

### บทที่ 3

#### การทดสอบความงอกและการเก็บรักษาละอองเรณู

##### 3.1 บทนำ

การปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมข้าม อุปสรรคอย่างหนึ่งที่อาจพบได้เสมอ คือ การบานไม่พร้อมกันของดอกจากต้นที่ต้องการใช้เป็นพ่อพันธุ์ หรือแม่พันธุ์ ฉะนั้นเทคนิคที่มีส่วนช่วยให้การปรับปรุงพันธุ์ทำได้สำเร็จคือ การเก็บรักษาละอองเรณู และปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บรักษาละอองเรณูคือ อุณหภูมิ และความชื้น (อดิศร, 2539) ได้มีการศึกษาการเก็บรักษาละอองเรณูของ *Lilium* 12 ชนิด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60-65 เปอร์เซ็นต์ พบว่าหลังจากการเก็บไว้ 12 เดือน ความมีชีวิตของละอองเรณูอยู่ที่ 7-77 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำกว่าละอองเรณูสด นอกจากนี้ยังมีการทดลองเก็บละอองเรณูไว้ในหลอดเจลาติน และซองกระดาษเคลือบไข พบว่าความมีชีวิตของละอองเรณูที่เก็บไว้ในหลอดเจลาตินสูงกว่าเรณูที่เก็บไว้ในซองกระดาษเคลือบไข และเมื่อนำไปผสมเกสร พบว่าสามารถติดเมล็ดได้ดีเท่ากับการใช้ละอองเรณูสด (Niimi and Shiokawa, 1992) โดยทั่วไปแล้วละอองเรณูที่เก็บมาจากต้น มักสูญเสียความมีชีวิตได้ง่าย ดังนั้นเมื่อมีการเก็บรักษาละอองเรณูและก่อนนำไปผสมเกสรควรมีการทดสอบความมีชีวิตของละอองเรณู โดยการงอกหลอดเรณูเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับอายุของเรณู ชนิดของดอกไม้ ความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาล และสิ่งแวดล้อมอื่นๆ (อดิศร, 2539) ได้มีการศึกษาวิธีการทดสอบความมีชีวิตของละอองเรณู อาทิเช่นใน *Cyclamen persicum* ทดลองการงอกของละอองเรณูในสารละลายที่มีส่วนผสมของน้ำตาล 5 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอัตราการงอกของละอองเรณูมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ในทุกความเข้มข้น (Takamura *et al.*, 1996) นอกจากนั้นแล้ว ยังสามารถตรวจสอบการงอกของหลอดเรณูในกล้องจุลทรรศน์เพชเม็ยหรือรังไข่ได้ โดยใช้คุณสมบัติการเรืองแสง (fluorescence) เนื่องจากผนังหลอดเรณู (pollen tube wall) ของพืชส่วนใหญ่เป็นสารประกอบจำพวก callose ซึ่งสารนี้เมื่อจับกับ aniline blue แล้วได้รับแสงสีน้ำเงินหรือแสงอัลตราไวโอเล็ต ปรากฏการเรืองแสงให้แสงสีเหลืองหรือสีเขียวออกมา ได้มีผู้นำเอาเทคนิคนี้มาใช้ทดสอบการงอกของหลอดเรณูในพืชหลายชนิด เช่น การทดสอบการงอกของละอองเรณูหลังการถ่ายละอองเรณูของว่านมหาลาภ ว่านแสงอาทิตย์ ว่านสีทศพันธุ์พื้นเมืองสีชมพู ว่านสีทศพันธุ์พื้นเมืองสีแดง ว่านสีทศพันธุ์พื้นเมืองสีส้ม บัวดินสีชมพูดอกใหญ่ บัวดินสีชมพูดอกเล็ก บัวดินสีเหลืองอ่อน และบัวดินสีเหลืองบนยอดเกสรเพศเมียของว่านนางค่อม พบว่าหลอดเรณูของ ว่านแสงอาทิตย์ ว่านสีทศพันธุ์พื้นเมืองสีชมพู ว่านสีทศพันธุ์พื้นเมืองสีแดง

และว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมืองสี่สี่สามารถงอกได้เพียงบริเวณยอดเกสรเท่านั้น (วิชญา, 2544) ในส่วนของอณิโรกาลัมได้มีวัตถุประสงค์ในการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมข้ามชนิด แต่เนื่องจากดอกของอณิโรกาลัมแต่ละชนิดบานไม่พร้อมกัน จึงได้ทำการศึกษาหาวิธีการเก็บละอองเรณูเพื่อนำมาใช้ในการผสมข้ามชนิดของอณิโรกาลัมต่อไป

### 3.2 วัสดุพันธุ์พืชและอุปกรณ์

#### 3.2.1 วัสดุพันธุ์พืช

3.2.1.1 ละอองเรณูของ *Ornithogalum arabicum*

3.2.1.2 ละอองเรณูของ *O. dubium*

3.2.1.3 ละอองเรณูของ *O. thyrsoides*

3.2.1.4 ละอองเรณูของ *O. umbellatum*

3.2.1.5 ดอกที่พร้อมผสมของ *O. arabicum*

3.2.1.6 ดอกที่พร้อมผสมของ *O. dubium*

3.2.1.7 ดอกที่พร้อมผสมของ *O. thyrsoides*

3.2.1.8 ดอกที่พร้อมผสมของ *O. umbellatum*

3.2.2 กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และ photomicroscope

3.2.3 ซิลิกาเจล

3.2.4 หลอดเจลาติน (แคปซูล)

3.2.5 ขวดพลาสติก

3.2.6 ถุงผ้ารีเมย์

3.2.7 ปากคีบ

3.2.8 เข็มเย็บ

3.2.9 สไลด์

3.2.10 กระจกปิดสไลด์

3.2.11 หลอดหยด

3.2.12 จุกยาง

3.2.13 จานแก้ว

3.2.14 แท่งแก้ว

3.2.15 สารเคมี

3.2.15.1 สารเคมีในการเตรียมอาหารเหลวเลี้ยงละอองเรณูตามวิธีการของ Brewbaker and Beyong (1963) คัดแปลงโดย ประภัสสร (2543) (ภาคผนวก ก ข้อ 1)

3.2.15.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับวิธี fluorescence microscope technique ตามวิธีการของ Kho and Baer (1968) คัดแปลงโดย วิชญา (2544) (ภาคผนวก ก ข้อ 2)

3.2.16 สมุดบันทึก

3.2.17 ปากกา

### 3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ต่อการงอกหลอดเรณูของอนิโรกัลัม แต่ละชนิด

3.3.1.1 เก็บวัสดุพันธุ์พืช โดยเก็บละอองเรณูที่แก่เต็มที่ (ภาพ 3.1)

