สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

ความเป็นไปได้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชคลุมดินโดยการผสมข้ามชนิดและข้ามสกุล

The possibility of improvement in legume cover crops by interspcific and intergeneric hybridization

ผู้วิจัย 1. นางสาวอรอุมา รุ่งน้อย

2. นายจิระ สุวรรณประเสริฐ

RCH
SB
132
0396ค

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 108267
วัน,เดือน,ปี 18 มิ.ย. 2553

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ประจำปีงบประมาณ 2550

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b. 12158422
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

(Acknowledgements)

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2550 คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และคณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสงขลา อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา ที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการ ความเป็นไปได้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชคลุมดินโดยการผสมข้ามชนิดและข้ามสกุล

The possibility of improvement in legume cover crops by interspcific and intergeneric hybridization

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก เงินรายได้

ประจำปี 2550 **จำนวนเงิน** 40,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2549 ถึง กันยายน 2550

หน่วยงานและผู้ดำเนินการวิจัย 1. นางสาวอรอุมา รุ่งน้อย

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

โทรศัพท์, โทรสาร 0-2326-4306

2. นายจิระ สุวรรณประเสริฐ

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสงขลา

อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110

โทรศัพท์ 0-7439-8201 โทรสาร 0-7439-8200

บทคัดย่อ

การปลูกพืชคลุมดินตระกูลถั่วในสวนยางพาราและปาล์มน้ำมันดินในภาคใต้ของประเทศเพื่อลดการชะล้างพังทลายของดิน รักษาความชื้นในดิน ควบคุมการเจริญเติบโตของวัชพืช และเพิ่มการหมุนเวียนธาตุอาหารอื่น ๆ โดยทั่วไปเกษตรกรนิยมปลูกคาโลโปโกเนียม (*Calopogonium mucunoides*) เพอราเรีย (*Peuraria phaseoloides*) เซนโตรซีมา (*Centrosema pubescens*) และคาโลโปโกเนียม ซีรูเลียม (*Calopogonium caeruleum*) หรือที่นิยมเรียกว่า ถั่วซีรูเลียม รวมกันในอัตราส่วนต่าง ๆ เนื่องจากพืชคลุมเหล่านี้มีคุณสมบัติที่ดีแตกต่างกันจึงต้องปลูกผสมเพื่อลดข้อด้อยของพืชคลุมแต่ละชนิด เพื่อให้มีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นพืชคลุมดิน วิธีการผสมข้ามชนิดหรือข้ามสกุลของพืชเป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมในการรวมลักษณะที่ต้องการเข้ามาไว้ด้วยกันในพืชพันธุ์ใหม่ อย่างไรก็ตาม อุปสรรคสำคัญในการผสมข้ามพืชระหว่างชนิดหรือสกุลคือการผสมไม่ติด หรือผสมติดในอัตราต่ำ ดังนั้นการศึกษาถึงวิธีการและเทคนิคต่าง ๆ เพื่อช่วยให้การผสมข้ามพันธุ์พืชคลุมตระกูลถั่วประสบผลสำเร็จซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชตระกูลถั่วคลุมดินในอนาคต ดำเนินการโดยรวบรวมเมล็ดพันธุ์และต้นพันธุ์พืชคลุมดินตระกูลถั่วทั้ง 4 ชนิดมาปลูกที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสงขลา จังหวัดสงขลา ชักนำให้พืชคลุมออกดอกในช่วงเวลาเดียวกัน ศึกษาความมีชีวิตและการงอกของละอองเกสรโดยนำละอองเกสรจากดอกที่ใกล้บานมาย้อมด้วย 1% triphenyl tetrazolium chloride และ 1% aceto-carmine เพื่อศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสร และเขี่ยละอองเกสรลงเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10 เปอร์เซนต์ กรดบอริค 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลเซียมไนเตรท 250 มิลลิกรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โปแตสเซียมไนเตรท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงวุ้น 2 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 6-14 ชั่วโมง และศึกษาความเป็นไปได้ในการผสมข้ามระหว่างชนิดหรือสกุลของพืชคลุมดินทั้ง 4 ชนิด โดยการผสมตรงและผสมสลับจำนวนทั้งหมด 12 คู่ผสม พบว่าความมีชีวิตหรือความสมบูรณ์ของละอองเกสรของพืชคลุมดินตระกูลถั่ว 4 ชนิด ไม่แตกต่างกันคือ 82-84 เปอร์เซนต์ แต่ไม่สามารถชักนำการงอกของละอองเกสรบนอาหารเพาะเลี้ยงได้ ส่วนการศึกษาความเป็นไปได้ในการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมข้ามชนิดและข้ามสกุลของพืชคลุมดินตระกูลถั่วทั้ง 4 ชนิด พบว่าคู่ผสมส่วนใหญ่ไม่ประสบความสำเร็จในการผสมข้าม ดอกที่ผสมข้ามจะร่วงภายในเวลา 1-2 วัน บางส่วนสามารถผสมติดและพัฒนาเป็นฝักอ่อนได้ แต่ฝักมักร่วงภายในเวลา 3-5 วัน มีเพียงคู่ผสมเพอราเรีย x เซนโตรซีมา และเพอราเรีย x ซีรูเลียม ที่สามารถผสมติดและให้ฝักที่พัฒนาจนสมบูรณ์ได้ เมล็ดมีความงอกตั้งแต่ 0-100 เปอร์เซนต์ ต้นที่งอกมีลักษณะเหมือนต้นแม่เพอราเรียทั้งหมด จึงเป็นไปได้ที่เมล็ดที่ได้อาจมีทั้งที่ได้จากการผสมข้ามจริง (true hybrid) แต่ลูกผสมที่ได้มีลักษณะใกล้เคียงกับต้นแม่จนไม่สามารถจำแนกความแตกต่างได้ หรืออาจเป็นเมล็ดที่ไม่ใช่เมล็ดลูกผสมที่แท้จริง เนื่องจากในการผสมข้ามสามารถเกิดความล้มเหลวได้หลายระดับตั้งแต่การงอกของละอองเกสรจนถึงการผสมข้าม ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงควรต้องมีการศึกษาหาระยะพร้อมผสมของละอองเกสรและเกสรตัวเมีย และศึกษาถึงลักษณะทางกายวิภาคของดอกที่ผสมตัวเองและผสมข้ามเพื่อตรวจสอบความสามารถและระยะเวลาในการงอกของท่อละอองเกสรในการเข้าสู่รังไข่ ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการช่วยชีวิตลูกผสมโดยการโดยการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอหรือเพาะเลี้ยงรังไข่จากฝักอ่อนลูกผสมที่ระยะพัฒนาต่าง ๆ และศึกษาวิธีการตรวจสอบลูกผสมด้วยเครื่องหมาย DNA เพื่อให้สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่และลูกผสมได้

Abstract

In rubber and oil plantation, planting leume cover crops were recommended for soil and water conservation and weed control. Generally, farmers planting these cover crops by mixing the seeds of *Calopogonium mucunoides, Peuraria phaseoloides, Centrosema pubescens* and *Calopogonium caeruleum* in many ratios. This inconvenient cultivation practice caused farmers using herbicide and plowing for weed control. To reduce the unfavorable trait, varietal improvement by interspecific and intergeneric hybridization can be use for overcome these problems. The experiment divided into 2 parts. The first part, study of pollen viability by staining with 1% triphenyl tetrazolium chloride and 1% aceto-carmine and pollen germination by culture pollen on 100 g/l sucrose, 100 mg/l H_3BO_3, 250 mg/l $Ca(NO_3).4H_2O$ 200 mg/l $MgSO_4.7H_2O$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

100 mg/l KNO_3 and 2% agar, culture for 4-16 hours. Second part, study of interspcific and intergeneric hybridization by direct cross and reciprocal cross of these 12 combinations. These study were conducted at Songkhla Agricultural Research and Development Center. The results revealed that the pollen viability of 4 legume cover crop species were 82-84% but could not germinated on culture medium. From 12 combination crosses, most of the young hybrid pods fell off within period of 3-5 days. Only the pod from Peuraria x Centrosema and Peuraria x Caeruleum could develop into mature pods. The phenotype of F_1 plants were similar to mathernal plant. Probably, these plants were true-hybrid, apomixsis or selfing. Thus, the further study should be investigate the receptive time between pollen and egg, the stigma and style morphology of selfing and crossing flowers , embryo rescue and the method for characterize the embryo hybrid.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญเรื่อง

(Table of Contents)

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญเรื่อง	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ช
บทนำ	1
การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
วิธีดำเนินการวิจัย	15
ผลการทดลอง	17
วิจารณ์ผลการทดลอง	21
สรุปผลการทดลอง	24
บรรณานุกรม	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

(List of Table)

ตาราง **หน้า**

ตารางที่ 1 แสดงคู่ผสม จำนวนเมล็ดต่อฝัก จำนวนวันงอกหลังปลูก และเปอร์เซนต์การงอก 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

(List of Illustration)

