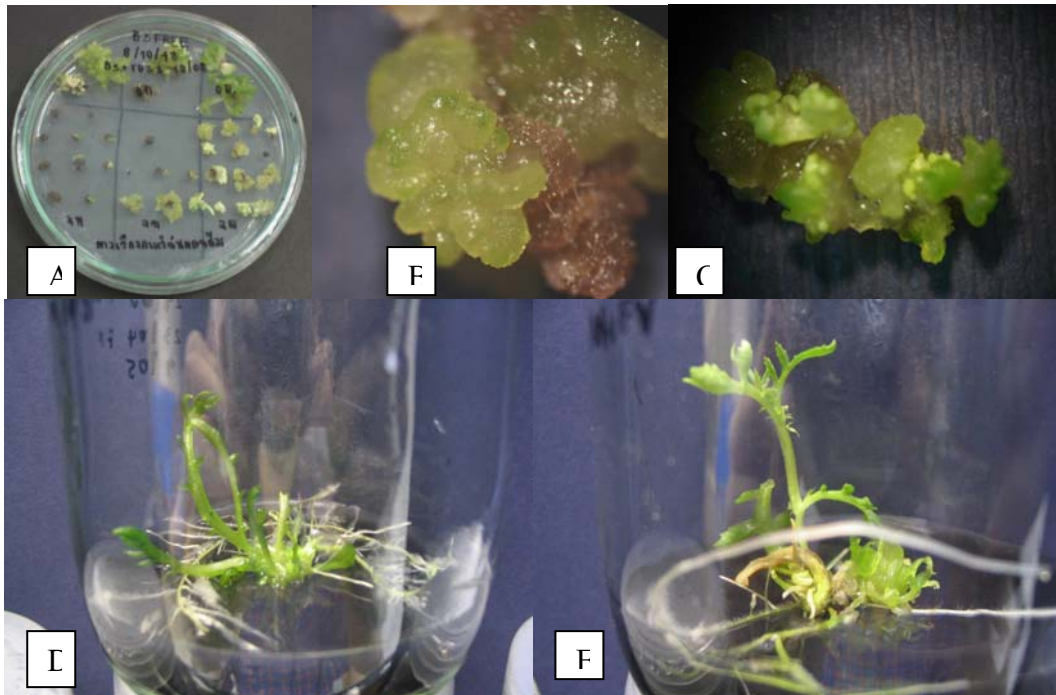
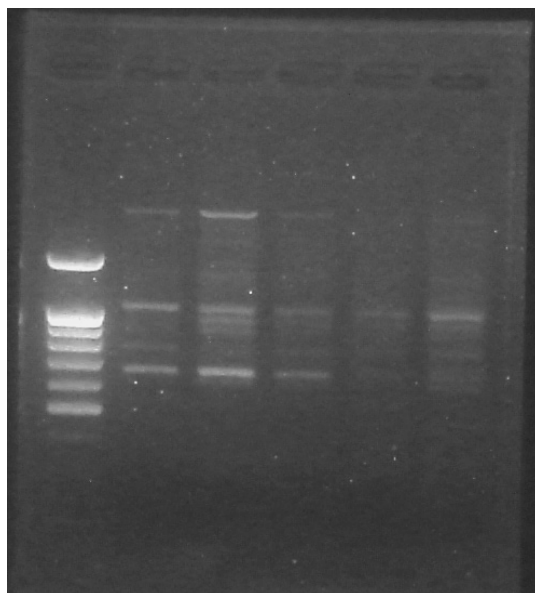


เพาะเลี้ยงทำให้พืชที่เจริญจากเซลล์ที่มีโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่งมีโครโมโซมเป็น 2n ปกติซึ่งเป็นประโยชน์ในการสร้างสายพันธุ์แท้ได้โดยไม่ต้องเลี้ยงต้นที่มีโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่งที่อ่อนแอ ก่อนนำมาเพิ่มโครโมโซมโดยใช้สารเคมีชักนำ



ภาพที่ 18 A. แคลลัสที่ย้ายปลูกลงสู่อาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต B. จุดกำเนิดยอดพัฒนามบนแคลลัส C. ยอดใหม่ที่พัฒนามบนแคลลัส D-E ต้นที่พัฒนาจากแคลลัส F. ต้นที่พัฒนาจากแคลลัส



ภาพที่ 19 แสดงรูปแบบ RAPD ของต้นพืชเมื่อใช้ primer OPU 6 เลนส์ จากซ้ายไปขวาคือ 100bp size marker ต้นเบญจมาศที่ให้ยับยั้งเอนไซม์ และต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงยับยั้งเอนไซม์



ภาพที่ 20 ดอกดาวเรืองดอกแรกด้านซ้ายดอกดาวเรืองจากต้นให้อับละองเกอร์ ดอกอื่นๆคือดอกจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละองเกอร์



ภาพที่ 21 ดอกที่เกิดจากต้นที่ได้จากเมล็ดที่เกิดจากการผสมตัวเองของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละองเกอร์ ดอกในคอลัมน์เดียวกันคือดอกที่ได้จากเมล็ดจากการผสมตัวเองของต้นที่ได้จากเพาะเลี้ยงอับละองเกอร์ต้นเดียวกัน

ดาวเรืองฝรั่งเศส

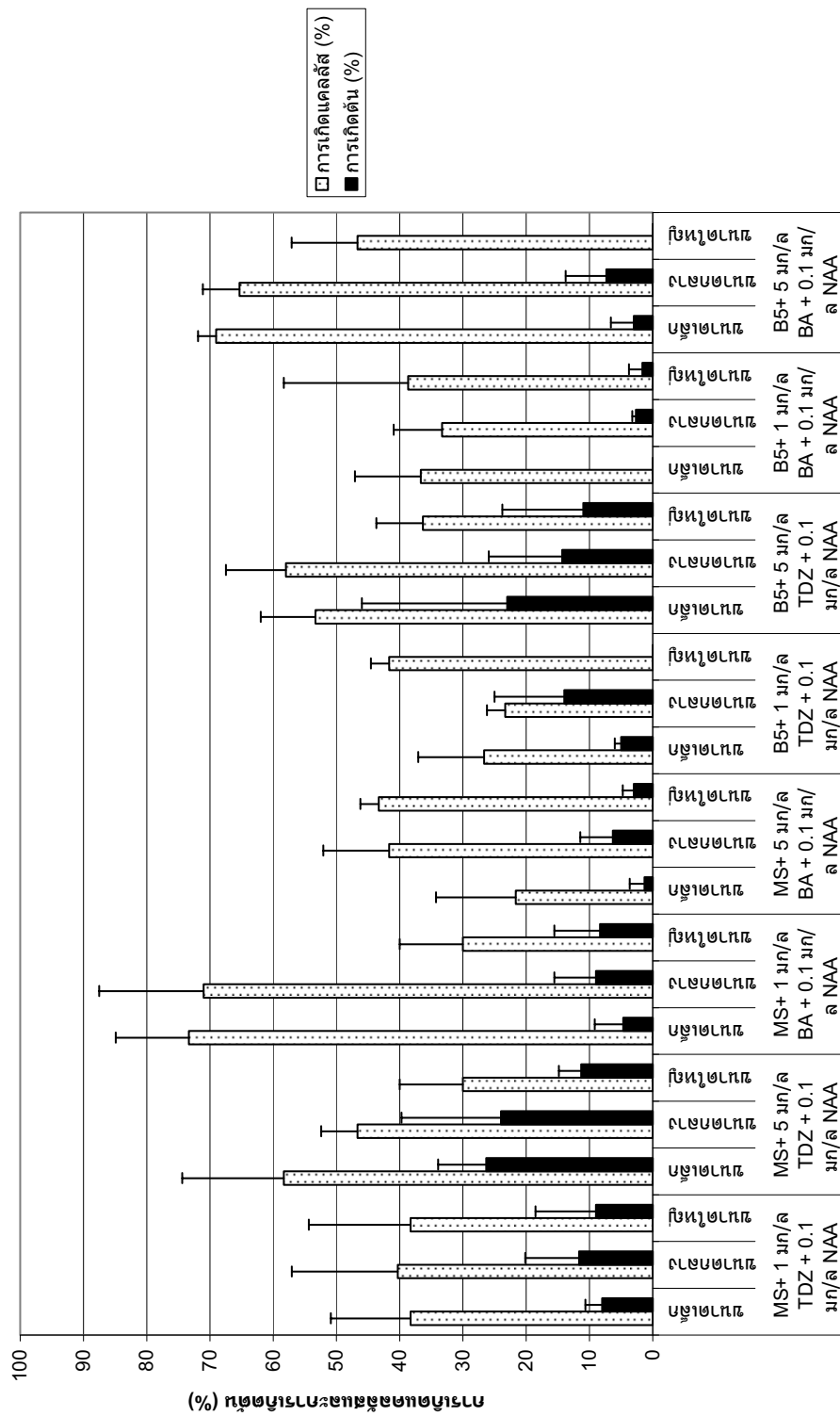
การเกิดแคลลัส

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรดาวเรืองฝรั่งเศสเบื้องต้นพบว่า ดาวเรืองฝรั่งเศสสามารถตอบสนองต่ออาหารสูตร MS และ BA ได้ดี และเมื่อทำการศึกษาการเกิดแคลลัสโดยทำการศึกษาถึงรายละเอียดของระดับสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่า ดอกขนาดเล็กที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA ดอกขนาดเล็กและขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA ดอกขนาดเล็กและขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA และ ดอกขนาดเล็กและขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA มีการเกิดแคลลัสสูงคือมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 58.3 73 71 53.3 58 69 และ 65 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลของขนาดดอกพบว่าดอกขนาดเล็กและขนาดกลางมีความสามารถในการเกิดแคลลัสได้ดีกว่าอับละอองเกสรจากดอกขนาดใหญ่ (ภาพที่ 22)

การเกิดต้น

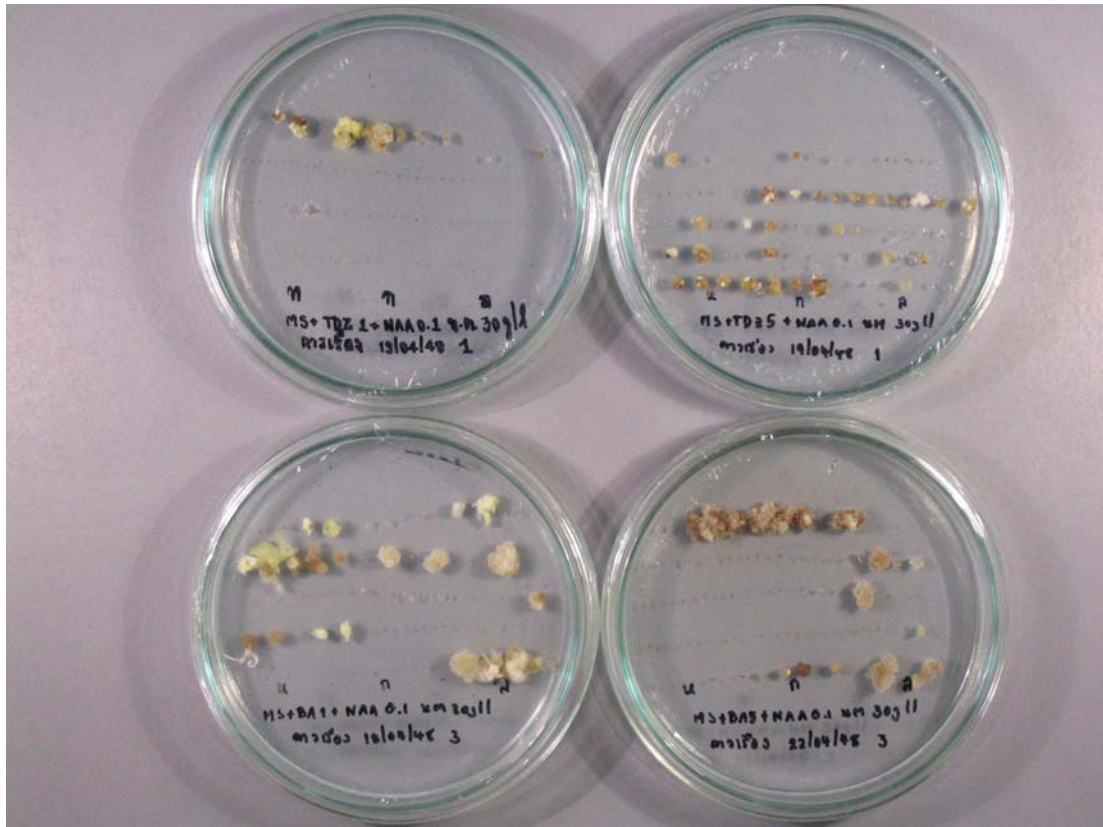
เมื่อทำการย้ายแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรบนอาหารสูตรต่าง ๆ ลงบนอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่า การเกิดต้นจากอับละอองเกสรไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดแคลลัส กล่าวคือแคลลัสจากอับละอองเกสรที่มีความสามารถในการเกิดแคลลัสที่สูงเมื่อนำมาย้ายปลูกลงบนอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตอาจจะมีการเกิดยอดจากแคลลัสเหล่านั้นต่ำเช่น แคลลัสที่ได้จากอับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA และ แคลลัสที่ได้จากอับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA แม้ว่าจะมีการเกิดแคลลัสที่สูงมากแต่มีการเกิดต้นที่ต่ำ (ภาพที่ 22)

แคลลัสที่ได้จากอับละอองเกสรจากดอกขนาดกลางและเล็กที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA และ แคลลัสที่ได้จากอับละอองเกสรจากดอกขนาดเล็กที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA มีการเกิดต้นที่สูง คือมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเท่ากับ 26.3 24 และ 23 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ มีความสามารถในการชักนำให้เกิดแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ดีกว่า BA (ภาพที่ 22 และ ภาพที่ 23)

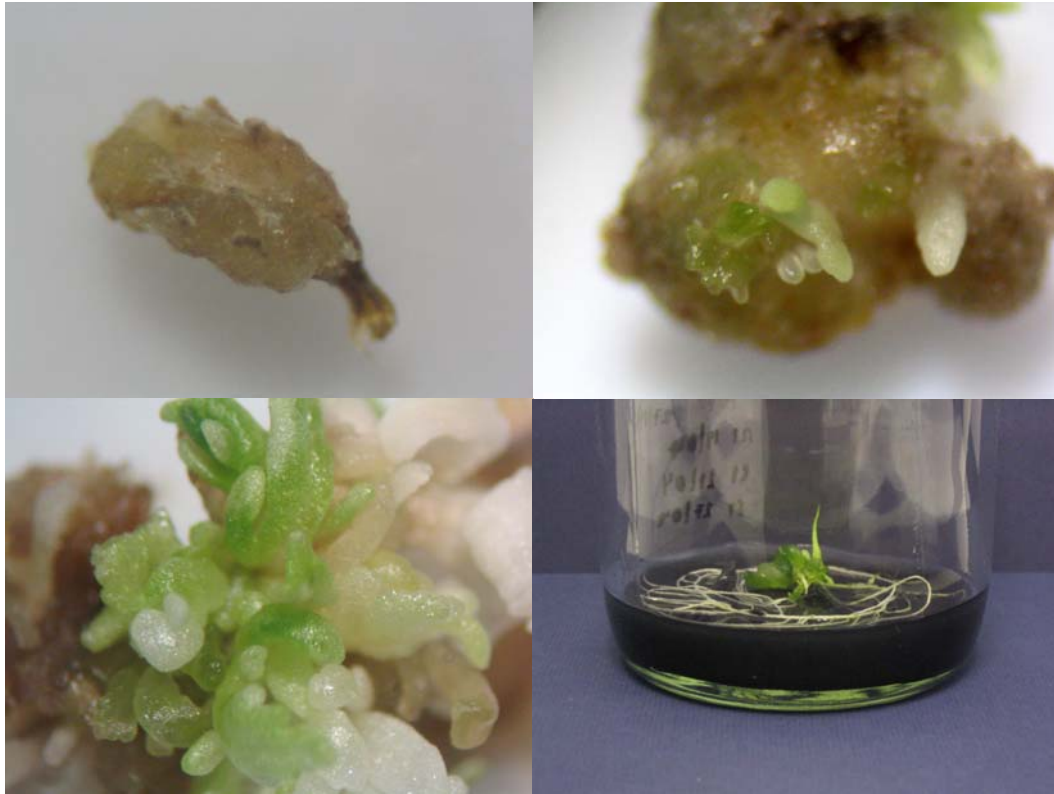


ภาพที่ 22 การเกิดคลอสและการเกิดต้น (%) จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของดาวเรืองฝรั่งผสมอาหารสูตรต่างๆ