3.3.1.2 นำละอองเรณูที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงละอองเรณู ที่มีปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสคือ 0 2.5 5.0 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ บนสไลด์

3.3.1.3 นำสไลด์ไปวางในจานแก้วที่มีน้ำ เพื่อให้ความชื้นแก่ละอองเรณูในอาหารเหลวที่เลี้ยงละอองเรณู โดยมีแท่งแก้วรองรับสไลด์

3.3.1.4 บันทึกผลการงอกหลอดเรณูบนแผ่นสไลด์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยสุ่มนับจำนวนละอองเรณูที่สามารถงอกหลอดเรณูได้ ต่อละอองเรณูที่เห็นทั้งหมด แผ่นละ 5 ตำแหน่ง

3.3.1.5 นำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การงอกหลอดเรณูเฉลี่ย



ภาพ 3.1 วิธีการเก็บละอองเรณูของอนิโรกัลัมที่แก่เต็มที่เพื่อใช้ในการศึกษา



3.3.2 การเก็บรักษาละอองเรณูที่อุณหภูมิต่างๆ ที่มีผลต่อการงอกของเรณูอณิโรกาลัยแต่ละชนิด

3.3.2.1 เก็บวัสดุพันธุ์พืชโดยเก็บละอองเรณูที่แก่เต็มที่ ใส่ในหลอดเจลาติน แล้วนำไปใส่ขวดพลาสติกที่บรรจุซิลิกาเจล เพื่อดูดความชื้น (ภาพ 3.2)

3.3.2.2 นำขวดเก็บละอองเรณู ไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง และที่ 5 องศาเซลเซียส

3.3.2.3 นำละอองเรณูที่อยู่ในขวดเก็บรักษาในแต่ละอุณหภูมิ มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมกับละอองเรณู ของอณิโรกาลัยแต่ละชนิด เพื่อทดสอบความสามารถในการงอกหลอดเรณูของอณิโรกาลัยแต่ละชนิดทุกๆ 7 วัน จนกระทั่งละอองเรณูไม่สามารถงอกหลอดเรณูได้

3.3.2.4 บันทึกผลการงอกหลอดเรณูบนแผ่นสไลด์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยตุนับจำนวนละอองเรณูที่สามารถงอกหลอดเรณูได้ ต่อ ละอองเรณูที่เห็นทั้งหมด แผ่นละ 5 ตำแหน่ง

3.3.2.5 นำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกหลอดเรณูเฉลี่ย



A

B

ภาพ 3.2 วิธีการเก็บรักษาละอองเรณูอณิโรกาลัย A = หลอดเจลาติน B = ขวดพลาสติกที่บรรจุซิลิกาเจล เพื่อดูดความชื้น

- 3.3.3 การงอกของหลอดเรณูในก้านชูเกสรเพศเมียโดยวิธี fluorescence microscope technique ตามวิธีการของ Kho and Baer (1968) คัดแปลงโดย วิชญา (2544)
- 3.3.3.1 ทำหมันดอกตูมของต้นแม่ โดยดึ่งกลีบดอกและเกสรเพศผู้ออก และคลุมดอกที่ทำหมันแล้วด้วยถุงผ้ารีเมย์ เพื่อป้องกันการปนเปื้อน
- 3.3.3.2 ผสมเกสรในวันที่เกสรเพศเมียที่ถูกทำหมันพร้อมผสม
- 3.3.3.3 ตัดดอกที่ได้รับการผสมแล้วมาเก็บไว้ในจานแก้วที่บรรจุสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ( $K_2Cr_2O_7$ ) อิ่มตัวเพื่อให้อากาศในจานแก้วมีความชื้นสัมพัทธ์เป็น 98 เปอร์เซ็นต์ โดยเก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 3.3.3.4 นำดอกมาต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 นอร์มอล (N) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- 3.3.3.5 เติสารละลาย NaOH ออกให้หมด ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง จากนั้นนำดอกออกจากสารละลาย มาวางไว้บนแผ่นสไลด์เพื่อหยดสารละลาย aniline blue 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในโพแทสเซียมไตรฟอสเฟต ( $K_3PO_4$ ) 0.1 N ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์แล้วกดเบาๆ
- 3.3.3.6 นำสไลด์ที่เตรียมไว้ไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดูการงอกของหลอดเรณูโดยใช้แสง fluorescence ทำการบันทึกภาพ

#### 3.4 สถานที่ที่ใช้ในการทดลองและรวบรวมข้อมูล

- 3.4.1 แปลงทดลอง สถานีวิจัยโครงการหลวงอินทนนท์ มูลนิธิโครงการหลวง อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่
- 3.4.2 ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