ภาพ		หน้า
ภาพที่ 1	ลักษณะใบและลำต้นของคาโลโปโกเนียม	4
ภาพที่ 2	ลักษณะดอกของคาโลโปโกเนียม	4
ภาพที่ 3	ลักษณะฝักของคาโลโปโกเนียม	4
ภาพที่ 4	ลักษณะใบและลำต้นของเพอราเรีย	5
ภาพที่ 5	ลักษณะดอกของเพอราเรีย	5
ภาพที่ 6	ลักษณะฝักของเพอราเรีย	6
ภาพที่ 7	ลักษณะใบและลำต้นของเซนโตรซีมา	7
ภาพที่ 8	ลักษณะดอกของเซนโตรซีมา	7
ภาพที่ 9	ลักษณะฝักของเซนโตรซีมา	7
ภาพที่ 10	ลักษณะใบและลำต้นของซีรูเลียม	9
ภาพที่ 11	ลักษณะดอกของซีรูเลียม	9
ภาพที่ 12	ลักษณะฝักของซีรูเลียม	9
ภาพที่ 13	ลักษณะดอกของซีรูเลียมหลังจากฉีดพ่นด้วยสารพาโคลบิวทราโซลประมาณ 5 สัปดาห์	17
ภาพที่ 14	ลักษณะการตัดฝักของซีรูเลียมหลังจากฉีดพ่นด้วยสารพาโคลบิวทราโซลประมาณ 10 สัปดาห์	18
ภาพที่ 15	ลักษณะฝักที่ได้จากคู่ผสมระหว่างเพอราเรีย x เซนโตรซีมา	19
ภาพที่ 16	ต้นอ่อนลูกผสมที่ได้จากคู่ผสมระหว่างเพอราเรีย x เซนโตรซีมาเมื่ออายุ 7-10 วันหลังงอก	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ในการปลูกสร้างสวนยางพารา ปาล์มน้ำมัน ไม้ผลยืนต้น หรือพืชอื่นที่ต้องใช้ระยะปลูกกว้างและต้องใช้ระยะเวลานานกว่าที่ทรงพุ่มครอบคลุมเต็มพื้นที่นั้น พื้นที่ว่างระหว่างต้นหรือระหว่างแถวในระยะแรกจะเป็นแหล่งสะสมวัชพืชซึ่งเกษตรกรต้องมีการกำจัดวัชพืชอย่างน้อยปีละ 2 ครั้ง โดยวิธีปฏิบัติที่ใช้กันเป็นส่วนใหญ่ในปัจจุบันคือการไถพรวนและใช้สารเคมีกำจัดวัชพืช ซึ่งส่งผลกระทบต่อการชะล้างพังทลายของดินและระบบนิเวศน์ของสิ่งมีชีวิตในดิน รวมทั้งเกษตรกรต้องเสียค่าใช้จ่ายคิดเป็นเงินประมาณ 500 – 800 บาทต่อไร่ต่อปี เดิมทีเดียวมีข้อกำหนดให้มีการปลูกพืชคลุมดินในการปลูกสร้างสวนยางพาราหากไม่มีการปลูกพืชไร่อายุสั้นเป็นพืชแซม แต่ปัญหาการจัดหาแหล่งเมล็ดพันธุ์และข้อจำกัดของพืชคลุมบางชนิดมีการเจริญเติบโตคลุมพื้นที่ได้ช้าในช่วงแรก ทำให้เกษตรกรต้องปลูกและดูแลรักษาพืชคลุมดินเช่นเดียวกับพืชปลูกในขณะที่ไม่ได้เห็นผลตอบแทนเป็นรายได้ที่สามารถเห็นได้ชัดเจนเหมือนกรณีการปลูกพืชที่ให้ผลผลิตอื่น ๆ ทำให้เกษตรกรละเลยที่จะปลูกพืชคลุมดินทั้ง ๆ ที่พืชคลุมดินมีประโยชน์อย่างมากทั้งในแง่การควบคุมวัชพืช ลดค่าใช้จ่ายในการกำจัดวัชพืช ป้องกันการชะล้างพังทลายของหน้าดิน และช่วยในการปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดินทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ในการปลูกสร้างสวนยางพารา ทางราชการได้แนะนำให้เกษตรกรปลูกพืชคลุมดินตระกูลถั่ว เนื่องจากพืชคลุมดินตระกูลถั่วให้ประโยชน์หลายด้าน เช่น การตรึงไนโตรเจน การหมุนเวียนธาตุอาหารอื่น ๆ ในดิน ลดการชะล้างพังทลายของดิน รักษาความชื้นในดิน และควบคุมการเจริญเติบโตของวัชพืช พืชคลุมดินตระกูลถั่วที่นิยมใช้กันมากคือ คาโลโปโกเนียม (*Calopogonium mucunoides*) เพอราเรีย (*Peuraria phaseoloides*) เซนโตรซีมา (*Centrosema pubescens*) และ คาโลโปโกเนียม ซีรูเลียม (*Calopogonium caeruleum*) หรือที่นิยมเรียกว่าถั่วซีรูเลียม พืชคลุมเหล่านี้ต่างมีคุณสมบัติที่ดีและด้อยแตกต่างกัน คาโลโปโกเนียมเป็นพืชคลุมที่มีการเจริญเติบโตและปกคลุมดินได้แน่นทึบดีตั้งแต่ในระยะ 2 ถึง 3 เดือนแรกที่ปลูก แต่เป็นพืชที่มีอายุสั้นเพียง 18 เดือนเท่านั้น ชอบขึ้นในที่ฝนตกชุก แต่น้ำไม่ขัง ไม่ชอบร่มเงามาก และไม่ทนแล้ง ถ้ามีสภาพอากาศแห้งแล้งจะโทรมและตาย ในขณะที่เซนโตรซีมามีการเจริญเติบโตในช่วงแรกช้ากว่า แต่มีอายุนานกว่าและทนร่มเงามากกว่าคาโลโปโกเนียม และทนแล้งได้พอสมควร ส่วนเพอราเรียนั้นจะคลุมดินได้ดีเมื่อมีอายุมากกว่า 2 ปีขึ้นไป ไม่ทนร่มเงา แต่ทนต่อสภาพน้ำขังได้ดีกว่าพันธุ์อื่น ๆ และพืชคลุมซีรูเลี่ยมจะมีการเจริญเติบโตช่วงแรกช้าที่สุด แต่สามารถเจริญเติบโตและปกคลุมดินได้หนาแน่นและยาวนานกว่าพืชคลุมชนิดอื่น ๆ คือมีอายุได้นานถึง 10 ปี มีการรบกวนของโรคและแมลงน้อย ทนต่อร่มเงา และทนต่อสภาพแห้งแล้งได้ดีกว่าพืชคลุมชนิดอื่น ๆ (ไววิทย์ และคณะ, 2529; ภัทธาวุธ และคณะ, 2529; Tan *et al*., 1976)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยทั่วไปเกษตรกรจะปลูกคาโลโปโกเนียม เพอราเรีย และเซนโตรซีมาผสมกันทั้งสามชนิดในอัตราส่วนต่าง ๆ เนื่องจากพืชคลุมเหล่านี้มีคุณสมบัติที่ดีแตกต่างกันจึงต้องปลูกผสมเพื่อลดข้อด้อยของพืชคลุมแต่ละชนิด และให้มีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นพืชคลุมดิน ได้แก่ มีการเจริญเติบโตดี คลุมดินได้อย่างหนาแน่น ทนทานต่อโรคและแมลง ให้เมล็ดในปริมาณมาก และสะดวกต่อการขยายพันธุ์ แต่พืชคลุมทั้งสามชนิดที่กล่าวมาก็ยังมีข้อเสียคือ ไม่ทนต่อสภาพแห้งแล้งและสภาพร่มเงา ในภายหลังจึงนิยมปลูกซีรูเลียมเนื่องจากทนแล้งและทนสภาพร่มเงา (สุจินต์ และคณะ, 2526) แต่เมล็ดพันธุ์พืชคลุมซีรูเลียมหายากและมีราคาแพงมาก และมีแนวโน้มความต้องการใช้สูงขึ้นทุกปีทั้งในประเทศและต่างประเทศ (ไววิทย์ และคณะ, 2529) การปลูกพืชคลุมซีรูเลียมในภาคใต้ให้อัตราการติดเมล็ดต่ำหรือไม่ติดเมล็ดเลย (ปัทมา และคณะ, 2524; Yeoh, 1979) นอกจากนี้แล้วยังเป็นพืชวันสั้นที่มีการตอบสนองต่อช่วงแสง และมีการเจริญเติบโตแบบทอดยอด มีความแปรปรวนสูงเนื่องจากเป็นพันธุ์ป่าที่ยังไม่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์แต่อย่างใด (Humphreys, 1979) ดังนั้น เพื่อเอื้อให้เกษตรกรหันมาใช้วิธีการควบคุมวัชพืชที่เป็นมิตรกับสภาพแวดล้อม มีการลดการใช้สารเคมีในภาพรวมของประเทศ จึงควรทำการปรับปรุงพันธุ์พืชคลุมดินที่มีลักษณะเด่นบางประการอยู่แล้วให้มีคุณสมบัติที่ต้องการเพิ่มขึ้น เช่น มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเพื่อคลุมพื้นที่ได้เร็วในระยะแรก และสามารถผลิตเมล็ดพันธุ์ได้ง่ายเพื่อให้การขยายพื้นที่ปลูกเป็นไปอย่างกว้างขวาง หรือสามารถผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อจำหน่ายเป็นรายได้เสริม ซึ่งวิธีการผสมข้ามชนิดหรือข้ามสกุลของพืชเพื่อรวมเอาข้อดีเข้ามาไว้ด้วยกันในพันธุ์ใหม่จึงเป็นแนวทางโดยตรงที่จะสร้างความเปลี่ยนแปลงไปสู่การใช้พืชคลุมดินกันอย่างกว้างขวางซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อภาพรวมในระดับประเทศอย่างมาก อย่างไรก็ตาม อุปสรรคสำคัญในการผสมข้ามพืชระหว่างชนิดหรือสกุล คือการผสมไม่ติด หรือผสมติดในอัตราต่ำ ดังนั้นการศึกษาถึงวิธีการและเทคนิคต่าง ๆ เพื่อช่วยให้การผสมข้ามพันธุ์พืชคลุมตระกูลถั่วประสบผลสำเร็จจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชตระกูลถั่วคลุมดินในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาเทคนิคและวิธีการที่เหมาะสมในการผสมพันธุ์ระหว่างพืชตระกูลถั่วคลุมดินต่างชนิด
2. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและขยายฐานทางพันธุกรรมของพันธุ์พืชคลุมดินตระกูลถั่วสำหรับใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์

ขอบเขตของโครงการวิจัย

เป็นการศึกษาและทดสอบหาวิธีการและช่วงเวลาในการผสมพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการผสมข้ามระหว่างพืชคลุมดินชนิดต่าง ๆ เพื่อใช้ในการสร้างลูกผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พืชคลุมดิน

การปลูกพืชคลุมดินในสวนยางพารา ปาล์มน้ำมัน และไม้ผลมีวัตถุประสงค์เพื่อช่วยควบคุมและ ลดค่าใช้จ่ายในการกำจัดวัชพืช ปกปิดผิวหน้าดินเพื่อรักษาความชื้นภายในดิน ป้องกันการพังทลายของหน้าดิน ใบที่ร่วงหล่นทับถมลงดินช่วยเพิ่มอินทรีย์วัตถุให้แก่ดินทำให้คุณภาพทางกายภาพและเคมีของดินมีความอุดมสมบูรณ์มากขึ้น เพิ่มธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อพืชปลูกได้แก่ ไนโตรเจน โปแตสเซียม ฟอสฟอรัส แคลเซียม และแมกนีเซียม เป็นต้น ปัจจุบันพืชคลุมดินที่ใช้เป็นพืชคลุมดินตระกูลถั่วชนิดเลื้อย เจริญเติบโตเร็ว และเลื้อยอยู่บนผิวดิน ส่วนข้อใกล้ชิดดินจะมีรากงอกออกมายึดเกาะดินไว้ช่วยป้องกันการพังทลายของดิน แต่เนื่องจากลักษณะและการเจริญเติบโตของพืชคลุมดินแต่ละชนิดแตกต่างกัน จึงนิยมปลูกหลายชนิดรวมกัน ซึ่งพืชคลุมดินตระกูลถั่วที่ใช้ปลูกร่วมกันที่สำคัญมี 4 ชนิด ได้แก่ คาโลโปโกเนียม (*Calopogonium mucunoides*) เพอราเรีย (*Pueraria phaseoloides*) เซนโตรซีมา (*Centrosema pubescens*) และซีรูเลียม (*Calopopanium caeruleaum*)

คาโลโปโกเนียม

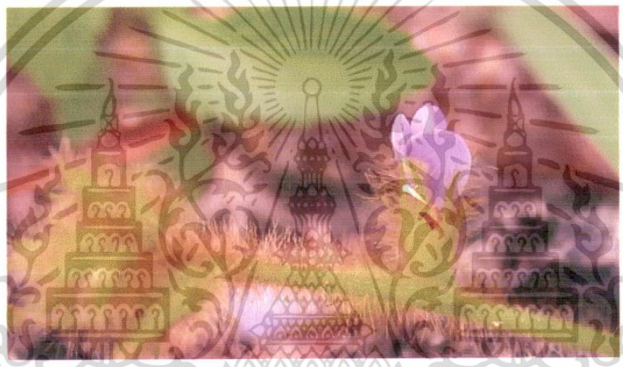
คาโลโปโกเนียมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Calopogonium mucunoides* Desv. ชื่อสามัญคือ Calopo มีจำนวนโครโมโซม 2n = 22 เป็นพืชวันสั้น มีถิ่นกำเนิดในอเมริกากลาง และอินดีส์ตะวันตก นำเข้ามาปลูกในแถบแอฟริกาและเอเชียในต้นศตวรรษที่ 19 ใช้ปลูกเป็นปุ๋ยพืชสดและพืชคลุมดินในภาคกลางและภาคตะวันตกของเกาะชวาประเทศอินโดนีเซียในปี 1922 หลังจากนั้นแพร่กระจายพันธุ์เข้าสู่มาเลเซียอย่างรวดเร็วเพื่อปลูกเป็นพืชคลุมดินในสวนยางพารา ปัจจุบันพบเจริญทั่วไปในเขตร้อนชื้น ('tMannetje and Jones, 1992)

คาโลโปโกเนียม เป็นพืชคลุมชนิดเถาเลื้อยไปตามผิวดิน ลำต้นมีขนสีน้ำตาล ใบใหญ่กว้าง 6-10 เซนติเมตร มีลักษณะเป็นรูปไข่ยาว มีขนสีน้ำตาลค่อนข้างยาว (ภาพที่ 1) ดอกมีขนาดเล็กสีน้ำเงินอ่อนอยู่รวมเป็นกลุ่ม 2-4 ดอก (ภาพที่ 2) ฝักมีขน (ภาพที่ 3) เมล็ดเล็กแบนสีน้ำตาลอ่อน ในช่วง 2-3 เดือนหลังจากปลูกเจริญเติบโตคลุมพื้นที่ได้รวดเร็วมากจนแน่นทึบ คลุมดินได้หนา 30-60 เซนติเมตร ภายในเวลา 5-6 เดือน ออกดอกหลังจากปลูกประมาณ 6-7 เดือนขึ้นไปจนถึงอายุ 18 เดือน ต้นโทรมและตายไปจนหมดหลังจากฝักแก่ (ชุลีพร, มปป) คาโลโปโกเนียมขึ้นได้ดีในดินทุกชนิด ชอบฝนตกชุก แต่ไม่ชอบน้ำขัง ไม่ชอบร่มเงา เมื่อเจริญเติบโตภายใต้ร่มเงาขนาดใบจะลดลงถึง 70 เปอร์เซนต์ ในขณะที่เซนโตรซีมาและซีรูเลียมลดลงเพียง 10-20 เปอร์เซนต์เท่านั้น ('tMannetje and Jones, 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

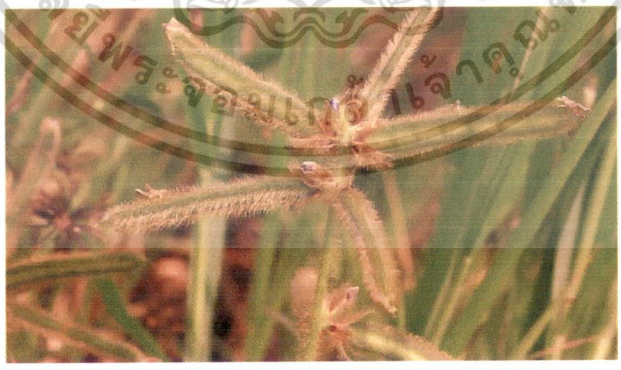
ภาพที่ 1 ลักษณะใบและลำต้นของคาโลโปโกเนียม

ที่มา : http://forrajestropicales202.blogspot.com/2008/04/nombre-cientifico-calopogonium.html



ภาพที่ 2 ลักษณะดอกของคาโลโปโกเนียม

ที่มา: http://www.kinmatsu.idv.tw/plant/Rosidae/Calopogonium.mucunoides.jpg



ภาพที่ 3 ลักษณะฝักของคาโลโปโกเนียม

ที่มา : http://woodman-garden.blogspot.com/2008_11_01_archive.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพอราเรีย

เพอราเรีย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth. ชื่อพ้องคือ *Dilichos phaseoloides* Roxb. *Pueraria javanica* Benth *P. phaseoloides* Roxb. var. *javanica* (Benth.) Baker. ชื่อสามัญคือ Tropical kudzu และ Puero มีจำนวนโครโมโซม 2n = 22 และ 2n = 24 เป็นพืชวันสั้น มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่ซึ่งนิยมปลูกเป็นพืชคลุมดิน หลังจากนั้นได้แพร่กระจายไปยังพื้นที่เขตร้อนอื่น ๆ และปัจจุบันสามารถปรับตัวเข้ากับพื้นที่เขตร้อนชื้นของออสเตรเลียและอเมริกา เพอราเรียเป็นพืชคลุมดินที่มีความสำคัญ เนื่องจากนิยมใช้ปลูกในพื้นที่ปลูกยางและปาล์มน้ำมันที่อาจเป็นปล่อยให้สัตว์เข้าไปแทะเล็ม หรือตัดเพื่อนำไปเลี้ยงสัตว์ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และออสเตรเลีย ('tMannetje and Jones, 1992) เพอราเรียเป็นพืชคลุมดินชนิดเถาเลื้อย มีเถาใหญ่ ชอบเลื้อยพันต้นไม้ มีขนมาก ใบใหญ่และหนา (ภาพที่ 4) ดอกสีม่วง (ภาพที่ 5) ฝักกลม (ภาพที่ 6) เมล็ดเล็กค่อนข้างกลม สีน้ำตาลแก่ เปลือกเมล็ดแข็ง งอกช้า มีการเจริญเติบโตในระยะแรกช้าใน 3-4 เดือนแรก คลุมดินได้เมื่ออายุ 1 ปี และมีอายุนาน 3-4 ปี แต่ถ้ามีร่มเงามากต้นจะโทรมและตายเร็ว

ภาพที่ 4 ลักษณะใบและลำต้นของเพอราเรีย

ที่มา : http://www.oknation.net/blog/nainoykrab/2008/08/15/entry-2

ภาพที่ 5 ลักษณะดอกของเพอราเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 6 ลักษณะฝักของเพอราเรีย

ที่มา : http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/images/Pueraria_phaseoloides Pueraria_phaseoloides_01-.jpg

เซนโตรซีมา

เซนโตรซีมา หรือถั่วลาย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Centrosema pubescens* Benth. ชื่อพ้องคือ *Centrosema molle* Martius ex Benth. ชื่อสามัญคือ Centro และ Butterfly pea มีจำนวนโครโมโซม 2n = 22 เป็นพืชวันสั้น มีถิ่นกำเนิดในอเมริกากลางและอเมริกาใต้ ใช้ปลูกเป็นปุ๋ยพืชสดและพืชคลุมดินในเกาะชวาและประเทศมาเลเซียตั้งแต่ต้นศตวรรษที่ 19 นิยมปลูกเป็นพืชคลุมดินและถั่วอาหารสัตว์ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ หมู่เกาะแปซิฟิก พื้นที่เขตร้อนชื้นของประเทศออสเตรเลีย และพื้นที่เขตร้อนชื้นอื่น ๆ ทั่วโลก (‘tMannetje and Jones, 1992)

เซนโตรซีมาเป็นพืชคลุมดินชนิดเถา เลื้อยไปตามผิวดินชอบเลื้อยพันขึ้นต้นไม้ รากแทงลงในดินได้ลึกและสามารถเจริญแผ่ออกด้านข้างได้มาก ใบสีเขียวอ่อนเป็นมัน มีลักษณะเรียวเล็กกว้าง 2-3 เซนติเมตร ยาว 4-6 เซนติเมตร ปลายใบแหลม (ภาพที่ 7) มีขนที่ใบเล็กน้อย ดอกสีม่วงเข้มหรืออ่อนขึ้นอยู่กับพันธุ์ ออกดอกเป็นช่อ มี 3-5 ดอก ดอกมีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 8) ฝักมีขนาดยาว 7-15 เซนติเมตร (ภาพที่ 9) เมื่อฝักแก่มีสีน้ำตาลแก่ ภายในฝักมีเมล็ด 15-20 เมล็ด เมล็ดเล็กแบน สีน้ำตาลอมเขียว มีลายกระ การเจริญเติบโตในระยะแรกช้า ใช้เวลาอย่างน้อยสองปีจึงจะขึ้นได้แน่น แต่มีอายุอยู่ได้ประมาณ 3-4 ปี ชอบดินค่อนข้างดี ชอบขึ้นในแหล่งฝนตกชุก แต่ไม่ท่วมขังขึ้นได้ดีภายใต้ร่มเงา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 7 ลักษณะใบและลำต้นของเซนโตรซีมา

ที่มา : http://www.moa.gov.jm/img/Centrosema%20pubescens.JPG

ภาพที่ 8 ลักษณะดอกของเซนโตรซีมา

ที่มา : http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Centrosema_pubescens.jpg

ภาพที่ 9 ลักษณะฝักของเซนโตรซีมา

ที่มา : http://woodman-garden.blogspot.com/2008_11_01_archive.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซีรูเลียม

ซีรูเลียมเป็นพืชคลุมตระกูลถั่ว มีชื่อสามัญว่า Caeruleum calop มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Calopogonium caeruleum* (Benth.) Sauvalle มีชื่อพ้องว่า *Calopogonium coeruleum* (Benth.) Sauvalle, *Calopogonium coeruleum* (Benth.) Sauvalle var. *glabrescens* (Benth.) Malme, *Calopogonium sericeum* (Benth.) Chodat & Hassler, *Calopogonium sericeum* (Benth.) Chodat & Hassler var. *villicalyx* Chodat & Hassler และ *Stenolobium caeruleum* Benth. มีจำนวนโครโมโซม 2n = 22 (Espert *et al.*, 2008) เป็นพืชวันสั้น มีถิ่นกำเนิดในอเมริกากลาง แถบประเทศเม็กซิโก อินดีส์ตะวันตก เขตร้อนตะวันออกตอนใต้ของอเมริกา ไปจนถึงตอนใต้ของบราซิล และนำเข้ามาปลูกในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในปี 1940 ปัจจุบันพบซีรูเลียมทั่วไปในเขตร้อนชื้น ('tMannetje and Jones, 1992)

ซีรูเลียมมีลำต้นประเภทเถาเลื้อยอายุข้ามปี มีความยาวหลายเมตร ลำต้นเลื้อยบนดิน มีขนเห็นไม่ชัด รากที่งอกจากเมล็ดจะเป็นรากแก้ว ส่วนของลำต้นบริเวณข้อที่สำผัสกับผิวดิน จะแตกรากฝอยยึดเกาะยึดผิวดิน ที่รากมีปมช่วยตรึงในโตรเจนจากอากาศ ให้ปริมาณไนโตรเจนกลับคืนสู่ดินได้มาก ใบมีลักษณะเป็นใบประกอบ 3 ใบ (trifoliolate) มีสีเขียวเข้มเป็นมันค่อนข้างหนา ก้านใบยาว 16 เซนติเมตร (ภาพที่ 10) ออกดอกเป็นช่อ ดอกมีสีม่วง (ภาพที่ 11) ฝักเรียวยาว มีความกว้าง 0.8 เซนติเมตร ยาว 4-8 เซนติเมตร (ภาพที่ 12) มีเมล็ด 4-8 เมล็ดต่อฝัก เมล็ดมีขนาดใหญ่ เปลือกหุ้มเมล็ดหนา มีสีเขียวอ่อนจนถึงสีน้ำตาล ผิวเรียบเป็นมัน (ส่วนวิจัยและพัฒนา, มมป : วิชิต, 2008) ซีรูเลียมเป็นพืชคลุมที่ทนต่อโรคและแมลง ทนต่อสภาพร่มเงาได้ดี ช่วงแรกจะเจริญเติบโตช้า ขึ้นคลุมพื้นที่ได้หนาแน่นภายใน 4 ปี และมีอายุนานถึง 10 ปี ทนแล้งได้ดีกว่าคาโลโปโกเนียมและเพอราเรีย สามารถเจริญเติบโตในที่อากาศเย็นได้ดีกว่าเซนโตรซีมา ถั่วซีรูเลียมสามารถปรับตัวได้ดีในดินเกือบทุกประเภท และเติบโตได้แม้ในระดับ pH ของดินต่ำถึงระดับ 4.00 สามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินที่มีการระบายน้ำดี พบเจริญเติบโตได้ในพื้นที่ทั่วไปจนถึงระดับความสูง 800 เมตรจากระดับน้ำทะเล ('tMannetje and Jones, 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 10 ลักษณะใบและลำต้นของซีรูเลียม

ที่มา : http://www.oknation.net/blog/home/album_data/183/24183/album/21457/images

ภาพที่ 11 ลักษณะดอกของซีรูเลียม

ภาพที่ 12 ลักษณะฝักของซีรูเลียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาความมีชีวิตและการงอกของละอองเกสร

การศึกษาลักษณะนิสัยของละอองเกสรเป็นสิ่งสำคัญมากสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากการงอกของละอองเกสรดีก็จะสามารถเข้าผสมกับไข่ได้ดี ทำให้ติดเมล็ดหรือผลดี และเมื่อนำเมล็ดนั้นไปปลูกก็จะสามารถงอกและพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์แข็งแรงได้ต่อไป นอกจากนี้การทราบความสามารถในการงอกของละอองเกสรจะเป็นประโยชน์มากต่อการศึกษาพื้นฐานการทำงานของละอองเกสร (pollen function) และการศึกษาประยุกต์ เช่น การเพาะเลี้ยงละอองเกสรและการผสมเกสรในหลอดทดลอง (Zenkteler, 1990) การเก็บรักษาละอองเกสร (Barnabas and Kovacs, 1997) และการผสมข้ามของพืช (Zenkteler, 1990)

วิธีการศึกษาความสมบูรณ์ของละอองเกสรมี 2 วิธี ได้แก่ การย้อมละอองเกสร (pollen staining) เพื่อตรวจสอบความมีชีวิตของละอองเกสร และการงอกของละอองเกสร (pollen germination) เพื่อตรวจสอบความแข็งแรงของละอองเกสร ซึ่งวิธีการที่ง่ายและสะดวกที่สุดคือ การเพาะเลี้ยงละอองเกสรบนอาหารเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (Tyagi, 2002) และเป็นวิธีการที่สะดวกและน่าเชื่อถือที่สุดในการใช้ทดสอบความมีชีวิตของละอองเกสรจากดอกสดหรือละอองเกสรที่เก็บรักษาไว้ใช้ในภายหลัง (Jayaprakash and Sarla, 2001) ซึ่งอาหารที่เพาะเลี้ยงละอองเกสรมีตั้งแต่อาหารง่าย ๆ ที่เติมเพียงน้ำตาลซูโครสกับกรดบอริค (Linskens, 1967) ไปจนถึงอาหารที่มีสูตรซับซ้อน เช่นเติม polyethylene glycol (Zhang and Croes, 1982) หรือเติมกรดอะมิโนต่าง ๆ (Read *et al*., 1993)

Kakani *et al* (2002) ทดลองเพาะเลี้ยงละอองเกสรของถั่วลิสงพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 21 สายพันธุ์ บนอาหารสูตร Niles and Quesenberry (Niles and Quesenberry, 1992) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซนต์ กรดบอริค 100 มิลลิกรัมต่อลิตร calcium nitrate 250 มิลลิกรัมต่อลิตร magnesium sulphate 200 มิลลิกรัมต่อลิตร potassium nitrate 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงวุ้น 2 เปอร์เซนต์ พบว่าละอองเกสรสามารถงอกท่อละอองเกสรได้แตกต่างกันในสายพันธุ์ตั้งแต่ 40-76 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าพันธุกรรมมีบทบาทต่อความสามารถในการงอกของละอองเกสร

ถวิลและสุดารัตน์ (2544) ทดลองเพาะเลี้ยงละอองเกสรยูคาลิปตัสบนอาหารที่มีเฉพาะกรดบอริค 150 ppm หรือน้ำตาลซูโครส 30 เปอร์เซนต์ และอาหารที่มีทั้งกรดกรดบอริค 150 ppm ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 เปอร์เซนต์ พบว่าละอองเกสรมีความงอก 23.25, 64.0 และ 81.5 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลซูโครสมีบทบาทสำคัญมากต่อการงอกของละอองเกสร ทั้งนี้เนื่องจากผนังของละอองเกสรประกอบด้วยเซลลูโลส (cellulose) และเพคติน (pectin) ซึ่งสามารถดูดน้ำตาลเข้าสู่ภายใน จากนั้นเอนไซม์ที่อยู่ที่บริเวณผนังละอองเกสรก็จะทำปฏิกิริยาเกิดขบวนการเมทาบอลิซึมโดยมีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีผลทำให้ละอองเกสรบวมและงอกท่อละอองเกสรได้ (Steffen, 1963) นอกจากนี้กรดบอริคยังความสำคัญต่อการงอกของท่อละอองเกสรด้วยเช่นกันเนื่องจากกรดบอริคมีสารโบรอนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารนี้มีบทบาทต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสร้างเพคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังท่องละอองเกสร (pollen tube membrane) ที่กำลังพัฒนา (Stanley and Loewus, 1963)

