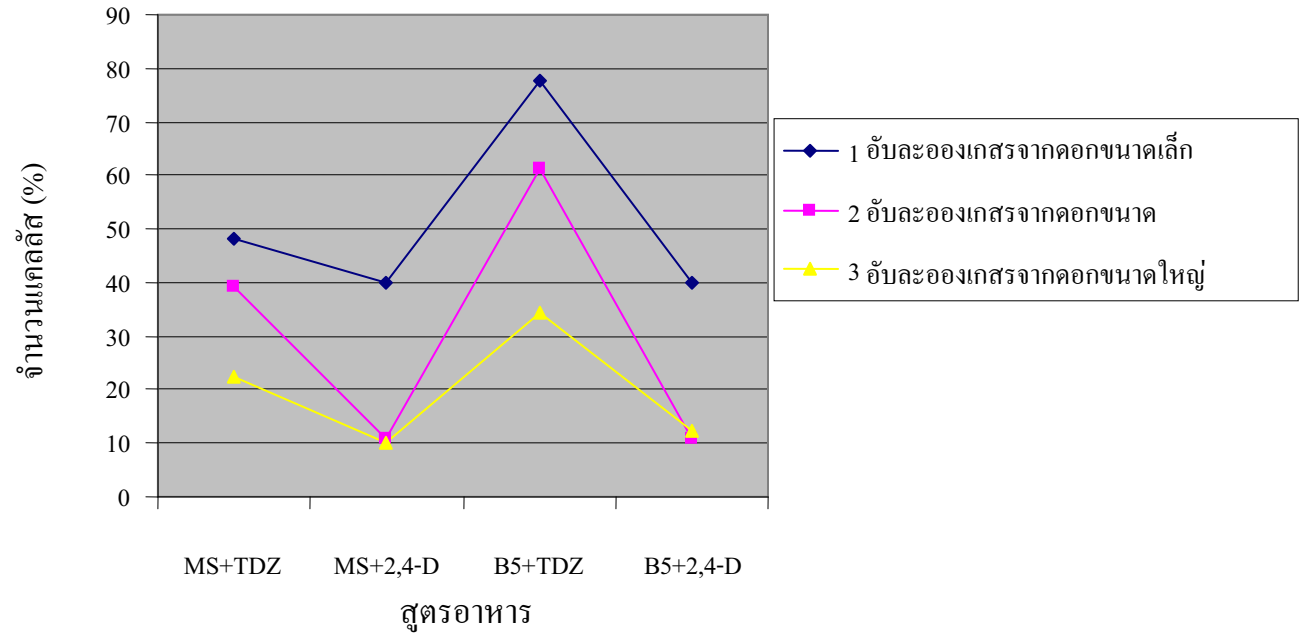
จากการทดลองการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของผีเสื้อเพื่อศึกษาการเกิดแคลลัส สัปดาห์ที่ 4, 6, 8, 10 และ 12 พบว่า อับละอองเกสรของผีเสื้อดอกเดี่ยวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA สามารถเกิดแคลลัสได้

สูงสุดถึง 58 เปอร์เซ็นต์ โดยในระยะแรกของการเพาะเลี้ยงพบว่าการเกิดแคลลัสของอับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารต่างๆไม่แตกต่างกันมากนัก แต่หลังจากเพาะเลี้ยงไปได้ 6 สัปดาห์ จะพบว่าการเกิดแคลลัสมีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของอาหารที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยอับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA สามารถเกิดแคลลัสได้สูงสุด รองลงมาคืออับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรสูตร MS ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZและ 0.1 มก/ล NAA และ อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล 2-4 D และ 0.1 มก/ล NAA ส่วนอับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร สูตร B5 ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล 2-4 Dและ 0.1 มก/ล NAA เกิดแคลลัสน้อยที่สุด (ภาพที่ 2 และ 3)

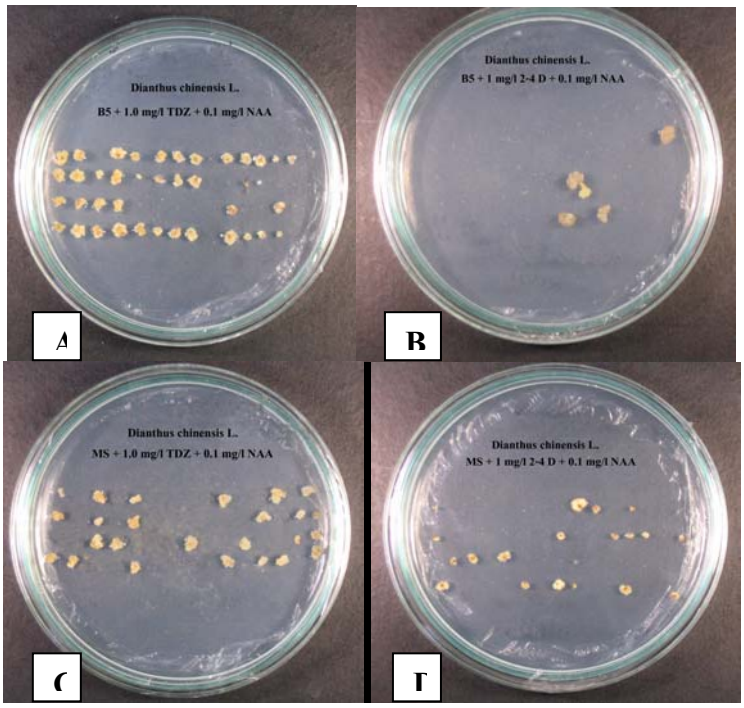
จากการศึกษาถึงผลของอายุของอับละอองเกสรที่มีผลต่อการเกิดแคลลัสพบว่าอับละอองที่แยกมาจากดอกขนาดเล็กซึ่งภายในอับละอองเกสรเริ่มมีละอองเกสรอยู่ภายในอับละอองเกสร จะสามารถเกิดแคลลัสได้สูงในทุกชนิดของอาหารที่ทำการศึกษาโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA จะทำให้เกิดแคลลัสสูงสุด ส่วนอับละอองเกสรที่แยกมาจากดอกขนาดกลางและขนาดใหญ่พบว่า อับละอองเกสรจากดอกขนาดกลาง ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA และ สูตร MS ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZและ 0.1 มก/ล NAA จะมีการเกิดแคลลัสสูงกว่าอับละอองเกสรจากดอกขนาดใหญ่ แต่หากทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร สูตร B5 ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล 2-4 Dและ 0.1 มก/ล NAA และ อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล 2-4 Dและ 0.1 มก/ล NAA จะมีการเกิดแคลัสต่ำและมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสไม่แตกต่างกันระหว่างอับละอองเกสรจากดอกขนาดกลางและขนาดใหญ่ (ภาพที่ 2 และ 3)



ภาพที่ 2 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรในสัปดาห์ที่ 4 6 8 10 และ 12



ภาพที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดแคลลัส(%) กับระยะการพัฒนา ของละออง เกสรตัวผู้และสูตรอาหาร



