บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้เป็นการหาข้อมูลพื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับการผสมพันธุ์พืชกลุ่มปทุมมา และกลุ่มกระเจียว ซึ่งมักมีปัญหาเรื่องการผสมไม่ติดของคู่ผสมข้ามสายพันธุ์ (พิมพ์ใจ, ติดต่อส่วนตัว) นอกจากนี้ยังพบปัญหาการบานของดอกแต่ละชนิดไม่ตรงกัน เช่นกลุ่มที่ดอกบานเร็วตามธรรมชาติต้นฤดูฝน (early flowering) (Apavatjrut *et al.*, 1999) และชนิดที่บานปลายฤดูฝน เช่น กระเจียวสีส้ม การทดลองจึงเริ่มตั้งแต่การศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสร การหาสภาพที่เหมาะสมเพื่อการเก็บรักษา และการงอกของละอองเกสร นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการผสมเกสร และการหาปัจจัยที่เหมาะสมเพื่อเลี้ยงคัพภะของคู่ผสม เพื่อเป็นแนวทางในการช่วยชีวิตคัพภะ (embryo recue) ก่อนที่ฝักจะฝ่อไป พบว่า ละอองเกสรที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีซูโครส 2.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถงอกหลอดละอองเกสรได้มากกว่าในน้ำยาเลี้ยงละอองเกสรที่เติมความเข้มข้นซูโครสที่สูงขึ้นคือ 7.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้การงอกหลอดละอองเกสรเพียง 13.41 และ 0.12 เปอร์เซ็นต์ ลดลงจาก 22.48 และ 28.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และหลอดเกสรที่งอกออกมามีลักษณะที่ผิดปกติ เนื่องจากซูโครสที่มีความเข้มข้นสูงมีผลต่อความดันออสโมซิสของน้ำยาเลี้ยงละอองเกสร ทำให้น้ำภายในหลอดละอองเกสรไหลออกจากเซลล์ ในทำนองเดียวกัน Mohammed *et al.* (2001) ได้ทดลองเลี้ยงละอองเกสรของ *Hibiscus esculentus* ในอาหารสูตร Taylor ที่มีความเข้มข้นซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เซลล์ละอองเกสรที่เลี้ยงเกิดการแตก เนื่องจากความไม่เหมาะสมของแรงดันออสโมติก แต่ในปี ค.ศ. 2000 Chi ได้ทดลองถ่ายละอองเกสรของพืชสกุล *Lilium* ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร Brewbaker and Kwack (1963) ที่เติมซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ คือ สภาพที่เหมาะสมที่สุดของการงอกของละอองเกสร

การเก็บรักษาละอองเกสรในสภาพต่างๆ พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสไม่เหมาะสมต่อการเก็บรักษา เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดละอองเกสรน้อยตั้งแต่อายุเพียง 1 วันหลังการเก็บรักษา ที่เป็นเช่นนี้น่าจะเป็นเพราะละอองเกสรของปทุมมาเป็นละอองเกสรแบบเปียก การเก็บรักษาในสภาพแห้งเหมือนละอองเกสรของพืชธรรมดาทั่วไป แม้ว่าจะเก็บที่อุณหภูมิค่อนข้างสูงเพราะเป็นพืชเมืองร้อน ก็ไม่เหมาะสม และยิ่งเก็บรักษาไว้ในสภาพชื้นร่วมกับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำให้เชื้อราขึ้นบนละอองเกสรตั้งแต่วันที่ 3 เพราะในสภาพชื้นและอุณหภูมิค่อนข้างสูงส่งเสริมให้เชื้อราเจริญได้ดี สำหรับการเก็บรักษาละอองเกสรในสภาพแห้งที่มี และไม่มีซิลิกาเจล พบว่าทั้งที่อุณหภูมิ 25 หรือ 8 องศาเซลเซียส ไม่เหมาะต่อการเก็บรักษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ละอองเกสรปทุมมา เพราะทำให้ละอองเกสรสูญเสียความชื้นมีผลต่อคควสมดันออสโมซิสภายในเซลล์ ดังนั้นเมื่อนำมาเลี้ยงจึงดูดน้ำมากทำให้เซลล์แตก (Shivanna and Rangaswamy, 1992)