เมื่อทำการศึกษาลักษณะแคลลัสพบว่าแคลลัสที่เกิดขึ้นได้ระยะหนึ่งจะมีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนเนื่องจากการสะสมของสารฟุติยภูมิ ในระยะแรกของการเกิดอับละอองเกสรจะกลายเป็นสีดำคล้ายตายแต่หลังจากนั้นจะมีการสร้างแคลลัสขึ้นมาจากอับละอองเกสรนั้น และในบางแคลลัสจะมีการพัฒนายอดใหม่เกิดขึ้นบนแคลลัสเหล่านั้น (ภาพที่ 23 และ 24 A B และ C) เมื่อนำแคลลัสเหล่านั้นย้ายลงสู่อาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตและเติมผงถ่านยอดเหล่านี้สามารถเกิดเป็นต้นได้ดี (ภาพที่ 24 D)



ภาพที่ 23 แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรบนอาหารสูตรต่างๆ



ภาพที่ 24 A. แคลลัสที่เกิดจากอับละอองเกสรของดาวเรืองฝรั่งเศส B. ยอดใหม่ที่เกิดจากแคลลัส C. ยอดที่เจริญเติบโตและเริ่มเกิดใบ D. ต้นใหม่ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรดาวเรืองฝรั่งเศส

ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของดาวเรืองฝรั่งเศสนั้นพบว่า มีระดับโครโมโซมเป็น $2n$ เมื่อทำการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างต้นที่ให้อับละอองเกสรและต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรด้วยเทคนิค RAPD ไม่พบความแตกต่างของแถบ DNA ในทุกต้นที่ทำการศึกษาแต่เมื่อปลูกต้นดาวเรืองเหล่านั้นจนกระทั่งออกดอกพบว่า ดาวเรืองเหล่านั้นมีลักษณะที่แตกต่างกันมากทั้งลักษณะดอกและลักษณะต้น (ภาพ 25 และ 26) ซึ่งอาจเกิดได้จากการทำ RAPD ใช้ primer ที่ไม่เหมาะกับการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของดาวเรืองฝรั่งเศส ซึ่งอาจแก้ไขได้โดยการตรวจสอบเพิ่มเติมโดยใช้ primer ชนิดอื่นๆเพิ่มเติม



ภาพที่ 25 ต้นดาวเรืองฝรั่งเศสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร



ภาพที่ 26 ดอกดาวเรืองฝรั่งเศสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

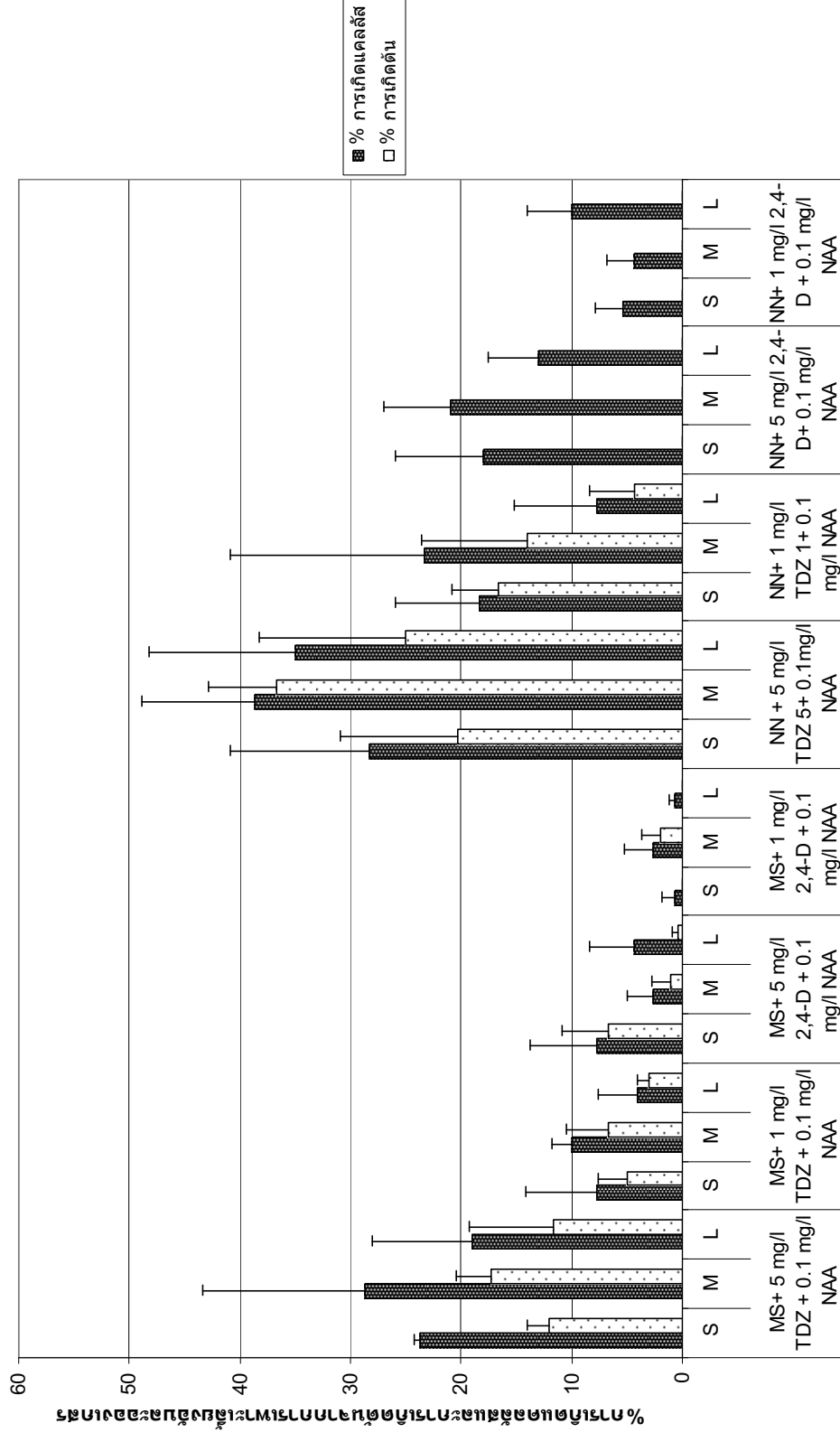
พื้ญเหีย

การเกิดแคลลัส

จากการเพาะเลี้ยงอับละองเกสรของพื้ญเหียพบว่าอับละองเกสรพื้ญเหีย พบว่าอับละองเกสรจากดอกขนาดกลางและเล็กสามารถเกิดแคลลัสได้สูงกว่าอับละองเกสรจากดอกขนาดใหญ่ อับละองเกสรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NN ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA สามารถเกิดแคลลัสได้สูงสุดโดยอับละองเกสรจากดอกขนาดใหญ่มีการเกิดแคลลัสสูงสุด คือ 38.7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอับละองเกสรจากดอกขนาดใหญ่และเล็กสามารถเกิดแคลลัสได้ 35 และ 28.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ อับละองเกสรขนาด ใหญ่ กลางและเล็ก ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA อาหารสูตร NN ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA และ อาหารสูตร NN ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล 2,4-D และ 0.1 มก/ล NAA มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสค่อนข้างสูง ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 23.6 28.7 19 18.3 23.3 7.7 18 21 และ 13 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารอื่นๆที่ทำการศึกษพบว่ามีการแคลลัสค่อนข้างต่ำ (ภาพที่27)

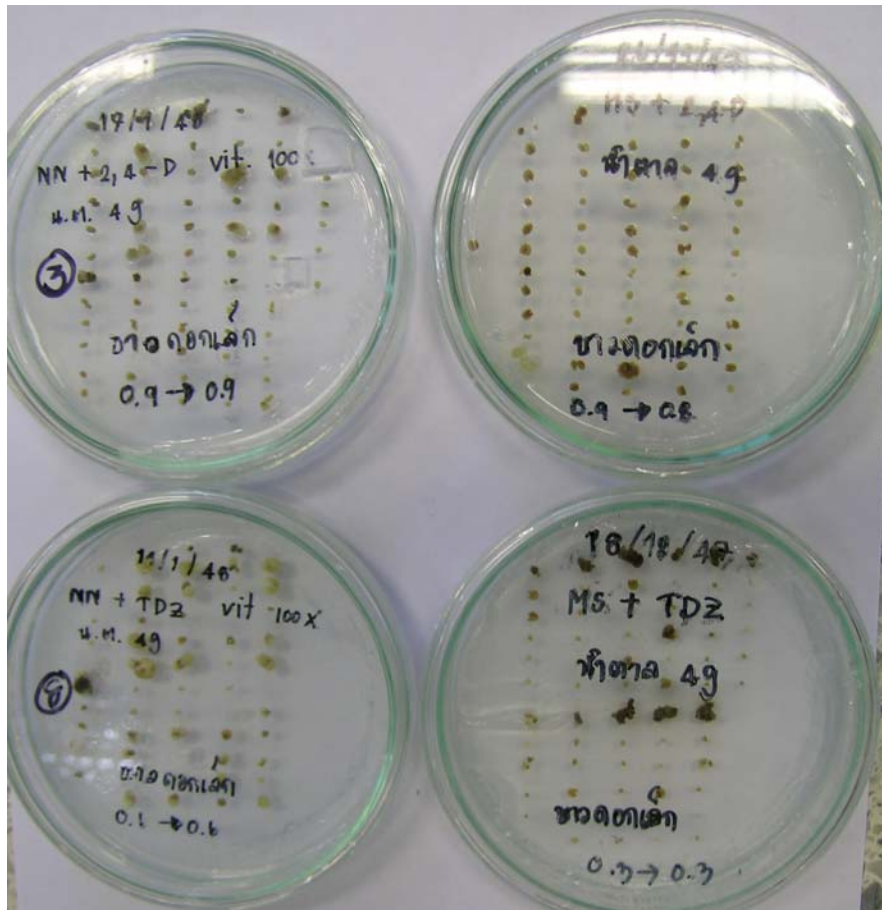
การเกิดต้น

จากการศึกษาพบว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละองเกสรบนอาหารสูตร MS และ NN ที่ประกอบด้วย TDZ จะพัฒนาไปเป็นต้นได้ดีกว่า อาหารที่ประกอบด้วย 2,4-D เมื่อทำการย้ายปลูกลงบนอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยแคลลัสจากอาหารเพาะเลี้ยงที่เกิดแคลลัสสูงจะสามารถชักนำให้เกิดต้นได้สูงด้วย โดยแคลลัสจากดอกขนาด เล็ก กลาง และ ใหญ่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NN ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA สามารถเกิดต้นได้สูงสุดคือ 20.3 36.7 และ 25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนแคลลัสจากดอกขนาด เล็ก กลาง และใหญ่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA และ แคลลัสจากดอกขนาด เล็ก และ กลาง ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NN ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA ซึ่งมีการเกิดต้นเท่ากับ 12 17 11.7 16.7 และ 14 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาพที่ 27) จากการศึกษจะเห็นได้ว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วย TDZ จะมีการเกิดต้นสูง ในขณะที่แคลลัสจากอับละองเกสรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วย 2,4-D จะเกิดต้นต่ำมากหรือไม่เกิดต้นเลย (ภาพที่ 27)

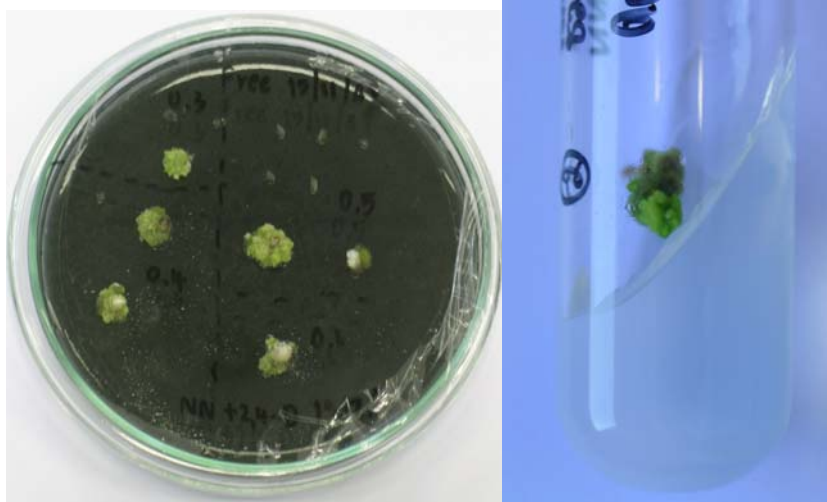


ภาพที่ 27 การเกิดแคลลัสและการเกิดต้น (เปอร์เซ็นต์) จากการเพาะเลี้ยงอับละของเกสรของพืชเนย

เมื่อศึกษาลักษณะแคลลัสของพืชเนี่ยพบว่าแคลลัสจะมีลักษณะขาวอมเหลืองบางครั้งมีลักษณะสีดำเกิดขึ้นบนแคลลัสซึ่งเกิดจากการเกิดสารทุติยภูมิระหว่างการเพาะเลี้ยงแคลลัส (ภาพที่ 28) เมื่อย้ายแคลลัสลงบนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เดิมผงถ่านในสภาวะที่มีแสงจะพบว่าแคลลัสสามารถพัฒนาและเกิดต้นได้ดี (ภาพที่ 29)



ภาพที่ 28 การเกิดแคลลัสของอับละอองเกสรพืชเนี่ยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ



ภาพที่ 29 การเกิดต้นจากแคลลัสของพิทูเนีย เมื่อย้ายแคลลัสลงบนอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต

จากการตรวจสอบระดับโครโมโซมโดย flow-cytometer พบว่าต้นที่ได้มีโครโมโซมเป็น 2n ทำการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของต้นที่ให้อับละองเกสรและต้นที่เกิดจากอับละองเกสรโดยเทคนิค RAPD ไม่พบความแตกต่างของแถบ DNA ในทุก ๆ primer ที่ทำการทดสอบ แต่เมื่อปลูกต้นพืชพบว่าดอกของพิทูเนียที่ปลูกมีลักษณะแตกต่างกัน (ภาพที่ 30) ซึ่งแสดงว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ ซึ่งหากใช้ primer อื่นๆในการตรวจสอบ ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากลักษณะที่แตกต่างกันไม่มากนักทำให้ต้องใช้ primer จำนวนมากตรวจสอบจึงจะพบ primer ที่เหมาะสมในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมได้



ภาพที่ 30 ดอกพิทูเนีย ดอกแรกย้ายดอกจากต้นที่ให้อับละองเกสร ดอกอื่นๆคือดอกที่ได้จากต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละองเกสร

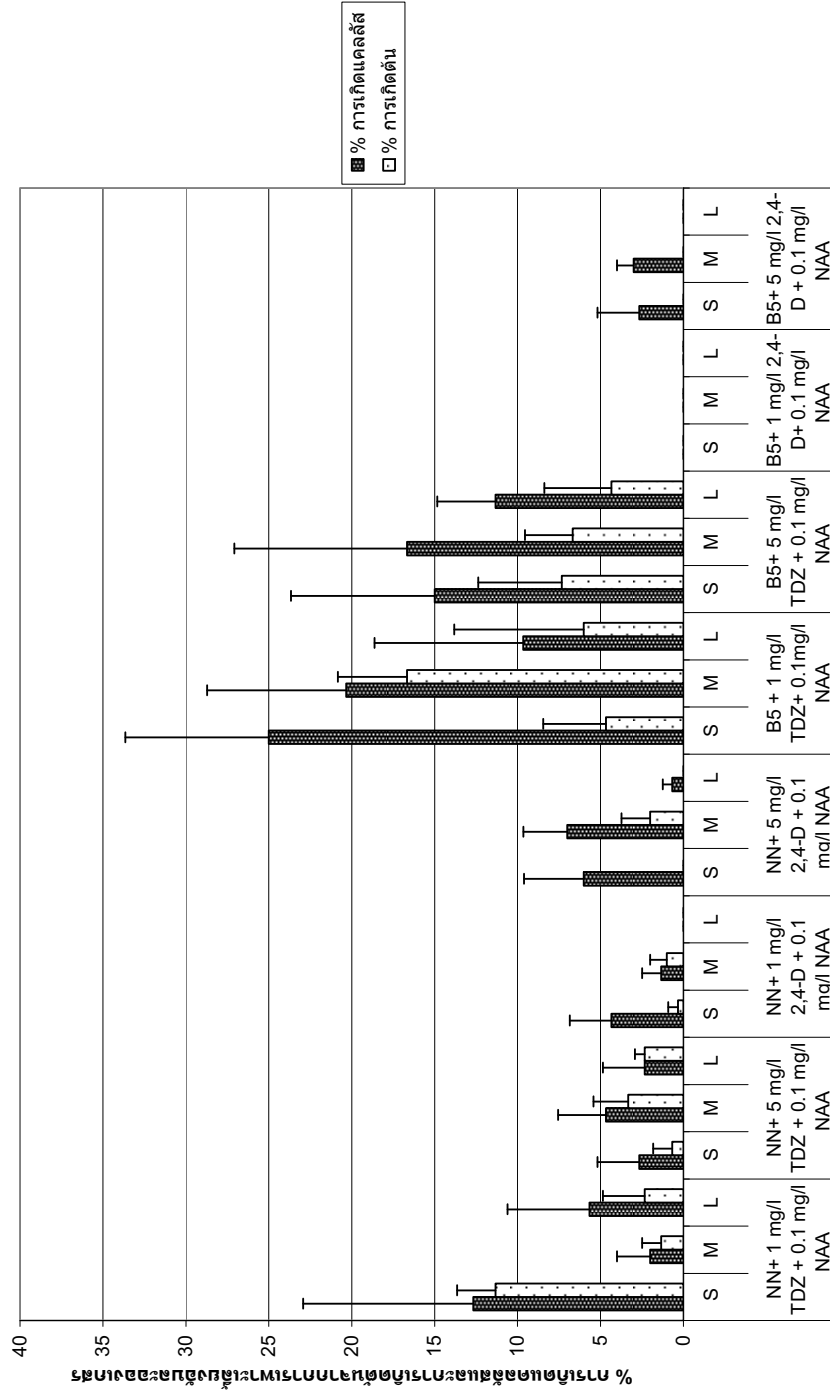
กาเซเนีย

การเกิดแคลลัส

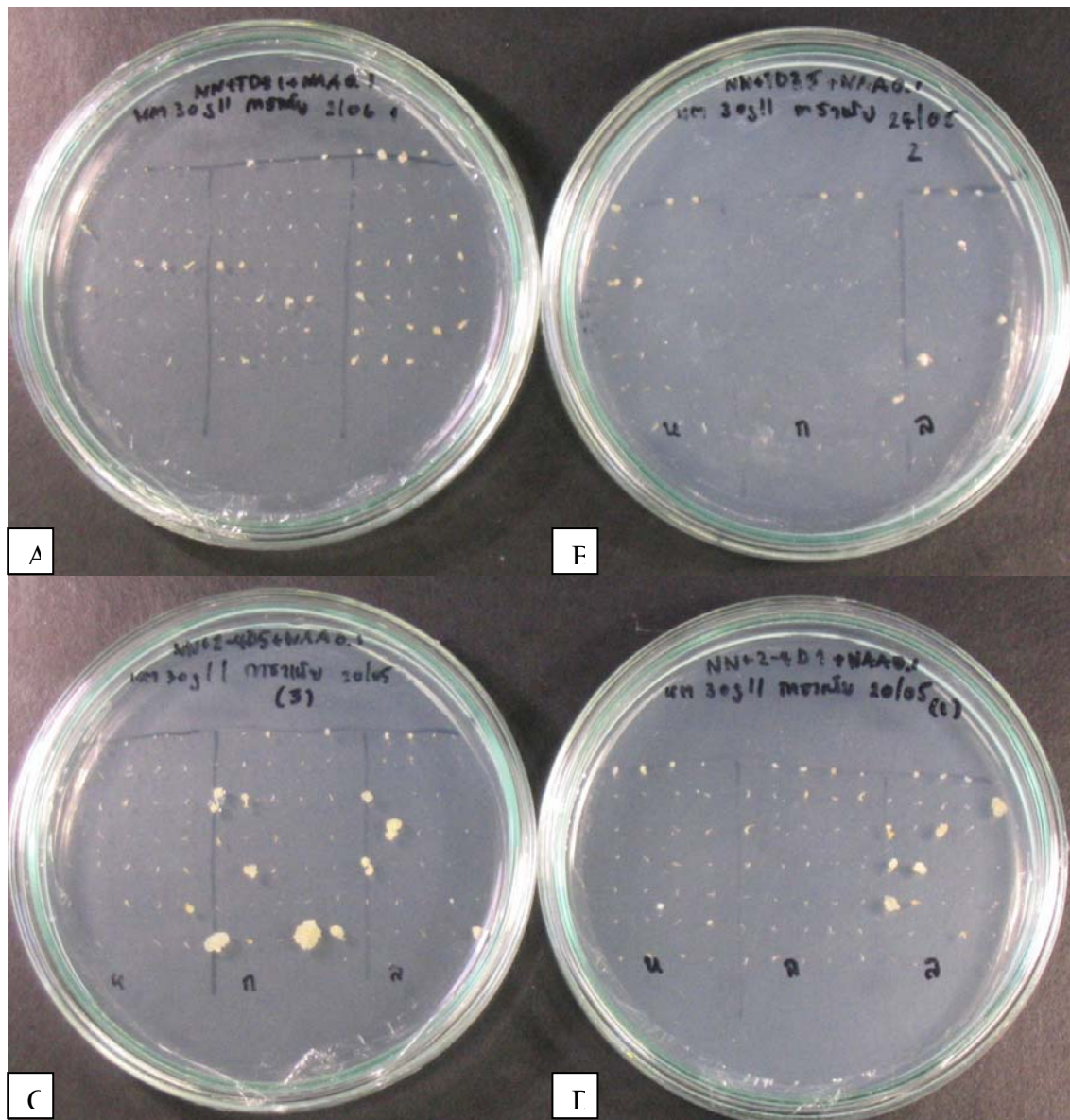
จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของกาเซเนียพบว่าการเกิดแคลลัสของกาเซเนียจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรจากดอกขนาดเล็กและกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA และอับละอองเกสรจากดอกขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA จะมีการเกิดแคลลัสสูงกว่าอาหารชนิดอื่นโดยมีการเกิดแคลลัสเท่ากับ 25 20.3 และ 16.67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงบนอาหารชนิดอื่นๆพบว่าการเกิดแคลลัสต่ำมากหรือบางครั้งไม่เกิดเลย โดยเฉพาะอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D จะเกิดแคลลัสได้น้อย (ภาพที่ 31 32 และ 33)

การเกิดต้น

แม้ว่าการเกิดแคลลัสของกาเซเนียจะไม่มากนักแต่พบว่าการเกิดต้นจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรมีการเกิดต้นที่ค่อนข้างสูง โดยแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรจากดอกขนาดกลางลงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA และ อับละอองเกสรจากดอกขนาดเล็กที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NN ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA มีการเกิดต้นสูงถึง 20 และ 11.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาพที่ 31) แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA และ อาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA จะเกิดต้นได้สูงกว่าอาหารชนิดอื่นที่ทำการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 31)

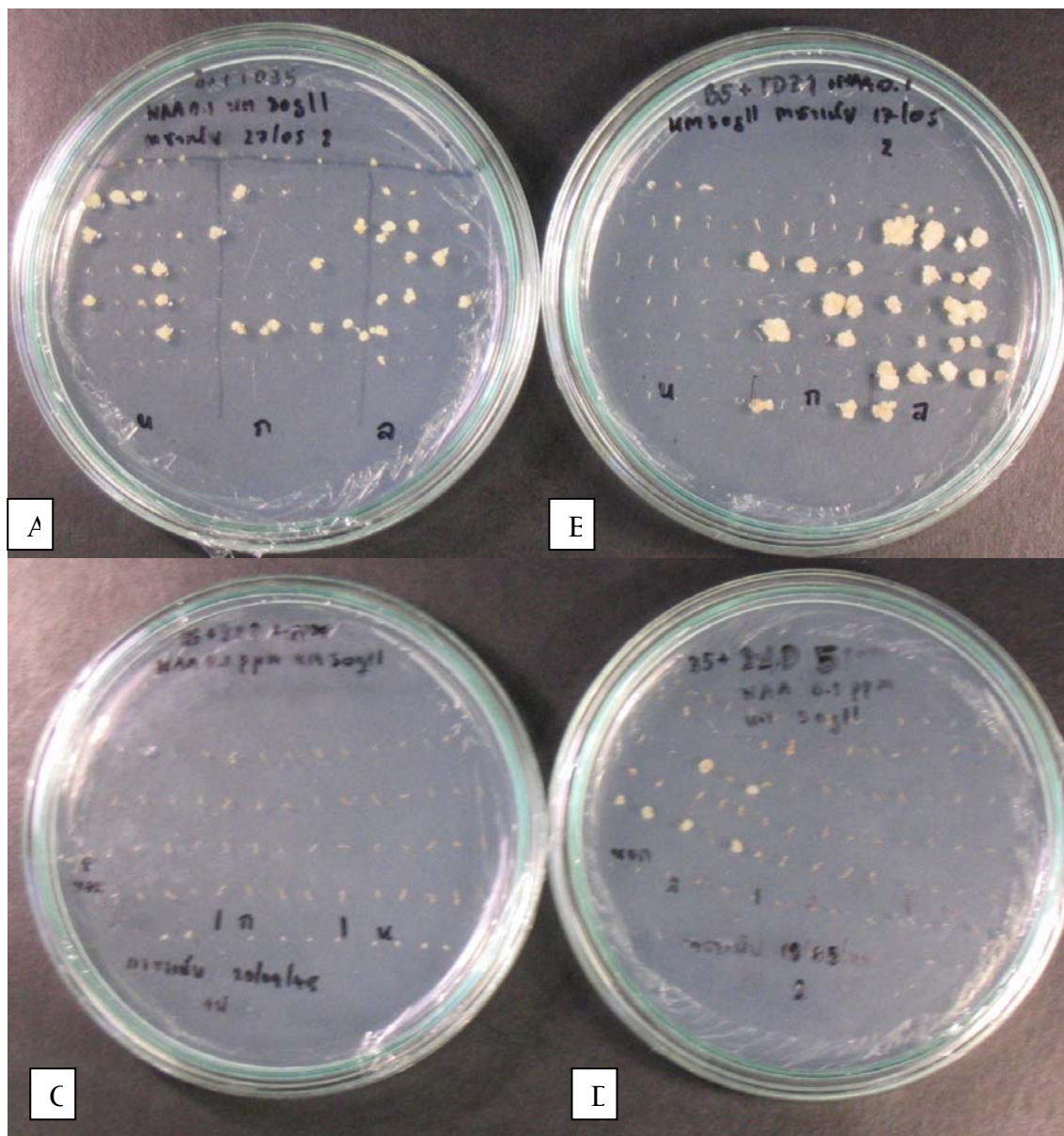


ภาพที่ 31 การเกิดแคลลัสและการเกิดต้น(%) จากการเพาะเลี้ยงอวัยวะของกาเข้ในอาหารสูตรต่างๆ



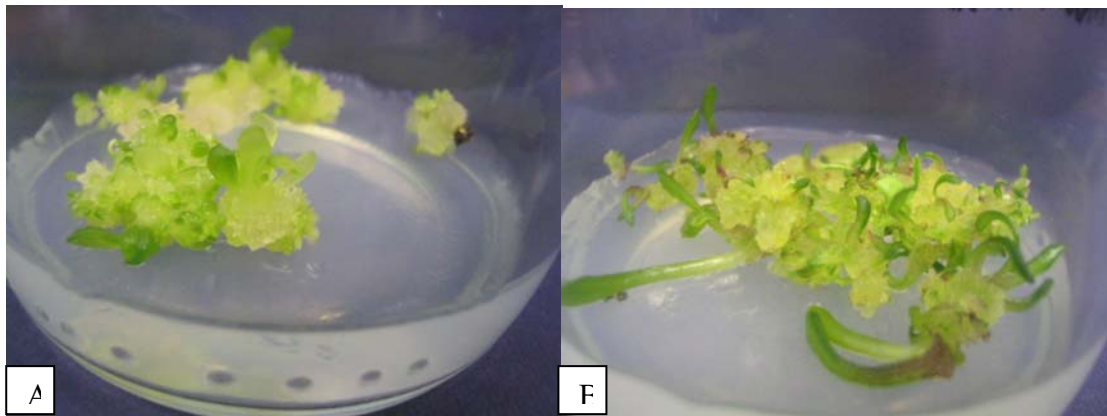
ภาพที่ 32 อับละอองเกสรกาเซเนียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NN ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ

- A. อับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NN ร่วมกับ 1 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA
 B. อับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NN ร่วมกับ 5 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA
 C. อับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NN ร่วมกับ 5 มก/ล 2,4-D และ 0.1 มก/ล NAA
 D. อับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NN ร่วมกับ 1 มก/ล 2,4-D และ 0.1 มก/ล NAA



ภาพที่33 อับละอองเกสรกาเซเนียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ A. อับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ร่วมกับ 5 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA
 B. อับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ร่วมกับ 1 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA
 C. อับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ร่วมกับ 1 มก/ล 2,4-D และ 0.1 มก/ล NAA
 D. อับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ร่วมกับ 5 มก/ล 2,4-D และ 0.1 มก/ล NAA

เมื่อทำการย้ายแคลลัสลงเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า แคลลัสจะมีการขยายขนาดและมีสีขาวอมเขียวเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและจากนั้นจึงจะมียอดและใบเกิดขึ้นจากแคลลัสเหล่านั้น (ภาพที่ 34 A) และเมื่อต้นที่ได้พัฒนาเป็นต้นก็จะพบว่าต้นมีลักษณะใส่น้ำ (ภาพที่ 34 A และ B) ซึ่งไม่สามารถอยู่รอดหลังจากย้ายปลูกลงสู่สภาพแวดล้อมได้ทำให้ไม่สามารถทำการตรวจระดับโครโมโซม ของต้นพืชที่ได้เหล่านี้ได้ และไม่สามารถตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร กับต้นแม่ที่ให้อับละอองเกสรได้



ภาพที่ 34 ลักษณะต้นกาเซเนียที่พัฒนาจากอับละอองเกสร A ยอดที่เริ่มพัฒนาจากแคลลัส และ B. ยอดที่พัฒนาเป็นต้นแสดงลักษณะต้นใสเหมือนแก้ว