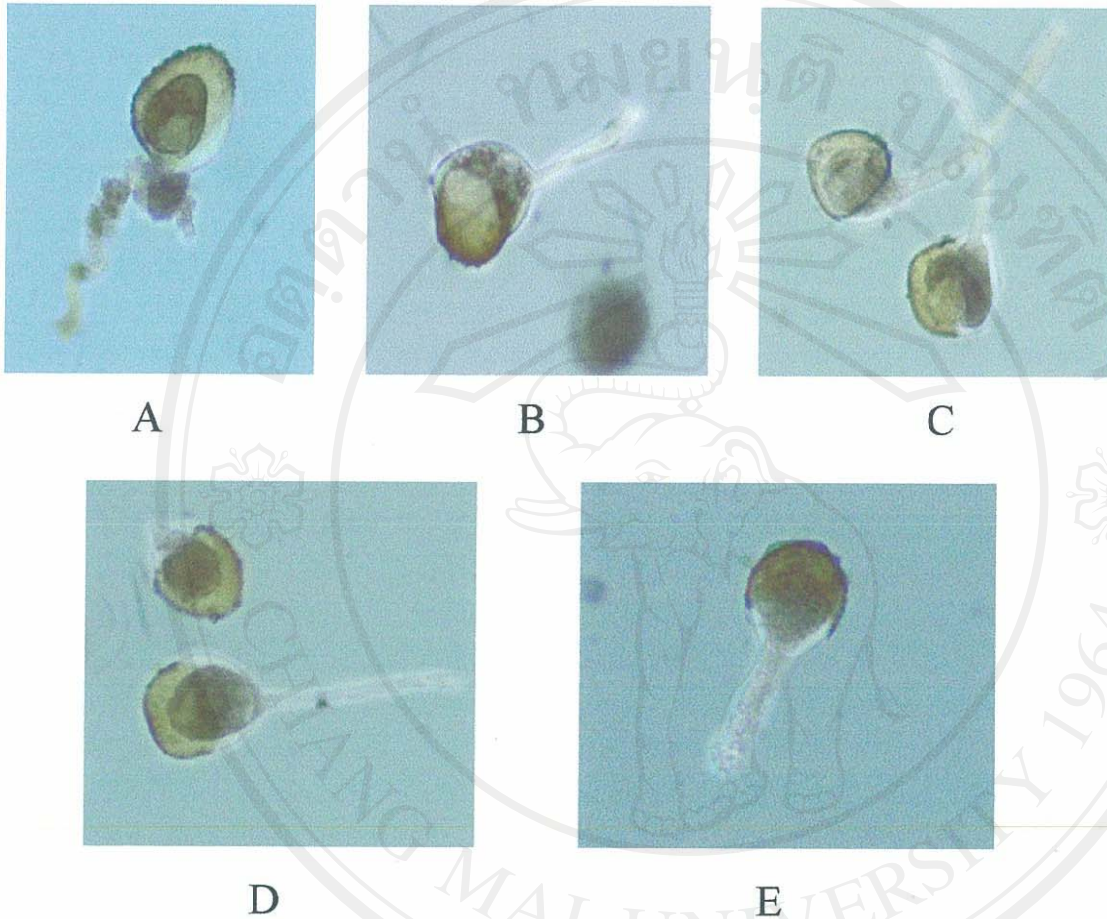
#### 3.5 ผลการทดลอง

##### 3.5.1 ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการงอกหลอดเรณูของอนิโซก้ามแต่ละชนิด

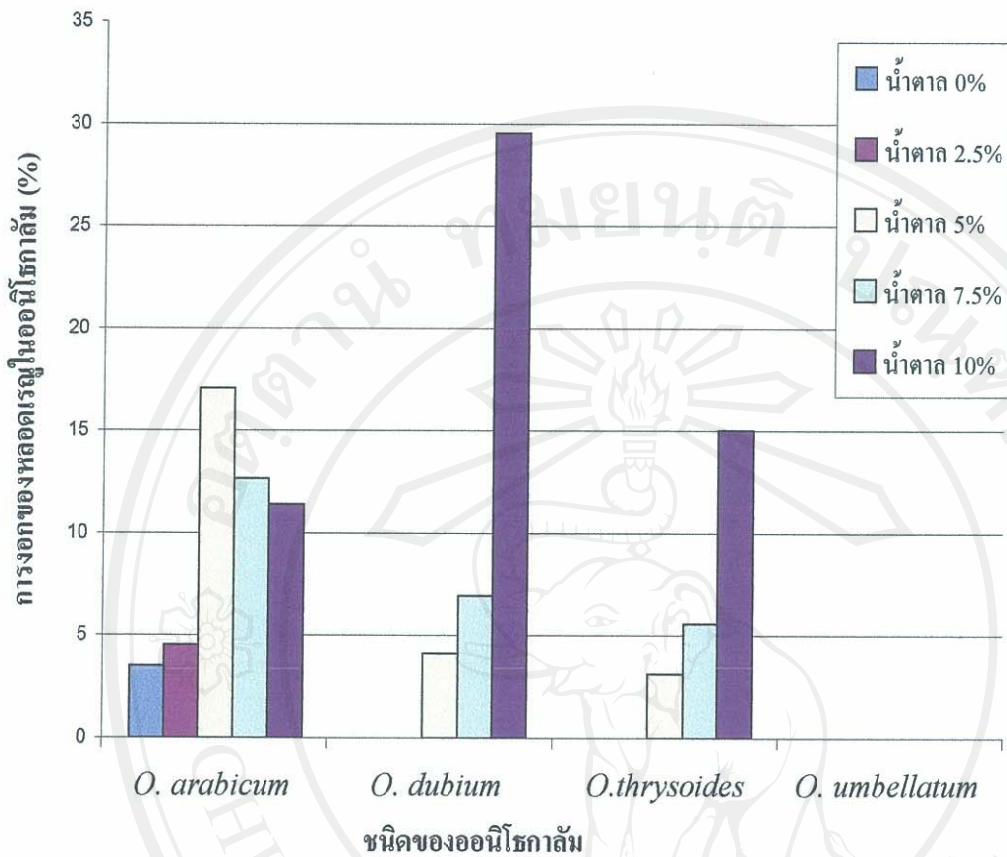
จากการเพาะเลี้ยงละอองเรณูของ *O. arabicum* พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 0 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้ละอองเรณูแตกเป็นจำนวนมาก ส่วนที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 2.5 5 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบการงอกของหลอดเรณูมีจำนวนมากและไม่พบการแตกของละอองเรณู (ภาพ 3.3) โดยเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ ให้เปอร์เซ็นต์การงอกหลอดเรณูสูงสุดที่ 17.07 เปอร์เซ็นต์



รองลงมาที่ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 7.5 10 2.5 และ 0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูเท่ากับ 12.67 11.40 4.55 และ 3.54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพ 3.4)