การเก็บรักษาละอองเกสรในสภาพชื้นที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเก็บรักษาละอองเกสรได้เป็นระยะเวลา 1 วันยังคงมีความมีชีวิตสูงอยู่คือ 41.19 เปอร์เซ็นต์ ลดลงจาก 48.85 เปอร์เซ็นต์เมื่อเก็บจากต้น แต่เมื่อเก็บละอองเกสรเป็นเวลา 3 - 10 วัน มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลงอยู่ในช่วง 13.80 - 21.27 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสร เมื่อเก็บรักษาไว้นาน 1 ซึ่งมีการงอกสูงสุดคือ 30.25 ลดลงจาก 34.54 เปอร์เซ็นต์ เมื่อยังไม่ได้เก็บรักษา แต่เมื่อเก็บรักษาไว้ตั้งแต่ 3 วันขึ้นไปมีเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสรลดลงอย่างรวดเร็ว เช่นเดียวกับผลของอรอนงค์ (2535) ที่รายงานการเก็บรักษาละอองเกสรของ *Curcuma* 16 สายพันธุ์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเกสร และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของละอองเกสรลดลงตามอายุการเก็บรักษาที่มากขึ้น

การทดลองเก็บรักษาละอองเกสรพืชกลุ่มปทุมมาและกลุ่มกระเจียวเพื่อใช้ประโยชน์ในการที่ดอกของพ่อพันธุ์ และแม่พันธุ์พร้อมผสมไม่ตรงกัน พบว่าพืชทดลองมีเปอร์เซ็นต์การงอกแตกต่างกันทันทีหลังจากเก็บละอองเกสรมาจากต้นพันธุ์ โดยพบว่าสายพันธุ์ C-28 และ BK มีเปอร์เซ็นต์การงอกประมาณ 55 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสายพันธุ์ CMP BC และ MM มีเปอร์เซ็นต์การงอกประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ แต่ในสายพันธุ์ OR และ K-38 มีเปอร์เซ็นต์การงอกน้อยมากเพียง 0- 1.68 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ที่เป็นเช่นนี้น่าจะเกี่ยวกับพันธุกรรมของแต่ละสายพันธุ์ที่แตกต่างกันมากกว่าสภาพแวดล้อมที่ปลูกพืชทดลอง เนื่องจากละอองเกสรที่ใช้เก็บมาจากแปลงทดลองบริเวณเดียวกัน โดยละอองเกสรของทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ สามารถมองเห็นข้อแตกต่างจากสายพันธุ์อื่นได้ด้วยตาเปล่า คือสายพันธุ์ K-38 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ลูกผสม และละอองเกสรจาก OR เมื่อดอกบานละอองเกสรมีลักษณะเป็นสีใส ค่อนข้างแห้ง และมีปริมาณละอองเกสรน้อยกว่าสายพันธุ์อื่น โดยภาพรวมพืชที่ศึกษาในกลุ่มกระเจียว (Eucurcuma) มีเปอร์เซ็นต์กางงอกต่ำกว่าพืชในกลุ่มปทุมมา (Paracurcuma)

เมื่อเก็บรักษาละอองเกสรนาน 10 วัน พืชกลุ่มปทุมมาและกลุ่มกระเจียวทุกสายพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์การงอกลดลงอย่างรวดเร็ว โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ ยิ่งไปกว่านั้นละอองเกสรของสายพันธุ์ BC MM และ K-38 มีเชื้อราเกิดขึ้น และพบว่าเมื่อเก็บรักษานาน 15 วัน พบเชื้อราเกิดขึ้นในละอองเกสรที่เก็บรักษาทุกสายพันธุ์ จึงสรุปได้ว่าสภาพที่แม้เหมาะสมที่สุดในการทดลองนี้ก็ไม่ควรเก็บละอองเกสรไว้นานถึง 10 วัน