Khan *et al* (1999) ทดลองเพาะเลี้ยงละอองเกสรของถั่วแปบ (lablab; *Phaseolus lablab*) ในน้ำกลั่น เปรียบเทียบกับการใช้สารละลายซูโครสเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ และสารละลายฮอร์โมน IBA (Indole butyric acid) เข้มข้น 0.0001 เปอร์เซนต์ พบว่าการใช้ฮอร์โมนทำให้ละอองเกสรงอกภายในเวลา 10 นาที ในขณะที่ละอองเกสรในน้ำตาลใช้เวลาในการงอก 40 นาที ส่วนในน้ำกลั่นใช้เวลานานที่สุดคือ 70 นาที

Jayaprakash and Sarla (2001) รายงานว่าการปรับปรุงสูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงละอองเกสรของถั่วแระ (pigeonpea; *Cajanus cajan* L.) ซึ่งจากเดิมใช้สูตรอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 40 เปอร์เซนต์ กรดบอริค 250 มิลลิกรัมต่อลิตร calcium nitrate 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงวุ้น 0.7 เปอร์เซนต์ สามารถชักนำการงอกละอองเกสรของถั่วแระได้ 43.1 เปอร์เซนต์ (Singh et al., 1992) โดยการดัดแปลงสูตรอาหาร Brewbaker and Kwack (Bk) (Brewbaker and Kwack, 1964) ซึ่งประกอบด้วยซูโครส 37.5 เปอร์เซนต์ กรดบอริค 250 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลเซียมไนเตรท 300 มิลลิกรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โปแตสเซียมไนเตรท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 1 เปอร์เซนต์ และ PEG (4000) 15 เปอร์เซนต์ เพิ่มความงอกของถั่วแระเป็น 53-87 เปอร์เซนต์ ซึ่งให้ผลดีในพืชอื่น เช่น ถั่วชิคพี (chickpea; *Cicer arietinum* L.) ด้วยเช่นกัน (Shivanna et al., 1997)

การผสมข้ามชนิดหรือข้ามสกุล (Interspecific and intergeneric hybridization)

การผสมข้ามเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถรวมลักษณะที่ดีของพืชแต่ละชนิดเข้ามาไว้ด้วยกัน แต่มักจะมีปัญหาในเรื่องของการผสมไม่ติดหรือความสามารถในการพัฒนาฝักของลูกที่ได้จากการผสมข้ามต่ำ ซึ่งเกิดจากสาเหตุสำคัญหลายประการ ได้แก่ ละอองเกสรไม่งอก ไข่ไม่สมบูรณ์ ความเข้ากันไม่ได้เนื่องจากมีพันธุกรรมแตกต่างกันมาก (genetic barriers) ทำให้เอนโดสเปิร์ม (endosperm) ไม่พัฒนาตามปกติ เนื่องจากมีปัญหาในเรื่องความแตกต่างทางพันธุกรรม ทำให้ฝักร่วงหรือไม่สามารถพัฒนาเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์ได้ (Chen et al., 1982; Rashid et al., 1987; Chen and Adachi, 1995)

Bharathi *et al* (2006) รายงานสาเหตุการเกิดอุปสรรคในการถ่ายละอองเกสร (external barrier) ได้แก่ ระยะเวลาการบานของดอก (anthesis) การแตกของอับละอองเกสร (dehiscence of anthers) หรือการพร้อมผสมของเกสรตัวเมีย (receptivity of the stigma) จะต้องพร้อมกันทั้งชนิดที่ใช้เป็นต้นพ่อ (แหล่งละอองเกสร) และชนิดที่ใช้เป็นต้นแม่ (เกสรตัวเมียเพื่อรับการผสมละอองเกสรจากต้นพ่อ) นอกจากนี้แล้ว การที่ละอองเกสรไม่สามารถงอกได้บนปลายยอดเกสรตัวเมีย (stigma) ท่อละอองเกสรเจริญได้ช้ามาก หรือหยุดการเจริญก่อนถึงรังไข่ หรือละอองเกสรงอกท่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละอองเกสรแต่ไม่สามารถแทงผ่านผนังของยอดเกสรตัวเมียและเจริญลงมาในก้านเกสรตัวเมีย (style) จัดว่าเป็นอุปสรรคที่เกิดก่อนการผสมเกสร (Chowdhury and Chowdhury, 1977; Bharathi *et al.*, 2006)

Allard (1960) สรุปอุปสรรคที่เป็นสาเหตุของความล้มเหลวในการผสมข้ามออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ คือ อุปสรรคก่อนการผสม (pre-fertilization barriers) และอุปสรรคหลังการผสม (post-fertilixation barriers) อุปสรรคที่เกิดขึ้นก่อนการผสมจะไม่เกิดเอ็มบริโอจากการผสมข้าม วิธีแก้ไขอุปสรรคชนิดนี้คือ การหาวิธีการส่งเสริมให้ละอองเกสรสามารถงอกบนปลายยอดเกสรตัวเมียและให้ท่อละอองเกสรเจริญลงไปในรังไข่ได้ (Knox *et al.*, 1971) ส่วนอุปสรรคที่เกิดขึ้นหลังการผสมข้ามอาจจะไม่ให้เอ็มบริโอ หรือได้เอ็มบริโอที่สามารถพัฒนาได้ช่วงหนึ่งแล้วแท้งตายไป หรือได้เอ็มบริโอที่มีขนาดเล็ก เมล็ดมีลักษณะเหี่ยวย่น มีความงอกต่ำ เป็นหมัน ไม่สามารถผลิตเมล็ดเพื่อสืบพันธุ์ต่อไปได้ มีส่วนน้อยที่ให้ลูกที่ปกติ อย่างไรก็ตามอุปสรรคที่เกิดขึ้นในการผสมข้ามชนิดของพืชมักเกิดจากอุปสรรคหลังการผสมเกสรมากกว่าอุปสรรคก่อนการผสมเกสร (Manshardt and Wenslaff, 1989) ได้แก่การผสมข้ามของพืชสกุล Cicer, Cajanus (Mallikarjuna, 1998) Vigna (Bharathi *et al.*, 2006) และ Phaseolus (Geerts *et al.*, 1999)

Bharathi *et al* (2006) ได้จัดให้ปรากฏการณ์ที่เกิดการร่วงของดอกถั่วเขียวที่ผสมข้ามระหว่างชนิดระหว่าง 3-30 วันหลังถ่ายละอองเกสรและการมีอัตราการติดเมล็ดต่ำเป็นอุปสรรคที่เกิดขึ้นหลังการผสมเกสร ซึ่งเกิดได้จากหลายสาเหตุ ได้แก่ เอ็นโดสเปิร์มไม่สามารถแบ่งเซลล์หรือแบ่งเซลล์ได้ช้าทำให้เกิดการแท้งของเอ็มบริโอและการหลุดร่วงของฝักในเวลาต่อมา หรือการที่เมล็ดมีลักษณะเหี่ยวย่นก็มีความสัมพันธ์กับการที่เอ็มบริโอไม่สามารถพัฒนาจนถึงระยะสุกแก่ได้ การแท้งของเอ็มบริโอลูกผสม (embryo abortion) ของพืชสกุล Phaseolus เกิดขึ้นภายใน 3-5 วัน ซึ่งเอ็มบริโอกำลังพัฒนาอยู่ในระยะรูปกลม (globular stage) หรือระยะรูปหัวใจในระยะต้น ๆ (early heart-shaped stage) (Baudoin *et al.*, 1992; Lecomte, 1997) นอกจากเนื้อเยื่อเอ็นโดสเปิร์ม (endosperm tissue) แล้วยังมีเนื้อเยื่ออีกชนิดที่เกี่ยวข้องกับการแท้งของเอ็มบริโอคือเนื้อเยื่อนิวเซลลัส (nucellus tissue) (Cooper and Brink, 1940) เนื้อเยื่อนิวเซลลัสจะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในถุงเอ็มบริโอ (embryo sac) ซึ่งจะไปเบียดและจำกัดการพัฒนาของเอ็มบริโอ ทำให้สมดุลระหว่างเอ็มบริโอและเอ็นโดสเปิร์มเสียไป และเกิดการแยกตัวของเซลล์นิวเซลลัส (nucellar cells) จากเนื้อเยื่อของต้นแม่ซึ่งก็คือเปลือกฝัก ทำให้เอ็มบริโอไม่สามารถพัฒนาและตายในที่สุด (Lecomte *et al.*, 1998; Singh, 1998) วิธีการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นคือการแยกเอ็มบริโอที่พัฒนาก่อนถึงระยะดังกล่าวไปเลี้ยงบนอาหารในสภาพหลอดทดลอง (embryo culture) (Geerts *et al.*, 2002) เรียกวิธีการดังกล่าวว่า การช่วยชีวิตลูกผสม (embryo rescue) อย่างไรก็ตาม Mallikarjuna (2003) แนะนำว่าการเพาะเลี้ยงรังไข่ (ovule culture) ให้ผลดีกว่าการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเพียงอย่างเดียว เนื่องจากการเพาะเลี้ยงทั้งรังไข่จะไม่ทำให้เอ็มบริโอเสียหาย หลังจากที่เอ็มบริโอพัฒนาเต็มที่แล้วจึงแยกออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฉพาะเอ็มบริโอออกมาเพาะเลี้ยงต่อไป ซึ่งวิธีการดังกล่าวเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการนำมาศึกษาการช่วยชีวิตลูกผสมพืชตระกูลถั่วต่อไป

Gupta *et al* (2002) ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อความสำเร็จ โดยใช้ gibberellic acid (GA_3) เข้มข้น 70 พีพีเอ็ม (ppm) ทาที่ปลายยอดเกสรตัวเมียหลังจากที่ได้มีการผสมเกสรระหว่าง *Vigna mungo* x *V. radiata* และ *V. angularis* เป็นเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง มีผลทำให้ได้ฝักและเมล็ดที่สมบูรณ์ อย่างไรก็ตามการผสมข้ามจะประสบผลสำเร็จได้เมื่อใช้ *V. angularis* เป็นแหล่งของละอองเกสร (ต้นพ่อ) สอดคล้องกับการทดลองผสมข้ามชนิดระหว่าง *V. umbellate* และ *V. minima* จะให้ผลสำเร็จเมื่อใช้ *V. minima* เป็นต้นแม่ และ *V. umbellata* เป็นต้นพ่อเท่านั้น ถ้าใช้ *V. minima* เป็นแหล่งละอองเกสร จะทำให้การงอกของท่อละอองเกสรไปยังรังไข่ช้าไปประมาณ 4 ชั่วโมง มีผลทำให้ผสมไม่ติด แต่ถ้าใช้ *V. umbellata* เป็นแหล่งละอองเกสรจะทำให้การงอกของท่อละอองเกสรเป็นปกติ และมีประสิทธิภาพในการผสมติดสูง ซึ่งอุปสรรคของการผสมไม่ติดโดยสาเหตุดังกล่าวเรียกว่า prefertilization barriers (Gopinathan *et al*., 1986) และเรียกวิธีการในการเลือกชนิดหรือจีโนไทพ์เพื่อเป็นแหล่งละอองเกสรดังกล่าวว่า pollination technique หรือ new pollination method (Andradf-Aguilar and Jackson, 1988)

Islam (1991) รายงานว่าการใช้ฮอร์โมน GA_3, naphthalene acetic acid (NAA) และ kinetin ฉีดพ่นที่ดอกสามารถป้องกันฝักหลุดร่วงและกระตุ้นให้ฝักที่มีเมล็ดลูกผสมนั้นพัฒนาต่อไปได้

สุดารัตน์ และคณะ (2550) ได้ทดลองฉีดพ่น GA เข้มข้น 10 พีพีเอ็มที่ขั้วฝักและที่ฝักของคู่ผสม *Centrosema pubescens* x *C pascuorum* ทุก ๆ 2 วัน หลังการผสมเกสรมีผลทำให้ฝักลูกผสมสามารถเจริญเติบโตเป็นฝักที่สมบูรณ์ได้

Hare *et al* (1997) รายงานการใช้ออร์โมนไซโตไคนิน เช่น 6-benzylaminopurine (BA) ฉีดพ่นที่ช่อดอกของถั่วเหลืองช่วยป้องกันการร่วงของฝักได้ เนื่องจากฮอร์โมนดังกล่าวช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้กับแหล่งสะสมอาหารและช่วยในการขนส่งอาหารไปยังเนื้อเยื่อที่ได้รับฮอร์โมนได้ดียิ่งขึ้น (Reese *et al*., 1995; Ma *et al*., 1998)

Lee *et al* (1985) รายงานว่า ไซโตไคนินมีบทบาทสำหรับต่อการพัฒนาคัพภะลูกผสม (hybrid embryo) โดยพบว่าฮอร์โมนชนิดนี้มีความสำคัญอย่างมากต่อการผสมติดและการพัฒนาของไข่ (ovule) ไปเป็นคัพภะ จากการผสมข้ามระหว่าง *Phaseolus lunatus* x *P. vulgaris* ได้คัพภะที่มีการแบ่งเซลล์เพียง 4 เซลล์เท่านั้น แต่เมื่อให้ฮอร์โมน cytokinin ไปที่ต้นแม่มีผลทำให้คัพภะนั้นพัฒนาจนถึงระยะ pre-heart stage ได้