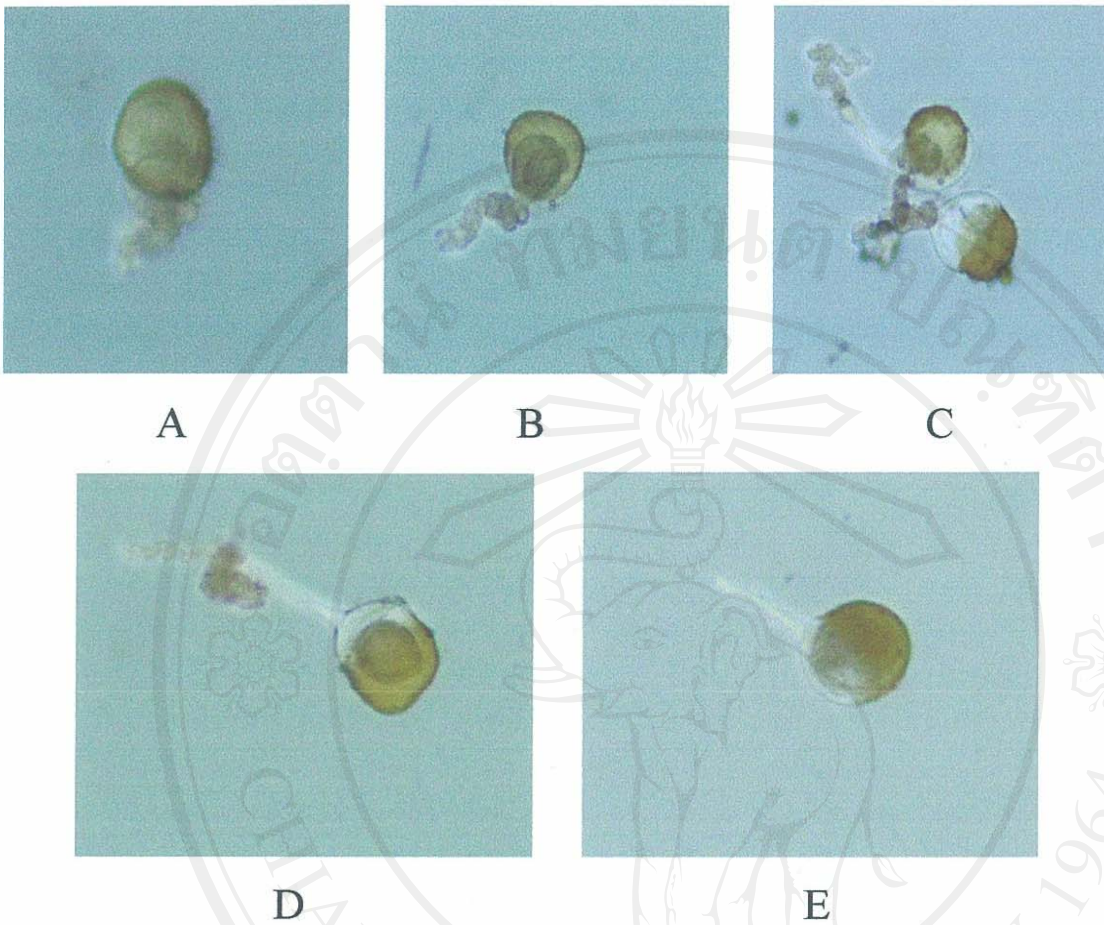
ภาพ 3.3 การงอกของหลอดเรณูใน *O. arabicum* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงละอองเรณู ซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ระดับต่างๆ กัน A = น้ำตาลซูโครส 0 เปอร์เซ็นต์ (55×) B = น้ำตาลซูโครส 2.5 เปอร์เซ็นต์ (61×) C = น้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ (64×) D = น้ำตาลซูโครส 7.5 เปอร์เซ็นต์ (70×) E = น้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ (75×) (วิธีคำนวณกำลังขยายในภาคผนวก ข ข้อ 1)



ภาพ 3.4 เปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูในอณิโรกาลัมทั้ง 4 ชนิด ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงหลอดเรณูที่มีปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ระดับต่างๆ กัน (ตารางภาคผนวก ค 1-4)

จากการเพาะเลี้ยงหลอดเรณูของ *O. dubium* พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้หลอดเรณูแตกเป็นจำนวนมากแต่ไม่พบการงอกของหลอดเรณู ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 5 และ 7.5 เปอร์เซ็นต์ มีการงอกของหลอดเรณูและพบการแตกของหลอดเรณูด้วย ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ การงอกของหลอดเรณูมีจำนวนมากแต่ไม่พบการแตกของหลอดเรณู (ภาพ 3.5) โดยเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูสูงสุดเท่ากับ 29.54 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาที่ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 7.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (6.95 และ 4.14 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) ส่วนปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ 0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถทำให้หลอดเรณูงอกหลอดเรณูได้ (ภาพ 3.4)



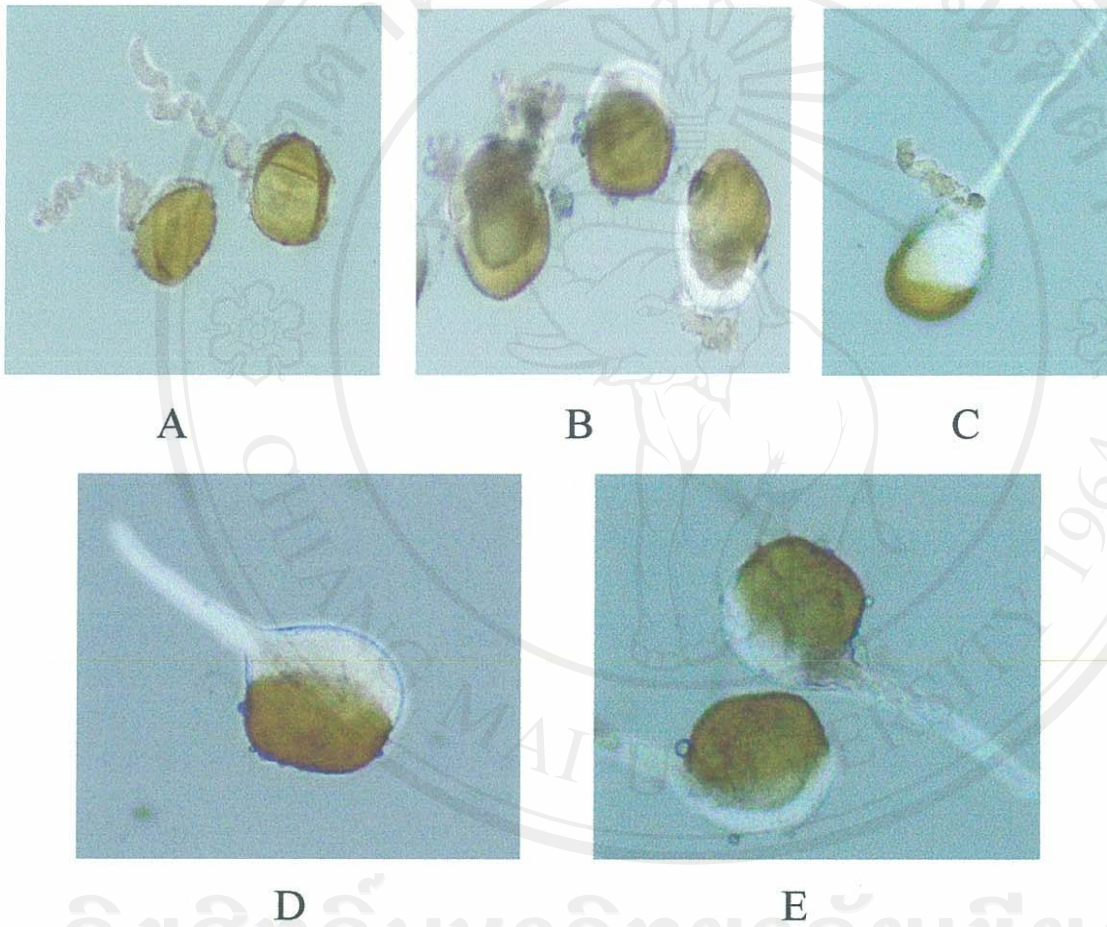


ภาพ 3.5 การงอกของหอดดเรณูใน *O. dubium* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงละอองเรณู ซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ระดับต่างๆ กัน A = น้ำตาลซูโครส 0 เปอร์เซ็นต์ (62×) B = น้ำตาลซูโครส 2.5 เปอร์เซ็นต์ (62×) C = น้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ (61×) D = น้ำตาลซูโครส 7.5 เปอร์เซ็นต์ (82×) E = น้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ (82×) (วิธีคำนวณกำลังขยายในภาคผนวก ข ข้อ 1)