ภาพที่ 4 การเกิดแคลลัสของอับละอองเกสรผีเสื้อดอกเดี่ยวที่เพาะเลี้ยงบน **A.** อาหารหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 1มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA **B.** อาหารหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 1มก/ล 2-4 D และ 0.1 มก/ล NAA **C.** อาหารหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA และ **D.** อาหารหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 1มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA

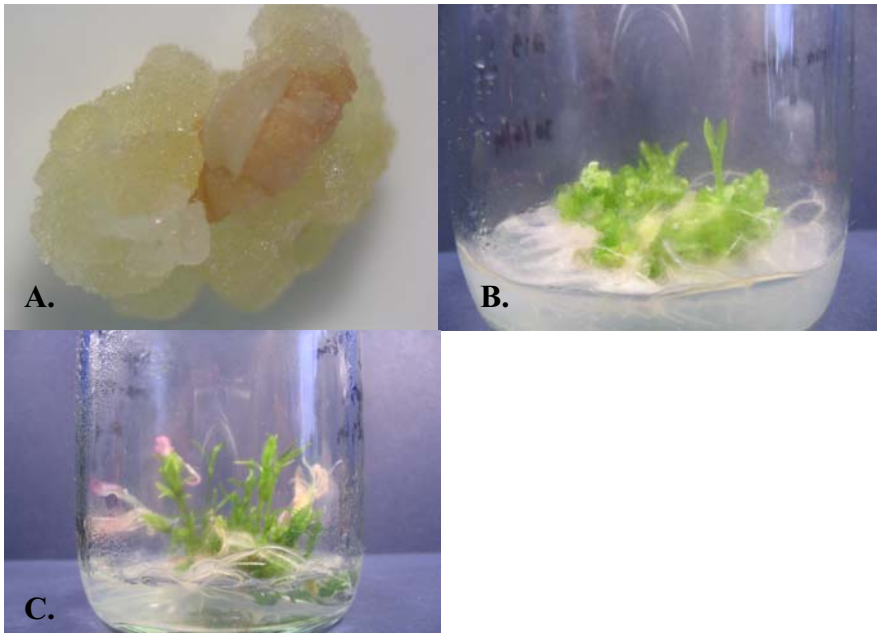
การชักนำแคลลัสให้เกิดต้น

จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของผีเสื้อ หลังจากที่มีแคลลัสเกิดขึ้นและมีขนาดที่เหมาะสมคือประมาณ 0.08-0.14 ตร.ซม. และทำการย้ายลงปลูกบนอาหารสูตร MS และ B5 ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดต้น พบว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่เติม 1 มก/ล TDZ + 0.1 มก/ล NAA สามารถชักนำให้เกิดต้นได้มากที่สุดคือ รองลงมาคือ3.61% ส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 1 มก/ล 2,4-D + 0.1 มก/ล NAA เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าสามารถเกิดต้นได้2.74% และแคลลัสจากอับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 1 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ลNAA สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 1.51% ส่วนแคลลัสจากอับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล 2,4-D และ 0.1 มก/ล NAA ไม่สามารถเกิดต้นได้เลย (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนแคลลัสที่สามารถชักนำให้เกิดต้น (%)

สูตรอาหาร	จำนวนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต	จำนวนแคลลัสที่สามารถชักนำให้เกิดต้น	% แคลลัสทีสามารถชักนำให้เกิดต้น
อาหารสูตร MS+1mg/l TDZ +0.1 mg/l NAA	132	2	1.52
อาหารสูตร MS+ 1 mg/l 2,4-D +0.1 mg/l NAA	73	2	2.74
อาหารสูตร B5+1 mg/l TDZ +0.1 mg/l NAA	240	9	3.61
อาหารสูตร B5+1 mg/l 2,4-D +0.1 mg/l NAA	16	0	0.00

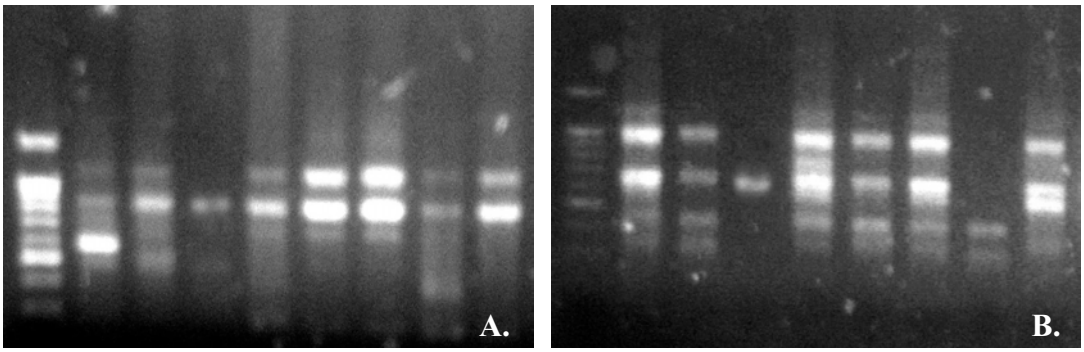
จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแคคลัส พบว่าในระยะแรกอับละอองเกสรจะเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 3-4 สัปดาห์จะเห็นแคลลัสสีขาวใสเกิดขึ้นและพัฒนาจนมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อย้ายละอองเกสรลงเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตในสภาพมีแสงจะพบว่าแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีเขียวและบางแคลลัสมียอดพัฒนาขึ้น (ภาพที่ 5 A และ B) เมื่อทำการเลี้ยงไปได้ระยะหนึ่งจะพบว่ายอดที่เกิดจากแคลลัสบางต้นออกดอกในระหว่างการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 5 C) อย่างไรก็ตามเมื่อนำออกปลูกในกระทางพบว่าเมื่อต้นไม้ตั้งตัวได้แล้วทำการตัดดอกทิ้งจนใกล้บริเวณโคนต้นจะทำให้ผีเสื้อกลับมามีการเจริญปกติได้อีกครั้ง จากการศึกษาถึงปริมาณโครโมโซมพบว่าส่วนใหญ่ต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรจะมีโครโมโซมเป็น 2 n แต่จะพบต้นพืช 1 n ด้วยแต่จำนวนน้อยมาก เมื่อปลูกและดูความแตกต่างระหว่างต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรและต้นที่ให้อับละอองเกสรมาเพาะเลี้ยงพบว่าลักษณะของต้นไม่แตกต่างกันแต่พบความแตกต่างในลักษณะดอกสำหรับต้นที่เป็น1 n มีต้นขนาดเล็กและอ่อนแอเมื่อออกดอกพบว่าดอกมีขนาดเล็กและแตกต่างจากพืช 2 n ปกติ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 5 **A.** แคลลัสที่พัฒนาจากอับละอองเกสร **B.** แคลลัสที่พัฒนาเป็นต้น และ **C.** ต้นผีเสื้อที่เกิดจากอับละอองเกสรบางต้นเกิดการออกดอกในระหว่างเพาะเลี้ยง

ภาพที่ 6 แสดงลักษณะของดอกผีเสื้อ **A.** ดอกผีเสื้อจากต้นที่ให้ละอองเกสรมาเพาะเลี้ยง **B.** ดอกผีเสื้อจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรและมีระดับโครโมโซมเป็น 2n และ **C.** ดอกผีเสื้อจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรและ มีระดับโครโมโซมเป็น 1n

เมื่อตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของต้นให้อับละอองเกสรและต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพบว่ามีความแตกต่างกันดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 แสดงรูปแบบ RAPD ของต้นผีเสื้อเมื่อใช้ primer OPU3 **(ภาพ A)** และ primer OPU6 **(ภาพ B)** ในแต่ละภาพ เลนส์ จากซ้ายไปขวาคือ 100bp size marker ต้นผีเสื้อที่ให้อับละอองเกสร และต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

.