คาร์เนชั่น

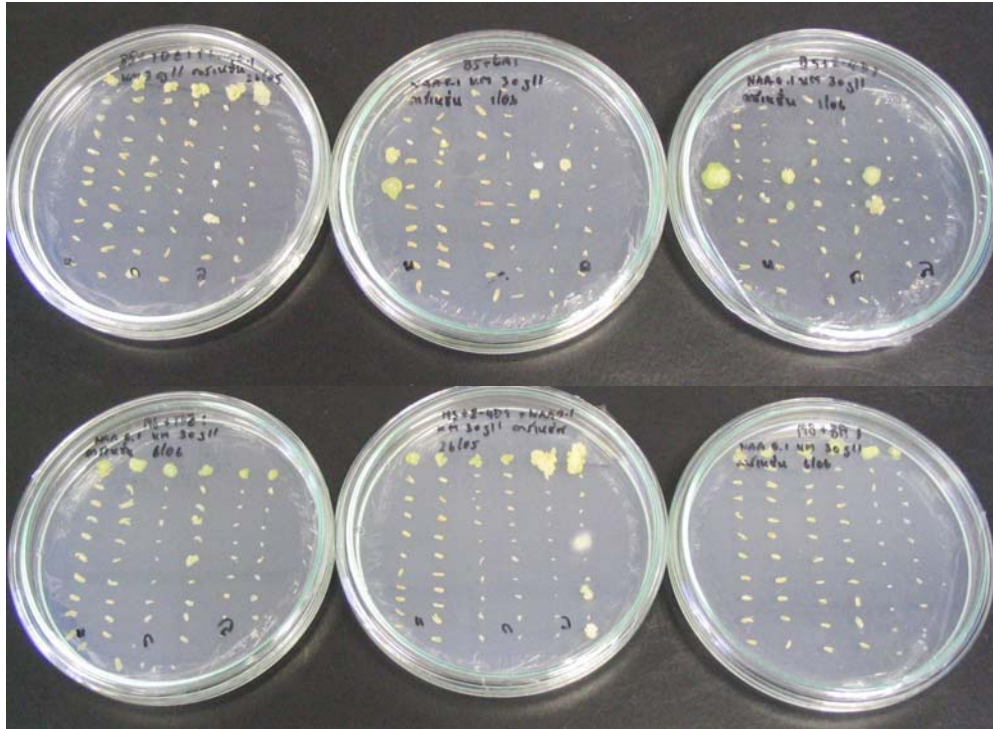
การเกิดแคลลัส

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของคาร์เนชั่นพบว่าการเกิดแคลลัสของคาร์เนชั่นจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรสามารถเกิดได้ไม่มากนัก โดย คาร์เนชั่นจากดอกขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA อับละอองเกสรจากดอกขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA และอับละอองเกสรจากดอกขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA จะมีการเกิดแคลลัสสูงกว่าอาหารชนิดอื่น โดยมีการเกิดแคลลัสเท่ากับ 13.75 18.5 และ 22.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงบนอาหารชนิดอื่นๆพบว่าการเกิดแคลลัสต่ำมากหรือบางครั้งไม่เกิดเลย โดยเฉพาะอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D จะไม่เกิดแคลลัสขึ้นเลย (ภาพที่ 35)

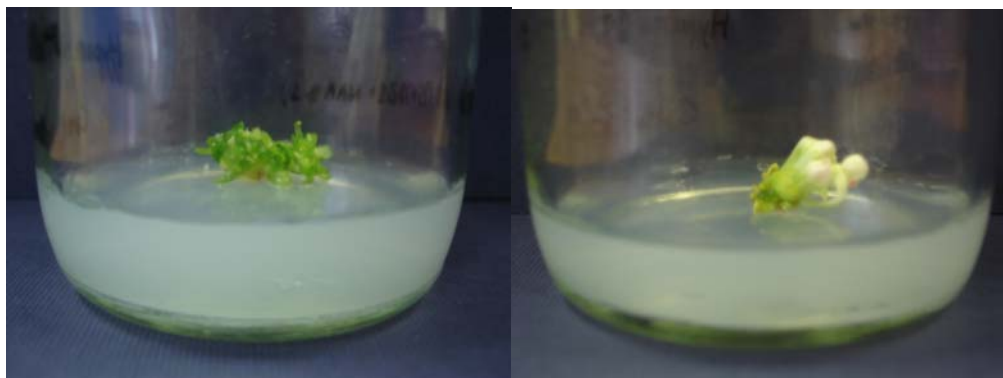
การเกิดต้น

การเกิดต้นจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพบว่ามี การเกิดต้นที่ค่อนข้างต่ำ โดยแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรจากดอกขนาดเล็กบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA อับละอองเกสรจากดอกขนาดกลางบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA และ อับละอองเกสรจากดอกขนาดกลางบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA โดยมีการเกิดต้นเท่ากับ 5 3.5 และ 2.7 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาพที่ 35)

เมื่อทำการศึกษาลักษณะแคลลัสพบว่าแคลลัสที่เกิดขึ้นของคาร์เนชั่นมีสีเขียวอมเหลืองไม่เกิดสีน้ำตาล(ภาพที่ 36) และเมื่อทำการย้ายลงบนอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่าอับละอองเกสรเหล่านี้จะพัฒนาเป็นต้นได้โดยจะเกิดเป็นกลุ่มที่มีลักษณะคล้ายใบเกาะกันแน่นเป็นก้อนแต่หลังจากนั้นจะเกิดอาการต้นใสเหมือนแก้วจมน้ำไม่สามารถนำรอดชีวิตได้เมื่อนำออกปลูก(ภาพที่ 37 A) และบางแคลลัสแทนที่จะพัฒนาเป็นต้นกลับพัฒนาไปเป็นดอกดังภาพที่ 37 B



ภาพที่ 36 แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรบนอาหารสูตรต่างๆ



ภาพที่ 37 A. ต้นคาร์เนชั่นที่พัฒนาจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรแสดงอาการต้นจมน้ำ B. แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรไม่พัฒนาเป็นต้นใหม่แต่พัฒนาไปเป็นดอก

รักเร่

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของรักเร่บนอาหารสูตร B5 โดยใช้ฮอร์โมน 2,4-D และ BA และขนาดดอกใหญ่ กลาง และเล็ก

การเกิดแคลลัส

จากการศึกษาพบว่า การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของรักเร่เพื่อศึกษาการเกิดแคลลัส วิธีการ(Treatment) ต่าง ๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยขนาดดอกยของรักเร่ไม่มีผลต่อการทำให้เกิดแคลลัส สารควบคุมการเจริญเติบโต มีผลทำให้การเกิดแคลลัสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งและไม่พบปฏิกิริยาร่วมระหว่างฮอร์โมนและตำแหน่งดอกย่อยของรักเร่

อิทธิพลของฮอร์โมนในการชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าดอกรักเร่ขนาดดอกเล็ก กลางใหญ่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 1 มก./ล 2,4-D อาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 1 มก./ล 2,4-D และ อาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 5 มก./ล BA ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูง 94 86 84 72 84 86 68 70 และ 70 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จากการศึกษาพบว่าการใช้อาหารที่ประกอบด้วยNAA จะมีการเกิดแคลลัสได้น้อย

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร (%)

ฮอร์โมน (H)	ขนาดของดอก			H-mean
	เล็ก	กลาง	ใหญ่	
2,4-D				
ความเข้มข้น 1 ppm	94.00 ^a	86.00 ^{ab}	84.00 ^{ab}	88.00
ความเข้มข้น 1 ppm +NAA	32.00 ^c	32.00 ^c	18.00 ^{cde}	27.33
ความเข้มข้น 5 ppm	72.00 ^b	84.00 ^{ab}	86.00 ^{ab}	80.67
ความเข้มข้น 5 ppm +NAA	2.00 ^{dc}	0.00 ^e	0.00 ^e	0.67
BA				
ความเข้มข้น 1 ppm	6.00 ^{dc}	4.00 ^{de}	2.00 ^{de}	4.00
ความเข้มข้น 1 ppm +NAA	22.00 ^{cd}	16.00 ^{cde}	22.00 ^{cd}	20.00
ความเข้มข้น 5 ppm	0.00 ^e	2.00 ^{de}	0.00 ^e	0.67
ความเข้มข้น 5 ppm +NAA	68.00 ^{ab}	70.00 ^{ab}	70.00 ^b	69.33
P-Mean	37.00	36.75	35.25	

C.V. = 37.74 %

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % เปรียบเทียบโดย DMRT

หลังจากทำการย้ายแคลลัสมาเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าแคลลัสของดอกทุกขนาดไม่มีผลต่อการทำให้เกิดรากของแคลลัส แต่แคลลัสที่ได้จากอับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรบนอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างกันมีผลทำให้การเกิดรากของแคลลัสแตกต่างกันโดยแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 1 มก./ล 2,4-D สามารถชักนำให้เกิดรากของแคลลัสได้สูงคือ 22 20 และ 16 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่น ๆ มีการพัฒนารากต่ำ

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยแคลลัสที่สามารถพัฒนาไปเป็นรากจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

ฮอร์โมน (H)	ตำแหน่งของดอกย่อย (P)			H-mean
	ชั้นใน	ชั้นกลาง	ชั้นนอก	
2,4-D				
ความเข้มข้น 1 ppm	22.0 ^a	20.0 ^a	16.0 ^a	19.33
ความเข้มข้น 1 ppm +NAA	2.00 ^b	8.00 ^b	4.00 ^b	4.66
ความเข้มข้น 5 ppm	2.00 ^b	4.00 ^b	4.00 ^b	3.33
ความเข้มข้น 5 ppm +NAA	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00
BA				
ความเข้มข้น 1 ppm	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00
ความเข้มข้น 1 ppm +NAA	2.00 ^b	2.00 ^b	0.00 ^b	1.30
ความเข้มข้น 5 ppm	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00
ความเข้มข้น 5 ppm +NAA	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00
P-Mean	3.50	4.25	3.00	

C.V. = 142.75 %

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % เปรียบเทียบโดย DMRT

จากการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของรักเร่เพื่อศึกษาการตาย (Senescence) ของแคลลัส ลักษณะของแคลลัสที่ตายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ โดยตำแหน่งดอกย่อยของรักเร่ไม่มีผลต่อการทำให้เปอร์เซ็นต์การตายของแคลลัส ส่วนฮอร์โมน (Hormone) มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การตายของแคลลัสมีความแตกต่างกัน โดยอับละอองเกสรที่เลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 5 มก./ล BA ร่วมกับ 0.1 มก./ล NAA จะมีเปอร์เซ็นต์การตายของแคลลัสสูงที่สุด 32.5 % เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาพบว่าแคลลัสทั้งหมดที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นพืชได้

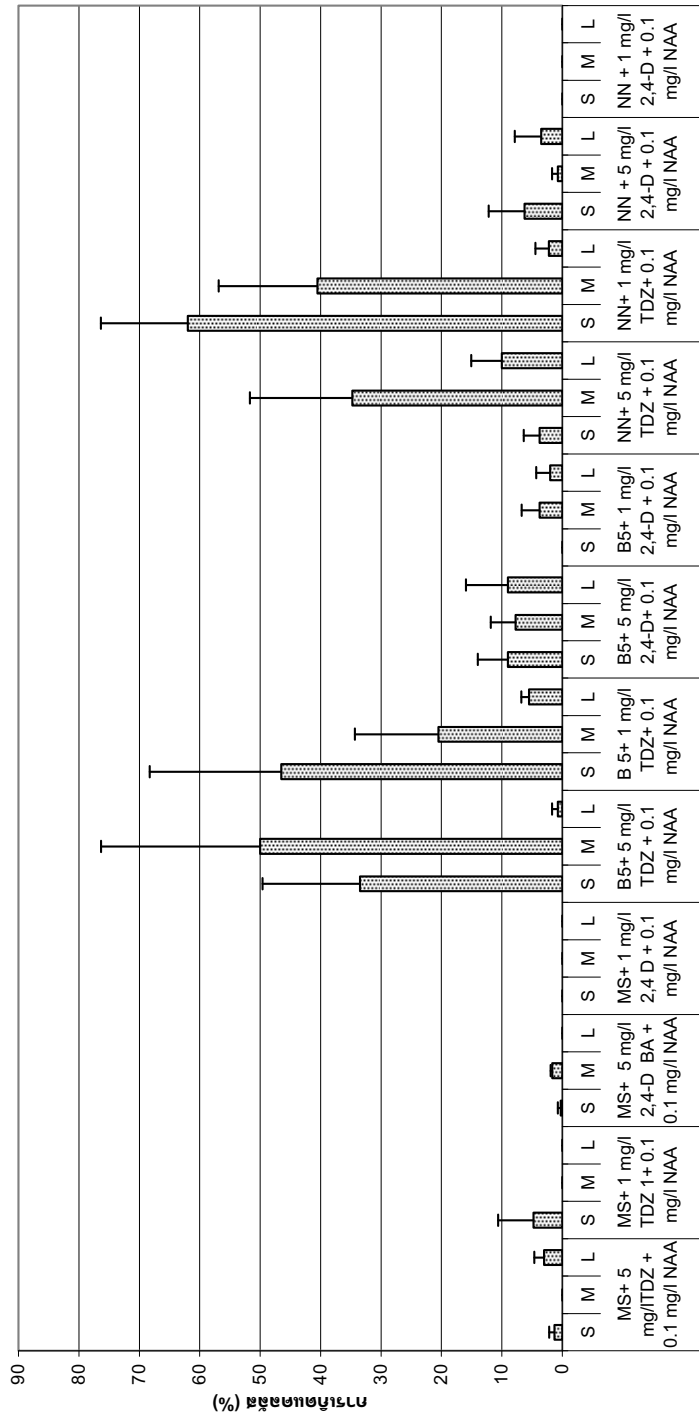
บีโกเนีย

การเกิดแคลลัส

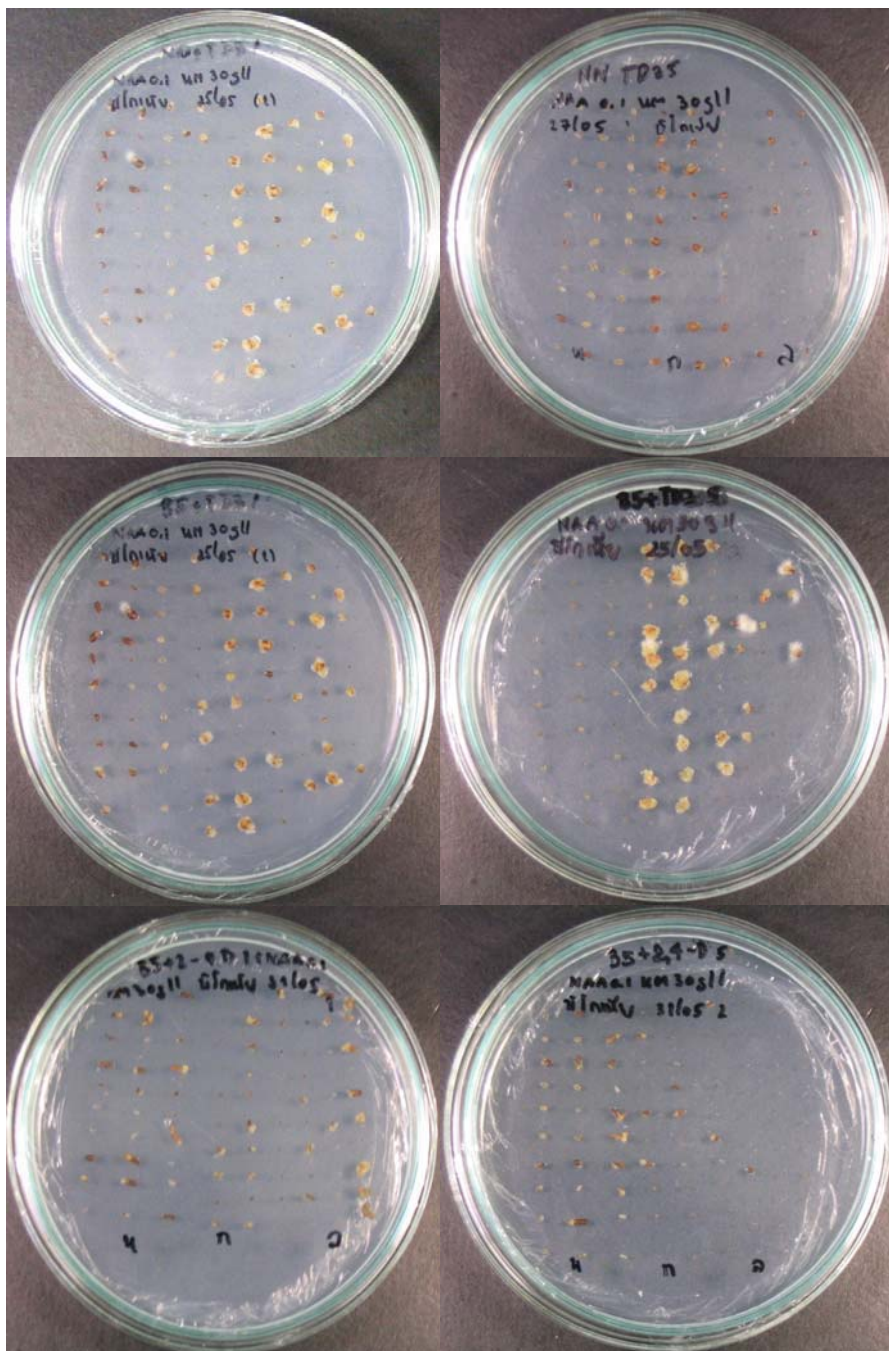
จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของบีโกเนียพบว่า อับละอองเกสรขนาดเล็ก และกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA อับละอองเกสรขนาดเล็กและกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA อับละอองเกสรขนาดกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NN ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA และ อับละอองเกสรขนาดเล็กและกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NN ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA มีการสร้างแคลลัสค่อนข้างสูงโดยมีการเกิดแคลลัสเท่ากับ 33.6 50 46.5 20.5 34.75 62 และ 40,5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาพที่ และ)