จากการเพาะเลี้ยงละอองเรณูของ *O. thyrsoides* พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 0 2.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้ละอองเรณูแตกเป็นจำนวนมาก ส่วนที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 7.5 เปอร์เซ็นต์ พบการงอกของหอดดเรณูและการแตกของละอองเรณูบางส่วน และที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ การงอกของหอดดเรณูมีจำนวนมากและไม่พบการแตกของละอองเรณู (ภาพ 3.6) โดยเปอร์เซ็นต์การงอกของหอดดเรณูในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของหอดดเรณู



สูงสุดที่ 15.05 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาที่ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 7.5 เปอร์เซ็นต์ ให้เปอร์เซ็นต์การงอกหลอดเรณูเท่ากับ 5.61 เปอร์เซ็นต์ และที่ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ ให้เปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูเท่ากับ 3.13 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถทำให้ละอองเรณูงอกหลอดเรณูได้ (ภาพ 3.4)



ภาพ 3.6 การงอกของหลอดเรณูใน *O. thyrsoidea* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงละอองเรณู ซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ระดับต่างๆ กัน A = น้ำตาลซูโครส 0 เปอร์เซ็นต์ (34×) B = น้ำตาลซูโครส 2.5 เปอร์เซ็นต์ (45×) C = น้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ (37×) D = น้ำตาลซูโครส 7.5 เปอร์เซ็นต์ (66×) E = น้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ (64×) (วิธีคำนวณกำลังขยายในภาคผนวก ข ข้อ 1)

จากการเพาะเลี้ยงละอองเรณูของ *O. umbellatum* พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ไม่มีการงอกของหลอดเรณูและการแตกของละอองเรณู (ภาพ 3.7 ภาพ 3.4)



ภาพ 3.7 การงอกของหลอดเรณูใน *O. umbellatum* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงละอองเรณู ซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ 0 2.5 5 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (96×) (วิธีคำนวณกำลังขยายในภาคผนวก ข ข้อ 1)

### 3.5.2 การเก็บรักษาละอองเรณูที่อุณหภูมิต่างๆ ที่มีผลต่อการงอกของหลอดเรณูอณิโรกาลัมแต่ละชนิด

การศึกษาการเก็บรักษาละอองเรณูที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสของอณิโรกาลัม แต่ละชนิด เมื่อนำมาทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกทุกๆ 7 วัน พบว่าอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษาหลอดเรณูอณิโรกาลัม โดยอณิโรกาลัมแต่ละชนิด มีอายุการเก็บรักษาไม่เท่ากัน กล่าวคือ การเก็บรักษาหลอดเรณูของ *O. arabicum* ไม่มีความแตกต่างในการงอกของหลอดเรณูระหว่างอุณหภูมิที่ทำการเก็บรักษาหลังจากเก็บละอองเรณูไว้ 21 วัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ดีกว่าที่อุณหภูมิห้องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตาราง 3.1) และเมื่อนำหลอดเรณูมาทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูในวันที่ 70 พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 5 องศาเซลเซียส ลดลงจนไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตาราง 3.1 เปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูใน *O. arabicum* ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

จำนวนวันหลังเก็บรักษา (วัน)	เปอร์เซ็นต์การงอกหลอดเรณูของ <i>O. arabicum</i> (%)		
	อุณหภูมิห้อง	อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส	t-test
0	12.73	13.88	ns
7	8.42	9.91	ns
14	5.65	9.05	ns
21	3.01	8.35	ns
28	0.45b	6.65a	*
35	0.55b	16.41a	*
42	0.54b	9.12a	*
49	0.00b	9.88a	*
56	0.00b	1.30a	*
63	0.00b	12.30a	*
70	0.00	1.26	ns
77	0.00	3.98	ns
84 <sup>1/</sup>	0.00	0.00	-

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 โดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบ t-test (ตารางภาคผนวก ก 5-16)

<sup>1/</sup> ไม่นำมาคิดสถิติ

เก็บรักษาละอองเรณูของ *O. dubium* ไม่มีความแตกต่างในการงอกของหลอดเรณูระหว่างอุณหภูมิที่ทำการเก็บรักษาหลังจากเก็บละอองเรณูไว้ 14 วัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ดีกว่าที่อุณหภูมิห้องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตาราง 3.2) และเมื่อนำละอองเรณูมาทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูในวันที่ 77 พบว่าไม่พบการงอกของหลอดเรณูทั้งที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 5 องศาเซลเซียส



ตาราง 3.2 เปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูใน *O. dubium* ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

จำนวนวันหลังเก็บรักษา (วัน)	เปอร์เซ็นต์การงอกหลอดเรณูของ <i>O. dubium</i> (%)		t-test
	อุณหภูมิห้อง	อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส	
0	32.89	24.97	ns
7	10.49	28.90	ns
14	4.73	31.16	ns
21	0.00b	29.16a	*
28	0.14b	40.62a	*
35	0.00b	8.95a	*
42	0.00b	33.13a	*
49	0.00b	14.04a	*
56	0.00b	12.59a	*
63	0.00b	10.03a	*
70	0.00b	18.64a	*
77 <sup>l</sup>	0.00	0.00	-

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 โดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบ t-test (ตารางภาคผนวก ค 17 -27)

<sup>l</sup> ไม่นำมาคิดสถิติ

การเก็บรักษาหลอดเรณูของ *O. thyrsoides* ไม่มีความแตกต่างในการงอกของหลอดเรณูระหว่างอุณหภูมิที่ทำการเก็บรักษาหลังจากเก็บหลอดเรณูไว้ 14 วัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ดีกว่าที่อุณหภูมิห้องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตาราง 3.3) และเมื่อนำหลอดเรณูมาทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูในวันที่ 105 พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 5 องศาเซลเซียส ลดลงจนไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตาราง 3.3 เปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูใน *O. thyrsoides* ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