Carlson *et al* (1987) และ Liu *et al* (2004) ทดลองใช้ BA เข้มข้น 1 ถึง 2 มิลลิโมลาร์ ฉีดพ่นที่ทรงพุ่มของถั่วเหลืองซึ่งประกอบด้วยใบและช่อดอก มีผลทำให้ติดฝักเพิ่ม 58 ถึง 69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังได้ผลดีในถั่วเขียว (Cliffoed, 1981) และ Phaseolus (Nelsing and Morris, 1979)

ทฤษฎี สมมุติฐานหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ลักษณะการแสดงออกของพืชมีพื้นฐานมาจากการพันธุกรรมของพันธุ์หรือชนิดพืชนั้น การปรับปรุงพันธุ์เป็นการเพิ่มพันธุกรรมที่เป็นที่ต้องการเข้าไป หรือพยายามกำจัดพันธุกรรมที่ไม่ต้องการออก หรือข่มไว้ไม่ให้มีการแสดงออก ซึ่งวิธีการเพิ่มพันธุกรรมที่ต้องการที่ทำกันตามปกติคือการผสมระหว่างพันธุ์ที่มีลักษณะที่ต้องการเข้าด้วยกัน แต่ในกรณีที่ในพืชชนิดเดียวกันไม่มีพันธุกรรมหรือลักษณะที่พึงประสงค์นั้นอยู่ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องผสมข้ามกับพืชต่างชนิดหรือต่างสกุล ซึ่งก็มีข้อจำกัดหลายประการเช่นกัน ในกรณีนี้พืชคลุมดินต่างชนิดมีคุณสมบัติข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกันหลายประการ ดังนั้นหากสามารถรวมความดีเด่นเข้ามาไว้ด้วยกันได้โดยการผสมข้ามชนิดหรือข้ามสกุล ก็จะเกิดประโยชน์เป็นมูลค่ามหาศาลในการใช้พืชคลุมดินเพื่อการควบคุมวัชพืช อนุรักษ์ดินและน้ำ ลดการใช้สารเคมีกำจัดวัชพืช ลดการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงในการไถพรวน และเพิ่มความอุดมสมบูรณ์แก่ดิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสวนยางพาราและสวนปาล์มน้ำมันที่กำลังขยายพื้นที่ปลูกอย่างรวดเร็วในปัจจุบัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้เทคนิคและวิธีการที่เหมาะสมในการชักนำการออกดอกและการผสมข้ามพันธุ์พืชตระกูลถั่วคลุมดิน

2. ได้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับพันธุกรรมและเพิ่มเชื้อพันธุกรรมของพืชคลุมดินตระกูลถั่วในประเทศไทยสำหรับใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การปลูกและการบังคับให้ออกดอก

รวบรวมเมล็ดพันธุ์และต้นพันธุ์พืชตลุมดินตระกูลถั่ว ได้แก่ คาโลโปโปเนียม ซีรูเลียม เซนโตรซีมา และเพอราเรีย จากพื้นที่เกษตรกรที่ปลูกยางพาราและปาล์มน้ำมันในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช สุราษฎ์ธานี กระบี่ ตรัง และสงขลา มาปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 นิ้ว จำนวน 10 กระถางต่อพันธุ์ หลังจากปลูกเป็นเวลา 5 เดือน ฉีดพ่นสารพาโคลบิวทราโซลเข้มข้น 600 พีพีเอ็ม ในเวลาประมาณ 9.00-10.00 นาฬิกา เพื่อบังคับให้ซีรูเลียมออกดอก

2. ความมีชีวิตและความสามารถในการงอกของละอองเกสร

2.1 ความมีชีวิตของละอองเกสร

สุ่มเก็บตัวอย่างดอกที่ระยะการพัฒนาต่าง ๆ จำนวน 5 ดอกต่อพันธุ์และต่อระยะการพัฒนาของดอก (สุ่มเก็บจำนวน 1 ดอก ต่อ 1 ช่อดอก) เปิดกลีบดอกออกแล้วใช้เข็มเขี่ยละอองเกสรลงบนกระจกสไลด์ ย้อมละอองเกสรด้วย 1% triphenyl tetrazolium chloride (Vara Prasad *et al.*, 2001) และ 1% aceto-carmine ศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสรภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนละอองเกสรที่ติดสีแดงเป็นละอองเกสรที่มีชีวิต และละอองเกสรที่มีลักษณะโปร่งใสเป็นละอองเกสรที่เป็นหมัน คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของละอองเกสร

$$\% \text{ ความมีชีวิตของละอองเกสร} = \frac{\text{จำนวนละอองเกสรที่มีชีวิต}}{\text{จำนวนละอองเกสรทั้งหมด}}$$

2.2 ความสามารถในการงอกของละอองเกสร

เขี่ยละอองเกสรลงเลี้ยงในอาหารบนกระจกสไลด์ตามสูตรและวิธีการของ Niles and Quesenberry (1992) ซึ่งอาหารที่เพาะเลี้ยงประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 100 กรัม H_3BO_3 100 มิลลิกรัม $Ca(NO_3).4H_2O$ 250 มิลลิกรัม $MgSO_4.7H_2O$ 200 มิลลิกรัม KNO_3 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ 1 ลิตร หลอมที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เติมผงวุ้น 20 กรัม ดูดวางลงบนกระจกสไลด์ แล้วทิ้งไว้ให้เย็น) วางกระจกสไลด์ที่มีละอองเกสรลงในจานเพาะเลี้ยง ปิดฝา และปิดทับฝาอีกครั้งด้วยกระดาษชุบน้ำเพื่อรักษาความชื้น หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 6-14 ชั่วโมงจึงเริ่มนับจำนวนละอองเกสรที่งอกและไม่งอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยละอองเกสรที่นับว่างอกจะต้องเป็นละอองเกสรที่มีขนาดของความยาวของท่อละอองเกสรมากกว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของละอองเกสร ทำซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสร

$$\% \text{ ความมีชีวิตของละอองเกสร} = \frac{\text{จำนวนละอองเกสรที่งอก}}{\text{จำนวนละอองเกสรทั้งหมด}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การผสมข้ามชนิดและสกุล

ติดป้ายที่ก้านดอกเมื่อเริ่มสังเกตเห็นกลีบดอกและสีของดอกชัดเจน ใช้คีมปลายแหลมเปิดกลีบดอก หรือ ตัดปลายกลีบดอกออก และดึงก้านชูอับละอองเกสรออกทิ้ง ให้เหลือเฉพาะเกสรตัวเมีย หาระยะเวลาที่เหมาะสมในการกำจัดเกสรตัวผู้โดยเริ่มตั้งแต่ระยะที่เริ่มเห็นกลีบและสีของดอกชัดเจนจนถึงระยะใกล้ดอกบาน เพื่อศึกษาหาระยะที่เหมาะสมในการพร้อมรับการผสมของเกสรตัวเมีย ทำการตอนทั้งหมด 5 ดอกต่อช่อดอก และดึงดอกที่ไม่ได้กำจัดละอองเกสรในช่อทิ้งออกให้หมด จากนั้นนำละอองเกสรจากพันธุ์อื่นมาป้ายบนปลายยอดเกสรตัวเมียที่ได้กำจัดละอองเกสรไว้แล้ว บันทึกวันและเวลาที่ผสม ระยะเวลาที่ผสมจะทดสอบเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการพร้อมผสมของถั่วแต่ละพันธุ์

ทำการผสมข้ามระหว่างชนิดหรือสกุลของพืชจำนวนทั้งหมด 12 คู่ผสม ได้แก่ คู่ผสมระหว่างคาโลโปโกเนียม x ซีรูเลียม คาโลโปโกเนียม x เซนโตรซีมา คาโลโปโกเนียม x เพอราเรีย ซีรูเลียม x คาโลโปโกเนียม ซีรูเลียม x เซนโตรซีมา ซีรูเลียม x เพอราเรีย เซนโตรซีมา x เพอราเรีย เซนโตรซีมา x คาโลโปโกเนียม เซนโตรซีมา x ซีรูเลียม เพอราเรีย x คาโลโปโกเนียม เพอราเรีย x ซีรูเลียม และ เพอราเรีย x เซนโตรซีมา

4. การใช้ฮอร์โมนช่วยป้องกันดอกร่วงและช่วยในการติดฝัก

ละลายฮอร์โมนแต่ละชนิดด้วยน้ำกลั่นที่ผสม Tween-20 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อช่วยลดแรงตึงผิวและให้ฮอร์โมนสัมผัสกับเนื้อเยื่อพืชดีขึ้น ฉีดพ่นฮอร์โมนแต่ละชนิดและความเข้มข้นไปที่ช่อดอกที่ผ่านการผสมเกสรแล้ว โดยแบ่งการทดลองออกดังนี้

ฉีดพ่นด้วย BA เข้มข้น 1 และ 2 มิลลิโมลาร์

ฉีดพ่นด้วย GA_3 เข้มข้น 1 และ 2 มิลลิโมลาร์

ฉีดพ่นด้วย IBA เข้มข้น 1 และ 2 มิลลิโมลาร์

ฉีดพ่นด้วย BA และ GA_3 เข้มข้น 1 และ 2 มิลลิโมลาร์

ฉีดพ่นด้วย BA และ IBA เข้มข้น 1 และ 2 มิลลิโมลาร์

ฉีดพ่นด้วย GA_3 และ IBA เข้มข้น 1 และ 2 มิลลิโมลาร์

ฉีดพ่นด้วย BA, GA_3 และ IBA เข้มข้น 1 และ 2 มิลลิโมลาร์

ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นที่ผสม Tween-20 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้เป็นหน่วยการทดลองเปรียบเทียบ (control)

บันทึกจำนวนดอกหลังจากฉีดพ่นฮอร์โมนไปแล้ว 1 วัน บันทึกจำนวนฝักที่ติดทุก ๆ 3 วันหลังจากการผสมเกสรจนกระทั่งไม่มีการร่วงของฝักอีกต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลการทดลอง

การศึกษาความมีชีวิตและการงอกของละอองเกสร

จากการศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสรพืชคลุม 4 ชนิด ได้แก่ คาโลโปโกเนียม เพอราเรีย เซนโตรซีมา และซีรูเลียม โดยการย้อมละอองเกสรด้วย 1% triphenyl tetrazolium chloride และ 1% aceto-carmine พบว่า ละอองเกสรของพืชคลุมทั้ง 4 ชนิดมีชีวิตใกล้เคียงกันคือ 82-84 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาความสามารถในการงอกของละอองเกสรบนอาหารเพาะเลี้ยงซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซนต์ กรดบอริค 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลเซียมไนเตรท 250 มิลลิกรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โปแตสเซียม 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงวุ้น 2 เปอร์เซนต์ โดยเก็บละอองเกสรจากดอกที่มีการพัฒนาเต็มที่และเริ่มบานมาเพาะเลี้ยงในเวลา 6.00, 8.00, 10.00, 16.00 และ 18.00 นาฬิกา เป็นเวลา 6-14 ชั่วโมง พบว่าไม่มีละอองเกสรของพืชคลุมชนิดใดสามารถงอกได้บนอาหารเพาะเลี้ยงดังกล่าว

การชักนำการออกดอกของซีรูเลียม

หลังจากการฉีดพ่นพาสารโคลบิวทราโซลความเข้มข้น 600 ppm ที่ทรงพุ่มของถั่วซีรูเลียมประมาณ 2-3 สัปดาห์ เริ่มมีตาดอกเกิดขึ้น และพัฒนาเป็นช่อดอกภายในเวลา 3-4 สัปดาห์ (ภาพที่ 13) หลังจากนั้นก็จะพัฒนาเป็นฝักซึ่งอยู่รวมกันเป็นกระจุก (ภาพที่ 14)

ภาพที่ 13 ลักษณะดอกของซีรูเลียมหลังจากฉีดพ่นด้วยสารพาโคลบิวทราโซลประมาณ 5 สัปดาห์

108267

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 14 ลักษณะการตัดฝักของซีรูเลียมหลังจากฉีดพ่นด้วยสารพาโคลบิวทราโซลประมาณ 10 สัปดาห์

การผสมข้ามชนิดและสกุล

จากการผสมข้ามชนิดและข้ามสกุลของพืชคลุมดินตระกูลถั่วทั้ง 4 ชนิด ตั้งแต่เดือนมกราคม 2549 จนถึงเดือนมีนาคม 2550 โดยทดสอบการกำจัดเกสรตัวผู้ของดอกที่ต้องการทำการผสมข้ามซึ่งเป็นดอกที่พร้อมจะบานในวันต่อไป ในตอนบ่ายเวลาตั้งแต่ 14.00 ถึง 18.00 นาฬิกา และเริ่มผสมในตอนเย็นเวลา 18.00 นาฬิกา และตอนเช้าของวันต่อไปในเวลา 6.00-8.00 นาฬิกา ทำการฉีดพ่นสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับการไม่ฉีดพ่น พบว่าดอกที่ผสมส่วนใหญ่จะร่วงภายในเวลา 1-3 วัน บางส่วนสามารถพัฒนาเป็นฝักอ่อนได้ประมาณ 1-2 สัปดาห์แล้วหลุดร่วงไป มีเพียง 22 ฝักเท่านั้นที่สามารถพัฒนาจนถึงระยะฝักแก่ได้คือคู่ผสมระหว่างเพอราเรีย x เซนโตรซีมา จำนวน 20 ฝัก และคู่ผสมเพอราเรีย x ซีรูเลียม จำนวน 2 ฝัก แต่ฝักมีลักษณะลีบเล็ก (ภาพที่ 15) โดยมีเพียง 1 ฝักเท่านั้นที่ได้จากดอกที่มีการกำจัดเกสรตัวผู้และผสมในวันเดียวกันคือฝักที่ได้จากการผสมระหว่างเพอราเรีย x เซนโตรซีมา และการฉีดพ่นสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่มีผลต่อการร่วงของดอกที่ผสมข้าม

เมล็ดที่ได้จากฝักที่ทำการผสมข้ามมีทั้งเมล็ดที่มีขนาดปกติ เมล็ดที่มีขนาดเล็กและเหี่ยวย่น มีจำนวนเมล็ดแตกต่างกันตั้งแต่ 6 ถึง 19 เมล็ด เมื่อนำเมล็ดจากฝักลูกผสมจำนวนทั้ง 22 ฝักซึ่งมาปลูกทดสอบความงอกและการเจริญเติบโตพบว่าเมล็ดลูกผสมข้ามส่วนใหญ่งอกช้ากว่าเมล็ดจากต้นปกติ (เมล็ดงอกภายใน 7 วัน) ที่ไม่ได้ผสมข้าม 4-10 วัน (ตารางที่ 1) แต่ลักษณะต้นที่งอกและเจริญเติบโตมีลักษณะและความแข็งแรงไม่แตกต่างจากต้นแม่คือเพอราเรีย (ภาพที่ 16)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 15 ลักษณะฝักที่ได้จากคู่ผสมระหว่างเพอราเรีย x เซนโตรซีมา

ภาพที่ 16 ต้นอ่อนลูกผสมที่ได้จากคู่ผสมระหว่างเพอราเรีย x เซนโตรซีมาเมื่ออายุ 7-10 วันหลังงอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงคู่ผสม จำนวนเมล็ดต่อฝัก จำนวนวันงอกหลังปลูก และเปอร์เซนต์การงอก

คู่ผสม	จำนวนเมล็ดต่อฝัก	วันงอกหลังปลูก	เปอร์เซนต์การงอก
1. เพอราเรีย	17	7	100
2. เซนโตรซีมา	19	7	100
3. ซีรูเลียม	6	7	100
4. เพอราเรีย x เซนโตรซีมา	14	7-14	100
5. เพอราเรีย x เซนโตรซีมา	13	7-14	67
6. เพอราเรีย x เซนโตรซีมา	19	7-14	100
7. เพอราเรีย x เซนโตรซีมา	19	7-16	100
8. เพอราเรีย x เซนโตรซีมา	16	7-14	100
9. เพอราเรีย x เซนโตรซีมา	14	7-14	100
10. เพอราเรีย x เซนโตรซีมา	18	7-14	100
11. เพอราเรีย x เซนโตรซีมา	16	10-14	67
12. เพอราเรีย x เซนโตรซีมา	18	10-16	83
13. เพอราเรีย x เซนโตรซีมา	12	0	0
14. เพอราเรีย x เซนโตรซีมา	16	0	0
15. เพอราเรีย x เซนโตรซีมา	9	0	0
16. เพอราเรีย x เซนโตรซีมา	8	10-16	50
17. เพอราเรีย x เซนโตรซีมา	10	10-16	33
18. เพอราเรีย x เซนโตรซีมา	12	7-16	67
19. เพอราเรีย x เซนโตรซีมา	7	7-16	67
20. เพอราเรีย x เซนโตรซีมา	6	7-14	50
21. เพอราเรีย x เซนโตรซีมา	13	7-16	50
22. เพอราเรีย x เซนโตรซีมา	10	10-14	50
23. เพอราเรีย x เซนโตรซีมา	15	7-16	67
24. เพอราเรีย x ซีรูเลียม	11	10-14	100
25. เพอราเรีย x ซีรูเลียม	11	7-16	67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาความมีชีวิตและการงอกของละอองเกสร

จากการทดลองศึกาความมีชีวิตและความสมบูรณ์พันธุ์ของละอองเกสรโดยการย้อมละอองเกสรของคาโลโปโกเนียม เพอราเรีย เซนโตรซีมา และซีรูเลียมด้วยสีย้อม aceto-carmine หรือ triphenyl tetrazolium chloride เข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ ทั้งสองชนิดให้จำนวนละอองเกสรที่มีชีวิตไม่แตกต่างกันในถั่วคลุมดินทุกชนิดแสดงว่าละอองเกสรส่วนใหญ่ของพืชคลุมทั้ง 4 ชนิดมีความสมบูรณ์พันธุ์และพร้อมจะทำหน้าที่ในการถ่ายทอดพันธุกรรมต่อไป อย่างไรก็ตามเมื่อนำละอองเกสรจากดอกของพืชคลุมทั้ง 4 ชนิดจากดอกที่พัฒนาเต็มที่แต่อับละอองเกสรยังไม่แตกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารในหลอดทดลองตามสูตรของ Niles and Quesenberry (1992) ซึ่งพัฒนาขึ้นเพื่อใช้เพาะเลี้ยงละอองเกสรของถั่วลิสงเถา (*Arachis glabrata*) สูตรอาหารดังกล่าวประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซนต์ กรดบอริค 100 มิลลิกรัมต่อลิตร calcium nitrate 250 มิลลิกรัมต่อลิตร magnesium sulphate 200 มิลลิกรัมต่อลิตร potassium nitrate 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงวุ้น 2 เปอร์เซนต์ วางเลี้ยงเป็นเวลา 6-14 ชั่วโมง พบว่าไม่มีละอองเกสรของพืชคลุมชนิดใดงอกบนอาหารสูตรดังกล่าวเลย ซึ่งอาจเกิดจากหลายปัจจัย ได้แก่ พันธุกรรมของพืช และองค์ประกอบของสูตรอาหารไม่เหมาะสม Jayaprakash and Sarla (2001) รายงานว่าโดยธรรมชาติของละอองเกสรของพืชตระกูลถั่วปกติแล้วจะชักนำให้งอกบนอาหารสังเคราะห์ได้ยากมาก การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิด เช่น IAA และ kinetin ช่วยให้การงอกของ *Dactyloctenium agyptium* เพิ่มสูงขึ้น (Koteswari and Mary, 1983) หรือการเติม GA ร่วมกับ IAA ลงในอาหารพื้นฐานที่มีเพียงน้ำตาลซูโครสและกรดบอริคช่วยให้ละอองเกสรของ *Vicia faba* งอกและมีการเจริญของท่อละอองเกสรได้ดีขึ้น (Gupta and Murty, 1985)

การผสมข้ามชนิดและสกุล

จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการผสมข้ามชนิดและสกุลของพืชคลุมดินทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ คาโลโปโกเนียม x ซีรูเลียม คาโลโปโกเนียม x เซนโตรซีมา คาโลโปโกเนียม x เพอราเรีย ซีรูเลียม x เซนโตรซีมา ซีรูเลียม x เพอราเรีย และเซนโตรซีมา x เพอราเรีย และคู่ผสมสลับระหว่างคู่ผสมดังกล่าวจำนวนทั้งหมด 12 คู่ผสม พบว่าคู่ผสมส่วนใหญ่ไม่ประสบความสำเร็จในการผสมข้าม ดอกที่ผสมข้ามจะร่วงภายในเวลา 1-2 วัน มีเพียงบางส่วนเท่านั้นที่ติดฝักอ่อน โดยเฉพาะคู่ผสมระหว่าง เซนโตรซีมา x เพอราเรีย และ เซนโตรซีมา x ซีรูเลียม ที่สามารถผสมติดและพัฒนาเป็นฝักอ่อนได้ แต่ฝักมักร่วงภายในเวลา 3-5 วัน แสดงให้เห็นว่ามีอุปสรรคเกิดขึ้นระหว่างการผสมข้ามซึ่งอาจมีทั้งอุปสรรคในการถ่ายละอองเกสร อุปสรรคที่เกิดขึ้นก่อนการผสมและอุปสรรคที่เกิดขึ้นหลังการผสม เนื่องจากในการทดลองผสมข้ามครั้งนี้เกิดความล้มเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลายระดับ ตั้งแต่ เมื่อผสมแล้วดอกร่วง แสดงให้เห็นว่าอาจมีอุปสรรคเกิดขึ้นในการถ่ายละอองเกสร เนื่องจากดอกที่ผสมตัวเองสามารถพัฒนาให้ฝักและเมล็ดเป็นปกติแต่ดอกที่ผสมข้ามส่วนใหญ่จะร่วงภายในเวลา 1-2 วัน และจากการสังเกตเบื้องต้นในการทดลองครั้งนี้พบว่าช่วงระยะเวลา 16.00-19.00 นาฬิกา มีการแตกของอับละอองเกสรของพืชคลุมดินทั้ง 4 ชนิด และช่วงเวลา 7.00-10.00 นาฬิกาของเช้าวันต่อมาดอกของพืชทั้ง 4 ชนิดก็บานในเวลาใกล้เคียง แสดงให้เห็นว่า ในช่วงระยะเวลาตั้งแต่ 16.00 ถึง 10.00 นาฬิกาของเช้าวันต่อมา เป็นช่วงที่พืชมีความพร้อมในการผสม จึงอาจเป็นไปได้ว่าความล้มเหลวในการผสมข้ามดังกล่าวไม่ได้เป็นสาเหตุอันเนื่องมาจากการการบานของดอกและการแตกของอับละอองเกสรหรือความสมบูรณ์พันธุ์ของละอองเกสร เนื่องจากพืชเหล่านี้สามารถให้เมล็ดจากการผสมตัวเอง และจากการศึกษาการย้อมละอองเกสรดูความมีชีวิตและความสมบูรณ์พันธุ์พบว่ามีมากกว่า 80 เปอร์เซนต์ แต่อาจเกิดจากระยะพร้อมผสมของละอองเกสรและเกสรตัวเมีย นอกจากนี้แล้วอุปสรรคที่เกิดก่อนการผสมเกสรก็อาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การผสมข้ามส่วนใหญ่ไม่ประสบผลสำเร็จ ซึ่งอาจเกิดจากการที่ละอองเกสรไม่สามารถงอกได้บนปลายยอดเกสรตัวเมีย ท่อละอองเกสรเจริญได้ช้ามากหรือหยุดการเจริญก่อนถึงรังไข่ (Bharathi *et al.*, 2006) หรือละอองเกสรงอกท่อละอองเกสรแต่ไม่สามารถแทงผ่านผนังของยอดเกสรตัวเมียและเจริญลงมาในก้านเกสรตัวเมียได้ (Chowdhury and Chowdhury, 1977) แต่จากการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าความล้มเหลวในการผสมข้ามเนื่องจากอุปสรรคที่เกิดขึ้นก่อนการถ่ายละอองเกสรเกิดจากสาเหตุใด เนื่องจากไม่มีข้อมูลการศึกษาพันธุกรรมในพืชนี้มาก่อน และจากการศึกษาการเพาะเลี้ยงละอองเกสรของพืชคลุมตระกูลถั่วทั้ง 4 ชนิดในเบื้องต้นก็ไม่สามารถชักนำการงอกของละอองเกสรบนอาหารเพาะเลี้ยงได้ทำให้ไม่สามารถทราบได้ว่าละอองเกสรมีอุปนิสัยในการงอกอย่างไรและใช้เวลาในการงอกและการเจริญของท่อละอองเกสรนานเท่าใด อย่างไรก็ตามอุปสรรคที่เกิดขึ้นในการผสมข้ามชนิดของพืชคลุมดินทั้ง 4 ชนิด อาจเกิดจากอุปสรรคหลังการผสมเกสร เนื่องจากมีการพัฒนาของฝักมาได้ระยะหนึ่งแล้วหลุดร่วง ซึ่งอาจเกิดจากเอ็นโดสเปิร์มไม่สามารถแบ่งเซลล์หรือแบ่งเซลล์ได้ช้าทำให้เกิดการแท้งของเอ็มบริโอและการหลุดร่วงของฝักในเวลาต่อมา (Bharathi *et al.*, 2006) นอกจากนี้ ยังอาจเกิดจากเนื้อเยื่อนิวเซลลัส ซึ่งจะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในถุงเอ็มบริโอ และไปเบียดและจำกัดการพัฒนาของเอ็มบริโอ ทำให้สมดุลระหว่างเอ็มบริโอและเอ็นโดสเปิร์มเสียไป และเกิดการแยกตัวของเซลล์นิวเซลลัสจากเนื้อเยื่อของต้นแม่ (เปลือกฝัก) อาจมีผลทำให้เอ็มบริโอไม่สามารถพัฒนาและตายในที่สุด (Lecomte *et al.*, 1998; Singh, 1998)

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อป้องกันดอกร่วงและช่วยในการติดฝักโดยการฉีดพ่นด้วย BA, GA, IBA, BA ร่วมกับ GA, BA ร่วมกับ IBA, GA ร่วมกับ IBA และ BA ร่วมกับ GA และ IBA ที่ระดับความเข้มข้น 1-2 มิลลิโมลาร์ในบริเวณก้านดอกและขั้วฝักหลังการผสมเกสร พบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตทุกชนิดและทุกระดับความเข้มข้นที่ศึกษาไม่มีผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อการลดการร่วงของดอกและช่วยในการติดฝักของพืชตลุมดินทั้ง 4 ชนิดจากการศึกษาในครั้งนี้ ให้ผลแตกต่างจากการทดลองของสุดารัตน์ และคณะ (2550) ซึ่งได้ทดลองฉีดพ่น GA เข้มข้น 10 พีพีเอ็มที่ขั้วฝักและที่ฝักของคู่ผสม *Centrosema pubescens* x *C pascuorum* ทุก ๆ 2 วัน หลังการผสมเกสรมีผลทำให้ฝักลูกผสมสามารถเจริญเติบโตเป็นฝักที่สมบูรณ์ได้ และการทดลองของ Carlson *et al* (1987) ซึ่งรายงานว่า การฉีดพ่น BA เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์บนช่อดอกของถั่วเหลืองเพียง 1 ครั้ง สามารถเพิ่มการติดฝักได้ 58 เปอร์เซนต์

การศึกษาความเป็นไปได้ในการผสมข้ามพืชตลุมดินตระกูลถั่วครั้งนี้สามารถให้ฝักที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างเพอราเรีย x เซนโตรซีมา จำนวน 20 ฝัก และจากคู่ผสมเพอราเรีย x ซีรูเลียม จำนวน 2 ฝัก ฝักทั้งหมดมีลักษณะเหมือนเพอราเรีย โดยพบว่าคู่ผสมระหว่างเพอราเรีย x เซนโตรซีมาให้จำนวนเมล็ดต่อฝักตั้งแต่ 6-19 เมล็ด คู่ผสมเพอราเรีย x ซีรูเลียม ซึ่งให้จำนวนเมล็ดเมล็ดต่อฝัก 11 เมล็ด เมล็ดมีความงอกตั้งแต่ 33-100 เปอร์เซนต์ โดยมีเมล็ดจาก 3 ฝัก ของคู่ผสมเพอราเรีย x เซนโตรซีมาที่ไม่สามารถงอกได้เลย และต้นที่งอกมีลักษณะเหมือนต้นแม่เพอราเรียทั้งหมด แสดงว่าฝักที่ได้จากการทดลองผสมข้ามครั้งนี้อาจมีทั้งฝักที่ได้จากการผสมข้ามจริงคือฝักที่เมล็ดไม่งอกทั้ง 3 ฝัก ซึ่งเป็นฝักที่มีลักษณะเหี่ยวย่นและติดเมล็ดน้อย เมล็ดมีขนาดเล็กกว่าปกติและไม่สมบูรณ์ หรือเมล็ดจากฝักที่สามารถงอกได้แต่งอกได้ช้ากว่าปกติคือใช้เวลาในการงอกนานถึง 16 วัน มีการเจริญเติบโตช้าและตายในที่สุด ส่วนฝักที่ให้เมล็ดจำนวนมากคือ 12-19 เมล็ดต่อฝัก และเมล็ดมีความสมบูรณ์สามารถเจริญเติบโตแข็งแรงไม่แตกต่างจากต้นแม่เพอราเรีย ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่เมล็ดเหล่านี้อาจไม่ใช่เมล็ดลูกผสมที่แท้จริง เนื่องจากการสังเกตลักษณะลูกผสมข้ามตระกูลถั่วบางครั้งสังเกตได้ยากและค่อนข้างสับสน โดยเฉพาะแต่ถ้าลูกผสมที่ได้มีลักษณะละอองเกสรสมบูรณ์พันธุ์ ให้เมล็ดเหมือนแม่ ขาดลักษณะของต้นพ่อ มีความสามารถหรือมีความแข็งแรงในการงอกและการเจริญเติบโตเหมือนแม่นั้น เป็นไปได้ว่าเมล็ดที่ได้อาจเกิดจากการกำจัดละอองเกสรที่ไม่สมบูรณ์หรือล้มเหลว หรืออาจเป็นเมล็ดที่เกิดจากอะโพมิกซีส (aopmixis) ก็ได้ (Muhammad, 1979; Smartt, 1979) เนื่องจากลูกผสมข้ามชนิดหรือข้ามสกุลมักมีปัญหาในเรื่องของพันธุกรรมที่เข้ากันไม่ได้หรือเข้ากันมาสมบูรณ์ ดังนั้นลูกผสมมักจะไม่สามารถพัฒนาจนเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์ได้ หรือเมื่อพัฒนาเป็นเมล็ดได้ก็มักจะไม่งอก หรือมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ ความสมบูรณ์พันธุ์ลดลงไม่ให้ผลผลิตหรือให้ผลผลิตต่ำ (Smartt, 1979) สุดารัตน์ และคณะ (2550) ได้ศึกษากลไกการในการผสมข้ามชนิดและการแก้ไขอุปสรรคในการผสมข้ามชนิดของถั่วอาหารสัตว์ระหว่าง *C. pascuorum C. pubescens* และ *C. macrocarpum* พบว่าลูกผสมที่ได้มีลักษณะใกล้เคียงกับต้นแม่จนไม่สามารถจำแนกความแตกต่างได้ การใช้วิธีการตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย DNA โดยเทคนิค PCR สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่และลูกผสมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาความมีชีวิตหรือความสมบูรณ์ของละอองเกสรของพืชคลุมดินตระกูลถั่ว 4 ชนิด ได้แก่ คาโลโปโกเนียม เพอราเรีย เซนโตรซีมา และซีรูเลียม โดยการย้อมละอองเกสรด้วย aceto-carmine หรือ triphenyl tetrazolium chloride เข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ ให้จำนวนละอองเกสรที่มีชีวิตไม่แตกต่างกันคือ 82-84 เปอร์เซนต์ ส่วนการศึกษาการงอกของละอองเกสรโดยเพาะเลี้ยงละอองเกสรบนอาหารสูตร Niles and Quesenberry (1992) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซนต์ กรดบอริค 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลเซียมไนเตรท 250 มิลลิกรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โปแตสเซียมไนเตรท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงวุ้น 2 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 6-14 ชั่วโมง ไม่สามารถชักนำการงอกของละอองเกสรได้ ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัย ทั้งทางด้านพันธุกรรมของและองค์ประกอบของสูตรจึงควรต้องมีการทดสอบการเพาะเลี้ยงละอองเกสรของพืชคลุมดินทั้ง 4 ชนิดจากพืชจำนวนหลายต้นและจากแหล่งที่มาแตกต่างกัน เนื่องจากพืชคลุมดินทั้ง 4 ชนิดมีลักษณะทางพันธุกรรมที่เป็นพันธุ์ป่าสูง และจะต้องพัฒนาสูตรอาหารให้เหมาะสมต่อการงอกของละอองเกสร โดยพิจารณาองค์ประกอบของสูตรอาหารเช่น การเพิ่มระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส เพิ่มปริมาณกรดบอริค เติมสาร PEG กรดอะมิโนบางชนิด เช่น EACA หรือฮอร์โมนต่าง ๆ

การศึกษาความเป็นไปได้ในการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมข้ามชนิดและข้ามสกุลของพืชคลุมดินตระกูลถั่วทั้ง 4 ชนิดทั้งคู่ผสมตรงและคู่ผสมสลับจำนวนทั้งหมด 12 คู่ผสม พบว่าคู่ผสมส่วนใหญ่ไม่ประสบความสำเร็จในการผสมข้าม ดอกที่ผสมข้ามจะร่วงภายในเวลา 1-2 วัน มีเพียงบางส่วนเท่านั้นที่ติดฝักอ่อน โดยเฉพาะคู่ผสมระหว่าง เซนโตรซีมา x เพอราเรีย และ เซนโตรซีมา x ซีรูเลียม ที่สามารถผสมติดและพัฒนาเป็นฝักอ่อนได้ แต่ฝักมักร่วงภายในเวลา 3-5 วัน คู่ผสมที่สามารถผสมติดและให้ฝักที่พัฒนาจนสมบูรณ์ได้มีเพียงคู่ผสมเพอราเรีย x เซนโตรซีมา และเพอราเรีย x ซีรูเลียม โดยคู่ผสมเพอราเรีย x เซนโตรซีมา ให้จำนวนฝักลูกผสมทั้งหมด 20 ฝัก และได้จากคู่ผสมเพอราเรีย x ซีรูเลียม จำนวน 2 ฝัก ฝักทั้งหมดมีลักษณะเหมือนเพอราเรีย ให้จำนวนเมล็ดต่อฝักตั้งแต่ 6-19 เมล็ด เมล็ดมีความงอกตั้งแต่ 0-100 เปอร์เซนต์ เนื่องจากในการทดลองผสมข้ามครั้งนี้เกิดความล้มเหลวหลายระดับ ตั้งแต่เมื่อผสมแล้วดอกร่วงภานใน 2-3 วัน มีการพัฒนาเป็นฝักอ่อนได้ระยะหนึ่งแล้วฝักหลุดร่วง หรือพัฒนาเป็นเมล็ดสมบูรณ์แต่ไม่งอก แสดงให้เห็นว่าอาจมีอุปสรรคเกิดขึ้นได้หลายระดับ ได้แก่ 1) ระดับการถ่ายละอองเกสร ซึ่งเกิดขึ้นได้หลายสาเหตุ ได้แก่ ระยะเวลาการบานของดอก การแตกของอับละอองเกสร หรือการพร้อมผสมของเกสร นอกจากนี้แล้วยังอาจเกิดจากการที่ละอองเกสรไม่สามารถงอกได้บนปลายยอดเกสรตัวเมีย ละอองเกสรงอกท่อละอองเกสรแต่ไม่สามารถแทงผ่านผนังของยอดเกสรตัวเมียและเจริญลงมาในก้านเกสรตัวเมียได้ ท่อละอองเกสรเจริญได้ช้ามาก หรือหยุดการเจริญก่อนถึงรังไข่ ดังนั้น ในการศึกษาต่อไปจึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควรต้องมีการศึกษาหาระยะพร้อมผสมของละอองเกสรและเกสรตัวเมีย และศึกษาถึงลักษณะทางกายวิภาคของดอกที่ผสมตัวเองและผสมข้ามเพื่อตรวจสอบความสามารถและระยะเวลาในการงอกของท่อละอองเกสรในการเข้าสู่รังไข่ และ 2) ระดับอุปสรรคที่เกิดขึ้นในการผสมข้าม พืชคลุมดินมีการพัฒนาของฝักมาได้ระยะหนึ่งแล้วหลุดร่วงไป ซึ่งอาจเกิดจากเนื้อเยื่อเอ็นโดสเปิร์มหรือเนื้อเยื่อนิวเซลลัสไม่พัฒนาหรือพัฒนามากผิดปกติจนไปมีผลต่อการพัฒนาของเอ็มบริโอหรือทำให้เอ็มบริโอแท้ง ในการทดลองครั้งต่อไปจึงควรมีการแยกเอ็มบริโอ ไปเลี้ยงบนอาหารในสภาพหลอดการเพาะเลี้ยงโดยการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอหรือเพาะเลี้ยงรังไข่

การปลูกเพื่อศึกษาความงอกและลักษณะของลูกผสมที่ได้ จากการผสมข้ามระหว่างเพอราเรีย x เซนโตรซีมา จำนวน 20 ฝัก และจากคู่ผสมเพอราเรีย x ซีรูเลียม จำนวน 2 ฝัก พบว่าเมล็ดที่ได้จากฝักของแต่ละคู่ผสมมีความงอกตั้งแต่ 0-100 เปอร์เซนต์ ต้นที่งอกมีลักษณะเหมือนต้นแม่เพอราเรียทั้งหมด จึงเป็นไปได้ที่เมล็ดที่ได้อาจมีทั้งที่ได้จากการผสมข้ามจริง (true hybrid) แต่ลูกผสมที่ได้มีลักษณะใกล้เคียงกับต้นแม่จนไม่สามารถจำแนกความแตกต่างได้ หรืออาจเป็นเมล็ดที่ไม่ใช่เมล็ดลูกผสมที่แท้จริงซึ่งอาจเกิดจากการกำจัดละอองเกสรที่ไม่สมบูรณ์หรือล้มเหลว หรืออาจเป็นเมล็ดที่เกิดจากอะโพมิกซีส (aopmixis) ดังนั้นจึงควรนำวิธีการตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย DNA โดยเทคนิค PCR เพื่อให้สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่และลูกผสมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ชุลีพร เตชะศีลพิทักษ์. มปป. การป้องกันและกำจัดวัชพืชในสวนไม้ผล-ไม้ยืนต้น โดยการปลูกพืชคลุมดิน. แผ่นพับเผยแพร่ที่ 205 กรมส่งเสริมการเกษตร.

ถวิล กุศลกุล และ สุดารัตน์ วิสุทธิเทพกุล. 2544. การทดสอบความมีชีวิตของละอองเกสรยูคาลิปตัสยูโรฟิลล่าในอาหารเหลาว. หน้า 106-112. *ใน* รายงานการสัมมนาวิชาการเรื่อง วนวัฒนวิทยาเพื่อพัฒนาสวนป่าเศรษฐกิจ, กรุงเทพมหานคร.

ปัทมา ชนะสงคราม, สุจินต์ แม้นเหมือน, จิราภร โกสัยเสวี, เสมอ สมนาค, ประสาน ศุภผล, สมศักดิ์ พุกพิบูลย์, ประเทือง ดลกิจ และ สมพงษ์ สุขมาก. 2526. โครงการใช้ *Calopogonium caeruleum* เป็นพืชคลุมในสวนยาง : เปรียบเทียบผลผลิตในท้องที่ต่าง ๆ. รายงานผลการค้นคว้าทดลองและวิจัย ประจำปี 2526 กรมวิชาการเกษตร

ภัทธาวุธ จิวตระกูล, สนิท สโมสร และ ศรีโบ ไชยประสิทธิ์. 2529. พืชคลุม *Calopogonium caeruleum*, บทบาทและความสำคัญ. หน้า 106-112. *ใน* รายงานการสัมมนาวิชาการเรื่องการปลูกยางพาราในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, ขอนแก่น.

ไววิทย์ บูรณธรรม, ประวิตร วงศ์สุคนธ์ และ ภัทธาวุธ จิวตระกูล. 2529. การจัดระบบพืชแซมในระหว่างแถวยาง (เอกสารโรเนียว) เรื่องเสนอที่ประชุมกลุ่มยาง 11-13 มีนาคม ณ. ศูนย์วิจัยยางสงขลา จ. สงขลา

สุจินต์ แม้นเหมือน, ประเทือง ดลกิจ และ ภัทธาวุธ จิวตระกูล. 2526. พืชคลุมคาโลโปโกเนียม ซีรูเลียม. ว. ยางพารา 4: 37-38.

สุดารัตน์ สกุลดู, อเนก โตภาคงาม, สุชีลา เตชะสงเสถียร, ชุติพงศ์ อรรคแสง และ สุมนทิพย์ บุนนาค. 2550. การตรวจลูกผสมข้ามชนิดของถั่วอาหารสัตว์ระหว่าง *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade กับ *Centrosema pubescens* และ *Centrosema macrocarpum* ด้วยเทคนิค RAPD. แก่นเกษตร. 35:159-169.

ส่วนวิจัยและพัฒนา. มปป. ซีรูเลียม พืชคลุมดินมหัศจรรย์. แผ่นพับเผยแพร่. ส่วนวิจัยและพัฒนาฝ่ายวิจัยและแผน, สำนักงานกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยาง.

Allard, R.W. 1960. Principles of plant breeding. John Wiley and Sons, London.

Andradf-Aguilar, J. A and M. T. Jackson. 1988. Attempts at interspecific hybridization between *Phaseolus vulgaris* L. and *P.nacutifolius* A. Gray. using embryo rescue. Plant Breeding 101:173.

Barnabas, B and G. Kovacs. 1997. Storage of pollen. Pp.293-314. *In* Shivanna K. R and V. K. Sawhney (eds). *Pollen biotechnology for crop production and improvement*., Cambridge Univerity, New York.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Baudoin, J.P., F.M. Camarena, and V. Schmit. 1992. Contribution à une meilleure connaissance de la position phylétique de la légumineuse alimentaire *Phaseolus polyanthus* Greenm. Bull. Rech. Agron. Gembolux. 27:167-198.

Bharathi A., K.S. Vijay Selvaraj, P. Veerabadhiran and B. Subba Lakshmi. 2006. Crossibility barriers in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek): with its wild relatives. Indian J. Crop Science. 1:120-124.

Brewbaker, J.L and B.H. Kwack. 1964. The calcium ion and substances influencing pollen growth. Pp 145-151. *In* Linskens, H.F (ed). Pollen physiology and fertilization. Amsterdam, Elsevier North Holland.

Carson, D. R., D. J. Dyer, C. D. Cotterman and R. C. Durley. 1987. The physiological basis for cytokinin induced increases in pod set in IX93-100 soybeans. Plant Physiol 84:233-239.

Chen, H. K., M. C. Mok, S. Shanmugasundaram and D. W. S. Mok. 1989. Interspecific hybridization between *Vigna radiata* (L.) Wilczek and *V. glabrescens*. Theor. Appl. Genet. 78:641-647

Chen, L and T. Adachi. 1995. Mechanism of abortion of postfertilization hybrid embryo in interspecific backcross, Lycopersicon esculentum x (L. esculentum x L. peruvianum). Cytologia. 60:121-131.

Chen, N.E., L.R. Baker and S. Honma. 1982. Interspecific crossability among four species of *Vigna* food legumes. Euphytica. 32:925-937.

Chowdhury R.K and J.B. Chowdhury. 1977. Intergeneric hybridization between *Vigna mungo* L. Hepper and *Phaseolus calcaratus* RoxB. Indian J. Agric. Sci. 47:117-121.

Clifford, P. E. 1981. Control of reproductive sink yield in mung beans. Z. Pflanzenphysiol 102:173-181.

Cooper D.C and R.A. Brink. 1940. Somatoplastic sterility as a cause of seed failture after interspecific hybridization. Genetics. 25:593-617.

Espert, S. M., S. M. Sede, L. K. Ruiz, R.H. Fortunato and L. Poggio. 2008. New chromosome reports in the subtribes Diocleinae and Glycininae (Phaseoleae: Papilionoideae: Fabaceae). Bot. J. of the Linnean Society. 158:336-341.

Geerts, P., G. Mergeai and J. P. Baudoin. 1999. Rescue of early heart-shaped embryos and plant regeneration of *Phaseolus polyanthus* Greenm. and *Phaseolus vulgaris* L. Biotechnol. Agron. Environ. 3:141-148.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Geerts, P., A. Toussaint, G. Mergeai and J. P. Baudoin. 2002. Study of early abortion in reciprocal crosses between *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus polyanthus* Greenm. Biotechnol. Agron. Environ. 6:109-119.

Gopinathan., C. R. Babu and K. R. Shivanna. 1986. Interspecific hybridization between rice bean (*Vigna umbellate*) and its wild relative (*V. minima*): Fertility-sterility relationships. Euphytica. 35:1017-1022.

Gupta, M and Y.S. Mutry. 1985. *In vitro* hormonal regulation of pollen germination and tube growth of *Vicia faba* L. Biovigvanam. 112:156-158.

Gupta, V. P., P. Plaha and P. K. Rathore. 2002. Partly fertile interspecific hybrid between a black gram x green gram derivative and an adzuki bean. Plant Breed. 121:182.

Hare, P. D., W. A. Cress and J. van Staden. 1997. The involvement of cytokinins in plant response to environmental stress. Plant Gr. Reg. 23:79-103.

Humphreys, L. R. 1979. Tropical Pasture Seed Production. *In* FAO Plant Production and Protection Paper 8. Rome, Italy.

Islam, M. M. 1991. Interspecific hybridization between *Vigna radiata* (L.) Wilczek and *V. mungo* (L.) Happer. Acta Hort. 289:241-242.

Jayaprakash, P and N. Sarla. 2001. Development of an improved medium for germination of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. Pollen *in vitro*. J. Expt. Bot. 52:851-855.

Kakani, V.G., P.V.V. Prasad, P.Q. Craufurd and T.R. Wheeler. 2002. Response of in vitro pollen germination and pollen tube growth of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes to temperature. Plant, Cell and Env. 25:1651-1661.

Knox, RB., R.R. Willing and L.D. Pryor. 1971. Interspecific hybrids in poplars usibg recognition pollen. Silae Genetica. 21:65-69.

Khan A. M., I.A. Mahmood and M. Aslam. 1999. Effect of hormones and antibiotics on pollen grain germination. Int. J. Afri. Biol. 1:215-217.

Koteswari. M. V and T. N. Mary. 1983. The effect of some growth regulators and pesticides on pollen germination in the crowfoot grass (*Dactylotenium Egyptian* L.). Indian Bot. Reporter. 3:32-33.

Lecomte, B. 1997. Étude du développement embryonnaire *in vivo* et *in vitro* dans le genre Phaseolus L. Thèse doct., Fac. univ. sci. agron. Gembloux, Belgique.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lee, Y. H., M. C. Mok, R. A. Griffin and G. Shaw. 1985. Cytokinin metabolism in *Phaseolus* embryo. Genetic difference and the occurrence of novel zeatin metabolites. Plant Physiol 77:636-641.

Linskens, H.F. 1967. Pollen. Handbuch der pflanzenphysiologie XVIII.

Liu, F., C. R. Jensen and M. N. Andersen. 2004. Pod set related to photosynthetic rate and endogenous ABA in soybean subjected to different water regims and exogeneous ABA and BA at early reproductive stages. Ann. Bot. 94:405-411.

Ma, Q., N. Longnecker and C. Atkins. 1998. Exogenous cytokinin and nitrogen do not increase grain yield in narrow-leafted lupins. Crop Sci. 38:717-721.

Mallikarjuna, N. 2003. Wild hybridization in important food legumes. Pp.120-139. *In* P.K. Jaiwal and R.P. Singh (ed). Improvement strategies for Leguminosae biotechnology. Kluwer Academic Publishers, London, UK.

Mallikarjuna, N., H.C. Sharma and H.D. Upadhyaya. 2007. Exploitation of wild relatives of pigeonpea and chickpea for resistance to *Helicoverpa armigera*. SAT ejournal/ejournal.icrisat.org. December 2007.

Manshardt, R.M and T.F. Wenslaff. 1989. Intergeneric hybridization of papaya with other *Carica* species. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 114:689-694.

Nelsing, F. A. V and D. A. Morris. 1979. Cytokinin levels and embryo abortion in interspecific *Phaseolus* crosses. Z. Pflanzenphysiol 91:345-358.

Niles, W. L and K. H. Quesenberry. 1992. Pollen germination of Rhizoma peanut cv. Florigraze. Peanut Sci. 19:105-107.

Rashid, K.A., J. Smartt and N. Hag. 1987. Hybridization in the genus *Vigna* Mungbean Thiland. Mungbean meeting. Bangkok, Thailand.

Read, S.M., A. Clarke and A. Basic. 1993. Stimulation of growth of cultured *Nicotiana tabacum* W-38 pollen tubes by polyethylene glycol and Cu(II) salts. Protoplasma. 177:1-14.

Reese R. N., C. D. Dybing, C. A. White, S. M. Page and J. E. Larson. 1995. Expression of vegetative storage protein (VSP-Beta) in soybean receme tissues in response to flower set. J. Expt. Bot. 46:957-964.

Shivanna, K.R., N.P. Saxena and N. Seetharama. 1997. An improvised medium for *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of chickpea. Int. Chickpea and Pigeonpea News. 4:28-29.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Singh, B. B. and H.K. Dikshit. 2002. Possibilities and limitations of interspecific hybridization involving green gram (*Phaseolus radiatus*) and black gram (*Phaseolus mungo*). Indian J. of Agr. Sci. 72:676-678.

Singh, I.S., I.S. Bharti, A.S. Nandwal, C. L. Goswami and S. K. Verma. 1992. Effect of temperature on *in vitro* pollen germination. Biologia Plantarum. 34:461-464.

Smartt, J. 1979. Interspecific hybridization in the grain legumes-A review. Economic Botany. 33:329-337.

Stanley, R.G. and F. A. Loewus. 1963. Boron and myo-inositol in pollen pectin biosynthesis. Pp 120-139. *In* H.F. Linkens (ed). Pollen physiology and fertilization. A symposium held at the University of Nijmegen, The Netherlands.

Steffen, K. 1963. Male gametophyte. *In* P. Mahesware (ed). Recent advance in the embryology of angiosperm Delhi: Interm. Soc. Plant Morphologists. Delhi. India

Tan, K. H., E. Pushparajah, R. Shepherd and C. H. Teoh. 1976. *Calopogonium caeruleum*, a shade tolerant leguminous cover for rubber. Pp 45-62. *In* Proc. Rubb. Res. Inst. Malaysia Plrs' Conf., Kuala Lumpur.

'tMannetje, L and R. M. Jones. 1992. Plant resources of South-East Asia. PROSEA. Bogor Indonesia.

Tyagi, A. P. 2002. Chromosomal pairing and pollen vaiability in *Rhizophora mangle* and *Rhizophora stylosa* hybrids. S. Pac. J. Nat. Sci. 20:1-3.

Vara Prasad, P. V., P. Q. Craufurd, V. G. Kakani, T. R. Wheeler and K. J. Boote. 2001. Influence of high temperature during pre- and post-anthesis stages of floral development on fruit-set and pollen germination in peanut. Aust. J. Plant Physiol. 28:223-240.

Yeoh, C. H. 1979. Propagation of legume clover crops in rubber plantation. Plrs' Bull. Rubb. Res. Inst. Malaysia N. 159.54.

Zenkteler, M. 1990. *In vitro* fertilization and wide hybridization in higher plants. Cri. Rev. in Plant Sci. 9:267-279.

Zhang, H.Q and A.F. Croes. 1982. A new medium for pollen germination in vitro. Acta Botanica Neerlandica. 31:113-119.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้