การเกิดต้น

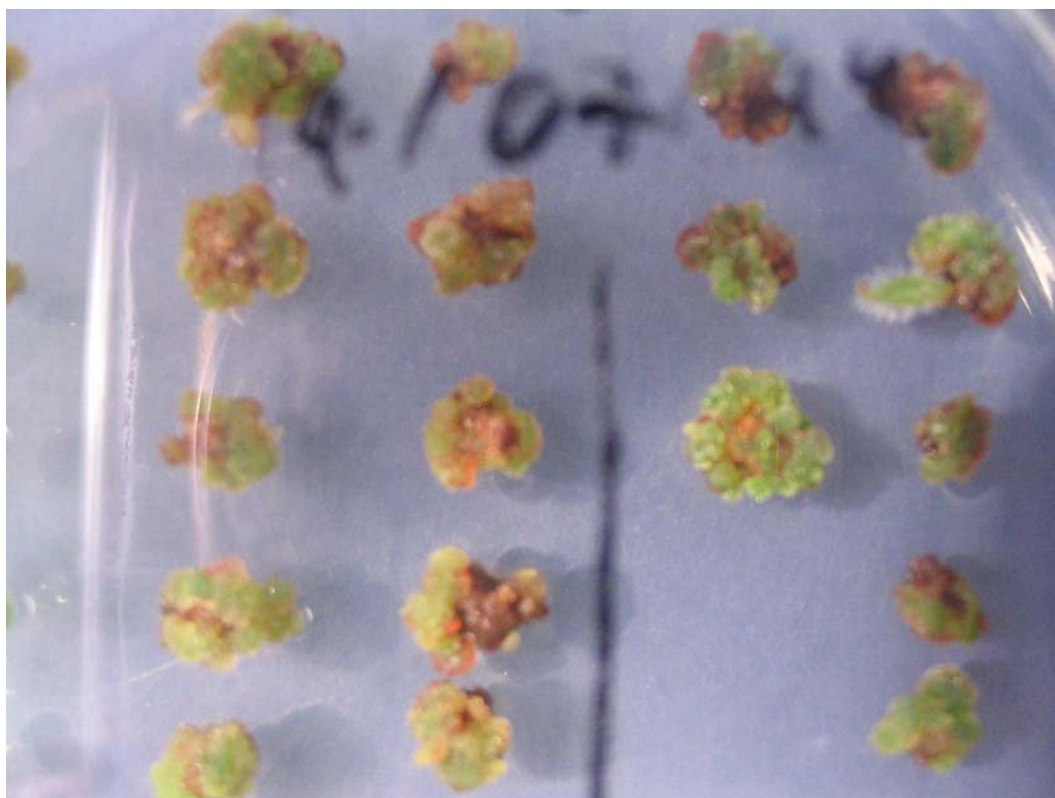
เมื่อทำการย้ายแคลลัสลงสู่อาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่า แคลลัสไม่มีการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้เลย โดยแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพบว่าจะมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลอ่อนเนื่องจากสารทุติยภูมิและเมื่อทำการทำการย้ายลงสู่อาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตในสภาพมีแสงพบว่าแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมแดง และมีบางแคลลัสพัฒนาไปจนมีลักษณะคล้ายรากแต่ไม่มากนัก(ภาพที่)และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปพบว่า แคลลัสเหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลและตายไป



ภาพที่ 38 การเกิดแคลลัส(%) จากการเพาะเลี้ยงอับละของเกสรของบีโกเนียบนอาหารสูตรต่างๆ



ภาพที่ 39 การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงอับละอองปีโกเนียบนอาหารสูตรต่างๆ



ภาพที่ 40 แคลลัสของบีโกเนียเมื่อย้ายลงสู่อาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต

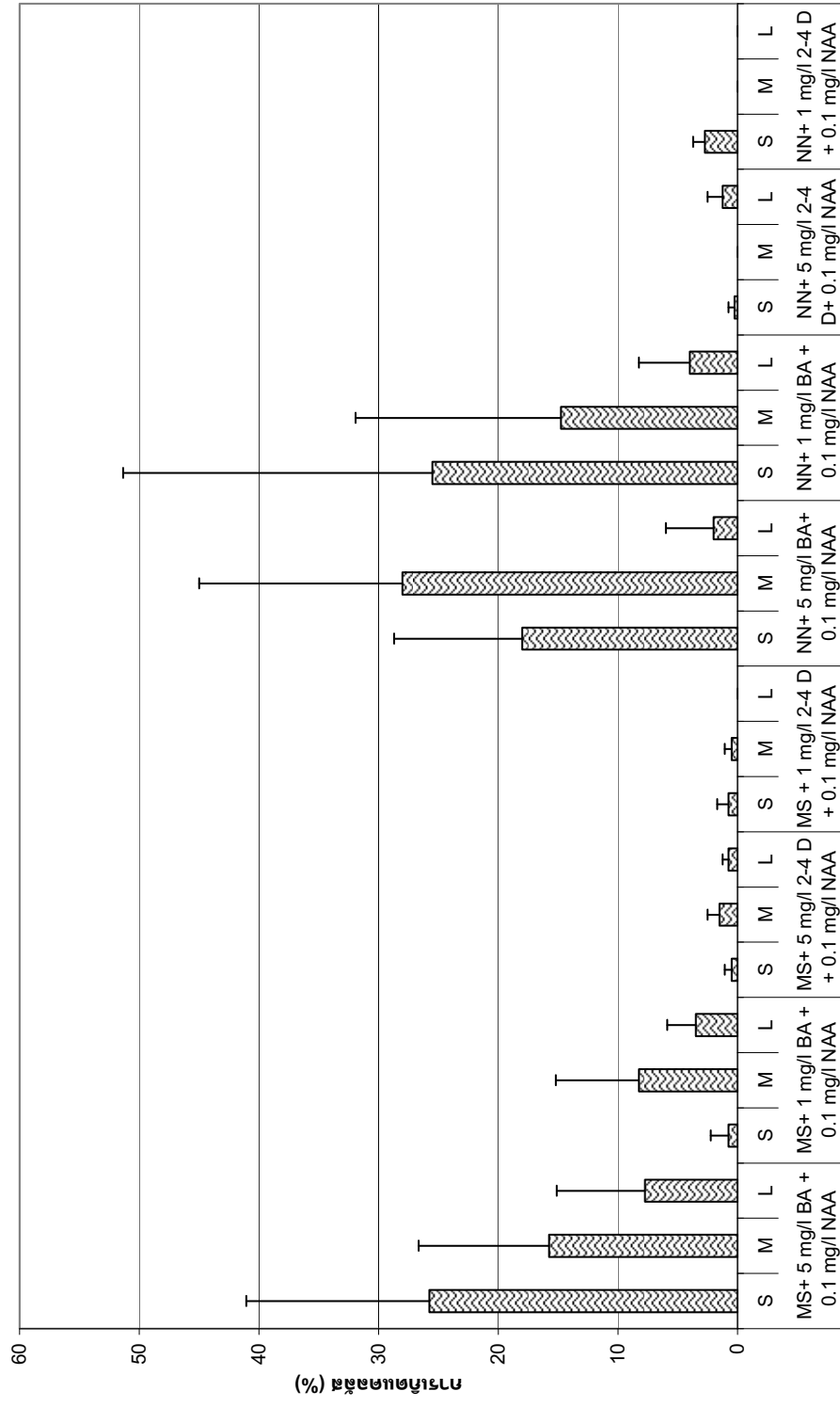
บลูซัลเวีย

การเกิดแคลลัส

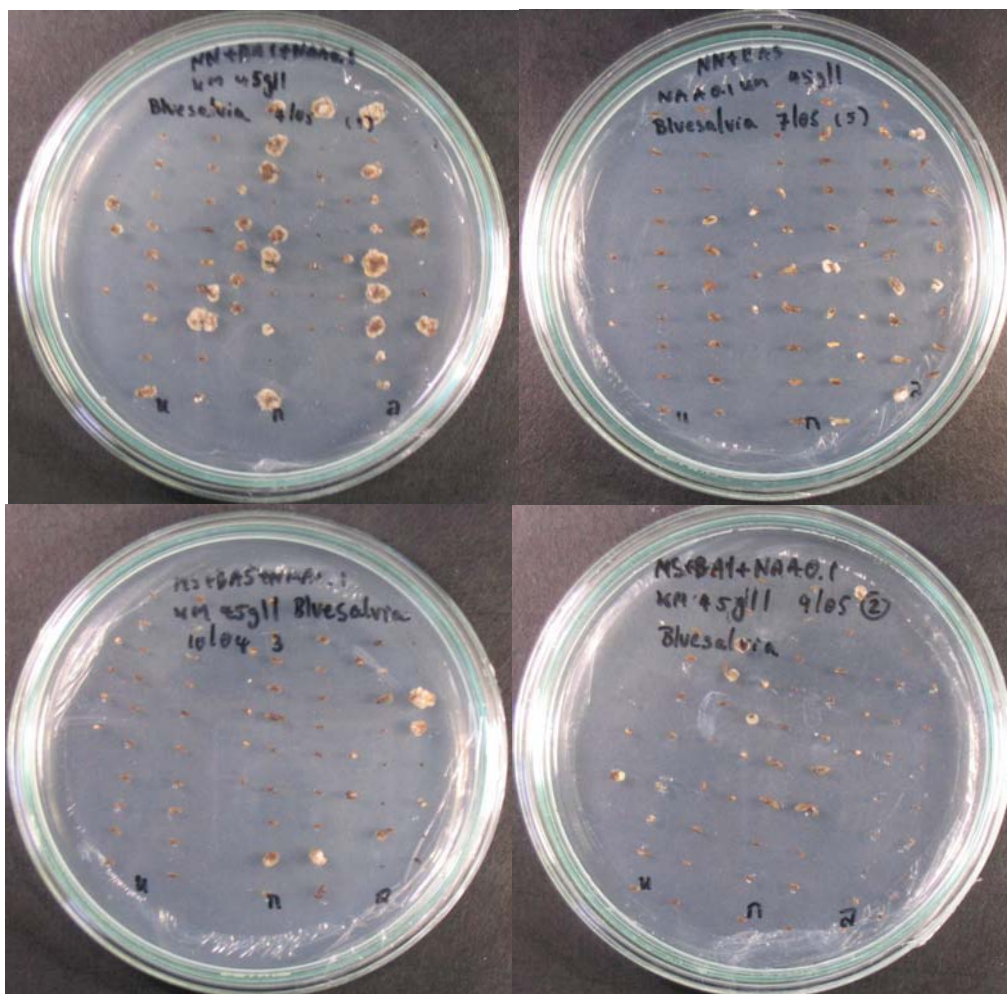
จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรบลูซัลเวียพบว่าอับละอองเกสรจากดอกขนาดเล็กและกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA อับละอองเกสรจากดอกขนาดเล็กและกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NN ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA และ อับละอองเกสรจากดอกขนาดเล็กและกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NN ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล BA และ 0.1 มก/ล NAA โดยมีการเกิดแคลลัสเท่ากับ 25.75 15.75 18 28 25.5 และ 14.75 ตามลำดับ(ภาพที่ 41)

การเกิดต้น

เมื่อแคลลัสเกิดได้ระยะหนึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเมื่อทำการย้ายลงบนอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่าแคลลัสไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงและตายลงในที่สุด (ภาพที่ 42)



ภาพที่ 41 การเกิดแคลลัส (%) จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรบลูวัลเวียบนอาหารสูตรต่างๆ



ภาพที่ 42 แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรบลูซัลเวีย

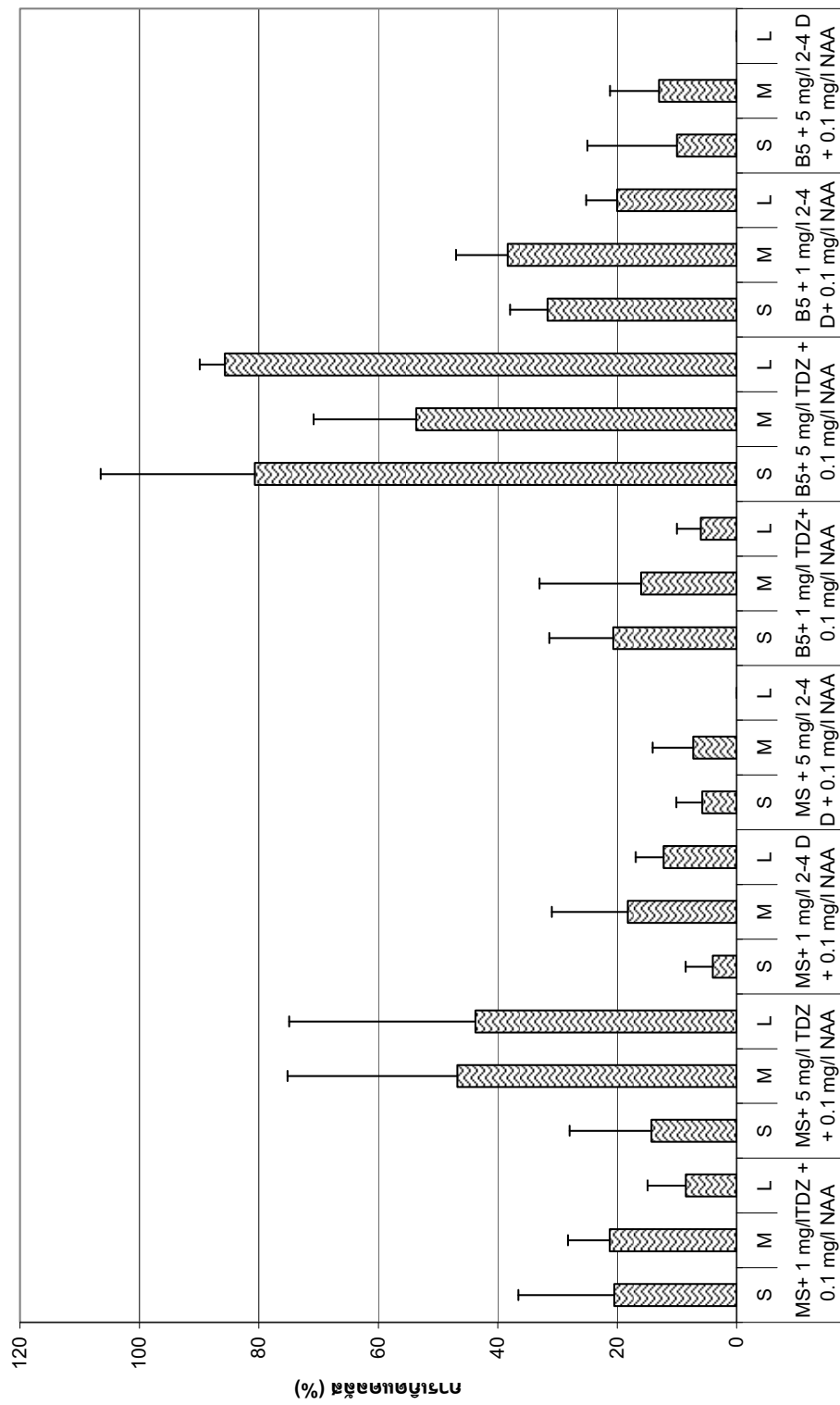
แพ่งพวย

การเกิดแคลลัส

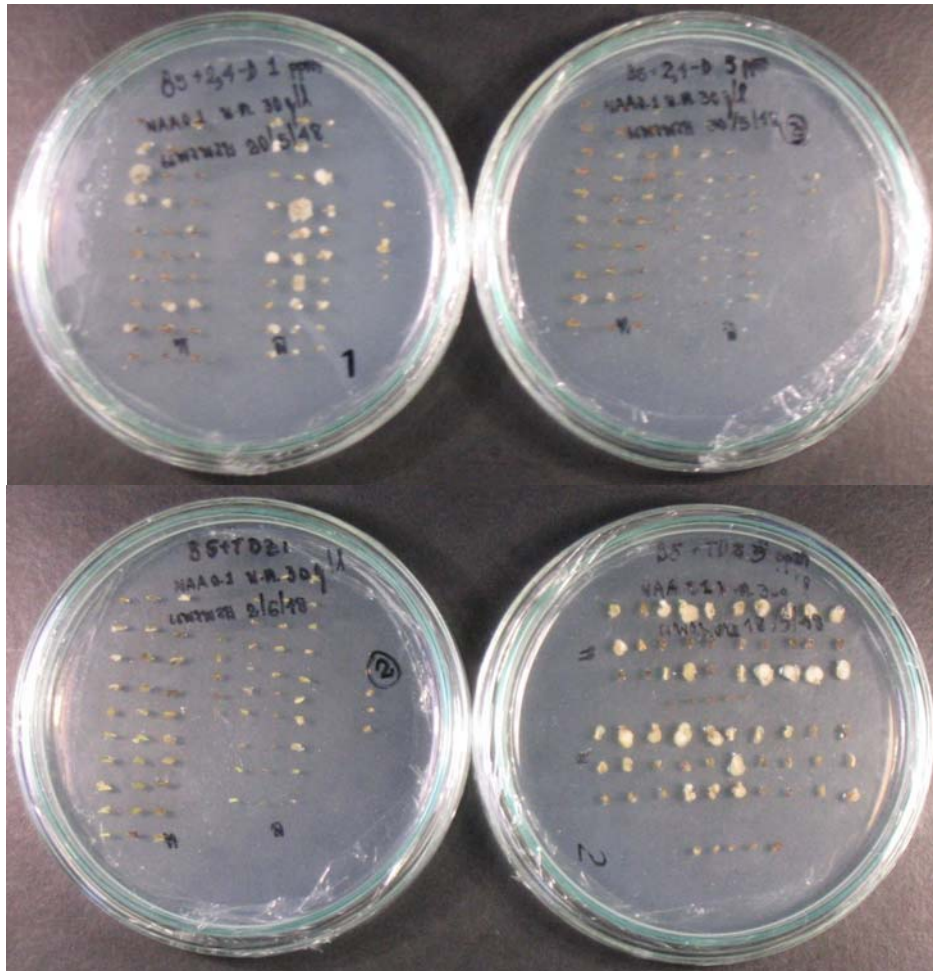
จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรแพ่งพวยพบว่า อับละอองเกสรจากดอก ขนาด กลาง และใหญ่ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA และ อับละอองเกสรจากดอกขนาดเล็ก กลาง และใหญ่ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร สูตร B5 ที่ประกอบด้วย 5 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA โดยมีการเกิดแคลลัสเท่ากับ 43.8 42 80.3 67 และ 83.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ(ภาพที่ 43)

การเกิดต้น

เมื่อแคลลัสเกิดได้ระยะหนึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเมื่อทำการย้ายลงบน อาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่าแคลลัสไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง(ภาพที่ 44)



ภาพที่ 43 การเกิดแคลลัส (%) จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรแหวงพวยบนอาหารสูตรต่างๆ



ภาพที่ 44 แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรบนอาหารสูตรต่างๆ

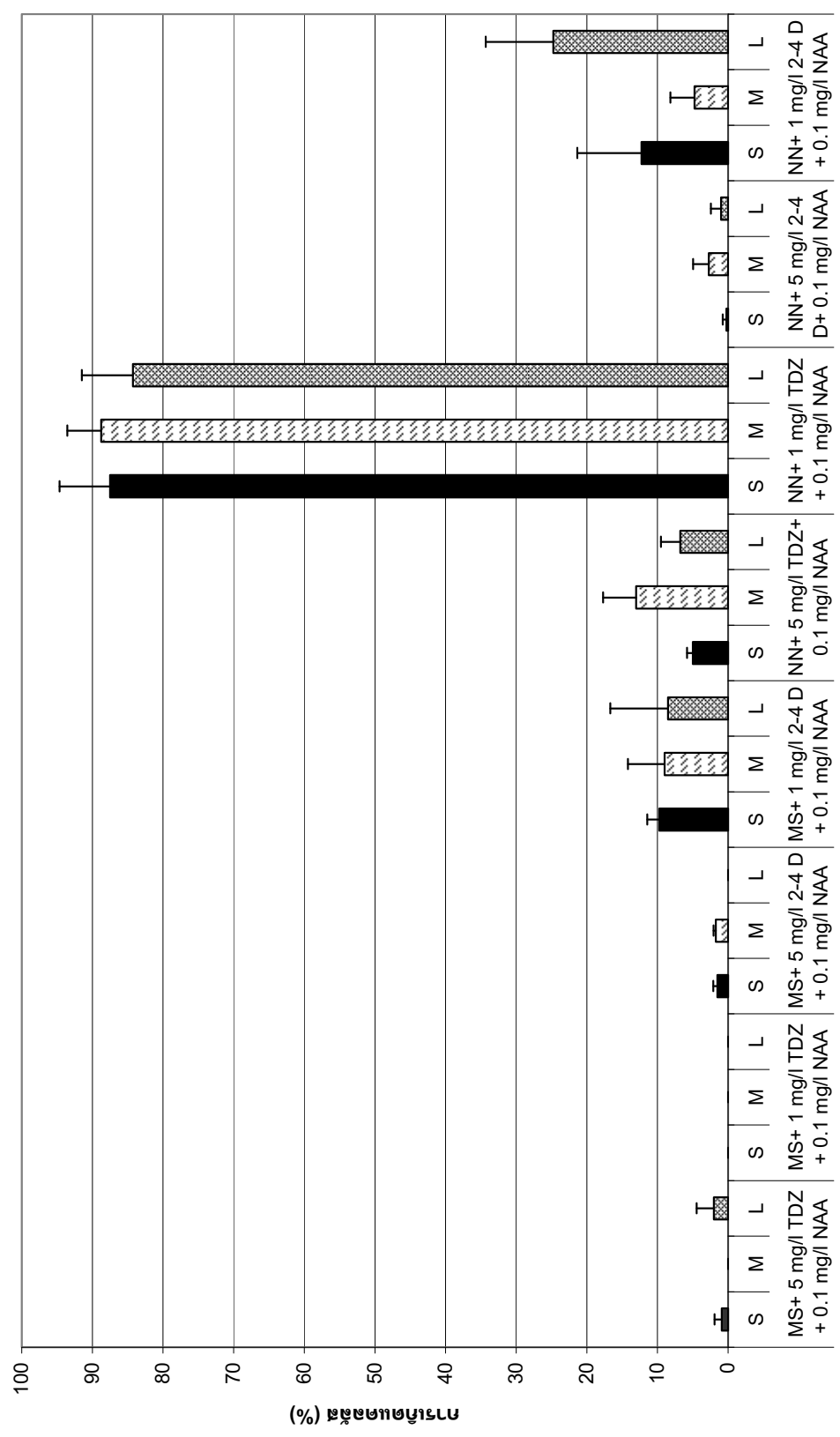
บานขึ้น

การเกิดแคลลัส

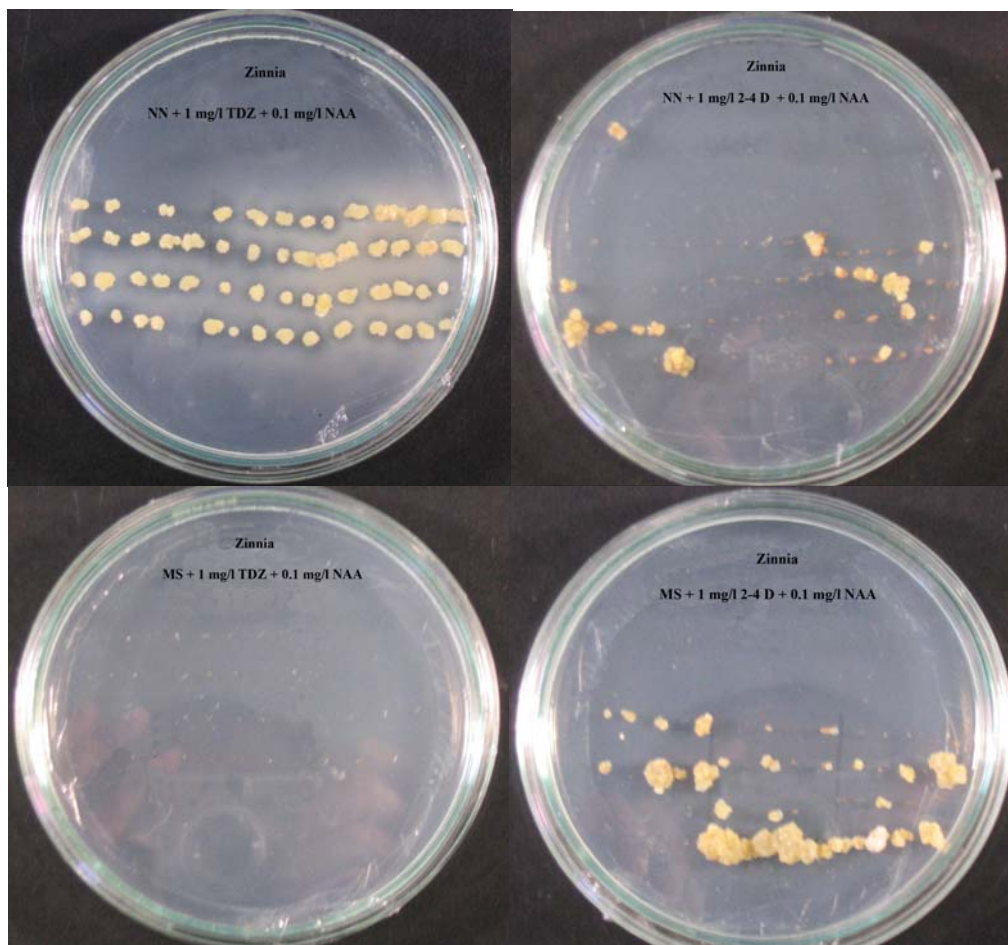
จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรบานขึ้นพบว่า อับละอองเกสรจากดอก ขนาด เล็ก กลาง และใหญ่ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NN ที่ประกอบด้วย 1 มก/ล TDZ และ 0.1 มก/ล NAA โดยมีการเกิดแคลลัสเท่ากับ 87.5 88.75 และ 84.25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาพที่ 45)

การเกิดต้น

เมื่อแคลลัสเกิดได้ระยะหนึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเมื่อทำการย้ายลงบนอาหารที่ไม่ มีสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่าแคลลัสขยายขนาดขึ้นแต่ไม่มีการพัฒนาเป็นยอดหรือ เปลี่ยนแปลงเป็นรากหรืออวัยวะอื่นๆเลย(ภาพที่ 46)



ภาพที่ 45 การเกิดแคลลัส (%) จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของบานขึ้นอาหารสูตรต่างๆ



ภาพที่ 46 การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรบนอาหารสูตรต่างๆ

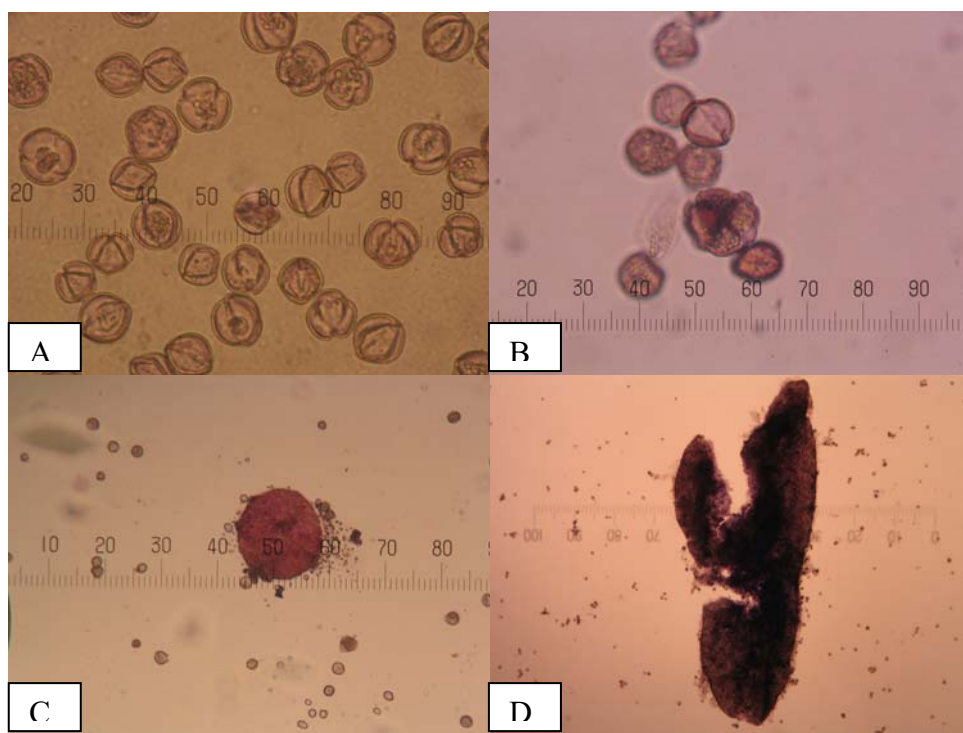
จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของไม้ดอกบางชนิดไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เลย อับละอองเกสรจะมีลักษณะเหมือนเดิมและเมื่อเพาะเลี้ยงไประยะหนึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายไป โดยอับละอองเกสรของ ลิ้นมังกร เจอราเนียม ปทุมมา เทียนญี่ปุ่น กล็อกซีเนีย แววมยุรา แกลดิโอลัส และ ฟร็อก ที่ทำการเพาะเลี้ยง พบว่าไม่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงใดๆเลย

การทดลองที่ 3 การเพาะเลี้ยง Microspore

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงละอองเกสรพืชชนิดต่างๆ พบว่า อิทธิพลของการทำการ pretreatment ไม่มีผลต่อการพัฒนาของละอองเกสรกล่าวคือการทำ Pretreatment โดยนำดอกไม้ชนิดต่างๆ ไปไว้ในอุณหภูมิ 30 หรือ 4 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากนำละอองเกสรไปเพาะเลี้ยงพบว่าดอกที่ทำการ pretreatment ต่าง ๆ มีการพัฒนาของละอองเกสรไม่แตกต่างกันหลังนำไปเพาะเลี้ยง

การเพาะเลี้ยงละอองเกสรของพิทูเนีย

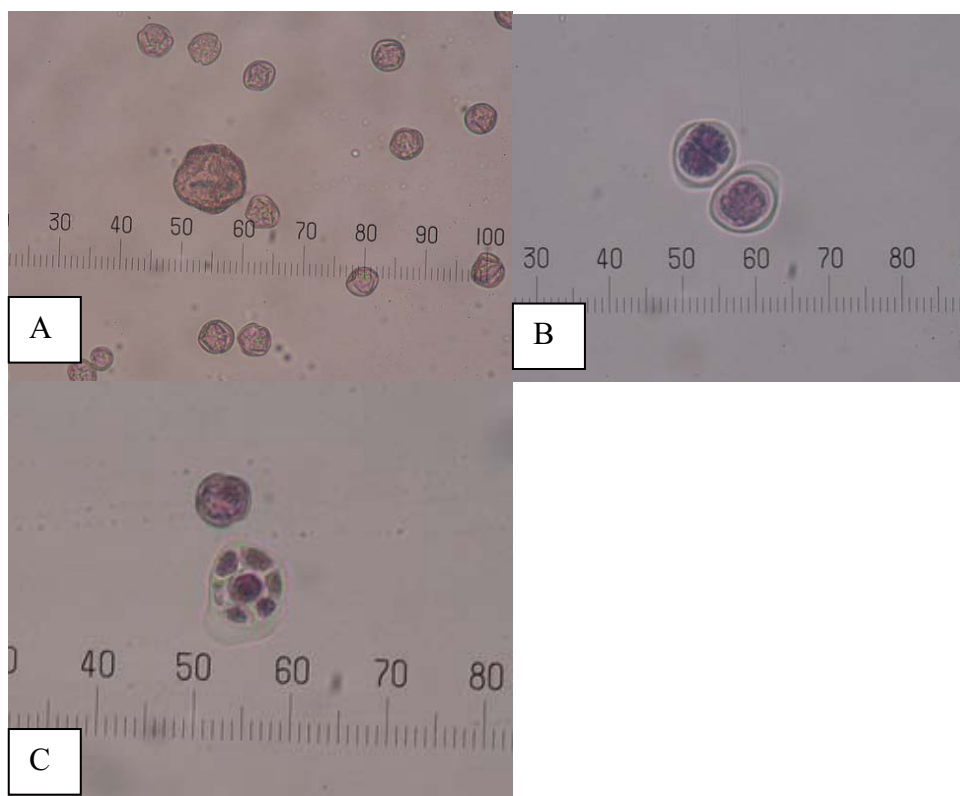
การเพาะเลี้ยงละอองเกสรของพิทูเนียพบว่า การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะมีการพัฒนาการได้ดี โดยในระยะแรกหลังการเพาะเลี้ยงใน manital พบว่าละอองเกสรมีนิวเคลียสขนาดใหญ่และมีการลักษณะเหี่ยวเนื่องจากการสะสมแป้งน้อย หลังจากนั้นเมื่อย้ายลงสู่อาหารสูตร medium B พบว่าบางละอองเกสรมีขนาดใหญ่และติดสีเข้ม และเมื่อย้ายลงสู่อาหารสูตร IMI ระยะหนึ่งพบว่าละอองเกสรบางละอองมีการเพิ่มขึ้นมาก และก่อนทำการย้ายลงสู่อาหารสูตร IMR พบว่าบางละอองเกสรมีการพัฒนาจนได้เอ็มบริโอแต่หลังจากการย้ายลงสู่อาหารสูตร IMR ซึ่งเป็นอาหารแข็งนั้นไม่พบว่าเอ็มบริโอมีการพัฒนาให้เห็น



ภาพที่ 47 A. ละอองเกสรที่ทำการเพาะเลี้ยงในmanital 1 สัปดาห์ B.-C ละอองเกสรหลังจากเพาะเลี้ยงใน medium B D. ละอองเกสรที่พัฒนาจนมีรูปร่างคล้ายเอ็มบริโอ หลังเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร IMI

การเพาะเลี้ยงละอองเกสรของลินม้งกร

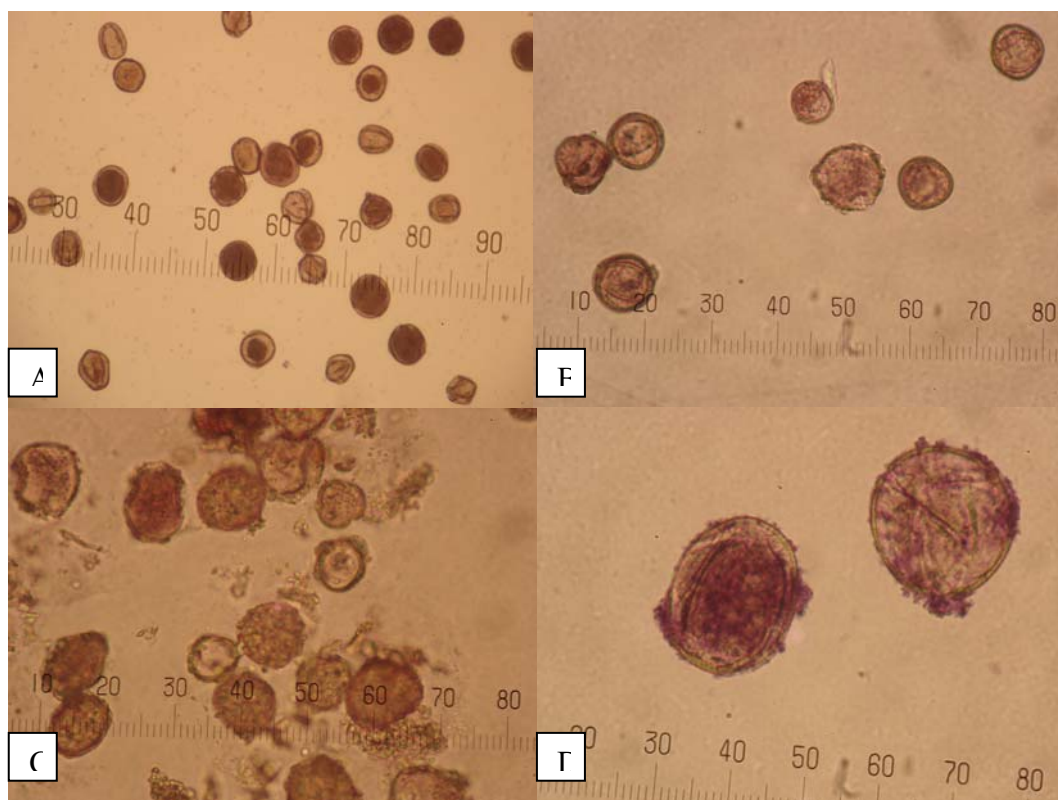
จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงละอองเกสรจากดอกของลินม้งกรขนาดดอก 0.4, 0.5 และ 0.6 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 4 °C, 25 °C และ 30 °C จากการสังเกตการณ์พัฒนาของการพัฒนาของตาดอกระยะต่างๆ โดยการสุมละอองเกสรที่เลี้ยงมาทำการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าละอองเกสร ที่ได้จากดอกขนาดใหญ่ที่ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C ในดอกขนาดใหญ่ มีการพัฒนาโดยละอองเกสร มีขนาดใหญ่กว่าที่อุณหภูมิต่างๆ โดยละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงไว้มีขนาดใหญ่ขึ้น และภายในคิณีสัย้อม เข้มขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ละอองเกสรจะเพิ่มขนาดขึ้นได้ระยะหนึ่งแล้วหยุดการพัฒนา โดย Kyo และ Harada (1985) ได้ทำการศึกษาสภาวะของการแบ่งเซลล์และการเกิดต้นอ่อนในการเพาะเลี้ยงละอองเกสรของ *Nicotiana rustica* โดยมีกระบวนการเพาะเลี้ยงในอาหาร 3 ขั้นตอนซึ่งพบว่า จากการเพาะเลี้ยงครั้งแรกใน Percoll Fractionation เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 3 วัน ละอองเกสรจะมีขนาดใหญ่ มีการสะสมแป้งและเป็นอับละอองเกสรที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่ ในการเพาะเลี้ยงครั้งที่ 2 แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าไม่สามารถพัฒนาไปสู่embryo ได้



ภาพที่ 48 A. การพัฒนาของละอองเกสรหลังเพาะเลี้ยงในอาหาร medium B B-C. ละอองเกสรแสดงการแบ่งตัวและบางละอองเกสรแสดงให้เห็นการเกิดกลุ่มเซลล์หลังเลี้ยงในอาหารIMI

การเพาะเลี้ยงละอองเกสรของแวมยูรา

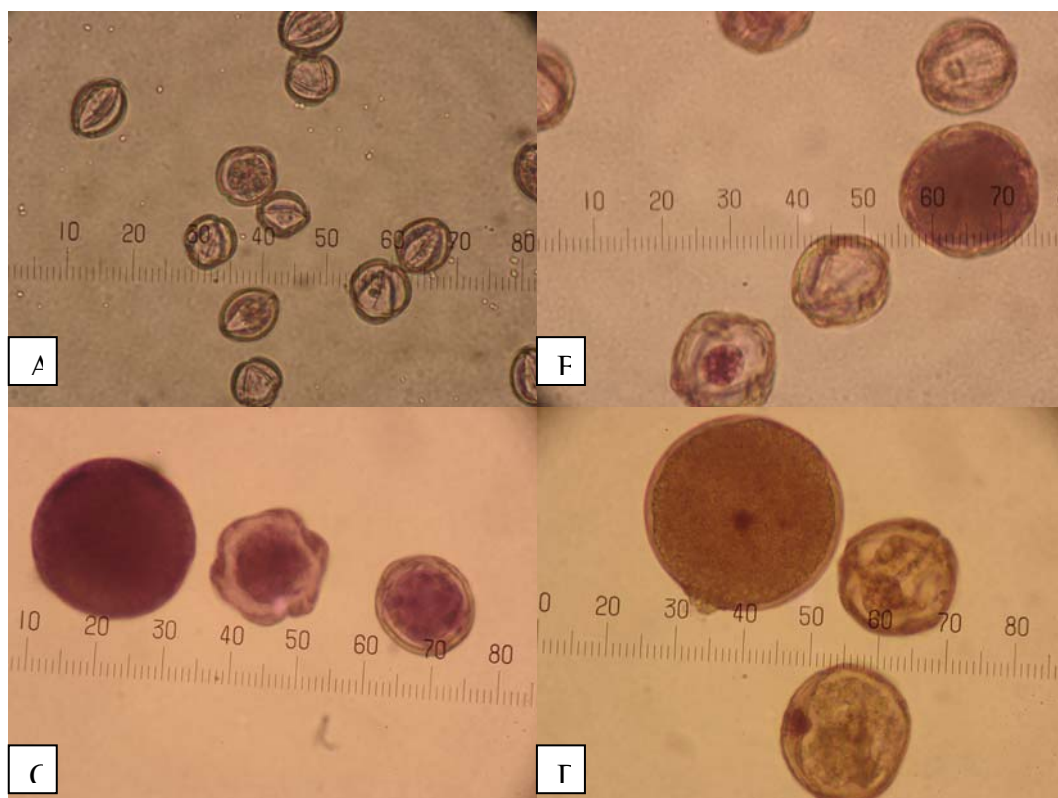
การเพาะเลี้ยงละอองเกสรของแวมยูรา พบว่า การเพาะเลี้ยงละอองเกสรที่อุณหภูมิ 4 25 และ 30 องศาเซลเซียส มีลักษณะไม่แตกต่างกัน ในmanital พบว่าละอองเกสรไม่แตกต่างจากก่อนการเพาะเลี้ยง หลังจากย้ายละอองเกสรลงปลูกในอาหารสูตร medium B พบว่าละอองเกสรไม่พัฒนามากนักแต่มีบางละอองเกสรมีขนาดเพิ่มขึ้น และหลังจากการย้ายสู่อาหารสูตร IMI และ IMR พบว่าละอองเกสรแทบจะไม่มีเปลี่ยนแปลงใดๆจากละอองเกสรดังรูป



ภาพที่ 49 A. การพัฒนาของละอองเกสรหลังเพาะเลี้ยงในอาหาร medium B B-D. ละอองเกสรแสดงการแบ่งตัวและบางละอองเกสรแสดงให้เห็นการเกิดกลุ่มเซลล์หลังเลี้ยงในอาหารIMI

การเพาะเลี้ยงละอองเกสรของแพะพวย

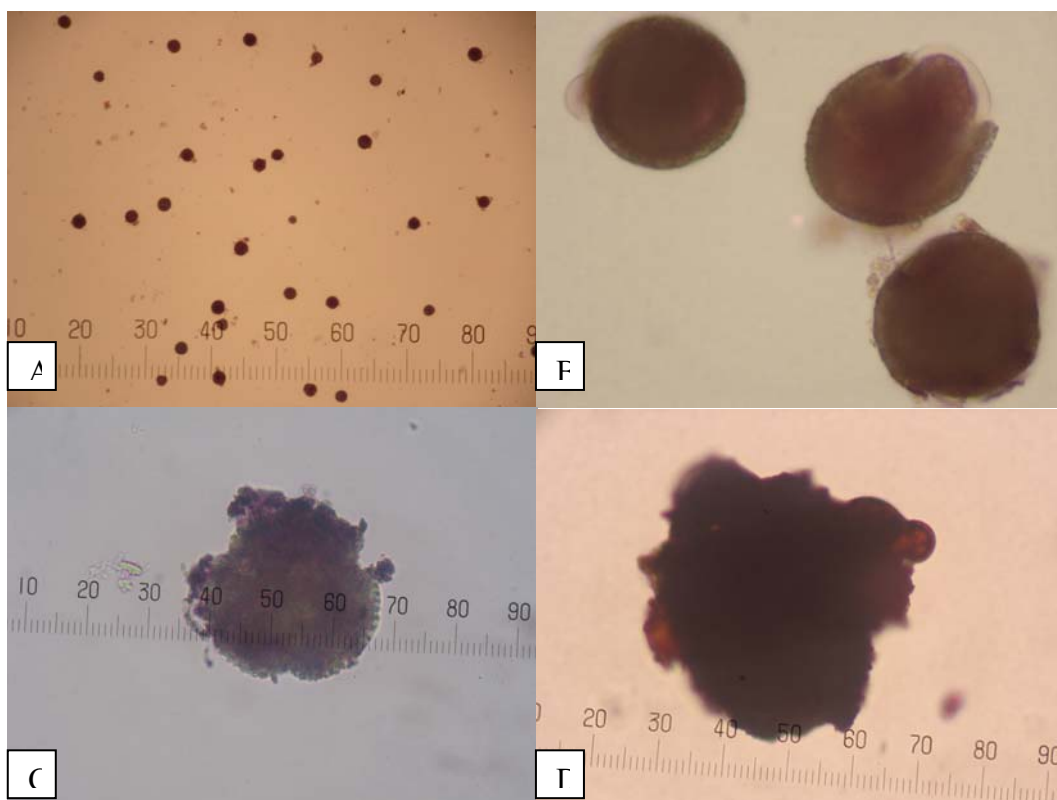
จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของแพะพวยพบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงใน manital พบว่าละอองเกสรไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก แต่หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร medium B ละอองเกสรบางละอองเกสรมีขนาดใหญ่ขึ้นและมีการติดสีเข้มขึ้นด้วยและหลังจากเลี้ยงในอาหารสูตร IMI พบว่าละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงไม่ต่างจากละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงในอาหารMedium B มากนัก และหลังจากย้ายปลูกลงสู่อาหารสูตร IMR พบว่าละอองเกสรบางละอองเกสรมีขนาดใหญ่ขึ้นเล็กน้อยแต่ไม่พัฒนามากนักแต่ละอองเกสรติดสีเข้ม แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร IMR ที่เป็นอาหารเหลวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร IMR ที่เป็นอาหารแข็งพบว่าไม่สามารถไม่มีการพัฒนาเป็นต้นได้



ภาพที่ 50 A. การพัฒนาของละอองเกสรหลังเพาะเลี้ยงในอาหาร medium B B-D. ละอองเกสรแสดงการแบ่งตัวและบางละอองเกสรแสดงให้เห็นการเกิดกลุ่มเซลล์หลังเลี้ยงในอาหารIMI