จำนวนวันหลังเก็บรักษา (วัน)	เปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูของ <i>O. thyrsoides</i> (%)		t-test
	อุณหภูมิห้อง	อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส	
0	17.35	16.95	ns
7	22.39	18.85	ns
14	18.55	14.20	ns
21	7.64b	25.77a	*
28	12.39	11.00	ns
35	19.41	18.90	ns
42	3.33b	13.27a	*
49	0.00b	10.96a	*
56	0.00b	5.33a	*
63	0.00b	12.64a	*
70	0.00b	15.67a	*
77	0.00b	14.63a	*
84	0.00b	14.02a	*
91	0.00b	17.19a	*
98	0.00b	5.03a	*
105	0.00	0.95	ns
112 <sup>1/</sup>	0.00	0.00	-

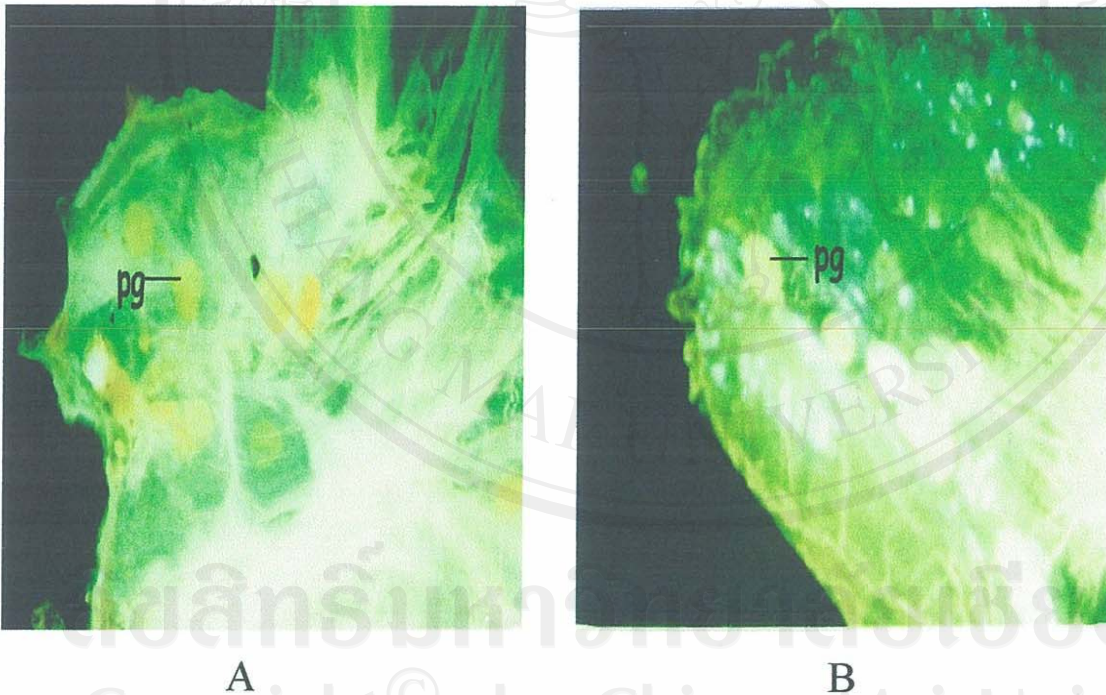
หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 โดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบ t-test (ตารางภาคผนวก ค 28 -43)

<sup>1/</sup> ไม่นำมาคิดสถิติ

เนื่องจากละอองเรณูของ *O. umbellatum* ที่นำไปทดสอบหาปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการงอกของหลอดเรณูในอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงละอองเรณู ไม่พบการงอกของหลอดเรณูในทุกระดับความเข้มข้น ดังนั้นเมื่อนำละอองเรณูไปเก็บรักษาและทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูครั้งแรกจึงไม่พบการงอกหลอดเรณูเช่นกัน

### 3.5.3 การรอกของหลอดเรณูในก้านชูเกสรเพศเมียโดยวิธี fluorescence microscope technique ตามวิธีการของ Kho and Baer (1968) และ วิชาญา (2544)

จากการศึกษาการรอกของหลอดเรณูในก้านชูเกสรเพศเมีย เมื่อทำการผสมข้ามชนิดของ อนิโรกัลัมได้ 6 คู่ผสม เนื่องจาก *O. umbellatum* ไม่สามารถเก็บรักษาละอองเรณูเพื่อใช้เป็นต้น พ่อและดอกเพื่อใช้เป็นต้นแม่ในการผสมได้ จึงไม่ได้นำมาทดสอบในครั้งนี้ ดังนั้น คู่ผสมที่นำมา ทดสอบคือ *O. arabicum* × *O. dubium*, *O. arabicum* × *O. thyrsoides*, *O. dubium* × *O. arabicum*, *O. dubium* × *O. thyrsoides*, *O. thyrsoides* × *O. arabicum* และ *O. thyrsoides* × *O. dubium* พบว่าละอองเรณูมีการเกาะกลุ่มและกระจายอยู่บริเวณปลายยอด เกสรเพศเมีย (ภาพ 3.8) นอกจากนี้ในคู่ผสม *O. arabicum* × *O. dubium* และ *O. thyrsoides* × *O. dubium* มีการรอกของหลอดเรณูของ *O. dubium* เฉพาะบริเวณปลายยอดเกสรเพศเมียเท่านั้น (ภาพ 3.9)



ภาพ 3.8 การเรืองแสงของละอองเรณูบริเวณปลายยอดเกสรเพศเมีย A = ละอองเรณูของ *O. dubium* กระจายอยู่บริเวณปลายยอดของเกสรเพศเมียของ *O. thyrsoides* (80×) B = ละอองเรณูของ *O. arabicum* เกาะกลุ่มอยู่บริเวณปลายยอดของเกสรเพศเมียของ *O. thyrsoides* (87×) pg = pollen grain (วิธีคำนวณกำลังขยายในภาคผนวก ข ข้อ 2)





ภาพ 3.9 การงอกของหลอดเรณูของ *O. dubium* บริเวณปลายยอดเกสรเพศเมีย A = คู่ผสม *O. arabicum* × *O. dubium* (637×) B = คู่ผสม *O. thyrsoides* × *O. dubium* (245×) pg = pollen grain pt = pollen tube (วิธีคำนวณกำลังขยายในภาคผนวก ข ข้อ 2)

### 3.6 วิจัยารณผลการทดลอง

เมื่อนำละอองเรณูของอณิโรกาลัยทั้ง 4 ชนิด มาเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงสำหรับเพาะเลี้ยงละอองเรณู พบว่าละอองเรณูของอณิโรกาลัยแต่ละชนิดสามารถงอกหลอดเรณูที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่างๆ กัน โดยการงอกของหลอดเรณูได้มากที่สุด ใน *O. arabicum* ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ *O. dubium* และ *O. thyrsoides* ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *O. umbellatum* ไม่พบการงอกของหลอดเรณูในทุกๆ ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (0 2.5 5 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) การที่อณิโรกาลัยต่างชนิด มีความต้องการระดับความเข้มข้นของน้ำตาลเพื่อใช้ในการงอกของหลอดเรณูแตกต่างกัน สอดคล้องกับรายงานของ ลาวัลย์ (2539) ว่าการงอกของหลอดเรณูเร็วหรือช้า ขึ้นอยู่กับอายุของละอองเรณู อุณหภูมิ ชนิดของละอองเรณู และความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาล ลักษณะการงอกของหลอดเรณูมีความแตกต่างตามความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส คือ ใน *O. arabicum* ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 0 เปอร์เซ็นต์ มีละอองเรณูแตกจำนวนมาก ในขณะที่ *O. dubium* ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ มีละอองเรณูแตกและไม่พบการงอกของหลอดเรณู และที่ 5 และ 7.5 เปอร์เซ็นต์ มี

การงอกของหลอดเรณูและการแตกของหลอดเรณู ส่วน *O. thyrsoides* ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 0 2.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ มีละอองเรณูแตกเป็นจำนวนมาก และที่ 7.5 เปอร์เซ็นต์ มีการงอกของหลอดเรณูและการแตกของละอองเรณู ซึ่งอาจเกิดจากความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลต่ำเกินกว่าความต้องการของละอองเรณู หรือสูงเกินความต้องการของละอองเรณู ถ้าความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลต่ำเกินไปส่งผลให้ละอองเรณูและหลอดเรณูที่งอกเกิดการแตก หรือถ้าความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลสูงเกินไปทำให้หลอดเรณูไม่สามารถงอกได้ หรือมีการงอกที่ผิดปกติ นอกจากระดับความเข้มข้นของน้ำตาลแล้ว การดูดซับน้ำมีผลเกี่ยวข้องกับการแตกและการงอกหลอดเรณูด้วย คือ ละอองเรณูโดยทั่วไปเมื่อหลุดออกจากอับละอองเรณูแล้วมีลักษณะเหี่ยวและเมื่อตกลงบนยอดเกสรเพศเมีย หรือนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงละอองเรณู ละอองเรณูเริ่มมีการดูดซับน้ำทำให้เกิดการพองตัว ในระยะแรกๆ ของการดูดน้ำ cell membrane ของละอองเรณูยังไม่ได้ทำหน้าที่ใดๆ ดังนั้นส่วนประกอบของเซลล์ รวมทั้งน้ำตาล กรดอะมิโน และเอนไซม์ ถูกขับออกจากเซลล์ ในขณะที่ยวกันสารที่เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่อื่นๆ จากภายนอกเข้าสู่ละอองเรณู พร้อมกันนั้น membrane เริ่มทำหน้าที่ให้น้ำผ่านเข้าภายในเซลล์แต่ยับยั้งสารอื่นๆ ที่ไม่ใช่ น้ำไม่ให้เข้าภายในเซลล์ ต่อมาเกิดแรงตึงผิวภายในละอองเรณูเพิ่มขึ้นและอยู่ในสภาพสมดุล ทำให้ละอองเรณูงอกหลอดเรณูและยึดขนาดของเซลล์ แต่ถ้ามีแรงตึงผิวของละอองเรณู หรือมีการดูดซับน้ำเข้าไปในเซลล์มากเกินไป ส่งผลให้หลอดเรณูแตกทำให้ plasma ไหลออกมา และอาจทำให้หลอดเรณูหยุดการเจริญเติบโต เนื่องจากเกิดการสร้างผนังเซลล์มาซ่อมส่วนที่แตกทำให้บริเวณปลายหลอดเรณูหนาเกินไปจนไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (อดิศร, 2539)

การเก็บรักษาละอองเรณู พบว่าการเก็บรักษาละอองเรณูไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ของ *O. arabicum*, *O. dubium* และ *O. thyrsoides* มีแนวโน้มสามารถเก็บรักษาละอองเรณูได้นานกว่าที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งมีประโยชน์ต่อการผสมเกสรทำให้ยืดอายุการใช้งานของละอองเรณูได้ สอดคล้องกับคำแนะนำของ ลาวัลย์ (2539) ว่าการเก็บรักษาละอองเรณูไว้ได้นานๆ ควรเก็บไว้ในภาชนะปิดที่ไม่มีอากาศ และมีความชื้นสัมพัทธ์ 5-10 เปอร์เซ็นต์ หรือควรมีการควบคุมอุณหภูมิตามความเหมาะสมของละอองเรณูแต่ละชนิด ซึ่งในการศึกษานี้ได้นับอายุการเก็บรักษาละอองเรณูที่มีความสามารถในการงอกมากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าเป็นละอองเรณูที่ใช้ประโยชน์ได้อยู่ ตามที่ สมศรี (2538) ได้กล่าวไว้ว่าการผสมเกสร ละอองเรณูที่นำมาผสมเกสรควรมีความมีชีวิตในระดับที่มากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ผลที่ได้คล้ายกับผลการศึกษารักษาละอองเรณูของว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นบ้านดอกเล็กสีแสด พันธุ์ดอกใหญ่จากต่างประเทศพันธุ์ Apple Blossom, Orange Sovereign พบว่าที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสเก็บรักษาละอองเรณูไว้ได้นาน 45 วัน ส่วนที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เก็บรักษาละอองเรณูไว้ได้นาน 6 วัน

(ประภัสสร, 2543) นอกจากนี้ วัชรภรณ์ (2544) รายงานการเก็บรักษาละอองเรณูของดอกว่านนางคูนที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถเก็บไว้ได้นาน 6 วัน แต่ที่อุณหภูมิห้องไม่สามารถเก็บรักษาละอองเรณูได้ โดยการงอกของหลอดเรณูที่ลดลงในช่วงเวลาที่เก็บรักษานั้น อาจเกิดจากเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการงอกของหลอดเรณูไม่ทำงาน การสะสมของไขมัน (oil) ที่ผนังเซลล์ของละอองเรณู และการเปลี่ยนแปลงขบวนการเมตาบอลิซึมของสารที่เกี่ยวข้องกับการงอกของหลอดเรณู (Stanley and Linskens, 1974)

