

Thesis Title	Characters and Floral Development of Diploid and Tetraploid Fire Lily (<i>Hippeastrum</i> spp.)	
Author	Miss Prapassorn Arayakitcharoenchai	
Degree	Doctor of Philosophy (Horticulture)	
Thesis Advisory Committee	Lect. Dr. Chuntana Suwanthada	Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Soraya Ruamrangsri	Co-advisor
	Assoc. Prof. Dr. Chusie Trisonthi	Co-advisor

ABSTRACT

Commercial varieties of *Hippeastrum* (fire lily) have currently been in increased demands, thus new varieties via hybridization are unavoidably necessary to replace expensive introduced materials. Attempts have been made on producing hybrids from various *Hippeastrum* parents of different ploidy levels, in spite of arising obstacles. This research was intended to carry out studies on biological aspects concerning two groups of *Hippeastrum*, i.e. 1) local and introduced diploids and 2) introduced commercial tetraploid hybrids, to provide informative results applicable in supporting those attempts. The research was organised, in two parts, to examine characteristics and floral development of diploid and tetraploid *Hippeastrum*.

Part I of the studies included investigations on characterization of the plants, capable of determining their ploidy level as well as varietal identity. Such characterization was limited to those of pollen morphology, surface anatomy, vascular anatomy and chromosome number.

Results showed that *Hippeastrum* varieties of SP-Pink, SP-Red, Night Star, Tango, Apple Blossom, Lemon Lime and Susan obtained the pollens of similar features, i.e. ellipsoid monad, with the exine of reticulate type but different sculpturing.

As for internal structure examined from transverse sections, prepared via paraffin embedding technique, of leaf, petal, peduncle and pedicel of 4 varieties, i.e. diploid SP-Pink and SP-Red and tetraploid Apple Blossom and Susan, it revealed that they all had similar structure of the tissue systems. The dermal tissue of leaf and petal composed of uniseriate upper and lower epidermis. Epidermal cells were parenchyma in type. Stomata were seen distributed in the same level as epidermal cells. The ground tissue also made up of parenchymatous cells with vascular tissue embedded in radius manner. The dermal tissue of peduncle and pedicel expressed the same structure as that of the leaf. Stomata were as well found. The ground tissues of those two organs were composed of loosely arranged parenchymatous cells. Vascular bundles were figured scatteredly in the cortical tissue. In these grounds, sclerenchymatous cells did not exist. Stomata found on the surface of these organs were of anomocytic, having no subsidiary cells. Those distributing on the surfaces of the leaves and petals appeared amphistomatically. Orientation and distribution of stomata on surfaces of various organs were not different, i.e. they appeared in linear order coinciding with lateral venation. The size of stomata distributing in the surfaces of different organs of the same plant and of the same variety were invariable. But, different varieties obtained different stomatal size and stomatal frequencies on the organ surfaces.

Chromosome investigations from root tip tissue yielded appropriate technique of tissue preparation as follows: root sampling at 9.30-10.00 a.m., PDB pre-treatment at 10°C for 48 hours, fixing in Carnoy's solution for 5 minutes, maceration in 1 N HCl for 5 minutes and stained in modified carbol fuchsin for 24 hours. Chromosome counts of the varieties showed $2n = 22$ for SP-Pink and SP-Red, $2n = 44$ for Apple Blossom and Susan and $2n = 22$ and 44 for the hybrids.

Investigations in Part II concerned floral development, especially that occurred the dormant bulbs, microsporogenesis and megasporogenesis and embryo development. Germination capacity of pollens, pollen storage and germination of hybrid seeds were also studied.

Results from the 4 varieties showed that the floral buds located at every fourth scale axil of individual dormant bulb, with the size and number of the buds correlated with the bulb size. Organogenesis of the floral parts occurred continuously and

completed before the opening of the flower. Such floral bud contained fully developed perianth, androecium and gynoecium with the anthers full of pollens and the ovary bearing expanded ovules.