นอกจากนี้ต้องใช้ช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการงอกของหลอดละอองเกสรในน้ำยาเลี้ยงละอองเกสร ซึ่งใช้ในการทดลองนี้เก็บละอองเกสรเพื่อนำมาเพาะระหว่าง 6.00-10.00 น เนื่องจาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ช่วงเวลาดังกล่าวมีอากาศที่ไม่ร้อนมากนักและความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศยังคงสูงอยู่ สอดคล้องกับการทดลองของ Shinichi (2001) ที่พบว่าการเก็บรักษาละอองเกสรของ ขิงไว้อย่างน้อย 3 ชั่วโมง ภายใต้ความชื้นสัมพัทธ์ 40-80 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดการสูญเสียเปอร์เซ็นต์การงอกได้ดีที่สุด และ Shivanna and Rangaswamy (1993) ยังพบว่าความหนาแน่นของละอองเกสรในน้ำยาเลี้ยงละอองเกสรมีผลต่อการงอกของละอองเกสรอีกด้วย

การศึกษาการผสมพันธุ์ของพืชกลุ่มปทุมมาและกลุ่มกระเจียว พบว่าคู่ผสมที่สามารถผสมติดฝักได้เป็นคู่ผสมที่อยู่ในสกุลย่อยเดียวกัน คือกลุ่มปทุมมา (Paracurcuma) ได้แก่ C-28 × CMP (ผสมข้ามต้นในชนิดเดียวกัน) และ C-28 × BK (ผสมข้ามชนิด) โดยทำการผสมแบบสลับพ่อแม่ และ แบบผสมตัวเองของลูกผสมสายพันธุ์มะเหมี่ยว (MM) ซึ่งเป็นลูกผสมในกลุ่มกระเจียว แต่เมื่อผสมข้ามระหว่างสกุลย่อยในทุกสายพันธุ์ที่ทดลองไม่สามารถผสมติดฝักได้เลย ซึ่งสอดคล้องกับการผสมข้ามระหว่าง ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมืองสีชมพู × รางนาค แบบสลับพ่อแม่ พบว่าเมล็ดไม่สามารถพัฒนาจนแก่ตามธรรมชาติได้ (สุชาดา และ อรดี, 2542) และในปี ค.ศ. 2000 Chi ได้รายงานว่าการผสมข้ามชนิดไม่สำเร็จในสกุล *Lilium* เป็นเพราะ อุปสรรคทั้งก่อน และหลังการปฏิสนธิ (pre-fertilization barriers and post-fertilization barriers) ในกรณีการผสมตัวเองของปทุมมาสายพันธุ์ C-28 มีการขยายขนาดของฝักหลังจากทำการผสมเกสรแต่จะฝ่อไปเมื่ออายุประมาณ 7-10 วัน น่าจะเป็นเหตุผลเดียวกับ Edite (2001) ที่ได้ศึกษาการผสมพันธุ์ *Chaenomeles japonica* ด้วยวิธีการ fluorescence microscopy พบว่า การเข้ากันไม่ได้ในการผสมพันธุ์เกิดจากมีการงอกของหลอดละอองเกสรน้อยมาก และหลอดละอองเกสรที่งอกได้ไม่สามารถงอกผ่านก้านเกสรเพศเมีย และมีเปอร์เซ็นต์การผสมในรังไข่ต่ำมาก