การงอกของหลอดเรณูในก้านชูเกสรเพศเมียของการผสมข้ามชนิดในอนิโรกาลัม พบว่ากลุ่มผสมของ *O. thyrsoides* × *O. arabicum* และ *O. thyrsoides* × *O. dubium* มีละอองเรณูเกาะอยู่บริเวณปลายยอดเกสรเพศเมีย และกลุ่มผสมของ *O. arabicum* × *O. dubium* และ *O. thyrsoides* × *O. dubium* มีการงอกของหลอดเรณูเฉพาะบริเวณปลายยอดเกสรเพศเมียนั้น แสดงให้เห็นความเข้ากันไม่ได้ของอนิโรกาลัมต่างชนิด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเกิดปฏิกิริยาระหว่างละอองเรณูกับเกสรเพศเมีย โดยปกติเซลล์ของเกสรเพศเมียมีการสร้างสารประกอบโปรตีนขับออกมาอยู่บริเวณปลายยอดเกสรเพศเมีย ส่วนละอองเรณูมีสารประกอบโปรตีนเคลือบอยู่บริเวณผิวด้านนอกของละอองเรณูเช่นกัน เมื่อละอองเรณูตกบนยอดเกสรเพศเมียแล้ว เกิดปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบโปรตีนทั้งสองแหล่ง ซึ่งทำงานอย่างเฉพาะเจาะจงต่อกันและกัน โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นตัวกำหนดว่า ละอองเรณูสามารถงอกแล้วแทงผ่านยอดเกสรเพศเมียลงไปในก้านชูเกสรเพศเมียและผสมกับไข่ได้หรือไม่ (Shivanna and Johri, 1989) ผลที่ได้เป็นไปในทำนองเดียวกันกับการทดสอบการงอกของหลอดเรณูหลังการถ่ายละอองเรณูของการผสมข้ามสกุล พบว่ากลุ่มผสมที่มีการถ่ายละอองเรณูของว่านแสงอาทิตย์ ว่านสีทศพันธุ์พื้นเมืองสีชมพู ว่านสีทศพันธุ์พื้นเมืองสีแดง และว่านสีทศพันธุ์พื้นเมืองสีส้มบนยอดเกสรเพศเมียของว่านนางคูน สามารถงอกหลอดเรณูได้เพียงบริเวณปลายยอดเกสรเพศเมียนั้น (วิชญา, 2544) แสดงให้เห็นถึงความเข้ากันไม่ได้ของไม้ดอกต่างชนิด ในกรณีของ *O. umbellatum* ซึ่งไม่สามารถตรวจสอบการงอกของหลอดเรณูและการงอกของหลอดเรณูเมื่อมีการผสมข้ามชนิดได้ อาจเนื่องมาจากความผิดปกติในระดับโครโมโซมของ *O. umbellatum* ทำให้ขบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ไม่สามารถเกิดได้ โดย Moret (1991) รายงานว่า *O. umbellatum* มีชุดโครโมโซมพื้นฐานประกอบด้วย 2x 3x 4x 5x และ 6x และการขยายพันธุ์แบ่งได้ 2 แบบ คือ การขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ และการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศแบบ apomixis ซึ่งอัตราส่วนการขยายพันธุ์ทั้ง 2 แบบแตกต่างกันไปแล้วแต่ระดับของชุดโครโมโซมพื้นฐาน นอกจากนี้การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศยังส่งผลให้ชุดโครโมโซมพื้นฐานของต้นลูกแตกต่างกันด้วย คือ ถ้าใช้ sister bulb ปลูกทำให้ได้ต้นลูกเป็น 2x ถ้าใช้ offset ปลูกทำให้ได้ต้นลูกเป็น 3x และถ้าใช้ bulblets ปลูกทำให้ได้ต้นลูกมีมากกว่า 3x



การทดสอบการงอกของหลอดเรณูได้ทำที่ห้องปฏิบัติการ คณะเกษตรศาสตร์ จึงพบว่า การงอกของหลอดเรณูเกิดเฉพาะบริเวณยอดเกสรเพศเมียเท่านั้น ในขณะที่การผสมเกสรข้ามชนิดในงานปรับปรุงพันธุ์ (บทที่ 4) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การผสมติด สันนิษฐานว่าเป็นผลมาจากอุณหภูมิ โดยอุณหภูมิที่สถานีวิจัยโครงการหลวงอินทนนท์ค่อนข้างต่ำ อาจเหมาะสมต่อการงอกของหลอดเรณูของอนิโรกาลัมกว่าอุณหภูมิในห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ทำการทดสอบการงอกของหลอดเรณูในก้านชูเกสรเพศเมีย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kho and Bear (1971) ที่ทำการทดลองผสมข้ามชนิดในทิวลิป 4 ชนิด โดยทำการผสมเกสรดอกที่ปลูกในโรงเรือนที่ควบคุมอุณหภูมิ 10 14 และ 17 องศาเซลเซียส พบว่าการผสมเกสรที่อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส ทำให้การผสมติดและเมล็ดมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงสุด โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกของหลอดเรณูแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของพืช

### 3.7 สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบการเลี้ยงหลอดเรณูของอนิโรกาลัม 4 ชนิด หลอดเรณูของ *O. arabicum* สามารถงอกได้ในอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงหลอดเรณูที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสทุกระดับความเข้มข้น โดยที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ มีการงอกหลอดเรณูมากที่สุด ในหลอดเรณูของ *O. dubium* และ *O. thyrsoides* สามารถงอกได้ในอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงหลอดเรณูที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้น 5 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ มีการงอกของหลอดเรณูมากที่สุด และหลอดเรณูของ *O. umbellatum* ไม่สามารถงอกได้ในอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงหลอดเรณูที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสทุกระดับความเข้มข้น

การเก็บรักษาหลอดเรณูของอนิโรกาลัม 4 ชนิด ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ให้ผลดีกว่าการเก็บรักษาหลอดเรณูไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดย *O. arabicum* สามารถเก็บรักษาหลอดเรณูได้ 49 วัน *O. dubium* สามารถเก็บรักษาหลอดเรณูได้ 70 วัน และ *O. thyrsoides* สามารถเก็บรักษาหลอดเรณูได้ 91 วัน แต่ไม่สามารถเก็บรักษาหลอดเรณูของ *O. umbellatum* ได้

การตรวจสอบการงอกของหลอดเรณูในก้านชูเกสรเพศเมียในการผสมข้ามชนิดของอนิโรกาลัม ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ พบการงอกของหลอดเรณูแต่สามารถงอกได้เฉพาะบริเวณปลายยอดเกสรเพศเมียเท่านั้นในคู่ผสมของ *O. arabicum* × *O. dubium* และ *O. thyrsoides* × *O. dubium*