Germination tests of pollen grains of 7 varieties showed that the pollens collected from the anthers 3 days after blooming stained and germinated well with high germination percentages. Suitable time for germination were 6.00-10.00 a.m. Storage at 5°C can preserve the pollens for longer period and lose germination in 91-120 days while those stored at room temperature (28-33°C) lose germination when kept for 15-45 days.

Embryo development of the hybrid seeds was followed. It was found that the embryo embedding inside the endosperm was in cylindrical shape. Its single cotyledon coiled with a plumule enclosed at the base. The radicle was short and tiny. These hybrid seeds could germinate in 14-30 days after pod dishiscence with very high germination percentages, ranging from 62.31 to 98.64%.

Results gathered from this research provide specific knowledge and certain information concerning physiological aspects of floral development of *Hippeastrum* applicable in breeding programme involving the varieties of different ploidy levels. Such knowledge is useful for practices in parents selecting, appropriate timing of application, particular techniques conveniencing pollination and hybridization. Possible approaches in rescuing immature pods and seedlings obtained from interploidy fertilizations could also be evaluated from the study. On the other hand, varietal identification, necessary in new varietal releasing could also be commenced from the investigation. The above mentioned statement could thus indicate accomplishment of this research at a certain level.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

ลักษณะและพัฒนาการทางดอกของว่านสี่ทิศดิพลอยด์และ
เทตระพลอยด์

ผู้เขียน

นางสาวประภัสสร อารยะกิจเจริญชัย

ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (พืชสวน)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อาจารย์ ดร. มั่นทนา สุวรรณธาดา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

รองศาสตราจารย์ ดร. ไสระยา ร่วมรัมย์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

รองศาสตราจารย์ ดร. ชุศรี ไตรสนธิ

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ปัจจุบันความต้องการว่านสี่ทิศ (Fire Lily; *Hippeastrum* spp.) พันธุ์การค้ามีเพิ่มมากขึ้น จึงต้องมีการผลิตพันธุ์ใหม่ๆ เพื่อทดแทนการนำเข้าหัวพันธุ์ที่มีราคาแพง โดยการสร้างลูกผสมให้หลากหลายจากพันธุ์ต่างๆ ที่มีอยู่ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีระดับพลอยดีที่แตกต่างกัน การผสมข้ามพลอยดีให้สำเร็จมีปัญหาให้ศึกษาหลายประการ การศึกษาครั้งนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับปัญหาต่างๆ ดังกล่าว โดยศึกษาลักษณะและพัฒนาการทางดอกของว่านสี่ทิศดิพลอยด์และเทตระพลอยด์ ดำเนินการกับพืชทดลองพันธุ์ต่างๆ 2 กลุ่ม ที่มีระดับพลอยดีแตกต่างกัน คือ 1) กลุ่มพืชดิพลอยด์พันธุ์พื้นบ้านและพืชดิพลอยด์พันธุ์แท้จากต่างประเทศ และ 2) กลุ่มพืชที่เป็นพันธุ์ลูกผสมเทตระพลอยด์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ

การทดลองส่วนที่ 1 เป็นการศึกษาลักษณะต่างๆ ของว่านสี่ทิศเพื่อใช้ลักษณะเหล่านั้นในการจำแนกระดับพลอยดีและใช้เป็นลักษณะที่บ่งเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ โดยศึกษาสัณฐานวิทยาของเรณู ลักษณะทางกายวิภาควิทยาของเนื้อเยื่อผิวและเนื้อเยื่อลำเลียง และลักษณะทางเซลล์พันธุศาสตร์ ผลการศึกษาพบว่า เรณูของว่านสี่ทิศ 7 พันธุ์ คือ SP-Pink, SP-Red, Night Star, Tango, Apple Blossom, Lemon Lime และ Susan เป็นเรณูเดี่ยว มีรูปร่างรี มีลักษณะผิวเรณูเป็นลายตาข่าย มีขนาดและรูปแบบของลายแตกต่างกันไปตามพันธุ์

การศึกษากายวิภาควิทยาของเนื้อเยื่อผิวและเนื้อเยื่อลำเลียง จากเนื้อเยื่อตัดตามขวางของใบกลีบดอก ก้านช่อดอก และก้านดอกย่อยของพืชทดลอง โดยการเตรียมเนื้อเยื่อด้วยวิธีการฝังใน

พาราฟิน พบว่า วานส์ทิส 4 พันธุ์ คือ SP-Pink และ SP-Red ซึ่งเป็นกลุ่มดิพลอยด์ และ Apple Blossom และ Susan ซึ่งเป็นกลุ่มเทตระพลอยด์ มีลักษณะ โครงสร้างของระบบเนื้อเยื่อดังกล่าวคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ ใบและกลีบดอก มีระบบเนื้อเยื่อผิวที่ประกอบด้วยเซลล์ผิวด้านบนใบและด้านใต้ใบเป็นเซลล์พาราคีมาเรียงกันชั้นเดียว มีปากใบอยู่ในระดับเดียวกันกับเซลล์ผิว เนื้อเยื่อพื้นเป็นเซลล์พาราคีมาที่มีเนื้อเยื่อลำเลียงฝังอยู่ โดยมีกลุ่มของท่อลำเลียงเรียงกันในแนวรัศมี ระบบเนื้อเยื่อผิวของก้านช่อดอกและก้านดอกย่อยมีลักษณะเช่นเดียวกับของใบ และพบปากใบอยู่ในลักษณะเดียวกัน เซลล์เนื้อเยื่อพื้นเป็นเซลล์พาราคีมาเรียงตัวอย่างหลวมๆ และมีกลุ่มท่อลำเลียงกระจายอยู่ภายใน โดยไม่พบเซลล์สเกลอพาราคีมาแต่อย่างใด ปากใบที่อยู่บริเวณเนื้อเยื่อผิวของส่วนต่างๆ ของวานส์ทิสเป็นแบบอะนอโมไซติก ไม่มีเซลล์ข้างเซลล์คุม ปากใบที่ปรากฏบนใบและกลีบดอกเป็นแบบแอมฟิสโตมาติก การกระจายและการเรียงตัวของปากใบในเนื้อเยื่อผิวของใบ กลีบดอก ก้านช่อดอก และก้านดอกย่อยมีลักษณะเหมือนกัน คือ ปากใบกระจายทั่วไป เรียงตัวในแนวขนานตามเส้นใบอย่างเป็นระเบียบ มีความหนาแน่นของปากใบและขนาดของปากใบแตกต่างกันไปตามพันธุ์ แต่ขนาดของปากใบของต้นพืชพันธุ์เดียวกันแม้ปรากฏอยู่บนอวัยวะที่แตกต่างกันจะมีขนาดของปากใบไม่แตกต่างกัน

การศึกษาโครโมโซมของวานส์ทิสจากเซลล์ปลายรากนั้นพบเทคนิคที่เหมาะสมในการเตรียมเนื้อเยื่อปลายราก คือ เก็บตัวอย่างรากระหว่างเวลา 9.30-10.00 น. หยดวงซีฟเซลล์ใน PDB ที่อุณหภูมิ 10°C นาน 48 ชั่วโมง รักษาสภาพเซลล์ในน้ำยานาน 5 นาที และแยกเซลล์ใน HCl 1 N นาน 5 นาที ย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี carbol fuchsin ที่ปรับปรุงสูตรโดยช้อมนาน 24 ชั่วโมง ผลการตรวจนับจำนวนโครโมโซม พบว่า SP-Pink และ SP-Red มีจำนวนโครโมโซม $2n = 22$ พันธุ์ Apple Blossom และ Susan มีจำนวนโครโมโซม $2n = 44$ และลูกผสมมีจำนวนโครโมโซม $2n = 22$ และ 44

การทดลองส่วนที่ 2 เป็นการศึกษาพัฒนาการทางดอกของวานส์ทิส โดยเฉพาะพัฒนาการของตาดอกภายในหัว พัฒนาการของเกสรเพศผู้ เกสรเพศเมีย และเอ็มบริโอ รวมทั้งศึกษาความสามารถในการงอกของละอองเรณู การเก็บรักษาละอองเรณู และการงอกของเมล็ดลูกผสม ผลการศึกษาพบว่า ตาดอกของวานส์ทิสอยู่ภายในหัว โดยอยู่ที่ซอกของกาบใบในตำแหน่งต่างๆ วงที่ 4 ของกาบใบ โดยที่จำนวนและขนาดของตาดอกมีความสัมพันธ์กับขนาดของหัว สำหรับการสร้างส่วนประกอบของดอกของวานส์ทิสทั้ง 4 พันธุ์นั้นพบว่า เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและเสร็จสมบูรณ์ในระยะเวลาที่ดอกยังไม่บาน กล่าวคือ มีการสร้างวงกลีบดอก หน่วยสืบพันธุ์เพศผู้และหน่วยสืบพันธุ์เพศเมียเสร็จสิ้นสมบูรณ์ มีเรณูบรรจุอยู่เต็มอับเรณู และรังไข่มีอวูลที่พัฒนาเต็มที่

การทดสอบความมีชีวิตของละอองเรณู พบว่า ละอองเรณูจากดอกที่บ้านได้ 3 วันของทั้ง 7 พันธุ์ แสดงความมีชีวิต สามารถติดสีย้อมและงอกหลอดเรณูได้ มีการงอกค่อนข้างสูง และพบว่า

ช่วงเวลาตั้งแต่ 06.00-10.00 น เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการงอกของเรณู และเมื่อนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C สามารถเก็บรักษาได้นานแตกต่างกัน โดยที่ละอองเรณูของทุกพันธุ์เสียความงอกโดยสิ้นเชิงในเวลา 91-120 วัน ในขณะที่การเก็บที่อุณหภูมิห้อง (28-33°C) ทุกพันธุ์สูญเสียความงอกโดยสิ้นเชิงเมื่อเก็บไว้นาน 15-45 วัน

การติดตามพัฒนาการของเอ็มบริโอภายในเมล็ดลูกผสมนั้นพบว่า เอ็มบริโอฝังตัวอยู่ในเอนโดสเปิร์ม มีใบเลี้ยงใบเดียว มีลักษณะเป็นหลอดอยู่ภายในเมล็ด รากแรกเกิดมีขนาดเล็กและสั้น ส่วนของใบเลี้ยงมียอดอ่อนอยู่ภายใน เมื่อศึกษาการงอกของเมล็ดลูกผสม พบว่า เมล็ดจากฝักแก่ไม่มีระยะพักตัว สามารถงอกได้ภายใน 24-31 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกค่อนข้างสูงคือ 62.31-98.64 เปอร์เซ็นต์

ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้นอกจากจะทำให้ทราบถึงข้อมูลเกี่ยวกับสรีรวิทยาการเจริญเติบโตทางดอกของว่านสี่ทิศที่สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในการวางแผนการผสมพันธุ์ว่านสี่ทิศที่มีระดับพลอยดีแตกต่างกัน การเลือกใช้พันธุ์สำหรับเป็นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ในการผสมช่วงเวลาที่เหมาะสมในการปฏิบัติในขั้นตอนต่างๆ เทคนิคเฉพาะทางในการเื้ออำนวยความสะดวกผสมเกสร และแนวทางในการเพิ่มความเป็นไปได้ในการรักษาฝักอ่อน ตลอดจนต้นอ่อนของกลุ่มผสมต่างพลอยดีให้เติบโตสมบูรณ์แล้ว ยังได้วิธีการในการระบุเอกลักษณ์ในระดับพันธุ์ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นของการปฏิบัติในการปล่อยพันธุ์ลูกผสมออกสู่ตลาดในเชิงการค้าอีกด้วย จึงนับว่าได้บรรลุถึงจุดประสงค์ของการศึกษาทดลองในระดับหนึ่ง