การที่ละอองเกสรดอกไม้ไม่สามารถงอกลงไปผสมกับเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย เป็นกระบวนการทางชีวเคมี ซึ่งถูกควบคุมโดยระบบพันธุกรรม กระบวนการดังกล่าวอาจเกิดขึ้นในระยะใดก็ได้ในการถ่ายละอองเกสร ไปจนถึงระยะการปฏิสนธิของพืช (ลาวัลย์, 2539) การผสมไม่ติดของพืชทดลองครั้งนี้อาจเกิดจากละอองเกสรงอกช้าทำให้หลอดละอองเกสรไม่สามารถผ่านก้านเกสรเพศเมียที่ยาวมากลงไปผสมออวุลได้ทัน เนื่องจากการบานของดอกมีอายุเพียง 1 วัน การเกิดปัญหาในลักษณะนี้น่าจะเกิดได้ในบางกรณีเท่านั้น แต่ปัญหาหลักน่าจะมาจากจำนวนละอองเกสรที่มีชีวิตมีน้อยมากในหลายสายพันธุ์ตั้งแต่เริ่มเก็บจากต้น หรือเกิดการเข้ากันไม่ได้ (incompatibility) ทางพันธุกรรมทำให้ไม่มีการผสมระหว่างสเปิร์มนิวเคลียส และนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย หรือละอองเกสรงอกตามปกติ สามารถเข้าไปผสมกับเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียได้ แต่ไม่สามารถเจริญและพัฒนาต่อไปในระยะ globular stage, heart-shaped stage และ torpedo-shaped stage มีสาเหตุมาจากการที่โครโมโซมไม่สามารถเข้าคู่กันได้ เห็นได้จากกรณีคู่ผสมที่ทดลองซึ่งมีจำนวนโครโมโซม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ต่างกัน หรือมีการไม่เสถียรของยีนในคัพภะ หรือคัพภะไม่สามารถใช้อาหารจากเนื้อเยื่อรอบ ๆ ถุงคัพภะ (embryo sac) หรืออาหารไม่สามารถลำเลียงไปสู่ suspensor ได้ (นิตย์ศรี, 2541; อดิศร, 2541) ซึ่งน่าจะใช้อธิบายในกรณีการผสมไม่ติดของคู่ผสม CMP × MM ซึ่งฝักฝ่อไป และการไม่พัฒนาต่อของคัพภะ และอาหารสะสมในคู่ผสมตัวเองของ CMP ซึ่งต่อมาฝักฝ่อไป ที่เป็นเช่นนี้เพราะในพืชชั้นสูงที่มีดอก จะเกิดกระบวนการปฏิสนธิคู่ (double fertilization) โดยปลายหลอดละอองเกสรจะปลดปล่อยเจเนอเรทิฟนิวเคลียส (generative nucleus) ที่มีลักษณะเป็นแฮพลอยด์ออกมา 2 เซลล์ เซลล์หนึ่งไปรวมตัวกับเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย เกิดเป็นไซโกต และอีกเซลล์ไปรวมกับโพลาร์นิวเคลียส (polar nuclei) เกิดเป็นเนื้อเยื่อสะสมอาหาร โดยนิวเคลียสของอาหารสะสมแบ่งตัวได้เป็นเนื้อเยื่อล้อมรอบคัพภะ และมีบทบาทสำคัญในการเป็นแหล่งอาหารแก่คัพภะในระหว่างกระบวนการกำเนิดคัพภะ หรือในระยะต่อมาคือพัฒนาเป็นเมล็ด และการงอกของเมล็ดต่อไป (ลิลลี่, 2546) ในกรณีที่อาหารสะสมไม่มีการพัฒนาต่อจึงทำให้คัพภะเริ่มฝ่อ และฝักฝ่อไปในที่สุด

จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าออวุลของปทุมมา มีลักษณะคล้ายรูปไข่หัวกลับ (anatropous) ซึ่งลักษณะคล้ายกับออวุลของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวชนิดอื่น เช่น *Iris* (Bryan, 1997) เมื่อเมล็ดปทุมมาอายุ 7 วันหลังจากผสมเกสร พบว่าเมล็ดมีการขยายขนาดทั้งทางด้านกว้าง และด้านยาว เช่นเดียวกันเซลล์ภายในเมล็ดมีขนาดใหญ่ และมีแวคิวโอ เนื่องจากเซลล์ดังกล่าวเป็นเซลล์ที่สะสมอาหาร เซลล์มีการเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ สอดคล้องกับการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของเมล็ดที่ยังไม่แก่เต็มที่ของ *Capsella vursapastoris* (Bryan, 1997) และเมล็ดของ *Ricinus communis* :7j'gxHo พืชใบเลี้ยงคู่ในวงศ์ Euphorbiaceae (Esau, 1997)