ผีเสื้อดอกซ่อ (*Dianthus bulbathus*)

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของผีเสื้อซ่อ โดยนำอับละอองเกสรจากดอกขนาดดอกขนาดเล็ก 0.5-0.6 ขนาดกลาง0.7-0.8 และ ขนาดใหญ่ 0.9-1.0 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ B5 ที่เติมฮอร์โมน TDZ และ 2,4-D มีผลดีต่อการพัฒนาของอับละอองเกสรผีเสื้อที่ทำการเพาะเลี้ยงดังนี้คือ

การเกิดของแคลลัส

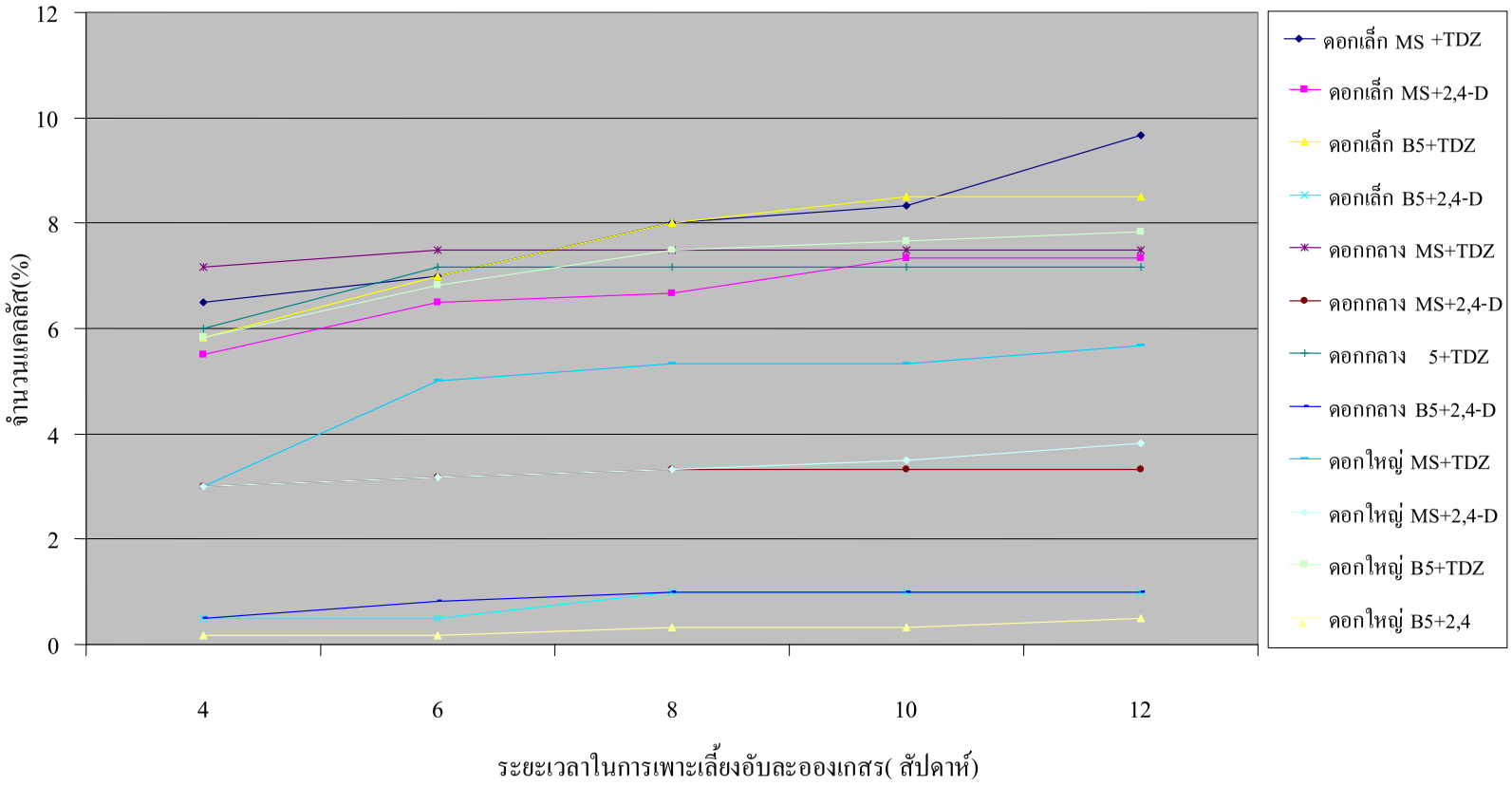
ในสัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าอับละอองเกสรขนาดเล็กที่เลี้ยงบนอาหาร สูตร MS และ B5 ที่เติม 1 มก/ล TDZ + 0.1 มก/ล NAA และอาหารสูตร B5 ที่เติม 1 มก/ล 2,4-D + 0.1 มก/ล NAA อับละอองเกสรขนาดกลางที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ B5 ที่เติม 1 มก/ล TDZ + 0.1 มก/ล NAA และอับละอองเกสรขนาดใหญ่ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่เติม 1 มก/ล TDZ + 0.1 มก/ล NAA เกิดแคลลัสสูง คือ 6.50%, 5.83%, 5.50%, 7.17%, 6.00% และ 5.83% ตามลำดับ อับละอองเกสรขนาดกลางที่เลี้ยงบนอาหาร B5 ที่เติม 1 มก/ล 2,4-D + 0.1 มก/ล NAA และ อับละอองเกสรขนาดใหญ่ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม 1 มก/ล TDZ + 0.1 มก/ล NAA และอาหาร B5 ที่เติม 1 มก/ล 2,4-D + 0.1 มก/ล NAA เกิดแคลลัส ปานกลาง คือ 3.00% ส่วนอับละอองเกสรขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่เติม 1 มก/ล 2,4-D + 0.1 มก/ล NAA เกิดแคลลัสต่ำ คือ 0.50%, 0.50% และ 0.17% ตามลำดับ (ภาพที่ 8)

ในสัปดาห์ที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าอับละอองเกสรขนาดเล็กที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ B5 ที่เติม 1 มก/ล TDZ + 0.1 มก/ล NAA อับละอองเกสรขนาดกลางที่เลี้ยงบนอาหารสูตรMS และ B5 ที่เติม 1 มก/ล TDZ + 0.1 มก/ล NAA และอับละอองเกสรขนาดใหญ่ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่เติม 1 มก/ล TDZ + 0.1 มก/ล NAA เกิดแคลลัสสูง คือ 7.00%, 7.00%, 7.50%, 7.17% และ 6.83% ตามลำดับ ส่วนอับละอองเกสรขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่เติม 1 มก/ล 2,4-D + 0.1 มก/ล NAA เกิดแคลลัสต่ำ คือ 0.50%, 0.83% และ 0.17% ตามลำดับ (ภาพที่ 8)

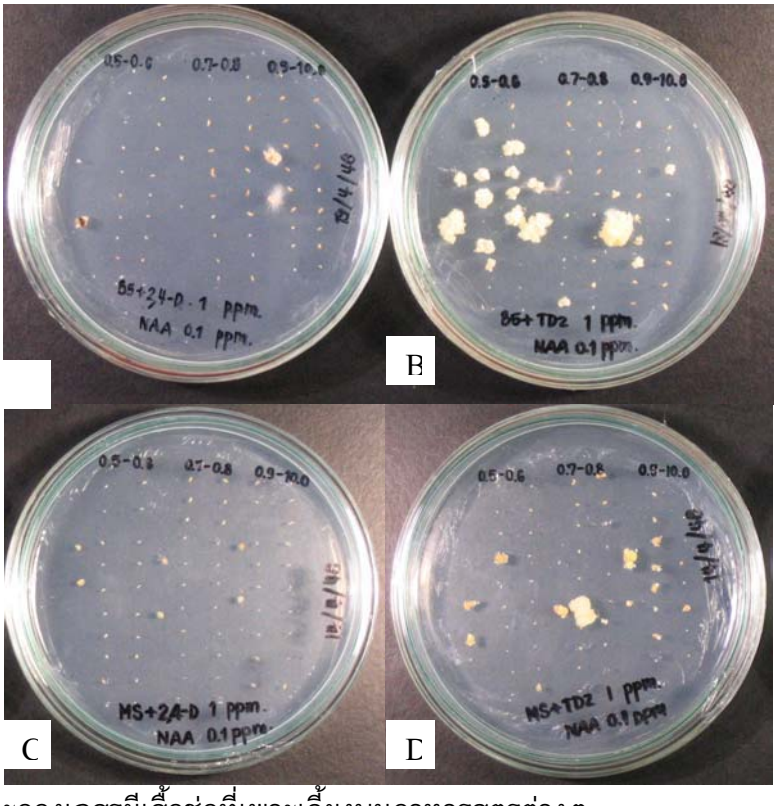
ในสัปดาห์ที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าอับละอองเกสรขนาดเล็กที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ B5 ที่เติม 1 มก/ล TDZ + 0.1 มก/ล NAA อับละอองเกสรขนาดกลางที่เลี้ยงบนอาหารสูตรMS และ B5 ที่เติม 1 มก/ล TDZ + 0.1 มก/ล NAA และอับละอองเกสรขนาดใหญ่ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่เติม 1 มก/ล TDZ + 0.1 มก/ล NAA เกิดแคลลัสสูง คือ 8.00%, 8.00%, 7.50%, 7.17% และ 7.50% ตามลำดับ ส่วนอับละอองเกสรขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่เติม 1 มก/ล 2,4-D + 0.1 มก/ล NAA เกิดแคลลัสต่ำ คือ 1.00%, 1.00% และ 0.33% ตามลำดับ (ภาพที่ 8)

ในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร 10 สัปดาห์ พบว่าอับละอองเกสรขนาดเล็กที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ B5 ที่เติม 1 มก/ล TDZ + 0.1 มก/ล NAA และอาหารสูตร MS ที่เติม 1 มก/ล 2,4-D + 0.1 มก/ล NAA อับละอองเกสรขนาดกลางที่เลี้ยงบนอาหารสูตรMS และ B5 ที่เติม 1 มก/ล TDZ + 0.1 มก/ล NAA และอับละอองเกสรขนาดใหญ่ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่เติม 1 มก/ล TDZ + 0.1 มก/ล NAA เกิดแคลลัสสูง คือ 8.33%, 8.50%, 7.50%, 7.17% และ 7.67% ตามลำดับ ส่วนอับละอองเกสรขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่เติม 1 มก/ล 2,4-D + 0.1 มก/ล NAA เกิดแคลลัสต่ำ คือ 1.00%, 1.00% และ 0.33% ตามลำดับ (ดังภาพที่ 8)

ในสัปดาห์ที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าอับละอองเกสรขนาดเล็กที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 1 มก/ล TDZ + 0.1 มก/ล NAA เกิดแคลลัสสูง คือ 9.67% ส่วนอับละอองเกสรขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่เติม 1 มก/ล 2,4-D + 0.1 มก/ล NAA เกิดแคลลัสต่ำ คือ 1.00%, 1.00% และ 0.50% ตามลำดับ (ดังภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 การเกิดแคลลัส(%) ในสัปดาห์ที่ 4 6 8 10 และ 12



ภาพที่ 9 อับละอองเกสรผีเสื้อช่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ

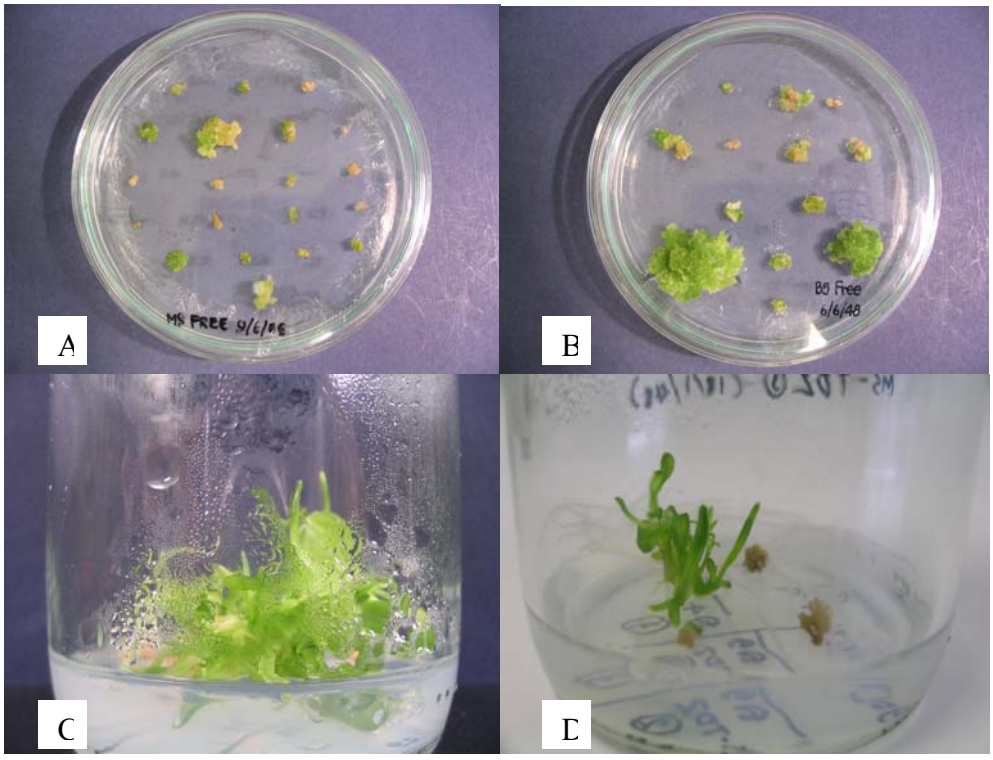
การชักนำแคลลัสให้เกิดต้น

จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของผีเสื้อช่อ โดยใช้อับละอองเกสรที่ได้จากดอกขนาดเล็ก 0.5-0.6, ขนาดกลาง 0.7-0.8 และ ขนาดใหญ่ 0.9-1.0 ซม. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส ได้แก่ อาหารสูตร MS และ B5 ที่เติมฮอร์โมน TDZ และ 2,4-D หลังจากที่มีแคลลัสเกิดขึ้น และมีขนาดที่เหมาะสม คือประมาณ 0.2×0.2 ตร.ซม. จึงทำการย้ายแคลลัสลงอาหารสูตร MS และ B5 ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดต้น พบว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 1 มก/ล TDZ + 0.1 มก/ล NAA สามารถชักนำให้เกิดต้นได้คือ 2.19% ส่วนอาหารสูตร MS และ B5 ที่เติม 1 มก/ล 2,4-D + 0.1 มก/ล NAA และ B5 ที่เติม 1 มก/ล TDZ + 0.1 มก/ลNAA แคลลัสไม่มีการพัฒนาไปเป็นต้น (ดังตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 จำนวนแคลลัสที่สามารถชักนำให้เกิดต้น (%)

สูตรอาหาร	จำนวนแคลลัสที่เกิด	จำนวนแคลลัสเกิดต้น	% แคลลัสที่เกิดต้น
อาหารสูตร MS+TDZ	137	3	2.19
อาหารสูตร MS+2,4-D	87	-	-
อาหารสูตร B5+TDZ	141	-	-
อาหารสูตร B5+2,4-D	14	-	-

ต้นผีเสื้อช่อที่พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรจะมีลักษณะผิดปกติทางสรีรวิทยาคือมีลักษณะต้นแก้ว (ภาพที่ 10 C และ D) กล่าวคือต้นมีลักษณะใสเหมือนแก้ว และเมื่อนำต้นเหล่านี้ไปปลูกพบว่าไม่สามารถอยู่รอดได้ตามธรรมชาติ ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบระดับโครโมโซมและไม่สามารถตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างต้นที่ให้อับละอองเกสรกับต้นที่เกิดจากอับละอองเกสร



ภาพที่ 10 แสดงลักษณะแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต(A-B) และต้นที่เกิดจากอับละอองเกสรของผีเสื้อช่อ (C-D)

เบญจมาศ

การเกิดแคลลัส

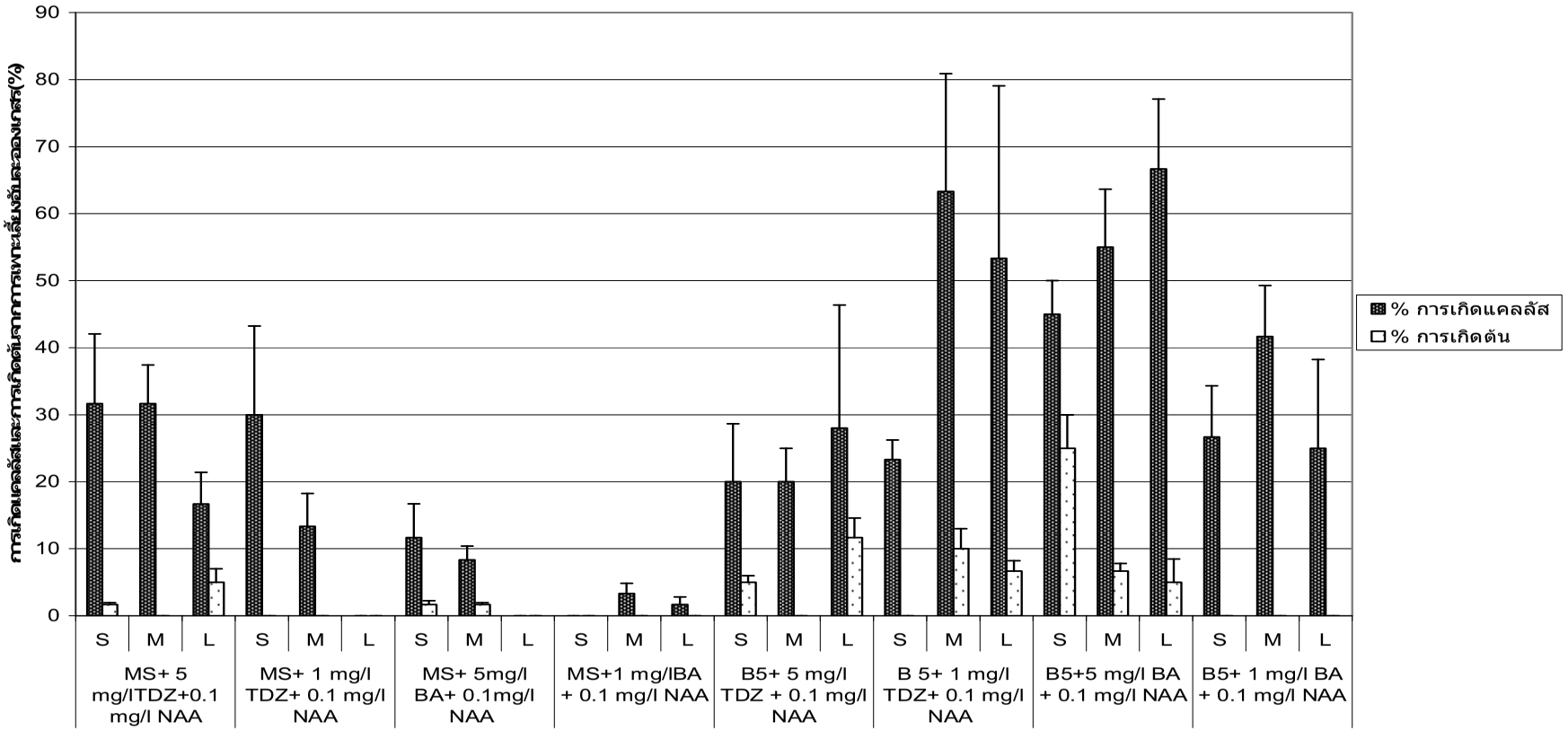
จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของเบญจมาศ พบว่า อับละอองเกสรที่ได้จากดอกขนาดต่างกันสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้แตกต่างกัน อับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS โดยอับละอองเกสรที่เลี้ยงบนอาหารสูตร B5 นั้น อับละอองเกสรจากดอกขนาดกลางและใหญ่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าอับละอองเกสรที่ได้จากดอกขนาดเล็ก โดยอับละอองขนาดกลางและใหญ่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1มก/ล NAA และอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล BA และ 0.1มก/ล NAA จะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสสูงสุด โดยอับละอองเกสรขนาดกลางและใหญ่ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1มก/ล NAA มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส เท่ากับ63.4 % และ 53.0 % ตามลำดับ ส่วนอับละอองเกสรขนาดกลางและเล็กที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล BA และ 0.1มก/ล NAA มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส เท่ากับ55.0% และ 66.7 % ตามลำดับ ส่วนอับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS มีการเกิดแคลลัสไม่สูงนักเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 โดยอับละอองเกสรจากดอกขนาดเล็กและขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล TDZ และ 0.1มก/ล NAA สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 31.7 % และ 31.7 % ตามลำดับ อับละอองเกสรจากดอกขนาดเล็กที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1มก/ล NAA สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 30 % ส่วนอับละอองเกสรขนาดกลางและใหญ่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1มก/ล NAA อับละอองเกสรขนาดเล็ก กลางและใหญ่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล BA และ 0.1มก/ล NAA และ อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA มีการเกิดแคลลัสต่ำ (ภาพที่ 11)

การเกิดต้นจากแคลลัส

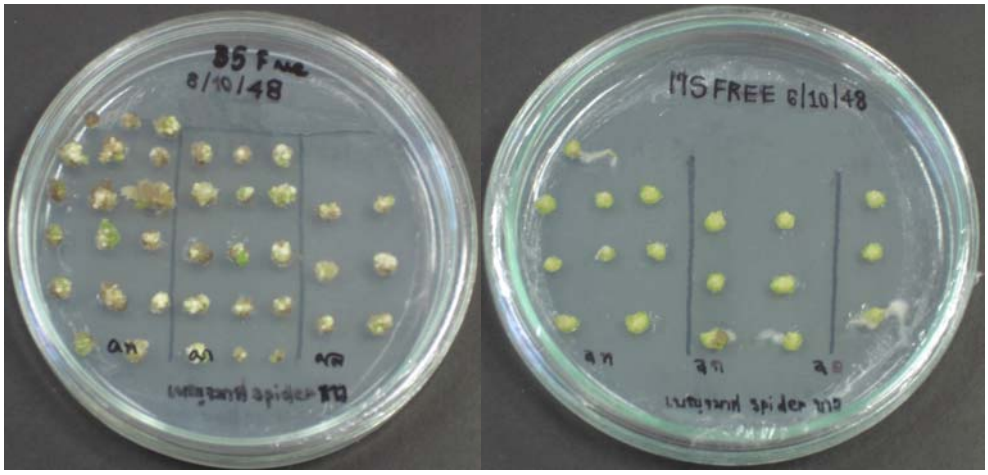
จากการศึกษาพบว่าการเกิดแคลลัสไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดต้น แคลลัสจากอับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS มีความสามารถในการชักนำให้เกิดต้นต่ำหรือไม่เกิดต้นเลยส่วนการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ยกเว้นอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล BA และ 0.1มก/ล NAA ที่ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้

จากการศึกษาพบว่าอับละอองเกสรจากดอกขนาดเล็กที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZและ 0.1มก/ล NAA จะเกิดต้นสูงสุด ซึ่งสูงถึง24 % รองลงมาคืออับละอองเกสรจากดอกขนาดใหญ่ที่เพาะเลี้ยงบน B5 ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล TDZ และ 0.1มก/ล NAA และอับละอองเกสรจากดอกขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1มก/ล NAA ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเท่ากับ 11.67% และ 10 % ตามลำดับ (ภาพที่ 11 และ ภาพที่ 12)

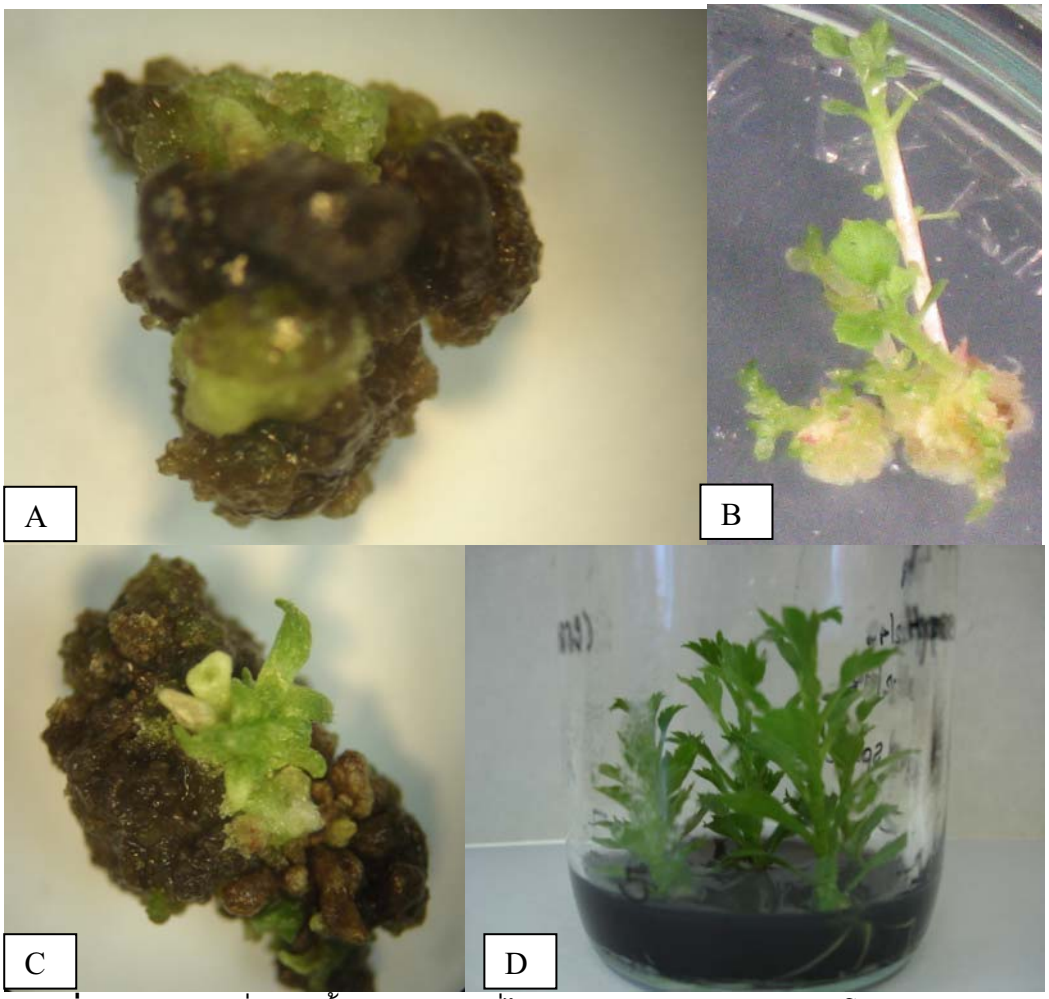
เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตโดยในระยะแรกแคลลัสจะสร้างสารทุติยภูมิทำให้เกิดสีดำ หลังจากนั้นจะมีจุดกำเนิดยอดเกิดขึ้นจากแคลลัสและสามารถเจริญเป็นต้นต่อไป (ภาพที่13) เมื่อทำการตรวจสอบระดับโครโมโซมของเบญจมาศพบว่าพืชมีโครโมโซมเป็น 2n และเมื่อทำการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างต้นที่ให้อับละอองเกสรและต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพบว่ามีความแตกต่างของแถบDNA ที่ตรวจสอบโดยเทคนิค RAPD ดังภาพที่ 14 ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของลักษณะของพืชที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดดังภาพที่ 15 ซึ่งแสดงว่าต้นพืชที่เกิดขึ้นไม่ได้เกิดจากเซลร่างกายของต้นแม่ที่ให้อับละอองเกสร แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการผสมตัวเองต้นเหล่านั้นพบว่าไม่ประสพความสำเร็จในการผสมตัวเองจึงไม่สามารถตรวจสอบความเป็นสายพันธุ์แท้ของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรได้แต่อย่างน้อยทำให้เราทราบว่าเบญจมาศที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรไม่ได้เกิดจากเซลร่างกายของต้นแม่ที่ให้อับละอองเกสร



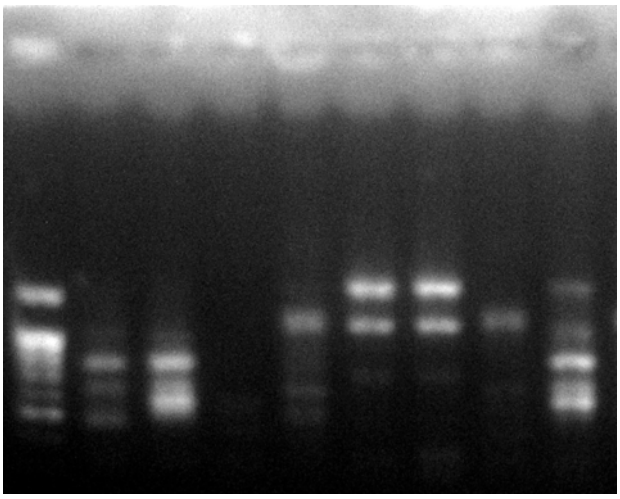
ภาพที่ 11 การเกิดแคคลัสและต้นจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเบญจมาศจากดอกขนาดต่างๆ บนอาหารสูตร MS และ อาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วยสารควบคุมกาเจริญเติบโตชนิดต่างๆ



ภาพที่ 12 แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรบนอาหารต่าง ๆแล้วย้ายลงสู่อาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต



ภาพที่ 13 แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต A. จุดกำเนิดยอดของเบญจมาศจากแคลลัส B.-C. ยอดที่พัฒนาไปเป็นแคลลัส D. ต้นเบญจมาศที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร



ภาพที่ 14 แสดงรูปแบบ RAPD ของต้นผีเสื้อเมื่อใช้ primer OPU **14** เลนส์ จากซ้ายไปขวา คือ 100bp size marker ต้นเบญจมาศที่ให้อับละอองเกสร และต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

ภาพที่ 15 ดอกที่ได้จากต้นที่ให้อับละอองเกสร(ดอกบนซ้ายภาพ A และ ช่อดอกซ้ายภาพ B) และช่อดอกจากต้นที่เกิดจากอับละอองเกสร

ดาวเรืองสีส้ม

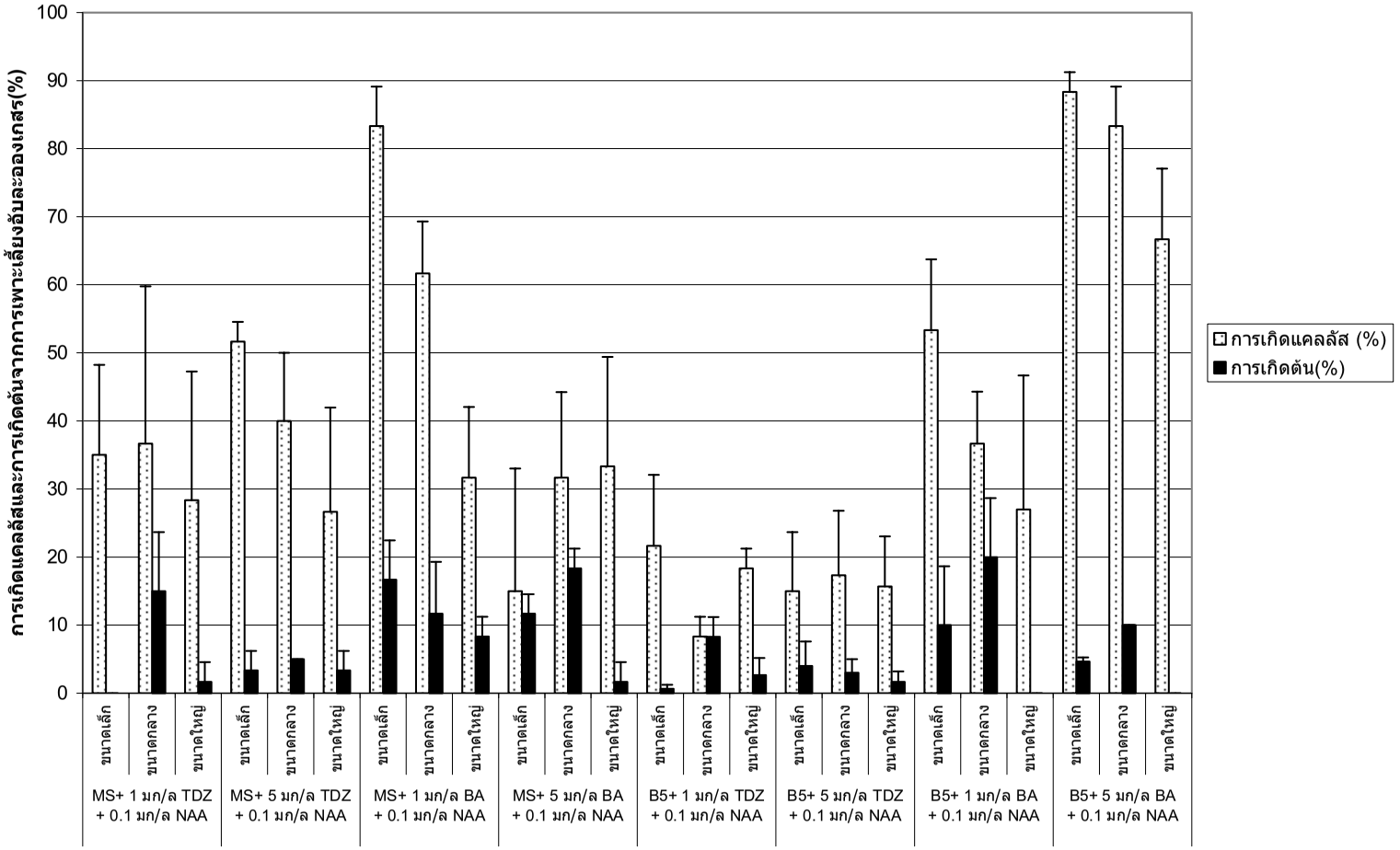
จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของดาวเรืองอเมริกาดอกสีส้มพบว่าอับละอองเกสรสามารถตอบสนองต่อ อาหารสูตร MS และ B5 ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ BA โดยได้ทำการศึกษาขนาดดอก 3 กลุ่มดอกคือ ขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่ ได้ผลการทดลองดังนี้

การเกิดของแคลลัส

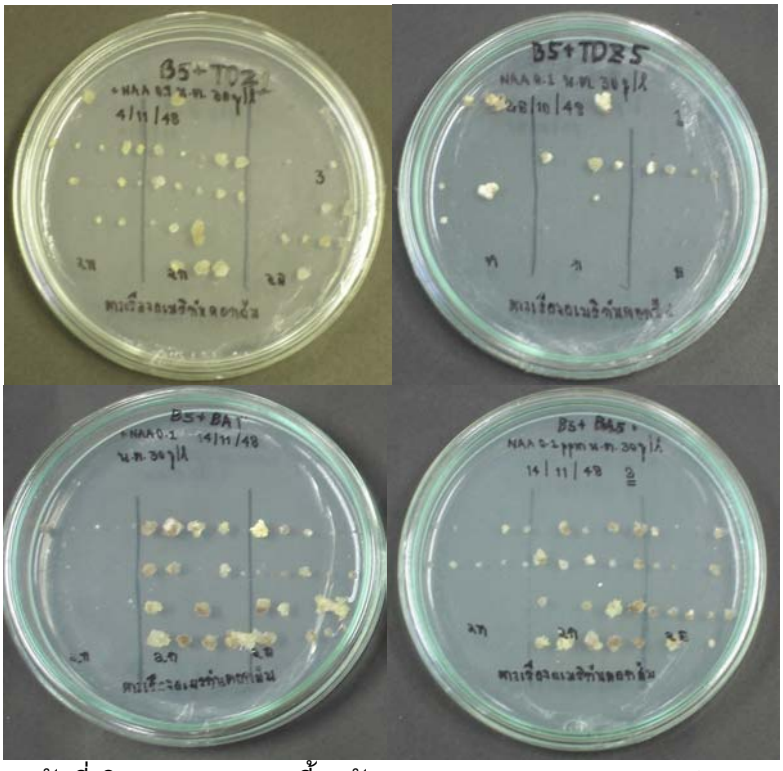
จากการทดลองการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของดาวเรืองดอกส้มเพื่อศึกษาการเกิดแคลลัส พบว่า อับละอองเกสรของดาวเรืองดอกสีส้มขนาดดอกใหญ่ กลาง และเล็กที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA และอับละอองเกสรจากดอกขนาดเล็กและขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA สามารถเกิดแคลลัสได้สูง ซึ่งมีการเกิดแคลลัสเท่ากับ 88.33 83.33 66.67 83.33 และ 61.65 เปอร์เซ็นตามลำดับ อับละอองเกสรดาวเรืองดอกส้มจะมีการเกิดแคลลัสได้ค่อนข้างดีเมื่อเทียบกับพืชชนิด อื่น เมื่อพิจารณาขนาดดอกต่อการเกิดแคลลัสพบว่าดอกขนาดเล็กและขนาดกลางสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าดอกขนาดใหญ่ (ภาพที่ 16 และ ภาพที่ 17)

การเกิดต้น

เมื่อทำการย้ายแคลลัสลงสู่อาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดต้นพบว่าแคลลัสที่เกิดจากดอกขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B 5 ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA แคลลัสจากอับละอองเกสรของดอกขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA และดอกขนาดเล็กและขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA และแคลลัสจากอับละอองเกสรของดอกขนาดเล็ก และกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA จะสามารถชักนำให้เกิดต้นได้สูง ซึ่งเท่ากับ 20 15 17 12 และ 18 เปอร์เซ็นตามลำดับ แคลลัสจากดอกขนาดเล็กและขนาดกลางสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ดี ส่วนแคลลัสจากดอกขนาดใหญ่จะเกิดต้นได้น้อยหรือไม่เกิดเลย จะเห็นได้ว่าความสามารถในการเกิดแคลลัสไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดต้น โดยแม้ว่าอับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B 5 จะเกิดแคลลัสได้สูงกว่าอาหารสูตร MS แต่พบว่าแคลลัสจากอับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เกิดต้นได้ดีกว่า (ภาพที่ 16)



ภาพที่16 การเกิดแคลลัสและต้น(%) จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของดาวเรืองดอกส้มบนอาหารสูตรต่าง ๆ



ภาพที่ 17 แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรบนอาหารสูตรต่างๆ

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแคคลัส พบว่าในระยะแรกอับละอองเกสรจะเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 3-4 สัปดาห์จะเห็นแคลลัสสีขาวอมเหลืองเกิดขึ้นและพัฒนาจนมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อย้ายละอองเกสรลงเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตในสภาพมีแสงจะพบว่าแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีเขียวและบางแคลลัสมียอดพัฒนาขึ้น (ภาพที่ 18 A-C) เมื่อยอดเจริญเติบโตและทำการตรวจสอบระดับโครโมโซม พบว่าพืชส่วนใหญ่มีระดับโครโมโซมเป็น 2n แต่จะพบบางต้นซึ่งแสดงระดับโครโมโซมเป็น 8 n แต่แสดงลักษณะผิดปกติและตายหลังจากเจริญในสภาพการเพาะเลี้ยงปลอดเชื้อได้ไม่นานนัก เมื่อนำต้นที่เกิดจากอับละอองเกสรมาปลูกพบว่า เมื่อปลูกและดูความแตกต่างระหว่างต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรและต้นที่ให้อับละอองเกสรมาเพาะเลี้ยงพบว่าลักษณะของต้นไม่แตกต่างกันแต่พบความแตกต่างในลักษณะดอก โดยดอกจะมีความแตกต่างในเรื่องของความซ้อนของกลีบดอก ลักษณะดอก และขนาดของดอกดังภาพ 20 และเมื่อตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างต้นที่ให้อับละอองเกสรกับต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรโดยเทคนิคทาง RAPD พบว่ามีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 19) และเมื่อทำการผสมตัวเองของเกสรต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพบว่าต้นที่ได้จากการผสมตัวเองจะมีความเหมือนกันของลักษณะดอกและไม่มีการกระจายตัวของลักษณะภายในเมล็ดจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรต้นเดียวกันแต่พบความแตกต่างระหว่างต้นที่ได้จากเมล็ดที่ผสมตัวเองคนละต้นกัน (ภาพที่ 21) ซึ่งแสดงว่าต้นเหล่านั้นเป็นสายพันธุ์แท้ อาจกล่าวได้ว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเกิดจากการเพิ่มขึ้นของโครโมโซมภายในเซลพืชเองระหว่างทำการ