การเพาะเลี้ยงละอองเกสรของเจอร์ราเนียม

จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของเจอร์ราเนียมพบว่า หลังจากการเพาะเลี้ยงในManital พบว่าละอองเกสรไม่แตกต่างจากก่อนการเพาะเลี้ยงมากนักและหลังจากทำการย้ายลงในอาหารสูตร Medium B พบว่าละอองเกสรมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปมีลักษณะคล้ายเซลล์ภายในมีการแบ่งตัวตัวภาพ และหลังจากย้ายลงสู่อาหารสูตร IMI พบว่าละอองเกสรเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจากเดิมค่อนข้างมากโดยละอองเกสรมีลักษณะคล้ายเป็นกลุ่มเซลล์ หลังจากย้ายลงสู่อาหารสูตร IMR ระยะหนึ่งจะพบว่ากลุ่มเซลล์เหล่านี้จะใหญ่ขึ้น แต่หลังจากย้ายลงอาหารสูตร IMR ซึ่งเป็นอาหารแข็งก็ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดหรือกลุ่มเซลล์ที่เพิ่มขนาดขึ้นแต่อย่างใด



ภาพที่ 51 A. การพัฒนาของละอองเกสรหลังเพาะเลี้ยงในอาหาร medium B B-D. ละอองเกสรแสดงการแบ่งตัวและบางละอองเกสรแสดงให้เห็นการเกิดกลุ่มเซลล์หลังเลี้ยงในอาหารIMI

จากการทดลองเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรจะพบว่าละอองเกสรในพืชบางชนิดเช่น พืช ทุเรียน เจอราเนียม แพงพวย มีการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปอย่างเห็นได้ชัดแต่ไม่สามารถพัฒนาต่อไปเป็นต้นพืชได้ ทั้งนี้อาหารที่เพาะเลี้ยงอาจจะเหมาะสมในการพัฒนาในระยะแรกเท่านั้น แต่หลังจากนั้นควรมีการพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อไปเพื่อให้มีการพัฒนาไปจนกระทั่งได้พืชใหม่ แต่ในพืชอีกหลายชนิดพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆระหว่างเพาะเลี้ยง ซึ่งแสดงว่าอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงนั้นอาจไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาของพืชต่างๆเหล่านั้นก็ได้

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรหากพิจารณาโดยรวม จะเห็นได้ว่าอับละอองที่มีละอองเกสรส่วนใหญ่อยู่ในระยะ tetrad และ ระยะ uninucleate จะมีการพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีกว่าอับละอองเกสรที่มีการพัฒนาไปเป็นละอองเกสรที่สมบูรณ์แล้ว จากการทดลองเบื้องต้น สภาพแวดล้อมที่ให้กับละอองเกสรก่อนการเพาะเลี้ยงคือ อุณหภูมิต่ำ และ อุณหภูมิสูง พบว่าไม่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร จึงไม่จำเป็นต้องให้สภาพดังกล่าวกับอับละอองเกสรก่อนการเพาะเลี้ยง อับละอองเกสรมีการตอบสนองต่ออาหารที่แตกต่างกันโดยพืชบางชนิดอาจเกิดการตอบสนองต่ออาหารสูตร MS บางชนิดตอบสนองต่อ NN หรือ ตอบสนองต่ออาหารสูตร B5 นอกจากนี้อับละอองเกสรจะตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกันโดยบางพืชตอบสนองต่อ TDZ บางชนิดตอบสนองต่อ BA หรือ 2,4-D แต่พบว่าอับละอองเกสรไม่ตอบสนองต่อ Kinetin เลย เมื่อศึกษาถึงผลของสภาพแสงต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพบว่าอับละอองเกสรจะพัฒนาได้ดีหากทำการเพาะเลี้ยงในสภาพมืด แต่หากเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสงพบว่าอับละอองเกสรมีการพัฒนาที่ไม่ดี เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรค่อนข้างนานทำให้พืชบางชนิดแม้ว่าจะสามารถชักนำให้เกิดต้นได้แต่ต้นจะมีลักษณะต้นใสและฉ่ำน้ำ โดยเฉลี่ยแล้วระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรจะใช้เวลา 6-8 เดือน ซึ่งจะเห็นได้ว่าหากสามารถชักนำให้เกิดพันธุ์แท้จากอับละอองเกสรได้จะลดเวลาการสร้างสายพันธุ์แท้ได้มาก เมื่อทำการตรวจสอบระดับโครโมโซมของพืชที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรจะพบว่าส่วนใหญ่จะมีโครโมโซมเป็น $2n$ ซึ่งอาจเกิดจากการเพิ่มขึ้นของโครโมโซมของพืชในระหว่างการเพาะเลี้ยงโดยตัวพืชเอง (Spontaneous chromosome doubling) ซึ่งพบได้ในพืชหลายชนิดเช่น หน่อไม้ฝรั่ง (Corriols et al., 1990), ลิลลี่ (Fernandez et al., 1997), ข้าวสาลี (Ouyang et al., 1994), ข้าวบาเลย์ (Kasha et al., 2001), และข้าวโพด (Michard and Beckert, 1997) เป็นต้น ซึ่งการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานและเซลล์ที่มีโครโมโซม $2n$ เจริญเติบโตได้ดีกว่าและพืช $1n$ จะมีความอ่อนแอและเจริญเติบโตช้าอาจจะมีการแย่งอาหารจากพืช $2n$ ในระยะแรกของการเกิดยอดทำให้ยอด $1n$ ไม่พัฒนายอดให้เห็นมากนัก Nontaswatsri และ Fukai (2005) รายงานว่าในการเพาะเลี้ยงแคลลัสของฝัสน้ำพบว่าในระยะแรกยอดพืชที่เริ่มเกิดจะมีทั้ง $2n$, $4n$ และ $8n$ ในยอดเดียวกัน แต่เมื่อพืชเจริญได้ระยะหนึ่งจะพบว่ายอดเหล่านั้นจะมีโครโมโซมเป็น $2n$ ปกติ เนื่องจากเซลล์ $2n$ เจริญได้ดีกว่า แต่ Saji และ Sujatha (1998) กล่าวว่าพืช $2n$ เกิดจากเซลล์ $2n$ ของผนังอับละอองเกสร เมื่อทำการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยเทคนิค RAPD จะพบว่าแถบ DNA ของต้นแม่และต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรมีความแตกต่างกัน ซึ่งเป็นการพิสูจน์ได้ว่าพืชเหล่านี้มีพันธุกรรมแตกต่างจากต้นที่ให้อับละอองเกสรซึ่งแสดงว่าพืชเหล่านี้ไม่ได้เกิดมาจากเซลล์ร่างกายของต้นที่ให้อับละอองเกสร และเมื่อปลูกพืชเหล่านี้เปรียบเทียบกับต้นให้อับละอองเกสรจะพบว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรและต้นที่ให้อับละอองเกสรมีลักษณะแตกต่างกัน ซึ่งเป็นการยืนยันได้เป็นอย่างดี แต่อย่างไรก็ตามเพื่อยืนยันว่าต้นที่ได้นี้ไม่ได้เกิดจากการกลายพันธุ์ของเซลล์

ร่างกายต้นแม่หรือเกิดจากการแปรเปลี่ยนทางพันธุกรรมระหว่างการเพาะเลี้ยง (somaclonal variation) จึงต้องทำการผสมตัวเองดอกจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละองเกสรซึ่งหากไม่เกิดการกระจายตัวแสดงว่าพืชเหล่านี้เกิดจากเซลล์สืบพันธุ์ที่มีการเพิ่มปริมาณ DNA จนเป็นพืช $2n$ ซึ่งทำให้พืชนั้นเป็นพันธุ์แท้และสามารถใช้ประโยชน์ของพืชเหล่านี้ได้เลย ในบางครั้งจะพบว่าเมื่อตรวจสอบด้วย RAPD ไม่พบความแตกต่างแต่เมื่อปลูกพืชเหล่านี้เปรียบเทียบกับลักษณะพบว่า มีลักษณะที่แตกต่างซึ่งอาจเกิดจาก primer ที่ใช้ในการตรวจสอบเป็นแบบสุ่มซึ่ง primer ชุดที่ใช้นี้อาจไม่สามารถตรวจสอบความแตกต่างได้จึงจำเป็นต้องเปลี่ยน primer เพื่อหา primer ที่เหมาะสมต่อไป ซึ่งจากการทดลองนี้พบปัญหานี้เพียง 2 พืชเท่านั้น ในการเพาะเลี้ยงละองเกสรพบว่าในระยะแรกของการเพาะเลี้ยงจะพบการพัฒนาของละองเกสรโดยจะพบว่าละองเกสรบางเกสรจะมีขนาดใหญ่ขึ้นมีการแบ่งเซลล์เป็นกลุ่มของเซลล์ หรือในบางพืชพัฒนาจนได้เอ็มบริโอ แต่อย่างไรก็ตามเอ็มบริโอเหล่านั้นไม่สามารถจะพัฒนาต่อไปได้ทั้งนี้อาหารที่ใช้ในระยะสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงอาจไม่เหมาะสม หรือสภาพการเพาะเลี้ยงอาจไม่เหมาะสม ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาต่อไป

สรุป

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละองเกสร พบว่าอับละองเกสรที่มีละองเกสรอยู่ในระยะ tetrad และ ระยะ uninucleate เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและเกิดต้น การเพาะเลี้ยงในสภาพมืดจะเหมาะสมต่อการพัฒนาแคลลัสของอับละองเกสรดีกว่าในสภาพมีแสง ไม้ดอกบางชนิดสามารถเกิดแคลลัสและต้นได้ดีเช่น ดาวเรือง ดาวเรืองฝรั่งเศส ผีเสื้อ ผีเสื้อช่อ เบญจมาศ พิทูเนีย แต่บางพืชสามารถเกิดแคลลัสดีแต่เกิดต้นน้อยและมีลักษณะผิดปกติเช่น คาร์เนชั่น และ กาชเนีย เป็นต้น ในขณะที่พืชบางชนิดเกิดแคลลัสได้ดีแต่ไม่เกิดต้นขึ้นเลย และ อับละองเกสรของพืชบางชนิดไม่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงเลย ต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละองเกสรส่วนใหญ่มีโครโมโซม $2n$ ปกติ และเมื่อตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยเทคนิคทาง RAPD พบว่ามีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมระหว่างต้นที่ให้อับละองเกสรและต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละองเกสร นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างของลักษณะของพืชที่ให้อับละองเกสร และต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละองเกสร เมื่อทำการผสมตัวเองต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละองเกสรพบว่าเมล็ดที่ได้จากการผสมตัวเองไม่มีการกระจายตัวของลักษณะ

เอกสารอ้างอิง

- Afele J.C., L.W. Kannenberg, R. Keats, S. Sohota, and E. B. Swanson, 1992. Increased induction of microspore embryos following manipulation of donor plant environment and culture temperature in corn (*Zea mays* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 28: 87-90.
- Agarwal P.K. and S.S. Bhojwani 1993. Enhanced pollen grain embryogenesis and plant regeneration in anther cultures of *Brassica juncea* cv. PR-45. *Euphytica* 70(3): 191-196.
- Amaury M., A. Fernández, T. Nakazaki, H. Yamagata and T. Tanisaka, 1997. Production of doubled-haploid plants from *Lilium longiflorum* Thunb. anther culture. *Plant Science* 123:179-187.
- Binarova P., K. Straatman, B. Hause, G. Hause and A.A.M. Van Lammeren, 1993. Nuclear DNA synthesis during the induction of embryogenesis in cultured microspores and pollen of *Brassica napus* L. *Theoretical and Applied Genetics* 87(1-2):9-16
- Cegielska-Taras T., T. Tykarska, L. Szala, M. Kuras and J. Krzymanski, 2002. Direct plant development from microspore derived embryos of winter oilseed rape *Brassica napus* L. ssp. *Oleifera* (DC.) Metzger. *Euphytica* 124(3): 341-347.
- Corriols, L., Dore, C. and Rameau, C. (1990). Commercial release in France of andreas, The first asparagus all male F1 hybrid. *Acta Horticulturae*, 271, 249-252.
- Delalonde M. and Y. Barret and M.P. Coumans, 1996. Development of phenolic compounds in maize anther (*Zea mays*) during cold pretreatment prior to androgenesis. *Journal of Plant Physiology*: 149(5):612-616.
- Fernandez, A.M.A., Nakazaki, T., Yamagata, H. and Tanisaka, T. (1997). Production of doubled-haploid plants from *Lilium longiflorum* Thunb, anther culture. *Plant Science*, 123, 179-187
- Hamaoka Y., Y. Fujita and S. Iwai, 1991. Effects of temperature on the mode of pollen development in anther culture of *Brassica campestris*. *Physiologia Plantarum* 82(1):67-72.
- Jonard R. and A. Mazzarobba, 1990. In Bajaj Y.P.S. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 10, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 485-501.

- Kasha, K.J., Hu, T.C., Oro, R., Simion, E. and Shim, Y.S.(2001). Nuclear fusion leads to chromosome doubling manitol pretreatment of barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1227-1238.
- Kumar H.G.A., H.N. Murthy and K.Y. Peak, 2003. Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. *Scientia Horticulturae* 98:213-222.
- Kyo M. and H. Harada. 1985. Studies on conditions for cell division and embryogenesis in isolated pollen culture of *Nicotiana rustica*. *Plant Physiology*. 79 : 90-94.
- Laurain D., J. Tremouillaux-Guiller and J.C. Chenieux, 1993. Embryogenesis from microspores of *Ginkgo biloba* L., a medicinal woody species. *Plant Cell Reports* 12(9): 501-505.
- Michard, S.A. and Beckert, M. (1997). Spontaneous versus colchicine-induced chromosome doubling in maize anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48, 203-207.
- Miyoshi K. and N. Asakura, 1996. Callus induction, regeneration of haploid plants and chromosome doubling in ovule cultures of pot gerbera (*Gerbera jamesonii*)
- Muren R.C. 1989. Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion. *Hortscience*: 24(5) 833-834.
- Musial K., B. Bohanec and L. Prywara, 2001. Embryological study on gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.) *Sex Plant Reproduction* 13:335-341.
- Nontaswatsri, C. and S. Fukai, 2005. Regenerative callus of *Dianthus* 'Telstar Scarlet' showing mixoploidy produce diploid plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 83:351-355.
- Nurhidayah T., R. Horn, T. Röcher and W. Friedt, 1996. High regeneration rates in anther culture of interspecific sunflower hybrids. *Plant Cell Reports*. 16:167-173.
- Ouyang J.W., Liang, H., Jia, S.E., Zhang, C., Zhao, T.H., He, L. Z. and Jia, X. (1994). Studies on the chromosome doubling of wheat pollen plants. *Plant Science*, 98, 209-214.
- Owen H.R. and A.R. Miller, 1996. Haploid plant regeneration from anther cultures of three north american cultivars of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) *Plant Cell Reports* 15(12):905-909.
- Pechan P. M. and W. A. Keller, 1989. Induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. by gamma irradiation and ethanol stress. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 25(11): 1073-1074.

- Puddephat I.J., H.T. Robinson, B.M. Smith and J. Lynm, 1999. Influence of stock plant pretreatment on gynogenic embryo induction from flower buds of onion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57: 145-148.
- Saji K.V. and M. Sujatha, 1998. Embryogenesis and plant regeneration in anther culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.) *Euphytica* 103: 1-7.
- Takahata Y., D. C. W. Brown and W. A. Keller, 1991. Effect of donor plant age and inflorescence age on microspore culture of *Brassica napus* L. *Euphytica*. 58(1):51-55.
- Telmer A.C., W. Newcomb and D. H. Simmonds, 1993. Microspore development in *Brassica napus* and the effect of high temperature on division *in vivo* and *in vitro*. *Protoplasma* 172(2-4): 154-165.
- Tosca A. L. Arcara and P. Frangi, 1999. Effect of genotype and season on gynogenesis efficiency in Gerbera. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59:77-80.
- Wang M., M. W. Farnham and J.S.P. Nannes, 1999. Ploidy of broccoli regenerated from microspore culture versus anther culture. *Plant Breeding* 118: 249-252.
- Zarsky V., D. Garrido, N. Eller, L. Rihova, J. Tupy, O. Vincente and E. Heberle-Bors, 1992. Depression of the cell cycle by starvation is involved in the induction of tobacco pollen embryogenesis. *Sexual Plant Reproduction* 5(3): 189-194.