เมื่อเมล็ดปทุมมาแก่เต็มที่คัพภะ และเนื้อเยื่อสะสมอาหารจะแยกกันอย่างชัดเจน โดยคัพภะอยู่บริเวณแกนกลางของเมล็ด และมีเนื้อเยื่อสะสมอาหาร 2 ส่วน คือ ส่วนที่หนึ่งเป็นเซลล์ที่มีส่วนประกอบของแป้งอยู่ด้านข้างทั้งสองด้านของคัพภะ เนื่องจากย้อมสีด้วยสารละลายไอโอดีนแล้วติดสีน้ำเงิน และอีกส่วนอยู่รอบ ๆ บริเวณส่วนปลายด้านบนของคัพภะประกอบไปด้วยเซลล์ที่มีส่วนประกอบของไขมันเป็นส่วนใหญ่ และเซลล์ที่มีส่วนประกอบของแป้งเพียงเล็กน้อย ส่วนคัพภะมีเซลล์ที่มีไขมันเป็นส่วนประกอบเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากย้อมด้วยสารละลาย Sudan IV แล้วติดสีส้มแดง (ภูวดล, 2528)

สำหรับการงอกยอดและรากของคัพภะปทุมมาจะเกิดจากบริเวณส่วนโคนของคัพภะ เนื่องจากบริเวณดังกล่าวมีเนื้อเยื่อเจริญอยู่โดยลักษณะคัพภะของปทุมมาคล้ายกับพืช *Allim cepa* L. (Meyer, 2001) และสอดคล้องกับพืชในสกุล *Liliaceae* ซึ่งมีการแบ่งเซลล์ของคัพภะในทิศทางด้านยาว (longtitudinal) (Mcdonald and Kwang, 2005)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมล็ดแก่ของปทุมมามีสีน้ำตาล เปลือกเมล็ดค่อนข้างแข็งซึ่งเป็นส่วนของเปลือกชั้นนอก ผิวด้านนอกสุดเป็นมัน ซึ่งมองเห็นชั้นนี้ชัดเจนจากการตัดเนื้อเยื่อด้วย ตามปกติในธรรมชาติเมล็ดมีระยะพักตัว และงอกในฤดูฝนต่อไป การศึกษาครั้งนี้ได้หาปัจจัยที่เหมาะสมเพื่อเพาะเลี้ยงคัพภะขึ้นโดยการแยกเอาคัพภะออกจากเมล็ดมาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อที่จะช่วยชีวิตคัพภะที่ไม่สามารถพัฒนาต่อจนเป็นคัพภะที่แก่ได้ จากการทดลอง พบว่า คัพภะที่มีอายุ 27 และ 30 วันหลังจากผสมเกสรมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และการเจริญดีกว่าคัพภะที่มีอายุ 24 วัน เพราะเมื่อนำคัพภะที่มีอายุน้อยนี้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารมีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตน้อยมาก อาจเนื่องจากความไม่พร้อมในการพัฒนาของคัพภะ และขึ้นกับอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงคัพภะ ในกรณีนี้อาหารที่เติม casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซูโครส ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ใช้เพาะเลี้ยงได้ดีระดับหนึ่ง ในขณะที่คัพภะที่มีอายุมากกว่าจนถึงคัพภะแก่ไม่ต้องการ casein hydrolysate เติมในอาหาร อีกทั้งน้ำตาลที่เหมาะสมก็ใช้เพียง 3 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากในการเพาะเลี้ยงคัพภะที่อยู่ในระยะแรก ๆ นั้นต้องการการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบทางเคมี และความดันออสโมซิสกของอาหารที่เหมาะกับสภาพคัพภะที่ เคยอยู่ในรังไข่ เช่น มีความเข้มข้นซูโครสระดับที่สูง (แสงจันทร์, 2547) ยิ่งคัพภะที่ยังไม่มีการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นส่วนต่าง ๆ นั้นมีความต้องการอาหารมาก อาจต้องเติมอาหารเสริม เช่น น้ำมะพร้าว ในบางกรณีก็ต้องให้ความเข้มข้นซูโครสเพิ่มเป็น 8-12 เปอร์เซ็นต์ การให้ฮอร์โมนพวกออกซิน และไซโตไคนินในปริมาณที่เหมาะสมอาจช่วยให้คัพภะเจริญได้ดีขึ้น (บุญยืน, 2544) การสามารถแยกเอาคัพภะอายุ 27 และ 30 วัน มาเลี้ยงสามารถช่วยทำลายการพักตัวของเมล็ดได้ จึงมีประโยชน์ในการผสมพันธุ์พืชทำให้คัดเลือกลูกผสมได้เร็วขึ้น

จากการทดลองที่ 3.3 พบว่า ไม่สามารถเลี้ยงออวุลที่ได้รับการผสมแล้ว (คัพภะอ่อน) เดี่ยวๆได้ อาจเนื่องจากภายในเมล็ดที่อ่อนมากอายุเพียง 3-6 วัน ไม่สามารถเลี้ยงในอาหารที่มีเพียงน้ำตาลระดับค่อนข้างสูง และ casein hydrolysate ได้ แต่จำเป็นต้องพัฒนาอาหารให้มีความซับซ้อนและเหมาะสมยิ่งขึ้น และเมื่อนำกลุ่มคัพภะอายุน้อยที่มีรกติดอยู่ด้วยไปเลี้ยงมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตน้อยกว่าเนื้อเยื่อที่มีอายุมากขึ้น แต่กลุ่มคัพภะที่แก่ขึ้นอายุ 12 วันและมีรกติดอยู่เมื่อเพาะเลี้ยงพบว่า กลุ่มคัพภะมีการขยายขนาด และสีของเมล็ดเปลี่ยนจากสีขาวขุ่นไปเป็นสีเขียวอ่อนๆ แต่เกิดเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน 100 เปอร์เซ็นต์ในช่วงหลังของการเพาะเลี้ยงโดยเกิดขึ้นจากตัวของเนื้อเยื่อเนื่องจากรกดังกล่าวมาจากฝักที่มีอายุมากขึ้น และฝักอายุมากมีโอกาสปนเปื้อนกับจุลินทรีย์ในบริเวณกลีบประดับของดอกซึ่งมีลักษณะเป็นแอ่งคล้ายถ้วยได้มากกว่า จึงทำให้การฆ่าเชื้อบริเวณผิวของรังไข่ทำได้ยากกว่าปกติ สำหรับอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงคัพภะคือ อาหารที่เติม casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซูโครส ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับ Custers (1992) ซึ่งได้ศึกษาการเลี้ยงออวุลของทิวลิป พบว่าการเติมซูโครสความเข้มข้น 6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารสูตร MS เหมาะสมต่อการเกิดโครงสร้างเมล็ดและผลิตเป็นหัวเล็ก ๆ และคำนูญ (2544) รายงานว่า casein hydrolysate เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ ช่วยให้คัพภะที่ได้จากการผสมของเซลล์สืบพันธุ์ที่อ่อนมากให้มีการแบ่งเซลล์ และออวุลพัฒนาเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์ได้

แม้ว่าการทดลองครั้งนี้ไม่ได้ต้นจากคัพภะที่เลี้ยง แต่เนื้อเยื่อออวุลที่มีอายุ 9 วัน สามารถเกิดเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด แสดงให้เห็นว่าปัจจัยเกี่ยวกับอายุของเนื้อเยื่อมีบทบาทสำคัญในการชักนำให้เกิดแคลลัส ซึ่งสอดคล้องกับงานของวิชญา (2544) ยังพบว่าการเติม casein hydrolysate ลงไปในอาหารสูตร MS ที่ใช้เลี้ยงออวุลอายุ 3 และ 5 วันหลังผสมเกสร ของลูกผสมว่านนางคุ้มกับไม้ดอกสี่สกุล สามารถทำให้ออวุลของคู่ผสมที่ใช้ว่านนางคุ้มเป็นแม่เริ่มมีการแบ่งเซลล์จากชั้นในของผนังออวุล (integument) ซึ่งต่อมาพัฒนาเป็นเอมบริโอเจนิกแคลลัส และสามารถพัฒนาเป็นต้นพืชได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved