การถ่ายทอดลักษณะและตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับลักษณะดอกเพศผู้เป็นหมันในดาวเรืองอเมริกัน

พันทิภา โพธิ์พันธุ์

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชสวน
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2563

การถ่ายทอดลักษณะและตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับลักษณะดอกเพศผู้เป็นหมันในดาวเรืองอเมริกัน

พันทิภา โพธิ์พันธุ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชสวน
สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การถ่ายทอดลักษณะและตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยง
กับลักษณะดอกเพศผู้เป็นหมันในดาวเรืองอเมริกัน

พันทิภา โพธิ์พันธุ์

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชสวน

พิจารณาเห็นชอบโดย **อาจารย์ที่ปรึกษา**

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก .....
(อาจารย์ ดร.พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(อาจารย์ ดร.ประนอม ยังคำมั่น)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(อาจารย์ ดร.สุเทพ วัชรเวชศฤงคาร)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรนุช เจริญกิจ)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)
รักษาการแทนรองอธิการบดี ปฏิบัติการแทน
อธิการบดีมหาวิทยาลัยแม่โจ้
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ชื่อเรื่อง การถ่ายทอดลักษณะและตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยง กับลักษณะดอกเพศผู้เป็นหมันในดาวเรืองอเมริกัน

ชื่อผู้เขียน นางสาวพันทิภา โพธิ์พันธุ์

ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ ดร.พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาการถ่ายทอดลักษณะและสืบค้นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับยีนที่ควบคุมลักษณะเพศผู้เป็นหมันในดาวเรืองอเมริกัน ได้ปลูกประชากรชั่วที่ 5 ของสายพันธุ์รักษาความเป็นหมันที่ได้จากการผสมระหว่างลักษณะดอกชั้นเดียว (single flower) และดอกเพศผู้เป็นหมัน (apetalous flower) ของพันธุ์ ‘Optiva’ เพื่อสังเกตอัตราส่วนการกระจายตัว ณ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ในฤดูฝนปี 2561 และฤดูแล้งปี 2562 การกระจายตัวของประชากรถูกจำแนกลักษณะดอกชั้นเดียวที่เป็นดอกสมบูรณ์เพศและดอกเพศผู้เป็นหมัน (apetalous flower) จากการสังเกตพบว่า การกระจายของลักษณะดอกมีอัตราส่วน 1:1 ของลักษณะดอกชั้นเดียวและดอกเพศผู้เป็นหมัน มีค่าไคว์สแควร์ 0.399 และ 0.191 ตามลำดับ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าลักษณะเพศผู้เป็นหมันถูกควบคุมโดยพันธุ์แท้ลักษณะด้อย (homozygous recessive gene) และการถ่ายทอดลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันถูกควบคุมด้วยระบบ Genetic Male Sterility (GMS) ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอาร์เอพีดี และเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบเอสเอสอาร์ เพื่อค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมัน โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี 520 เครื่องหมาย และเครื่องหมายเอสเอสอาร์ 36 เครื่องหมาย คัดกรองลักษณะดอกสมบูรณ์เพศและลักษณะดอกเพศผู้เป็นหมันรายต้น พบว่าเครื่องหมายอาร์เอพีดี 14 เครื่องหมาย แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรม (polymorphisms) และเครื่องหมายเอสเอสอาร์ 36 เครื่องหมายไม่สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ถูกนำมาใช้จำแนกดอกสมบูรณ์เพศและดอกเพศผู้เป็นหมันรายต้นของประชากรรักษาความเป็นหมัน แต่อย่างไรก็ตามเครื่องหมายอาร์เอพีดี OPA-01 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถทำซ้ำได้ และมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 700 bps ที่พบในรายต้นของดอกเพศผู้เป็นหมัน นอกจากนี้ เครื่องหมายอาร์เอพีดี OPA-01 เชื่อมโยงกับลักษณะดอกแบบเพศผู้เป็นหมัน (apetalous) และสอดคล้องกับอัลลีลด้อยที่ควบคุมความเป็นหมัน

คำสำคัญ : ดาวเรืองอเมริกัน, การถ่ายทอดลักษณะ, ดอกเพศผู้เป็นหมัน, เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอาร์เอพีดี

Title Inheritance and Investigation of DNA Marker Associated with Gene Controlling Male Sterile in American Marigold (*Tagetes erecta* L.)

Author Miss Phanthipha Phophan

Degree Master of Science in Horticulture

Advisory Committee Chairperson Dr. Pornpan Pooprompan

ABSTRACT

The objetive of this is research was to study the inheritance and investigate the DNA markers associated with genes controlling male sterility in American marigolds (*Tagetes erecta* L.*)*. The maintainer seeds of F_5 population from the cross between single flower plants with male sterility of 'Optivar' variety were grown to observe the segragation ratio at Maejo University during the wet season of 2018 and dry season of 2019. The segragation of maintainer population was into fertile single flower plants and male sterile apetalous flower plants. The observation showed the 1 : 1 ratio between fertile and male sterile plants at Chi-square with a value of 0.399 and 0.191, respectively. The results indicated that male sterility was controlled by single homozygous recessive gene and its inheritance was governed by the genetic male sterility system. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Simple Sequence Repeat (SSR) were used to study the association of genes controlling male sterility. A total of 520 RAPD and 36 SSR markers were used to screen individual fertile and male sterile plants. Fourteen RAPD polymorphic markers and 36 monomorphic SSR markers were found. Polymorphic markers were used to identify individual fertile and male sterile plants. RAPD marker OPA-01 showed reproducible banding pattern and indicated DNA fragment of 700 bps of individual sterile plant. Further more, The RAPD marker OPA-01 had linkage with apetalous flower and corresponded to the recessive alleles controlling the male sterility.

Keywords : American marigold, Inheritance, Apetalous flower, RAPD

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาช่วยเหลือ แนะนำ ให้คำปรึกษา ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่งจาก อาจารย์ ดร.พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่ให้คำปรึกษาแนะนำในการดำเนินการทดลอง ตลอดจนช่วยเหลือสนับสนุนวัสดุอุปกรณ์ รวมทั้งการตรวจสอบแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์จนสำเร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาตราจารย์ ดร. บุญหงษ์ จงคิด ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ประนอม ยังคำมั่น และอาจารย์ ดร.สุเทพ วัชรเวชคฤคาร กรรมการที่ปรึกษาในการให้คำแนะนำ ความรู้ ในการแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตรจารย์ ดร.ราตรี บุญเรืองรอด อาจารย์ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้องค์ความรู้เกี่ยวกับเครื่องหมายโมเลกุล ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ บริษัทโฮมซีด จำกัด ที่อนุเคราะห์สถานที่ทำงานวิจัย ความรู้ด้านการปลูกดูแลรักษาดาวเรือง และสนับสนุนสายพันธุ์ดาวเรืองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ ในด้านต่าง ๆ นำมาใช้ประกอบการศึกษา

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่สนับสนุนทุนการศึกษาวิจัยภายใต้โครงการนำร่อง การพัฒนาบัณฑิตวิจัยนักวิจัยปฏิบัติเพื่ออุตสาหกรรมและธุรกิจอุตสาหกรรม

ท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุก ๆ คนในครอบครัว ผู้สนับสนุนการเรียน อบรมสั่งสอน และเป็นกำลังใจที่สำคัญตลอดมา และขอขอบคุณลุง ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ สาขาพืชสวนประดับทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จ

พันทิภา โพธิ์พันธุ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญภาพ ..... ฌ

บทที่ 1 บทนำ 1

ความสำคัญ 1

ปัญหาของงานวิจัย 2

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

ขอบเขตของงานวิจัย 2

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร 3

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของดาวเรือง 3

การจำแนกดาวเรือง 6

การขยายพันธุ์ การปลูก และการดูแลรักษาดาวเรือง 7

โรคและแมลงศัตรู 8

ตลาดดาวเรือง 10

ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ (Male sterility) 11

ลักษณะการเป็นหมันในดาวเรือง 15

การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม 15

เครื่องหมายดีเอ็นเอ 19
เครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ (simple sequence repeat) 21
เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอาร์เอพีดี (random amplified polymorphic DNA) 22
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ 23
สายพันธุ์ดาวเรืองที่ใช้ในการศึกษา 23
อุปกรณ์ 24
วิธีการ 25
การทดลองที่ 1 การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะดอก 26
การทดลองที่ 2 การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับลักษณะเป็นหมัน 29
สถานที่ทำการทดลอง 31
ระยะเวลาในการทดลอง 31
บทที่ 4 ผลการทดลองและการวิจารณ์ 32
การทดลองที่ 1 การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม 32
การทดลองที่ 2 การสืบค้นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับลักษณะเป็นหมัน 35
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 44
การทดลองที่ 1 การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของยีนควบคุมลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมัน 44
การทดลองที่ 2 การสืบค้นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับลักษณะความเป็นหมัน 44
บรรณานุกรม 45
ประวัติผู้วิจัย 49

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การกระจายตัวของลักษณะดอกสมบูรณ์เพศ และต้นที่มีลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมัน..... 33

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยความสูงต้น (ซม.) และความกว้างทรงพุ่ม (ซม.) ของดาวเรือง อายุ 60 วัน 34

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนของเครื่องหมายโมเลกุลแบบ RAPD และเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR ที่ใช้ในการศึกษานี้..... 35

ตารางที่ 4 แสดงเครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ที่ใช้ในการสืบค้น 36

ตารางที่ 5 แสดงเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างต้นที่มีลักษณะ ดอกสมบูรณ์เพศ และต้นที่มีลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมัน 40

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ลักษณะดอกย่อยของดาวเรือง 4

ภาพที่ 2 ลักษณะดอกดาวเรือง 4 ประเภท 5

ภาพที่ 3 ลักษณะดอกดาวเรืองที่ใช้ในการศึกษา 23

ภาพที่ 4 ต้นกล้าที่เพาะในถาดเพาะ และปลูกทดสอบในโรงเรือนพลาสติก 26

ภาพที่ 5 วิธีแสดงการผสมเกสรของดาวเรืองอเมริกันเพื่อสร้างประชากรรักษาความเป็นหมัน 28

ภาพที่ 6 การคัดกรองลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ 39

ภาพที่ 7 เครื่องหมายแบบ SRAP ที่นำมาตรวจสอบลักษณะ ดอกเพศผู้เป็นหมัน 41

ภาพที่ 8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอรายต้น ต้นดอกเกสรเพศผู้เป็นหมัน (1-10) และต้นดอกสมบูรณ์เพศ (1-10) ของเครื่องหมาย OPA-01 42

ภาพที่ 9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอรายต้น ต้นดอกเกสรเพศผู้เป็นหมัน (11-20) และต้นดอกสมบูรณ์เพศ (11-20) ของเครื่องหมาย OPA-01 43

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญ

ดาวเรือง (*Tagetes spp.*) เป็นไม้ดอกที่คนไทยนิยมปลูกกันมาก เนื่องจากปลูกง่าย ต้นโตเร็ว ออกดอกเร็ว ดอกดก และไม่ต้องดูแลเอาใจใส่มาก (นันทิยา, 2545) ดาวเรือง มีชื่อภาษาท้องถิ่นแตกต่างกันออกไปในแต่ละภาคของประเทศ แต่มีความหมายคล้ายกันโดยที่เรียกตามสี และลักษณะของดอก เช่นทางภาคเหนือเรียกว่า คำปู้จู้ ซึ่งแปลว่า ทอง (วัลลภ, 2541) ประเทศไทยนิยมนำดอกดาวเรืองมาใช้ร้อยพวงมาลัย ปักแจกัน ใช้ในพิธีการในโอกาสต่าง ๆ นอกจากนี้ยังใช้เพื่อประดับตกแต่งสถานที่ และนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมอาหารสัตว์อีกด้วย ดาวเรืองเป็นไม้ดอกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เนื่องจากเป็นไม้ดอกที่ต้นทุนการผลิตต่ำ ให้ผลตอบแทนเร็ว ราคาซื้อขายสูง และสามารถกำหนดระยะเวลาวันตัดดอกตามความต้องการของตลาดได้ อีกทั้งดาวเรืองยังสามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศไทย และปลูกได้ตลอดทั้งปี (สมเพียร, 2532) สำหรับประเทศไทยมีปริมาณการใช้ดาวเรืองเป็นจำนวนมาก ในแต่ละปีเกษตรกรมีความต้องการใช้เมล็ดพันธุ์เป็นจำนวนมาก แต่ราคาเมล็ดพันธุ์ค่อนข้างสูง อีกทั้งผู้ปลูกไม่สามารถเก็บเมล็ดพันธุ์ได้ เพราะเมล็ดที่นำมาปลูกเป็นพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1-hybrid) ถ้าเกษตรกรเก็บเมล็ดไว้ เพื่อใช้ในการปลูกฤดูต่อไป จะทำให้ดาวเรืองมีลักษณะไม่ตรงตามพันธุ์ และเกิดการกระจายพันธุ์ เกิดขึ้น (สายชล, 2531) ซึ่งในการผลิตลูกผสมชั่วที่ 1 นั้น เป็นขั้นตอนที่ยุ่งยากซับซ้อน ลักษณะของดาวเรืองที่ใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ในปัจจุบันนี้ ส่วนใหญ่เป็นดอกซ้อนที่เป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีกลีบดอกซ้อนกันแน่น ทำให้ไม่สามารถผสมตัวเอง หรือผสมข้ามได้ เนื่องจากการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเสียค่าใช้จ่ายสูง และต้องใช้แรงงานจำนวนมากในการผสมเกสร ระบบการใช้ต้นแม่ที่มีเกสรเพศผู้เป็นหมัน จึงน่าจะทำให้ระบบการผลิตเมล็ดพันธุ์ดาวเรืองมีประสิทธิภาพมากขึ้น จึงมีแนวคิดการใช้ระบบเกสรเพศผู้เป็นหมันมาใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม ซึ่งจะเป็นประโยชน์ ต่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมต่อไปในอนาคต

ในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช ในปัจจุบันมีการนำเอาเทคนิคทางด้านชีววิทยาโมเลกุล (molecular biology) มาใช้เพื่อลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ โดยเฉพาะการใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ที่เป็นดีเอ็นเอ (DNA marker) เนื่องจากดีเอ็นเอ มีคุณสมบัติเป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่มีความจำเพาะเจาะจง (สุรินทร์, 2552) ดังนั้นจึงได้ศึกษาการใช้เครื่องหมาย

ดีเอ็นเอเพื่อระบุต้นที่เชื่อมโยงกับลักษณะดอกเกสรเพศผู้เป็นหมัน เพื่อที่จะคัดเลือกให้เป็นสายพันธุ์แม่ ซึ่งจะสามารถลดค่าใช้จ่าย และประหยัดเวลา ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม

ปัญหาของงานวิจัย

ดาวเรืองเป็นไม้ดอกที่มีความต้องการใช้เมล็ดเป็นจำนวนมาก ในแต่ละปีเกษตรกรมีความต้องการใช้เมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวนมาก ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 เป็นขั้นตอนที่เสียค่าใช้จ่ายสูง จึงได้มีการพัฒนาสายพันธุ์แม่ให้มีลักษณะดอกเกสรเพศผู้เป็นหมัน ซึ่งจะง่ายต่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม และสามารถลดต้นทุนการผลิต และประหยัดเวลาในการผสม ทั้งนี้ยังพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ ที่เชื่อมโยงกับลักษณะดอกเกสรเพศผู้เป็นหมันเพื่อใช้ช่วยในการคัดเลือกต้นที่มีลักษณะดอกเกสรเพศผู้เป็นหมัน

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมความเป็นหมัน (male sterile) ในดาวเรืองอเมริกัน
2. เพื่อสืบค้นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับยีนที่ควบคุมความเป็นหมัน (male sterile)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมความเป็นหมัน (male sterile) ในดาวเรืองอเมริกัน และได้เครื่องหมายดีเอ็นที่เชื่อมโยงกับยีนที่ควบคุมความเป็นหมัน (male sterile)

ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมความเป็นหมันในดาวเรืองและตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับลักษณะดอกเพศผู้เป็นหมัน

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ดาวเรืองมีชื่อสามัญว่า Marigold มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Tagetes* spp. อยู่ในวงศ์ Asteraceae มีถิ่นกำเนิดในเม็กซิโก ซึ่งมีการปลูกมานานกว่า 400 ปี และพบในประเทศโมรอกโค โปรตุเกต อิหร่าน อิรัก อินเดีย และปาเลสไตน์ (สุรพล, มปป) ดาวเรืองเป็นพืชที่คนไทยรู้จักกันทั่วไป มีชื่อภาษาท้องถิ่นแตกต่างกันออกไปในแต่ละภาคของประเทศ แต่ละมีความหมายคล้ายกันโดยเรียกตามสี และลักษณะดอก เช่นทางภาคเหนือเรียกคำปู้จู้ หรือคำพู้จู้ ซึ่งแปลว่า ทอง (วัลลภ, 2541) ดาวเรืองมีความหลากหลายชนิด หลายสีดอก และลักษณะการเจริญเติบโต ดาวเรืองมีประโยชน์เป็นไม้ดอกไม้ประดับได้หลายรูปแบบเช่น ไม้ตัดดอก ไม้ประดับ ไม้กระถาง (สมเพียร, 2532) ประโยชน์ของดาวเรืองนอกจากใช้ปลูกเป็นไม้ดอกแล้วยังสามารถใช้ประโยชน์เป็นพืชสีโดยใช้เป็นสีย้อมผ้าตั้งแต่โบราณกาล นอกจากนี้ยังมีผลในการควบคุมปริมาณไส้เดือนฝอยในดินได้อีกด้วย (ประดับพันธ์, 2539)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของดาวเรือง

ดาวเรือง อยู่ในวงศ์ Asteraceae และจัดอยู่ใน Subfamily Tuliforae (Bailey, 1963) เป็นไม้ล้มลุก เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ลำต้นมีลักษณะเป็นไม้เนื้ออ่อน ตั้งตรง แตกกิ่งก้านเป็นพุ่มแน่น มีใบประกอบแบบขนนกปลายคี่ (odd-innate) การเรียงตัวของใบเป็นแบบตรงข้าม (opposite) ดาวเรืองจัดเป็นพืชผสมข้าม ดอกเป็นช่อเดี่ยวประกอบด้วย ดอกย่อยขนาดเล็กจำนวนมาก ดอกย่อยแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ ดอกย่อยชั้นใน (disc floret) ซึ่งเป็นดอกสมบูรณ์เพศ คือมีทั้งเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย และดอกย่อยชั้นนอก (ray floret) (พูลทรัพย์, 2534)

ลำต้น

ดาวเรืองจัดเป็นพรรณไม้ล้มลุกอายุสั้น มีลักษณะเป็นไม้เนื้ออ่อน ลำต้นตั้งตรง แตกกิ่งก้านเป็นพุ่มแน่น ลักษณะทรงต้นมีหลายแบบ ได้แก่ ลำต้นสูง ลำต้นเตี้ย ซึ่งมีความสูงตั้งแต่ 30-90 เซนติเมตร ลำต้นเป็นสีเขียวและเป็นร่องทั้งต้น

ใบ

เป็นใบประกอบแบบขนนกปลายคี่ (odd-pinnate) เรียงตัวแบบตรงข้าม (opposite) ใบย่อยยาวเรียวรูปใบหอก (lanceolate) ตัวใบยาว 4-11 ซม. มีรอยเว้าลึก ถึงก้านใบ หลายรอย คล้ายแบ่งตัวใบออกเป็นใบย่อยหลายใบ

สีดอก

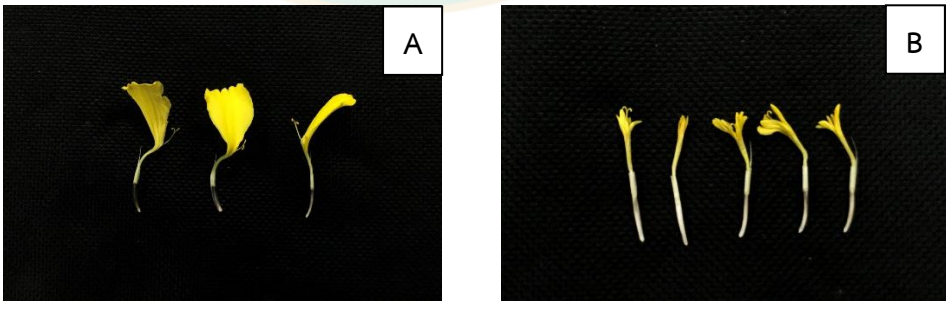
ดอกดาวเรืองมีสี ขาวครีม เหลืองอ่อน เหลือง ทอง ทองเข้ม ส้ม ส้มเข้ม (Bharathi *et al*., 2014)

เมล็ด

เมล็ดมีขนาดค่อนข้างใหญ่เมื่อเทียบกับเมล็ดไม้ดอกชนิดอื่นรูปร่างยาวเรียวและมีหาง สามารถเก็บรักษาได้นาน (นันทิยา, 2545) เมล็ดดาวเรืองส่วนใหญ่เป็นลูกผสมชั่วที่ 1 ดังนั้นเมล็ดในรุ่นถัดไปไม่สามารถเก็บมาขยายพันธุ์ได้ เพราะเมล็ดส่วนใหญ่เป็นหมัน และบางส่วนที่นำไปปลูกจะเกิดการกลายพันธุ์ไม่ได้ลักษณะเดิม (ประดับพันธ์, 2539)

ดอก

ดอกดาวเรืองประกอบด้วยดอกหลายดอกมาอยู่รวมกัน เรียกว่าดอกย่อย (floret) ไม่มีก้านดอก ดอกย่อยมีขนาดเล็กจำนวนมากอยู่รวมกันบนแกนกลาง เป็นช่อดอกที่หดสั้นมากจะแผ่กว้าง ตรงกลางนูนเล็กน้อยคล้ายฐานรองดอกทำให้มองเห็นคล้ายดอกเดี่ยว ดอกย่อยแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ ดอกย่อยชั้นใน (disc floret) มีลักษณะคล้ายกระดิ่งหรือหลอด เป็นดอกสมบูรณ์เพศมีทั้งเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย ส่วนดอกย่อยชั้นนอก (ray floret) มีรูปร่างคล้ายลิ้น ดังแสดงในภาพที่ 1 (A) และ (B)



ภาพที่ 1 ลักษณะดอกย่อยของดาวเรือง

หมายเหตุ A คือ ดอกย่อยชั้นนอก (ray floret)

B คือ ดอกย่อยชั้นใน (disc floret)

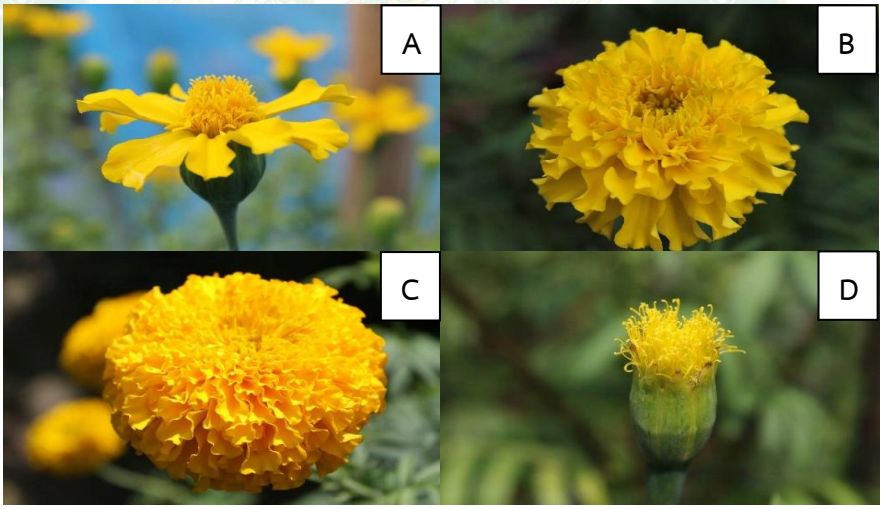
การจำแนกลักษณะดอกดาวเรือง แบ่งได้เป็น 4 ประเภท ดังนี้

1. ดอกชั้นเดียว (single flower) ช่อดอกจะมีดอกย่อยชั้นนอก (ray floret) อยู่เพียง 1-2 ชั้น เป็นดอกสมบูรณ์เพศตรงกลางช่อดอก ส่วนใหญ่จะเป็นดอกย่อยชั้นใน (disc floret) เมื่อมองดูทั้งช่อดอกจะคล้ายดอกดาวกระจาย

2. ดอกกึ่งซ้อน (double flower) ช่อดอกจะมีดอกย่อยชั้นนอก (ray floret) มากกว่า 2 ชั้นขึ้นไป ตรงกลางช่อดอกจะมีดอกย่อยชั้นใน (disc floret) อยู่ เป็นดอกสมบูรณ์เพศ ส่วนใหญ่จะพบดอกประเภทนี้ขึ้นอยู่ตามธรรมชาติ

3. ดอกซ้อน (fully flower) ช่อดอกประเภทนี้จะมีแต่ดอกย่อยที่มีลักษณะเป็น ray floret เท่านั้น เป็นดอกสมบูรณ์เพศ แต่เกสรเพศผู้อยู่ต่ำกว่าเกสรเพศเมีย ลักษณะดอกซ้อนจะมีรูปแบบที่แตกต่างกันออกไปได้แก่ ดอกซ้อนแบบดอกเบญจมาศ (chrysanthemum type) ดอกชนิดนี้มองดูคล้ายกับว่ามีแต่ดอกย่อยชั้นใน ดอกย่อยแต่ละดอกมีลักษณะคล้ายระฆังปลายเป็นแฉก ๆ

4. ดอกที่มีแต่เกสรตัวเมียและไม่มีกลีบดอก (apetalous flower) หรือ ดอกเกสรเพศผู้เป็นหมัน เป็นดอกที่กลีบดอกลดรูปมีแต่เกสรตัวเมีย ดอกดาวเรืองประเภทนี้นักปรับปรุงพันธุ์จะคัดเลือกเอาไว้เป็นสายพันธุ์แม่ (นันทิยา, 2545)



ภาพที่ 2 ลักษณะดอกดาวเรือง 4 ประเภท

หมายเหตุ A คือ ดอกชั้นเดียว (single flower)
B คือ ดอกกึ่งซ้อน (double flower)
C คือ ดอกซ้อน (fully flower)
D คือ ดอกที่มีแต่เกสรตัวเมียและไม่มีกลีบดอก หรือ เกสรเพศผู้เป็นหมัน (apetalous flower)

การจำแนกดาวเรือง

ดาวเรืองเป็นไม้ดอกไม้ประดับที่ได้รับความนิยม มีการศึกษาการปรับปรุงพันธุ์และผสมพันธุ์มาก โดยเฉพาะในอเมริกาที่ให้ความสำคัญต่อการศึกษาในเรื่องนี้ ทำให้ดาวเรืองมีความหลากหลายทั้งชนิด และขนาดของดอก ตลอดจนลักษณะการเจริญเติบโต ในปัจจุบันได้มีการจำแนกดาวเรืองที่พบเห็น และปลูกโดยทั่วไปเป็น 6 ประเภทดังนี้ (สมเพียร, 2532)

1. ดาวเรืองอเมริกา (*Tagetes erecta*) ซึ่งเรียกกันโดยทั่วไปว่า American marigolds หรือ African marigolds มีหลากหลายสายพันธุ์ทั้งพันธุ์เตี้ย พันธุ์กึ่งสูง และพันธุ์สูง มีการเจริญแบบตั้งตรง ลำต้นสูงตั้งแต่ 25-100 เซนติเมตร ดอกมีหลายสี เช่น สีเหลือง สีทอง สีทองเข้ม สีส้ม และสีขาว ลักษณะดอกมีทั้งดอกชั้นเดียว ดอกกึ่งซ้อน ดอกซ้อน ดอกมีขนาดใหญ่ประมาณ 7-10 เซนติเมตร สามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี นิยมนำมาใช้ทำพวงมาลัย

2. ดาวเรืองฝรั่งเศส (*Tagetes patula*) ซึ่งเรียกกันโดยทั่วไปว่า French marigolds เป็นชนิดพันธุ์เตี้ย ดอกเล็ก ต้นเป็นพุ่มเตี้ย ๆ สูงประมาณ 15-30 เซนติเมตร ดอกสีเหลือง ส้ม ทอง น้ำตาลอมแดง และสีแดง ดอกมีขนาดเล็กประมาณ 4 เซนติเมตร นิยมปลูกประดับในแปลง นอกจากนี้ยังเป็นดาวเรืองที่สามารถลดปริมาณไส้เดือนฝอยในดินได้อีกด้วย

3. Triploid marigolds และ Diploid marigolds เป็นลูกผสมของ *Tagetes erecta* ซึ่งมีโครโมโซม 2 ชุด (diploids) กับ *Tagetes patula* มีโครโมโซม 4 ชุด (tetraploids) ลูกผสมที่ได้จะมีโครโมโซม 3 ชุด (triploids) ทำให้ลูกผสมที่ได้มีลักษณะ ออกดอกเร็ว ดอกบานทนนาน และดอกมีขนาดใหญ่กว่าพ่อแม่ การพัฒนาดาวเรืองชนิดนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำลักษณะความแข็งแรง ดอกใหญ่ และมีกลีบซ้อนกันมากของดาวเรืองอเมริกัน มาใช้ประโยชน์รวมเข้ากับลักษณะต้นเตี้ยทรงพุ่มกะทัดรัดของดาวเรืองฝรั่งเศส (อภิชาติ, 2560)

4. *Tagetes tenuifolia pumila* หรือ *Tagetes signata pumila* หรือ เรียกสั้นๆว่า Signet marigolds มีลักษณะพุ่มเตี้ยประมาณ 7-10 นิ้ว ขนาดดอกเล็ก พุ่มมีขนาดใหญ่ ออกดอกดกแต่ขนาดดอกเล็กมาก และมีกลีบดอกชั้นเดียว นิยมปลูกเป็นไม้ขอบแปลงหรือประดับในสวนหิน

5. *Tagetes filifolia* หรือ Foliage marigolds เป็นดาวเรืองใบ มีใบสวยงามมาก มีทรงพุ่มแน่น นิยมปลูกประดับตามขอบแปลง

6. พันธุ์อื่น ๆ ที่นิยมปลูกในต่างประเทศ ได้แก่ *Tagetes minula* (L.) และ *Tagetes glandiflora*. (สุรพล, มปป)

การขยายพันธุ์ การปลูก และการดูแลรักษาดาวเรือง

การขยายพันธุ์ดาวเรืองส่วนใหญ่นิยมใช้เมล็ดพันธุ์ เมื่อเพาะเมล็ด เมล็ดดาวเรืองจะงอกภายใน 3-5 วัน เมล็ดจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วสามารถย้ายปลูกได้ภายใน 7-10 วัน การย้ายปลูกควรทำในตอนเย็น ดาวเรืองเป็นพืชที่ต้องการน้ำปานกลาง ให้น้ำวันละ 1 ครั้ง ในตอนเช้าและในช่วงที่ที่ดอกเริ่มบานไม่ควรรดน้ำให้โดนดอก เพราะจะทำให้คุณภาพดอกไม่ดี และเป็นโรคง่าย (ปรัชญา, 2543)

การปลูกดาวเรือง ควรปลูกที่ระยะห่าง ประมาณ 30-50 เซนติเมตร ระยะห่างระหว่างแถวประมาณ 0.8-1 เมตร สามารถปลูกได้ทั้งแถวเดี่ยว และแถวคู่ ในปัจจุบันส่วนใหญ่นิยมปลูกแบบแถวเดี่ยว เนื่องจากแดดสามารถส่องถึง เก็บดอกได้ง่าย ดอกมีขนาดใหญ่ และสม่ำเสมอกว่าแถวคู่ทั้งนี้ การปลูกแถวคู่ เหมาะสำหรับการปลูกในฤดูหนาว การปลูกแบบแถวเดี่ยวเหมาะสำหรับปลูกในฤดูร้อน และฤดูฝน

การให้ปุ๋ย เมื่อดาวเรืองอายุ 15 และ 25 วันหลังย้ายปลูก ควรใส่ปุ๋ย 16-16-16 และใส่ปุ๋ย 10-26-26 เมื่อดาวเรืองอายุ 35 และ 45 วัน ในการใส่ปุ๋ยให้ฝังลงในแปลงตื้น ๆ ประมาณครึ่งนิ้ว การใส่ปุ๋ยในแต่ละครั้งไม่ควรใส่ซ้ำที่จุดเดิม และทุกครั้งที่ใส่ควรพรวนดินรอบ ๆ แล้วกลบบริเวณโคนต้น รดน้ำทุกครั้งที่มีการใส่ปุ๋ย (ประดับพันธ์, 2539)

การเด็ดยอด โดยทั่วไป หากปลูกดาวเรืองเพื่อตัดดอกจำหน่าย จำเป็นอย่างมากที่ต้องให้ได้จำนวนดอกที่มาก ก้านดอกยาวและแข็งแรง หากปล่อยไว้ โดยไม่ทำการเด็ดยอด ดอกดาวเรืองจะแตกกิ่งก้าน และออกดอกจำนวนมาก แต่ขนาดดอกจะเล็ก ก้านดอกจะสั้น ทำให้ราคาไม่ค่อยดี การเด็ดยอดจึงมีความจำเป็นอย่างมากในการปลูกดาวเรืองเพื่อตัดดอกจำหน่าย เมื่อดาวเรืองมีอายุ 23-25 วัน มีใบจริง 4 คู่ และมีส่วนยอดที่มีใบเล็ก ๆ ใช้นิ้วมือรวบยอดดาวเรืองแล้วปลิออกให้หลุดออกจากส่วนยอด การเด็ดยอดควรเด็ดในตอนเช้า (สมเพียร, 2532)

ปกป้อง และคณะ (2561) ได้แนะนำถึงพันธุ์ที่นำมาปลูกต้องคำนึงถึงสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อสภาพอากกาศในแต่ละช่วง เนื่องจากในแต่ละช่วงฤดูมีความยากง่ายต่อการดูแลต้นดาวเรืองแตกต่างกันไป ได้แก่

1. ฤดูร้อน ดาวเรืองจะเจริญเติบโตช้า ดอกเล็ก ดอกไม่ดก ในฤดูนี้ยังพบการระบาดของเพลี้ยไฟ ไรแดงและหนอนที่สร้างความเสียหายอย่างมากแก่ดาวเรือง หากแหล่งน้ำมีไม่เพียงพอจะทำให้เกิดความเสียหายมากขึ้นด้วย

2. ฤดูฝน เป็นฤดูที่เสี่ยงมากในการปลูกดาวเรืองเพราะว่าในฤดูฝนจะพบการระบาดของโรคเหี่ยวเหลือง เหี่ยวเขียว ใบจุด ดอกเน่า ดอกลาย ต้นเน่าเป็นต้น และยังพบการระบาดของหนอนกัดกินใบ และดอกเป็นจำนวนมาก ทั้งนี้ฝนที่ตกลงมาทำให้กลีบดอกช้ำ และเน่าง่ายอีกด้วย

3. ฤดูหนาว เป็นฤดูที่เหมาะสมแก่การปลูกดาวเรืองมากที่สุด เนื่องจากเป็นฤดูที่อากาศและอุณหภูมิเหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของดาวเรือง แต่ควรระวังการระบาดของ เพลี้ยไฟ และไรแดง

โรคและแมลงศัตรู

โดยทั่วไปดาวเรืองเป็นไม้ดอกที่ปลูกและดูแลง่าย เจริญเติบโตได้ดี แต่การปลูกดาวเรืองในพื้นที่เดิม มักมีปัญหาโรคและแมลงสะสมง่าย โรคและแมลงศัตรูที่พบการเข้าทำลายดาวเรือง ได้แก่

1. โรคเหี่ยวเขียว เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เป็นโรคที่สร้างความเสียหายอย่างมากให้กับดาวเรืองทำให้ต้นดาวเรืองเหี่ยวลู่ลงมาทั้งต้น ในขณะที่ใบยังเขียวอยู่ สามารถแพร่กระจายได้ดีทั้งน้ำและติดไปกับอุปกรณ์ทางการเกษตรต่าง ๆ เช่น กรรไกรตัดกิ่ง การเดินย่ำแปลงที่เป็นโรค เชื้อจะสามารถติดมากับดินที่ติดอยู่ในรองเท้า เมื่อเดินเข้าไปในแปลงที่ไม่เป็นโรคเหี่ยวเชื้อสามารถแพร่กระจายได้ การป้องกันกำจัด หมั่นสำรวจต้นดาวเรืองในแปลงปลูก ถ้ามีต้นแสดงอาการเหี่ยวควรถอนต้นให้ติดรากขึ้นมาและนำออกจากแปลงแล้วนำไปเผาทำลายเพื่อลดการระบาดของเชื้อที่อยู่ในลำต้น ใช้เชื้อจุลลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เช่น บาซิลลัส ซับทิลิส หรือเชื้อราไตรโคเดอร์มา เพื่อช่วยควบคุมเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราในดินได้ (ประดับพันธ์, 2539)

2. โรคเหี่ยวเหลือง เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* จะปรากฏอาการช้ากว่าเชื้อแบคทีเรีย ดาวเรืองมักจะแสดงอาการใบเหลืองร่วมด้วย จะเกิดการชะงักการเจริญเติบโต และใบเหี่ยว โดยระยะแรกจะเหี่ยวชั่วคราว คือจะแสดงอาการใบเหี่ยวเฉพาะช่วงเวลากลางวันที่แดดร้อน พอตอนเช้าจะฟื้นตัว เป็นเช่นนี้ระยะหนึ่ง ต่อมาจะแสดงอาการเหี่ยวอย่างถาวร จะยืนต้นเหี่ยวและแห้งตายในที่สุด เชื้อโรคนี้จะเข้าทำลายในช่วงดาวเรืองสร้างตาดอก การสังเกตบริเวณโคนต้นจะเป็นแผลสีน้ำตาล ถ้าถอนต้นขึ้นมาให้สังเกตที่รากจะมีการเน่าร่วมด้วย ถ้าทำการผ่ากลางต้นดาวเรืองจะพบว่าบริเวณท่อน้ำ ท่ออาหารจะถูกทำลายเป็นแผลสีน้ำตาล การป้องกันกำจัด ควรฉีดพ่นยากันรา เช่น เทอร์ลาคลอร์ พรอนโต-40 แคปแทน โดยฉีดพ่นสัปดาห์ละครั้ง และควรกำจัดต้นที่เป็นโรคทิ้งและต้นบริเวณใกล้เคียงแล้วนำไปเผาทำลาย เพื่อป้องกันการระบาดของโรค (นิรนาม, 2551)

3. โรคใบจุด (leaf spot) เกิดจากเชื้อรา *Alternaria* sp. ใบจะแสดงอาการเป็นจุดสีน้ำตาล โดยจะเริ่มจากใบล่างก่อนเป็นจุดกลม ๆ หรือวงรีคล้ายรูปไข่ จากนั้นแผลจะลุกลาม จุดแผลเป็นสีน้ำตาลล้อมด้วยแผลสีเขียวอมเหลือง ตรงกลางแผลจะยุบและมีสีน้ำตาล ใบจะเริ่มแห้งตรงกลางแผลจะเป็นผงสีน้ำตาลหรือสีดำขึ้นปกคลุมอยู่ สามารถมองเห็นในตอนเช้าช่วงความชื้นสูง โรคนี้สามารถแพร่ระบาดเนื่องจากสปอร์ของเชื้อราจะปลิวไปตามลม แพร่กระจายไปกับน้ำ และสามารถติดไปกับเมล็ดพันธุ์ โรคนี้พบได้ตลอดทั้งปี ซึ่งทำความเสียหายมากในฤดูฝนช่วงที่อากาศมีความชื้นสูง การป้องกันและจำกัด เมื่อพบการระบาดให้เก็บพืชที่เป็นโรคออกเผาทำลาย พ่นด้วยสารในกลุ่ม iprodion สลับกลุ่ม mancozeb หรือฉีดพ่นด้วยแอนทราโคล สลับกับสารกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึม เช่น อมิสตา นูสตาร์ สกอร์ เป็นต้น ฉีดพ่นสารเคมีทุก ๆ ระยะ 5-7 วัน (นิรนาม, 2551)

4. โรคใบหยิก เกิดจากเชื้อไมโครพลาสม่า โรคนี้เกิดขึ้นกับดาวเรืองบางพันธุ์เท่านั้น จะเกิดกับดาวเรืองในระยะการเจริญเติบโตเต็มที่ และเริ่มออกดอกเช่นเดียวกับโรคเหี่ยว แต่โรคนี้จะเกิดขึ้นกับยอดอ่อนก่อน ลักษณะใบจะหยิกม้วน แผ่นใบจะไม่กางเต็มที่ ทำให้ดอกมีขนาดเล็กลงและบางครั้งดอกอาจจะไม่บานเลย วิธีป้องกันและกำจัด คือ หากพบต้นที่เป็นโรคควรถอนทิ้งและเผาทำลาย (ประดับพันธ์, 2539)

5. เพลี้ยไฟ มีขนาดเล็กรูปร่างเรียวยาว ตัวอ่อนและตัวเต็มวัยมีลักษณะคล้ายกัน ตัวเมียจะวางไข่ในเนื้อเยื่อพืช เมื่อฟักเป็นตัวแล้วจะเริ่มดูดกินน้ำเลี้ยงที่บริเวณยอดอ่อน ตาดอก ทำให้ส่วนที่ถูกทำลายเป็นรอยขีด ไม่สามารถออกดอกได้ กลีบเลี้ยงลายและแห้ง ใบบิดเบี้ยวไม่เจริญเติบโต และจะแห้งตายในที่สุด ระบาดมากในฤดูร้อน การป้องกันและกำจัด โดยใช้กาวเหนียว เพื่อลดปริมาณเพลี้ยไฟ หรืออาจฉีดพ่นด้วย คาร์โบซัลแฟน อิมิดาโคลพริด อะบาเม็กติน เป็นต้น (ประดับพันธ์, 2539)

6. หนอนชอนใบ เป็นหนอนแมลงวันขนาดเล็กกัดกินผิวใบ มักเข้าทำลายในระยะใบอ่อน รอยทำลายจะเห็นเป็นทางสีขาว โดยจะสังเกตเห็นเป็นทางเดินของหนอนภายในใบ เล็กใหญ่ตามขนาดของหนอน และระยะการเจริญเติบโตของหนอนใบที่ถูกหนอนเข้าทำลายจะแสดงลักษณะอาการแคระแกร็น บิดเบี้ยว หากปล่อยไว้จะเสียหายมากและจะทำให้โรคใบจุดทวีความรุนแรงมากขึ้น เนื่องจากแผลที่หนอนกัดกินจะทำให้โรคเข้าทำลายได้ง่ายขึ้น สารเคมีที่ใช้ในการกำจัด ได้แก่ คาร์แทป เบตาไซฟลูทริน และ อะบาเม็กติน เป็นต้น (ปกป้อง และคณะ, 2561)

ตลาดดาวเรือง

เนื่องจากดาวเรืองเป็นไม้ดอกที่ปลูกได้ทั่วไป ปลูกได้ทุกภาคของประเทศ และปลูกได้ตลอดทั้งปี พื้นที่ที่ปลูกดาวเรืองที่เป็นการค้าที่สำคัญของประเทศจะอยู่ในเขตจังหวัดบุรีรัมย์ นครราชสีมา ตาก เป็นต้น พื้นที่ปลูกดาวเรืองทั้งประเทศประมาณ 9,500 ไร่ ในแต่ละปี ปริมาณความต้องการเมล็ดพันธุ์ดาวเรืองไม่เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร ซึ่งปริมาณการใช้เมล็ดพันธุ์ประมาณ 80-100 ล้านเมล็ดต่อปี คิดเป็นมูลค่ากว่า 80 ล้านบาท การผลิตดาวเรืองตัดดอกในแต่ละปีไม่น้อยกว่า 1,000 ตัน คิดเป็นมูลค่า 500 กว่าล้านบาท สถานการณ์ราคาดาวเรืองตัดดอก เทศกาลเป็นตัวแปรในการกำหนดราคา รวมถึงสภาพอากาศก็มีอิทธิพลในการกำหนดราคาเช่นกัน โดยดอกดาวเรือง 1 ต้น ตัดดอกได้เฉลี่ย 35 ดอกต่อต้น หากพื้นที่ 1 ไร่ สามารถตัดดอกได้ประมาณ 140,000 ดอก (ปกป้องและคณะ 2561) ต้นทุนนับตั้งแต่เริ่มต้นปลูกจนถึงเก็บเกี่ยวเฉลี่ย 34,498 บาท/ไร่ ส่วนใหญ่ปลูกในช่วงเดือนสิงหาคม–ตุลาคม ระยะเวลาเก็บเกี่ยวช่วงเดือนตุลาคม ให้ผลผลิตเฉลี่ย 979 กก./ไร่ (5-6 หมื่นดอกคละเกรด) ราคาที่เกษตรกรขายได้เฉลี่ย 63 บาท/กก. ผลตอบแทนเฉลี่ย 27,056 บาท/ไร่/รอบการผลิต ซึ่งจะมีพ่อค้าคนกลางมารับซื้อถึงสวนทุกวัน ราคาแยกเป็นเกรดตามขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของดอก ซึ่งเกรด A ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 ซม. ราคาขายอยู่ที่ 1 บาท/ดอก เกรด B ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 - 9 ซม. ราคาขาย 0.6 บาท/ดอก เกรด C ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 - 7 ซม. ราคา 0.5 บาท/ดอก และขนาดเล็ก ราคา 0.3 - 0.25 บาท/ดอก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรที่ 3 จังหวัดอุดรธานี, 2562)

สถานการณ์ตลาดดาวเรืองในช่วง 1-2 ปีมานี้มีแนวโน้มไปในทิศทางที่ดี สถานการณ์การซื้อขายนี้มีแนวโน้มไปในทิศทางที่ดี มีความคึกคักอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากอยู่ในช่วงของเทศกาลสำคัญ เช่น เทศกาลส่งท้ายปีเก่าต้อนรับปีใหม่ ตรุษจีน สงกรานต์ วันลอยกระทง และวันพระสำคัญ ๆ เป็นต้น (ปกป้อง และคณะ, 2561)

ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ (Male sterility)

นพพร (2546) ได้กล่าวว่าความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ คือสภาวะที่การพัฒนาของละอองเรณูผิดปกติจนไม่สามารถทำหน้าที่ได้หรือปล่อยละอองเกสร (pollen) ได้ตามปกติ พบได้ในธรรมชาติและเกิดได้หลากหลายแบบ เช่น ชนิดที่ไม่มีละอองเรณูเลย หรือสร้างละอองเรณูที่มีลักษณะผิดปกติ หรือ อับละอองเรณูไม่ยอมแตก ทำให้ละอองเรณูไม่สามรถออกมาได้ และชนิดที่เกสรเพศผู้ไม่พัฒนา ซึ่งอาจเกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรม หรืออาจเกิดจากความผิดปกติของโครโมโซม (chromosome aberration) เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนในกลุ่มยีนที่ควบคุมการพัฒนาละอองเกสร การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมียในพืชพบว่าถูกควบคุมด้วยยีนภายในนิวเคลียส (nuclear genes) การกลายพันธุ์ของยีนอาจเกิดจากการผสมภายในหรือระหว่างชนิดของพืช (intra and interspecific hybridization) ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม รังสีต่าง ๆ พันธุวิศวกรรม และสารเคมี ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของยีนที่ควบคุมการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ลักษณะนี้อาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติเกิดในจำพวกไม้ป่า ทำให้พืชนั้นเป็นพืชผสมข้ามต้น และเป็นพืชดอกแยกเพศที่อยู่ต่างต้น (dioecious plant) สภาพความเป็นหมันแต่ละชนิด พบว่าระยะที่เกสรตัวผู้ฝ่อแตกต่างกัน ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้มีประโยชน์ต่องานปรับปรุงพันธุ์ในด้านการผลิตลูกผสมชั่วที่หนึ่งเป็นการค้า เพราะเป็นการลดต้นทุนการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม ปราโมทย์ (2540) ได้กล่าวว่าลักษณะเพศผู้เป็นหมันจะเกิดขึ้นเป็นบางครั้ง ในประชากรพืชผสมตัวเองและพืชผสมข้าม โดยพิจารณาจากสาเหตุการเกิดลักษณะเพศผู้เป็นหมัน ได้ 3 สาเหตุ คือ

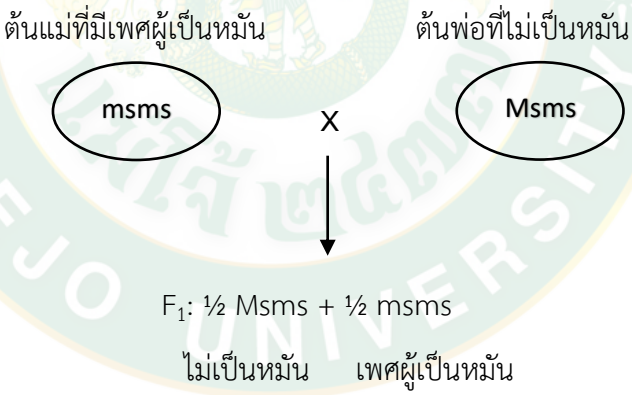
1. Pollen Sterility คือ ลักษณะละอองเกสรมีความผิดปกติ หรือละอองเกสรที่มีชีวิตมีปริมาณน้อย ไม่เพียงพอต่อการผสมเกสร เนื่องจากการกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (microsporogenesis) มีความผิดปกติ ของเนื้อเยื่อชั้นในของอับเรณู (anther) ซึ่งลักษณะละอองเกสรนี้มีความสำคัญอย่างมากต่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม

2. Functional male sterility คือ ลักษณะละอองเกสรมีความปกติแต่ถูกเก็บไว้ในอับละอองเรณูที่ไม่ยอมแตก ทำให้ละอองเรณูไม่สามารถออกมาผสมเกสรได้

3. Structural หรือ Staminal male sterility คือ เกสรเพศผู้ (Stamen) มีลักษณะผิดปกติหรือไม่สามารถทำหน้าที่ได้

ในปัจจุบันวิธีการนี้ได้นำมาใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมใน พริก มะเขือเทศ แตงโมง เป็นต้น ข้อจำกัดในการใช้ลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างยีนในนิวเคลียส และยีนในไซโตพลาสซึม เนื่องจากการควบคุมการแสดงออกของลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันที่ถูกควบคุมโดยยีนแล้วยังมีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย ประดิษฐ์ (2546) ได้รายงานว่าลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันถูกควบคุมด้วยยีน 3 ชนิดคือ

1. ลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันถูกควบคุมด้วยยีนในนิวเคลียส (Genetic male sterility; GMS) ลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันถูกควบคุมด้วยยีนด้อยเพียงคู่เดียว (single recessive gene : ms) ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในนิวเคลียส อยู่ในสภาพที่เป็นพันธุ์แท้มีจีโนไทป์ msms จะทำให้เกิดลักษณะดอกเพศผู้เป็นหมัน พบในพริก มะเขือเทศ แตงโม เป็นต้น พืชที่มีความเป็นหมันชนิดนี้ หากนำมาเป็นต้นแม่ที่มีเกสรเพศผู้เป็นหมัน (msms) มาผสมกับต้นพ่อที่ไม่เป็นหมันที่มีจีโนไทป์ Msms ลูกผสมที่เกิดขึ้นจะมีอัตราส่วนต้นที่มีดอกเพศผู้เป็นหมัน (sterile plant) ต่อต้นที่มีเกสรปกติ (fertile plant) จะเท่ากับ 1:1

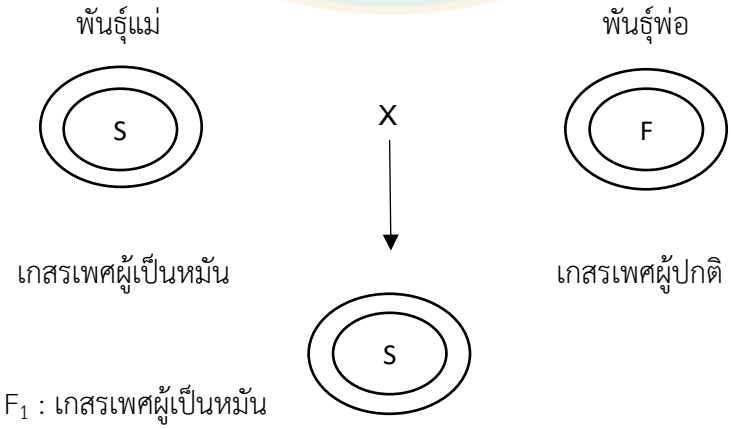


นพพร (2546) ได้รายงานว่าลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันแบบนี้ สามารถนำไปใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมโดยการใช้พันธุ์แม่เป็นตัวถ่ายลักษณะนี้ แล้วนำละอองเกสรของสายพันธุ์พ่อมาผสม ทั้งนี้สายพันธุ์พ่อที่มีเกสรเพศผู้ปกติอาจมีจีโนไทป์ 2 แบบ คือ MsMs และ Msms หากต้นพ่อมีจีโนไทป์ MsMs ลูกที่ได้จะมีลักษณะเกสรปกติทั้งหมด แต่ถ้าหากสายพันธุ์พ่อมีจีโนไทป์ Msms ลูกที่ได้จะมีลักษณะเกสรปกติครึ่งหนึ่งและเกสรเพศผู้เป็นหมันครึ่งหนึ่ง

นพพร (2546) กล่าวว่าในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมแม้จะใช้ลักษณะความเป็นหมันนี้ช่วยได้ ซึ่งต้องมีสิ่งอื่นประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ การรักษาเพศผู้เป็นหมัน (สายพันธุ์แม่) การคัดเลือกสาย

พันธุ์พ่อ และการผสมพันธุ์ การรักษาสายพันธุ์แม่ โดยนำพันธุ์เกสรเพศผู้เป็นหมันมาผสมกับพันธุ์พ่อที่เกสรปกติ ซึ่งพ่อพันธุ์อาจมีจีโนไทป์ได้ 2 แบบคือ MsMs และ Msms หากสายพันธุ์พ่อที่นำมาผสมเป็น MsMs ลูกผสมที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะปกติทั้งหมดซึ่งไม่ตรงตามต้องการ จะต้องใช้สายพันธุ์พ่อที่เป็น Msms ซึ่งจะให้ลูกที่ตรงตามความต้องการครึ่งหนึ่ง และจะมีลักษณะเหมือนต้นพ่ออีกครึ่งหนึ่ง เป็นสาเหตุให้เกิดการปะปนอยู่กับเมล็ด F_1 ในแปลงเดียวกัน การคัดเลือกสายพันธุ์พ่อที่จะนำมาเป็นพ่อพันธุ์ในการผลิตลูกผสมก็มีลักษณะเช่นเดียวกันจะต้องเลือกต้นที่มียีนควบคุมความเป็นหมันในสภาพโฮโมไซกัส (homozygous) ซึ่งเป็นต้นที่ให้ลูกเหมือนกันเมื่อนำมาผสมตัวเอง ส่วนต้นที่เป็นเฮทเทอโรไซกัส (heterozygous) เมื่อนำมาผสมตัวเองจะเกิดการกระจายตัวของลักษณะในรุ่นลูก

2. ลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันถูกควบคุมโดยลักษณะพันธุกรรมที่อยู่ในไซโตพลาซึม (Cytoplasmic male sterility; CMS) คือลักษณะเพศผู้เป็นหมันเนื่องจากถูกควบคุมโดยลักษณะพันธุกรรมที่อยู่ในไซโตพลาซึม (cytoplasm) (บุญหงษ์, 2548) ซึ่งแทนด้วยสัญลักษณ์ S (sterile) และ F (fertile) โดยที่ S แสดงลักษณะการเป็นหมัน และ F แสดงลักษณะไม่เป็นหมันในการผสมพันธุ์ระหว่างต้นที่เป็นหมัน และต้นที่ไม่เป็นหมัน ได้ลูกผสมชั่วที่ 1 พบว่าลูกผสมที่ได้จะมีลักษณะเป็นหมันเหมือนต้นแม่ทั้งหมด เนื่องจากเซลล์เชื้อต้นแม่ทุกเซลล์จะมี ไซโตพลาสซึมที่มีเชื้อพันธุกรรมความเป็นหมันติดไปด้วย ซึ่งสามารถถ่ายทอดจากต้นแม่สู่ลูกผสมเท่านั้น (สุทัศน์, 2528) ความเป็นหมันแบบนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตลูกผสมโดยเฉพาะพืชที่ขยายพันธุ์โดยไม่ใช้เมล็ด และไม่ใช้ผลผลิตเมล็ด และใช้ในการผลิตพืชที่ต้องการให้ดอกบานทนยาวนาน เนื่องจากเมื่อดอกไม่ได้รับการผสม กลีบดอกจะยังคงสดใสไม่เหี่ยวเร็ว (นพพร, 2546)



3. ลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันที่ควบคุมด้วยยีนในไซโตพลาซึมและนิวเคลียส (Cytoplasmic genetic male sterility; C-GMS) คือลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันที่ถูกควบคุมด้วยยีนในไซโตพลาสซึม และมียีนแก้ความเป็นหมันอยู่ในนิวเคลียสที่เรียกว่า restorer gene โดยใช้สัญลักษณ์ Rf และ rf โดยยีนเด่น Rf สามารถแก้ความเป็นหมันที่เกิดจากยีน S ในไซโตพลาสซึม การแสดงออกความเป็นหมันของเกสรเพศผู้เป็นหมันตามลักษณะพันธุกรรมดังนี้

1. ต้นที่เกสรเพศผู้เป็นหมัน จะมีจีโนไทป์ S(rf rf)

2. ต้นที่เกสรเพศผู้ปกติ จะมีจีโนไทป์ S(Rf Rf), F(Rf Rf), S(Rf rf), F(Rf rf) หรือ F(rf rf)

หากพิจารณาพันธุกรรมตามรูปแบบของเมนเดลจะเห็นได้ว่า F ข่ม rf ส่วน Rf ข่ม rf และ S แต่ถ้าพิจารณาจากรูปแบบหลักพันธุศาสตร์โมเลกุล ยีนทั้ง 2 ชุด อยู่กันคนละจีโนม (genomes) หรือบนโครโมโซมต่างชุดกัน แต่ทำหน้าที่เหมือนเป็นยีนตัวเดียวกัน (duplicate gene) ซึ่งพืชจะแสดงลักษณะปกติ ถ้ามี F หรือ Rf ตัวใดตัวหนึ่งอยู่ ดังนั้น F และ Rf มีลักษณะคล้ายเป็นยีนที่เหมือนกันทำหน้าที่แบบเดียวกัน ส่วน S และ rf เป็นยีนด้อย ที่ไม่ทำงานหรือทำงานผิดปกติ การผสมพันธุ์ระหว่างต้นแม่ที่มีลักษณะเพศผู้เป็นหมันกับต้นพ่อปกติที่มียีนไซโตพลาซึมและยีนในนิวเคลียสต่างๆ ทำให้ได้ลูกผสมดังนี้

เกสรเพศผู้เป็นหมัน	**เกสรเพศผู้ปกติ**		**ลูกผสมชั่วที่หนึ่ง**
	F(rf rf)	→	S(rf rf) เกสรเพศผู้เป็นหมัน
S(rf rf)	F/S(Rf Rf)	→	S(Rf rf) เกสรเพศผู้ปกติ
	F/S(Rf rf)	→	½ S(Rf rf) : ½ S(rf rf)
			เกสรเพศผู้ปกติ เกสรเพศผู้เป็นหมัน

นพพร (2546) กล่าวถึงลักษณะความเป็นหมันนี้ได้เข้ามามีบทบาทอย่างมากในการผลิตลูกผสม (F_1 hybrid) เนื่องจากนำมาใช้ประโยชน์ในการผสมพันธุ์ เพื่อการคัดเลือกพันธุ์ใหม่ และมีผู้นำมาใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเป็นการค้าอย่างกว้างขวาง ทั้งนี้เพราะช่วยในการประหยัดเวลาและแรงงานในการกำจัดเกสรเพศผู้ของสายพันธุ์แม่ทิ้งจึงทำให้ต้นทุนในการผลิตลูกผสมลดลงอย่างมาก โดยเฉพาะลักษณะเพศผู้เป็นหมันที่ถูกควบคุมด้วยยีนในไซโตพลาสซึม และยีนที่อยู่ในนิวเคลียส (Cytoplasmic genetic male sterility) ในข้าวโพดเป็นต้น (บุญหงษ์, 2548)

ลักษณะการเป็นหมันในดาวเรือง

ลักษณะของความเป็นหมันในดาวเรืองเรียกว่า Femina ถูกตรวจพบโดย (Towner, 1961) ความเกี่ยวข้องของความเป็นหมันของเพศผู้ เกิดจากการลิงเกจ หรือ ยีนตำแหน่งหนึ่งมีผลในการควบคุมลักษณะมากกว่าหนึ่งลักษณะ (pleiotropy) ภายหลังเมล็ดได้รับการฉายรังสีพบว่า ลักษณะดอกสมบูรณ์เพศเกิดการกลายพันธุ์เป็นดอกเพศเมียที่เกสรตัวผู้ไม่พัฒนา (Bolz, 1961) ซึ่งสภาพความผิดปกตินี้ถูกควบคุมโดย ยีนด้อย (recessive gene) Goldsmith (1968) ได้รายงานว่าพบลักษณะความเป็นหมันในดาวเรืองในการกระจายตัวของรุ่น M2 หลังการได้รับสาร ethyl methane sulphonate (EMS) 0.2% พบว่าสภาพความเป็นหมันถูกควบคุมโดย ยีนที่ชื่อว่า ms การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในเพศผู้ การแบ่งตัวดำเนินไปตามปกติจนกว่าขั้นตอน ปลดปล่อย microspore หลังจากนั้น microspore เกิดการเสื่อมสภาพ ซึ่งทำให้กลีบดอก (tapetal) ไม่พัฒนา นอกจากนี้ยังพบความเป็นหมันที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ซึ่งพืชจะมีลักษณะเตี้ยแคระ และออกดอกเร็ว (Kaul, 1988)

การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม

การถ่ายทอดลักษณะเป็นการนำลักษณะต่าง ๆ ทางพันธุกรรมจากพ่อแม่ไปยังรุ่นลูก ซึ่งลักษณะทางพันธุกรรมของพืชนั้นสามารถแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะคือ

1. ลักษณะทางคุณภาพ (qualitative characteristic) หมายถึงลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนน้อยคู่ ยีนแต่ละตัวมีความสามารถแสดงลักษณะที่ควบคุมอยู่ได้อย่างชัดเจน (major gene) ลักษณะการกระจายตัวของรุ่นลูกสามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน และสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการแสดงออกลักษณะเหล่านี้ได้น้อย เช่น ลักษณะ สีเมล็ด ความสูง เป็นต้น

2. ลักษณะทางปริมาณ (quantitative characteristic) หมายถึงลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนมากคู่ ยีนแต่ละตัวมีความสามารถแสดงลักษณะที่ควบคุมออกมาได้น้อย (minor gene) ลักษณะการกระจายตัวของรุ่นลูกไม่สามารถแยกออกเป็นหมวดหมู่ได้ชัดเจน เพราะมีลักษณะที่คาบเกี่ยวระหว่างลักษณะเด่นและลักษณะด้อย มีการกระจายตัวของลักษณะต่าง ๆ อย่างต่อเนื่อง และสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลมากต่อการแสดงออกทางลักษณะ เช่น ผลผลิต อายุการออกดอก ขนาดผล น้ำหนักผล เป็นต้น

ปฏิกิริยาของยีน (gene interaction)

สุทัศน์ (2552) ได้กล่าวว่าการถ่ายทอดทางพันธุกรรมเมื่อมียีนที่เกี่ยวข้องกัน 2 คู่ โดยใช้กฎการแยกและการรวมตัวกันของยีน ทำให้สัดส่วนหรืออัตราส่วนลูกชั่วที่ 2 จาก dihybrid cross อัตราส่วนที่ได้ 9 : 3 : 3 : 1 นั้นไม่เสมอไป หรืออาจเกิดปฏิกิริยาระหว่างยีนต่างคู่ (non-allelic genes) ทำให้สัดส่วนผิดแปลกออกไป ลักษณะปฏิกิริยาของยีนต่างคู่นั้น อาจถือเป็น epistasis นั้นเองและมีหลายลักษณะ ดังนี้

1. Complementary action เป็นลักษณะที่ยีนต่างคู่กันให้ผลแสดงออกในลักษณะเดียวกัน โดยสนับสนุนซึ่งกันและกัน จะมีอัตราส่วนเป็น 9 : 7

2. Modifying action เป็นลักษณะที่ยีนตัวหนึ่งจะแสดงลักษณะออกมาได้ ต้องมียีนอีกตัวหนึ่งซึ่งอยู่ต่างคู่กันจึงจะแสดงลักษณะ จะมีอัตราส่วนเป็น 9 : 3 : 4

3. Inhibiting action ยีนตัวหนึ่งบังคับไม่ให้ยีนอีกตัวหนึ่งที่อยู่ต่างคู่กันแสดงออก จะมีอัตราส่วนเป็น 13 : 3

4. Masking action ยีนตัวหนึ่งอาจซ่อนลักษณะการแสดงออกของยีนอีกตัวหนึ่งซึ่งอยู่ต่างคู่กัน จะมีอัตราส่วนเป็น 12 : 3 :1

5. Duplicate action ถ้ามียีนอยู่ 2 คู่ ซึ่งควบคุม การแสดงออกของลักษณะเดียวกันแม้มียีนตัวใดตัวหนึ่งก็จะแสดงออกลักษณะนั้น ๆ ได้เหมือนกับมียีนอยู่ทั้ง 2 ตัว จะมีอัตราส่วนเป็น 15 : 1

6. Additive effect ยีน 2 ตัวที่อยู่ต่างคู่กันอาจแสดงออกในลักษณะเดียวกัน ความเข้มข้นของลักษณะนั้นขึ้นอยู่กับจำนวนยีนข่ม จะมีอัตราส่วนเป็น 9 : 6 : 1

ชยพร (2544) รายงานว่า การทำงานของยีนที่แสดงออกเป็นฟีโนไทป์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะการทำงานคือ การทำงานร่วมกันของยีนภายในตำแหน่ง (locus) เดียวกัน และ การทำงานร่วมกันของยีนต่างตำแหน่งที่ควบคุมลักษณะเดียวกันดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. การทำงานร่วมกันของยีนภายในตำแหน่ง (locus) เดียวกัน แบ่งออกเป็น 2 แบบ ได้แก่

1.1.ปฏิกิริยาการทำงานแบบบวกสะสม (additive gene action) การแสดงออกของฟีโนไทป์ขึ้นอยู่กับจำนวนอัลลีลบวกหรืออัลลีลเด่น อัลลีลบวกแต่ละตัวจะเพิ่มค่าได้เท่า ๆ กัน

1.2.ปฏิกิริยาการทำงานแบบไม่เป็นแบบสะสม (non-additive gene action) แบ่งออกเป็น 4 ชนิด ได้แก่

1.2.1 ปฏิกิริยาการข่มสมบูรณ์ (complete dominance) หมายถึง ยีนเด่น (dominance allele) มีการข่มอย่างสมบูรณ์ต่อยีนด้อย (recessive allele) ทำให้สายพันธุ์แท้ที่มียีนเด่นทั้งหมด (homozygous dominant genotype) และสายพันธุ์ทาง (heterozygous genotype) มีลักษณะที่ปรากฏหรือฟีโนไทป์ (phenotype) เป็นไปตามของยีนที่ข่มนั้นทุกอย่าง

1.2.2 ปฏิกิริยาการข่มไม่สมบูรณ์ (incomplete dominant) หมายถึงยีนเด่นมีการข่มอย่างไม่สมบูรณ์ต่อยีนด้อย ทำให้สายพันธุ์ทางแสดงลักษณะที่ปรากฏค่อนไปทางสายพันธุ์แท้ที่มียีนเด่นทั้งหมด (homozygous dominant genotype)

1.2.3 ปฏิกิริยาที่ไม่มีการข่มหรือปฏิกิริยาแบบผลบวก (no dominant or intermediate) หมายถึง การข่มกันอย่างไม่ลงของคู่ยีนทั้งสองคู่ทำให้สายพันธุ์ทาง มีลักษณะกึ่งกลางระหว่างสายพันธุ์แท้ของพ่อและแม่

1.2.4 ปฏิกิริยาข่มเกิน (over dominance) เป็นลักษณะการข่มเกินโดยที่สายพันธุ์ทางแสดงลักษณะที่ปรากฏเหนือกว่าลักษณะที่ปรากฏของทั้งพ่อและแม่

1.2.5 ปฏิกิริยาการแสดงออกร่วมกัน (co-dominance) เป็นลักษณะที่แสดงออกร่วมกันของยีนแต่ละตัว โดยไม่มีการข่มร่วมกัน อัตราส่วนจีโนไทป์และฟีโนไทป์เป็น 1 : 1

2. การทำงานร่วมกันของยีนต่างตำแหน่งที่ควบคุมลักษณะเดียวกัน แบ่งออกเป็น 2 แบบได้แก่

2.1 ปฏิกิริยาการทำงานแบบบวกสะสม (additive gene action) การทำงานของยีนที่เป็นแบบบวกสะสมของยีนหลายตำแหน่งที่ควบคุมลักษณะเดียวกัน ยีนแต่ละตัวทำงานเป็นอิสระต่อกัน การแสดงออกของยีนแต่ละตัวไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนตัวอื่น ๆ และการแสดงออกของยีนแต่ละตัวมารวมกันเป็นฟีโนไทป์

2.2 ปฏิกิริยาการทำงานไม่เป็นแบบบวกสะสม (non-additive gene action) เป็นลักษณะที่ควบคุมด้วยยีนหลายตัวและแต่ละตัวไม่เป็นอิสระต่อกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาในระหว่างกลุ่มของยีนที่แสดงลักษณะนั้น ๆ และสภาพแวดล้อม กลุ่มของยีนด้อยที่ควบคุมลักษณะปริมาณเหล่านี้เรียกว่าโพลียีน (poly genes)

2.2.1 ปฏิกิริยาการข่มของยีนต่างตำแหน่ง (epistasis) คือ อัลลีลในตำแหน่งหนึ่งบดบังการแสดงออกของอัลลีลอีกตำแหน่งหนึ่งที่ควบคุมลักษณะเดียวกัน ปฏิกิริยาการข่มข้ามคู่ที่เกี่ยวข้องกับยีน 2 คู่ ซึ่งควบคุมลักษณะเดียวกัน ยีนทั้งสองคู่อยู่บนโครโมโซมคนละคู่จึงทำให้การถ่ายทอดของยีนทั้งสองคู่เป็นอิสระต่อกัน แต่การทำงานไม่เป็นอิสระต่อกัน โดยการทำงานของยีน

ภายในตำแหน่งเดียวกันของยีนแต่ละคู่เป็นแบบข่มสมบูรณ์ และการทำงานของยีนทั้งสองคู่ไม่มีความเป็นอิสระต่อกันเพราะมีการข่มข้ามคู่ จึงทำให้อัตราส่วนฟีโนไทป์ของลูกชั่วที่สองไม่เป็น 9 : 3 : 3 : 1 ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงไปขึ้นกับชนิดของการข่มข้ามคู่ แบ่งได้ 5 ชนิด ได้แก่

2.2.1.1 อัลลีลเด่นของยีนในตำแหน่งหนึ่งข่มข้ามคู่ (dominance epistasis) การข่มข้ามคู่แบบนี้เกิดจากอัลลีลเด่นของยีนในตำแหน่งแรกสามารถข่มการแสดงออกของอัลลีลอื่น ๆ ของยีนในตำแหน่งที่ 2 ทำให้อัตราส่วนฟีโนไทป์ของลูกชั่วที่สองเปลี่ยนจาก 9 : 3 : 3 : 1 เป็น 12 : 3 : 1

2.2.1.2 อัลลีลด้อยของยีนในตำแหน่งหนึ่งข่มข้ามคู่ (recessive epistasis) การข่มข้ามคู่กรณีนี้ อัลลีลด้อยของยีนในตำแหน่งแรกข่มการแสดงออกของอัลลีลอื่น ๆ ของยีน ในตำแหน่งที่ 2 ทำให้อัตราส่วนฟีโนไทป์ของลูกชั่วที่สองเปลี่ยนไปจาก 9 : 3 : 3 : 1 เป็น 9 : 3 : 4

2.2.1.3 อัลลีลเด่นของยีนทั้งสองตำแหน่งข่มข้ามคู่ (duplicate dominant epistasis) อัลลีลเด่นของยีนแต่ละตำแหน่งสามารถข่มการแสดงออกของยีนต่างคู่ คือ A เป็นอัลลีลเด่น ของยีนคู่ที่หนึ่งคือมีจีโนไทป์ AA หรือ Aa ข่มการแสดงออกของอัลลีล B และ b ซึ่งเป็นยีนคู่ที่ 2 และในขณะเดียวกันอัลลีลเด่น B ของยีนคู่ที่ 2 ซึ่งมีจีโนไทป์เป็น BB หรือ Bb สามารถข่มการแสดงออกของอัลลีล A และ a ทำให้อัตราส่วนฟีโนไทป์ของลูกชั่วที่สองเปลี่ยนไปจาก 9 : 3 : 3 : 1 เป็น 15 : 1

2.2.1.4 อัลลีลด้อยของยีนทั้งสองตำแหน่งข่มข้ามคู่ (duplicate recessive epistasis) อัลลีลด้อยของยีนทั้ง 2 ตำแหน่ง สามารถข่มการแสดงออกของยีนต่างตำแหน่ง นั้นคือ a เป็นอัลลีลด้อย ของยีนคู่แรกข่มการทำงานของอัลลีล B และ b ในขณะเดียวกันอัลลีลด้อยของยีนคู่ที่ 2 คือ b ข่มการทำงานของอัลลีล A และ a ทำให้อัตราส่วนฟีโนไทป์ของลูกชั่วที่สองเปลี่ยนไปจาก 9 : 3 : 3 : 1 เป็น 9 : 7

2.2.1.5 อัลลีลเด่นของยีนในตำแหน่งหนึ่งและอัลลีลด้อยของยีนในอีกตำแหน่งหนึ่งข่มข้ามคู่ (dominant and recessive epistasis) อัลลีลเด่นในยีนตำแหน่งแรกข่มการแสดงออกของยีนตำแหน่งที่ 2 และอัลลีลด้อยของยีนในตำแหน่งที่ 2 ข่มการแสดงออกของยีนตำแหน่งแรกทำให้อัตราส่วนฟีโนไทป์ของลูกชั่วที่สองเปลี่ยนไปจาก 9 : 3 : 3 : 1 เป็น 13 : 3

เครื่องหมายดีเอ็นเอ

สุรินทร์ (2543) ได้กล่าวถึงเครื่องหมายดีเอ็นเอ คือ ลำดับเบสช่วงหนึ่งบนโครโมโซมซึ่งสามารถบ่งบอกตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งบนโครโมโซมที่ตรวจสอบได้ และมีการถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ ซึ่งยังเป็นตัวบ่งชี้ที่มีความจำเพาะเจาะจง ในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้นำเอาเครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นเครื่องบ่งชี้ลักษณะทางด้านพันธุกรรม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกให้สูงขึ้นซึ่งเครื่องหมายที่ใช้แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) เป็นตัวบ่งชี้ทางสรีรวิทยาที่ปรากฏโดยทั่วไปสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า เช่น ความสูงต้น สีดอก ใบ เป็นต้น เครื่องหมายทางพันธุกรรมประเภทนี้ จัดว่าเป็นเครื่องหมายที่มีความต้องการมากในด้านปรับปรุงพันธุ์พืช และมีข้อได้เปรียบคือไม่จำเป็นต้องใช้วิธีการใดมาตรวจสอบ เพราะสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า แต่เครื่องหมายนี้มีข้อจำกัดมากเช่นกัน เนื่องจากมีจำนวนจำกัดและที่สำคัญการแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยานี้ได้รับผลกระทบจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง

2. เครื่องหมายทางชีวเคมี (biochemical marker) คือการใช้โมเลกุลทางชีวเคมีเป็นตัวระบุความแตกต่างของพืชที่ศึกษา เช่น ไอโซไซม์ (isozyme) หรือโปรตีน แต่เครื่องหมายประเภทนี้มีข้อจำกัดที่การแสดงออกของเอนไซม์ ที่ได้รับผลกระทบจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไป และระยะการเจริญเติบโตของพืช

3. เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) คือการใช้ดีเอ็นเอ (DNA) เป็นเครื่องหมายเพื่อทำการตรวจสอบถึงความแตกต่างระดับยีน (gene) เนื่องจากมีความถูกต้องแม่นยำ และมีความจำเพาะเจาะจงมากกว่าเครื่องหมายประเภทอื่น ๆ

ในการปรับปรุงพันธุ์ระดับโมเลกุล (molecular breeding) นี้เป็นการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) เพื่อศึกษาลักษณะที่สนใจในระดับยีน ร่วมกับวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อลดขั้นตอนและระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection, MAS) หรือเครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการผสมกลับ (marker assisted backcross, MAB) ประกอบกับปัจจุบันความก้าวหน้าของเทคโนโลยีชีวภาพ ที่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุ์พืชที่เป็นประโยชน์ใหม่ๆ ได้อย่างรวดเร็ว (สมวงษ์, 2543) ในอดีตนักปรับปรุงพันธุ์พืช ส่วนใหญ่จะศึกษาเฉพาะลักษณะภายนอกที่ปรากฏหรือลักษณะแสดงออก (phenotype) และศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ด้วยวิธีแบบดั้งเดิม ซึ่งยังไม่มีการศึกษา

ทางด้านชีววิทยาโมเลกุล แต่ในปัจจุบันความรู้ทางทางชีวโมเลกุลมีความก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว และมีบทบาทด้านสาขาวิชาต่าง ๆ เช่น การใช้เทคโนโลยีทางชีวภาพ และพันธุวิศวกรรม เพื่อการปรับปรุงพันธุกรรมพืชและสัตว์ (สุรินทร์, 2552) โดยมีการวิเคราะห์ระดับดีเอ็นเอ (DNA) คือการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ทำให้การวิเคราะห์เป็นไปอย่างรวดเร็ว เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งมีเท่ากันในทุก ๆ เซลล์ จึงสามารถศึกษาได้โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ระยะการเจริญเติบโตและอวัยวะ เครื่องหมายดีเอ็นเอประเภทแรกที่นำมาใช้ คือ RFLP (restriction fragment length polymorphism) ต่อมามีการพัฒนาวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) ซึ่งทำได้อย่างรวดเร็วและง่าย จึงเกิดเทคนิคใหม่ ๆ การวิเคราะห์อาศัยการใช้พีซีอาร์เป็นหลัก ข้อดีคือใช้ปริมาณดีเอ็นตั้งต้นจำนวนน้อย ใช้ระยะเวลาสั้น ใช้แรงงานน้อย ค่าใช้จ่ายต่ำ และแปลผลง่าย เครื่องหมายดีเอ็นเอได้รับการพัฒนามาจากเทคนิคพีซีอาร์ สามารถแบ่งได้ 2 ประเภท คือ

1. ประเภทที่มีไพรเมอร์ (primer) ชนิดที่จำเพาะเจาะจง (specific primer) เครื่องหมายชนิดนี้ ได้แก่ STS (sequence-tagged site) และ SSR (simple sequence repeat)

2. ประเภทที่มีไพรเมอร์ที่ไม่จำเพาะเจาะจง (random primer) ได้แก่ RAPD (random amplified polymorphic DNAs) และ AFLP (amplified fragment length polymorphism)

นอกจากนี้พืชแต่ละชนิดยังให้แถบดีเอ็นเอ หรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจง ซึ่งถือว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอนี้เป็นเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมที่สามารถตรวจสอบได้ในแต่ละพืช ทั้งนี้ข้อมูลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในด้านปรับปรุงพันธุ์พืช โดยอาศัยความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ทำให้สามารถติดตามการถ่ายทอดลักษณะนั้น ๆ ไปยังรุ่นต่อไปได้ ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอนี้สามารถคัดเลือกพันธุ์พืชได้ในระยะแรกๆของการเจริญเติบโตในกรณีที่เมล็ดพันธุ์มีจำนวนจำกัด และสามารถย่นระยะเวลาและค่าใช้จ่ายด้านการดูแลพืชได้ (จุลภาค, 2543)

เครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ (simple sequence repeat)

เครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ หรือ Microsatellite หมายถึง ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันของจำนวนชุดของลำดับเบสนั้น ๆ เรียงต่อกันหัวสลับหาง ซึ่งพบการกระจายตัวอยู่ภายในสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดยูคาริโอต ชนิดของเบสซ้ำได้แก่ ซ้ำเบสสอง (di - nucleotide repeat) เช่น AT ซ้ำเบสสาม (tri - nucleotide repeat) เช่น AAC และซ้ำเบสสี่ (tetra - nucleotide repeat) เช่น GTAC เป็นต้น โดยทั่วไปเบสซ้ำเหล่านี้มักมีลำดับเบสที่จำเพาะอยู่บริเวณรอบ ๆ ซึ่งเราสามารถสร้างชิ้นส่วนดีเอ็นเอรหัสเริ่มต้นจำลองตัวที่เข้าคู่ได้กับเบสจำเพาะเหล่านี้ ผลจากปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวเพื่อเพิ่มปริมาณของลำดับเบสซ้ำเหล่านั้นคือชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ซึ่งแสดงถึงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ เครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์สามารถตรวจสอบความหลากหลายได้มากกว่าเครื่องหมายโมเลกุลแบบอาร์เอฟแอลพี (restriction fragment length polrmorphism, RFLP) ทั้งนี้ยังตรวจสอบผลได้ง่าย และใช้สารพันธุกรรมเริ่มต้นปริมาณน้อย ดังนั้นจึงนับเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความเหมาะสมที่สุดในการทำเอกลักษณ์พันธุกรรมโดยใช้หลักการพีซีอาร์ (polymerase chain reaction) ผลผลิตของการทำพีซีอาร์นั้นจะนำไปแยกขนาดโดยใช้ gel electrophoresis ซึ่งความแตกต่างแต่ละต้นในประชากรนั้นเกิดจากความแตกต่างของจำนวนเบสซ้ำในแต่ละต้น คุณสมบัติที่สำคัญของเครื่องหมายโมเลกุลนี้คือ ความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งโมเลกุลเครื่องหมายบนจีโนม และจำนวนของ alleleic form ที่สามารถตรวจสอบได้ นอกจากนั้นโมเลกุลเครื่องหมายชนิดนี้ยังเป็นชนิดข่มร่วม (codominant) จึงสามารถตรวจสอบตำแหน่งที่เป็นพันธุ์ทาง (heterozygous) ได้ (อภิชาติ, 2550)

เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอาร์เอพีดี (random amplified polymorphic DNA)

โมเลกุลเครื่องหมายแบบอาร์เอพีดี เป็นเครื่องหมายสภาพข่ม (dominance) คือสามารถจำแนกลักษณะพันธุกรรมที่เป็นการข่มของยีนภายในตำแหน่งเดียวกัน (homozygous recessive) และทำได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช ตั้งแต่ระยะเมล็ด ต้นอ่อน จนถึงระยะสุกแก่ ในระยะต้นอ่อนและระยะกำลังเจริญเติบโต เป็นระยะที่เหมาะสมสำหรับศึกษา เนื่องจากมีปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุด เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอาร์เอพีดีนี้ ใช้ปริมาณชิ้นส่วนพืชหรือใบ สำหรับดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (กฤษณพงศ์, 2543)

การระบุเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอาร์เอพีดี จำเป็นต้องมีการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ เนื่องจากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพืชนั้นมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอจะต้องอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรก denature โดยการใช้อุณหภูมิที่ 94-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที เป็นการทำให้ DNA template แยกเป็นสายเดี่ยว ขั้นตอนที่สอง annealing ด้วยอุณหภูมิที่ 35-36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที ขั้นตอนนี้ต้องใช้อุณหภูมิค่อนข้างต่ำเพื่อให้ primer ไปเกาะตรงบริเวณที่คู่สมกันให้มากที่สุด และเกิดการเพิ่มของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ และขั้นตอนที่สาม extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เอนไซม์ DNA polymerase ขั้นตอนนี้นำ nucleotide ที่เป็นคู่สมกับ DNA template มาต่อกับ primer จนเป็นสายยาวจนเกิดเป็นเส้นดีเอ็นเอเส้นใหม่ ต่อจากนั้นทำให้เกิดปฏิกิริยาเหมือนขั้นตอนแรกถึงขั้นตอนที่สามซ้ำเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่หลาย ๆรอบจนเกิดการจำลองเส้นดีเอ็นเอเส้นใหม่ขึ้นมาจำนวนมาก (กฤษณพงศ์, 2543) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณมาทำการตรวจสอบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ บน Agarose Gel ที่ความเข้มข้น 1.5% โดยการย้อมเอทธิ-เดียมโปรไมด์ แล้วทำการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอรายต้นของตัวอย่างต้นที่มีลักษณะกลีบดอกชั้นเดียวสมบูรณ์เพศเปรียบเทียบกับตัวอย่างของต้นดอกเกสรเพศผู้เป็นหมัน โดยพิจารณาจากภาพถ่ายลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกัน และเปรียบเทียบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้ดีเอ็นเอมาร์กเกอร์ 1 Kb Plus DNA ladder (Thermo Scientific)

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

สายพันธุ์ดาวเรืองที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษาการกระจายตัวของลักษณะและการตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับยีนที่ควบคุมเพศผู้เป็นหมันในดาวเรืองอเมริกันซึ่งได้มาจากต้นที่มีลักษณะปน (off-type plants) ของสายพันธุ์ ‘Optiva’ ในประชากรชั่วที่ 5 ที่ได้จากการรักษาความเป็นหมันจากการผสมระหว่างลักษณะดอกชั้นเดียว (single flower) และดอกตัวผู้เป็นหมัน (apetalous flower) ภาพที่ 3

ภาพที่ 3 ลักษณะดอกดาวเรืองที่ใช้ในการศึกษา

A : ลักษณะดอกชั้นเดียว (single flower) B : ดอกตัวผู้เป็นหมัน (apetalous flower)

อุปกรณ์

1. ถาดเพาะกล้า

2. วัสดุเพาะกล้า

3. กระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว

4. วัสดุปลูก ประกอบด้วย ดิน : แกลบดิบ : ปุ๋ยคอก อัตราส่วน 2 : 1 : 0.5

5. ปุ๋ยเคมีสูตร 15 - 15 - 15

6. สารเคมีป้องกันกำจัดโรค

7. อุปกรณ์การผสมเกสร เช่น แก้ว พู่กัน ขวดใส่ละอองเกสร แอลกอฮอล์ ป้ายแท็ก ถุงคลุมดอก คลิบหนีบถุงคลุมดอก

8. อุปกรณ์การเก็บข้อมูลและบันทึกข้อมูล เช่น สมุด ปากกา ดินสอ ไม้บรรทัด

อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ

เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุล ได้แก่ เครื่องหมุนเหวี่ยง ตู้แช่สารเคมีที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) ยี่ห้อ Biometra รุ่น T1 thermocycler และ Tavanced เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ชนิดแนวนอน เครื่อง UV transilluminator และ Gel documentation อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ tube, PCR-tube, tips, microtip, PCR-plate , pipette , erlenmeyer flask เป็นต้น

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและทำปฏิกิริยา เช่น 2x-CTAB, isopropanol, chloroform-isoamyl alcohol, 75% ethanol with 10 mM ammonium acetate, 75% ethanol, TE buffer, 0.5 EDTA (pH 8.0), TE-dye, 10xPCR buffer, 1 mM dNTPs, primer, 50mM $MgCl_2$, *Taq* DNA polymerase, loading dye, 1xTAE buffer, Ethidium bromide และน้ำกลั่น เป็นต้น

วิธีการ

การวิเคราะห์การถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรม

ศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมความเป็นหมันของดาวเรือง โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติไคสแควร์ (chi-square) ระหว่างต้นที่มีดอกสมบูรณ์เพศ และต้นที่มีดอกเพศผู้เป็นหมัน ในประชากรรักษาสายพันธุ์ (maintainer population) ที่เกิดจากการผสมระหว่างต้นแม่ที่เป็นหมัน (apetalous) กับต้นพ่อที่มีดอกเป็นลักษณะดอกชั้นเดียว (single flower) ปลูกทดสอบรายต้น เพื่อใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมความเป็นหมันของดาวเรือง โดยคำนวณจากสูตรดังนี้ (สุรินทร์, 2543)

$$\chi^2 = \frac{\sum (O - E)^2}{E}$$

เมื่อ **O** = จำนวนต้นที่มีดอกสมบูรณ์เพศ และดอกเพศผู้เป็นหมันจากประชากรรักษาความเป็นหมัน

E = ค่าที่คาดหมาย หรือค่าที่ควรจะเป็นต้นที่มีดอกสมบูรณ์เพศ และดอกเพศผู้เป็นหมัน

$\sum$ = ผลรวมของจำนวนต้นที่มีดอกสมบูรณ์เพศ และดอกเพศผู้เป็นหมันในประชากรรักษาความเป็นหมัน

ค่า χ^2 ที่คำนวณได้นำไปเทียบกับค่าในตารางตาม degree of freedom (df) ถ้าค่า χ^2 ที่คำนวณได้น้อยกว่าค่า χ^2 ในตาราง ที่ *p= 0.05* แสดงว่ายีนที่ควบคุมความเป็นหมัน เป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้แต่ถ้าค่าของ χ^2 ที่คำนวณได้เท่ากับหรือสูงกว่าค่า ในตารางที่ *p = 0.05* แสดงว่ายีนที่ควบคุมความเป็นหมันไม่เป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอรายต้นของตัวอย่างต้นที่มีลักษณะดอกสมบูรณ์เพศเปรียบเทียบกับตัวอย่างของต้นลักษณะเพศผู้เป็นหมัน โดยพิจารณาจากภาพถ่ายลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันและ เปรียบเทียบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้ดีเอ็นเอมาร์กเกอร์ 1 Kb Plus DNA ladder (Thermo Scientific) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ (simple sequence repeat,SSR) จำนวน 36 เครื่องหมาย และเครื่องหมายโมเลกุลแบบอาร์เอพีดี (random amplified polymorphic DNA,RAPD) จำนวน 520 เครื่องหมาย ในการศึกษาครั้งนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะดอก

เตรียมต้นกล้าในถาดเพาะ (ภาพที่ 4) เพื่อเป็นการเตรียมต้นที่ใช้ในการศึกษา เนื่องจากเมล็ดมีจำนวนจำกัด การเพาะด้วยถาดเพาะนี้ ต้นกล้าจะได้รับการกระทบกระเทือนน้อย ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตสูง ต้นกล้าเจริญเติบโตเร็ว และระบบรากเจริญเติบโตเต็มที่พร้อมย้ายปลูกได้ วัสดุเพาะปลูกประกอบด้วย ดิน : แกลบดิบ : ปุ๋ยคอก อัตราส่วน 2 : 1 : 0.5

ภาพที่ 4 ต้นกล้าที่เพาะในถาดเพาะ และปลูกทดสอบในโรงเรือนพลาสติก

จากนั้นทำการดูแลรักษา เมื่อต้นกล้าอายุ 14-20 วันหลังเพาะเมล็ดทำการย้ายปลูกลงในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว แล้วนำไปปลูกในโรงเรือนพลาสติก รดน้ำทุก ๆ วัน วันละครั้ง โดยใช้ระบบมินิสปริงเกอร์ หลังจากย้ายปลูกใส่ปุ๋ยทุก ๆ 15 วัน โดยใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ทำการเด็ดยอดเมื่อดาวเรืองมีใบจริง 4 คู่ เพื่อให้ดาวเรืองแตกแขนงกิ่งก้าน หลังจากนั้นดูแลรักษาต้นดาวเรืองจนดาวเรืองออกดอก และทำการเก็บข้อมูล

ทำการเก็บข้อมูลจำนวนต้นที่มีลักษณะดอกชนิดดอกชั้นเดียว (single flower) และดอกเพศผู้เป็นหมัน (apetalous flower) เพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าไคสแคว์ (χ^2-test) อัตราส่วนโดยใช้โปรแกรม R บันทึกจำนวนต้นที่แสดงลักษณะดอกเดี่ยวและดอกตัวผู้เป็นหมัน รวมทั้งความสูงต้นและความกว้างทรงพุ่มต้น

การผสมเกสร เพื่อสร้างประชากรรักษาความเป็นหมัน (maintainer population)

ทำการคัดเลือกรายต้นระหว่างลักษณะดอกชั้นเดียว ผสมกับลักษณะดอกเพศผู้เป็นหมัน มีขั้นตอนการผสมดังนี้ (ภาพที่ 5)

1. คัดเลือกรายต้นดอกชั้นเดียว ที่มีอับละอองเกสรพร้อมที่จะผสมเก็บรวบรวมละอองเกสรไว้

2. ใช้นิ้วดีดที่ช่อดอกชั้นเดียวอย่างเบามือ เพื่อให้ละอองเกสรหล่นลงแก้ว

3. ใช้พู่กันแต้มละอองเกสรแล้วนำมาป้ายลงบนเกสรเพศเมีย (stigma) ของดอกเพศผู้เป็นหมัน (apetalous)

4. หลังจากผสมเกสรเสร็จแล้วคลุมดอกด้วยถุงกระดาษแล้วใช้คลิบหนีบถุงไว้ หากผสมทั้งต้นก็สามารถใช้ตาข่ายคลุมทั้งต้นได้

5. ทำการติดป้ายชื่อและรายละเอียดวัน เดือน ปี ที่ผสม โดยต้องติดทันที่หลังผสมเพื่อป้องกันความผิดพลาด ในการเก็บเมล็ด

6. หลังผสมเกสร ประมาณ 25-28 วัน สามารถทำการเก็บเมล็ดได้ หากเมล็ดพันธุ์มีความชื้นสูงจะต้องนำเมล็ดมาอบเพื่อลดความชื้นก่อน

7. เก็บเมล็ดพันธุ์ไว้ในซองกระดาษโดยเขียนชื่อคู่ผสม และวันที่เก็บเกี่ยว

ภาพที่ 5 วิธีแสดงการผสมเกสรของดาวเรืองอเมริกันเพื่อสร้างประชากรรักษาความเป็นหมัน (maintainer population)

หมายเหตุ A ลักษณะดอกชั้นเดียวที่พร้อมให้ละอองเกสร

B วิธีการเคาะละอองเกสร

C ละอองเกสรที่พร้อมผสมที่เก็บรวบรวมไว้

D นำพู่กันป้ายละอองเกสรลงบนเกสรเพศเมีย (stigma)

E การใช้ถุงคลุมดอก เพื่อป้องกันการผสมของสายพันธุ์อื่น

F การใช้ตาข่ายคลุมต้นเพื่อป้องการผสมข้าม

การทดลองที่ 2 การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับลักษณะเป็นหมัน

การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับลักษณะเป็นหมัน ใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบอาร์เอพีดีและเอสเอสอาร์ เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Doyle and Doyle (1987) โดยเก็บตัวอย่างใบอ่อนของดาวเรืองนำมาสกัดดีเอ็นเอ ดังนี้

1. นำตัวอย่างใบอ่อนมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ในโกร่งและบดให้ละเอียดเติมสารละลาย 2x-CTAB ปริมาตร 750 ไมโครลิตร เทตัวอย่างใส่หลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2. นำหลอดทดลองที่ใส่ตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พลิกหลอดทดลองทุก ๆ 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol ให้เต็มหลอด พลิกกลับไปมา 2 นาที ให้สารละลายในหลอดผสมกัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

3.เตรียมหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วดูดสารละลายที่แขวนลอย (supernatant) ที่อยู่ชั้นบนมาใส่หลอดทดลองเดิมที่เติม isopropanol ไว้ พลิกหลอดไปมาเบาๆ และนำเข้าตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4.นำหลอดตัวอย่างเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 วินาทีเทของเหลวทิ้งแล้วตากทิ้งไว้ 30 นาที เติม 75% ethanol + 10mM ammonium acetate ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

5.นำหลอดตัวอย่างเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 วินาที เทของเหลวทิ้งแล้วตากทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติม 75% ethanol ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทของเหลวทิ้งแล้วตากทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้ดีเอ็นเอแห้ง

6.จากนั้นเติม TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ RNase ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ในหลอดดีเอ็นเอที่สกัดได้ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าดีเอ็นเอจะละลายหมด เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ

เตรียมอะกาโรสเจล (agarose gel) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1x TAE buffer ผสมดีเอ็นเอตัวอย่างที่สกัดได้ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร กับ TE dye ปริมาร 9 ไมโครลิตร หยดดีเอ็นเอตัวอย่างที่ผสมกับ TE dye ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในอะกาโรเจล พร้อมกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้น 500 300 และ 100 นาโนกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิล (electrophoresis) ใช้แถบสีน้ำเงินของ bromophenol blue ที่มีใน TE dye เป็นตัวสังเกตการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ จากนั้นนำอะกาโรสเจลมาแช่ในน้ำกลั่นที่เติมเอธิเดียมโบรไมด์เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำกลั่นอีกครั้ง เป็นเวลา 30 นาที บันทึกภาพถ่ายภายใต้แสงอัตราไวโอเลตเพื่อเปรียบเทียบความชัดเจนของแถบและปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้มีความเหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้วปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ความเข้มข้น 5 และ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรเพื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction PCR) คือการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เทคนิคเอสเอสอาร์ (simple sequence repeat, SSR) จำนวน 36 เครื่องหมาย องค์ประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยมีส่วนประกอบของสารละลาย ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ 30 นาโนกรัม, 1x PCR buffer, 100 µM dNTPs, 0.5 µM Forward primer, 0.5 µM Reverse primer, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.3 unit *Taq* DNA polymerase และเติมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อปรับปริมาตร ใช้อุณหภูมิในปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ขั้นตอนที่ 1 Pre-denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอนที่ 2 Denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอนที่ 3 Annealing 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ขั้นตอนที่ 4 Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอนที่ 5 Final extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอนที่ 6 Holding 15 องศาเซลเซียส โดยทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 จนถึงขั้นตอนที่ 4 จำนวน 30 รอบ

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ไปตรวจผลโดยอิเล็คโทรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจล 3 % ที่ย้อมด้วยเอทธิเดียมโบมายด์ในบัฟเฟอร์ 1x TAE ใช้กระแสไฟฟ้า 60 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแผ่นอะกาโรสเจลไปแช่ในน้ำกลั่นที่เติมเอธิเดียมโบรไมด์นาน 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำกลั่นอีกครั้ง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปบันทึกภาพถ่ายภายใต้แสงอัตราไวโอเลต

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (random amplified polymorphic) จำนวน 520 เครื่องหมาย ปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยใช้ส่วนประกอบของสารละลาย ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ 20 นาโนกรัม, 1xPCR buffer, 200 µM dNTPs, 0.4 µM primer, 3.0 mM $MgCl_2$, 0.8 unit *Taq* DNA polymerase และเติมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อปรับปริมาตร ใช้อุณหภูมิและเวลาในปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 Pre-denature 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ขั้นตอนที่ 2 Denature 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอนที่ 3 Annealing 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอนที่ 4 Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ขั้นตอนที่ 5 Final extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอนที่ 6 Holding 15 องศาเซลเซียส โดยทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 จนถึงขั้นตอนที่ 4 จำนวน 45 รอบ

นำไปตรวจผลโดยอิเล็คโทรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจล 1.5 % ที่ย้อมด้วยเอทธิเดียมโบมายด์ ในบัฟเฟอร์ 1x TAE ใช้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเมื่อครบนำแผ่นอะกาโรสเจลไปแช่ในน้ำกลั่นที่เติมเอธิเดียมโบรไมด์เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 30 นาที แล้วบันทึกภาพถ่ายภายใต้แสงอัตราไวโอเลต

การสำรวจหาความแตกต่างทางพันธุกรรม (polymorphisms) ของลักษณะดอกสมบูรณ์เพศและดอกเพศผู้เป็นหมัน คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอลักษณะดอกสมบูรณ์เพศและดอกเพศผู้เป็นหมัน ด้วยวิธี simple sequence repeat (SSR) และ random amplified polymorphic DNA (RAPD) โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบ ดีเอ็นเอ ที่ปรากฏโดยพิจารณาแถบหลักที่มีความชัดเจน (major band) เมื่อได้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างลักษณะดอกสมบูรณ์เพศและดอกเพศผู้เป็นหมันแล้ว นำเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอรายต้นอีกครั้งหนึ่ง

สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี อาคารเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระศรีนครินทร์ฯ (ตึกกล้วยไม้) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

2. แปลงวิจัยดาวเรือง บริษัทโฮมซีดส์ จำกัด อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่

ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มทำการทดลองเดือนตุลาคม 2560

สิ้นสุดการทดลองเดือนกันยายน 2562

บทที่ 4

ผลการทดลองและการวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม

ผลของการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะดอกของประชากรที่รักษาความเป็นหมัน แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ ต้นที่มีดอกลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมัน (apetalous flower) และต้นที่มีลักษณะดอกชั้นเดียว หรือดอกสมบูรณ์เพศ (single flower) ซึ่งทำการปลูกทดสอบทั้งหมด 2 ฤดู ได้แก่ ฤดูฝน ปี 2561 และฤดูแล้ง ปี 2562 พบว่ามีอัตราการกระจายตัวโดยจำนวนต้นที่พบมีอัตราส่วนของต้นดอกเกสรเพศผู้เป็นหมันต่อต้นที่มีลักษณะดอกสมบูรณ์เพศ เท่ากับ 1:1 ดังแสดงใน (ตารางที่ 1) สอดคล้องกับบุญหงษ์ (2548) รายงานว่าการทำปฏิกิริยาของยีนเป็นการทำงานแบบไม่เป็นแบบบวกสะสม โดยมีการข่มสมบูรณ์จะพบว่ายีนที่ควบคุมการแสดงออกมีอัตราส่วน จีโนไทป์ และฟีโนไทป์เป็น 1:1 ซึ่งการทดลองครั้งนี้ได้ตั้งสมมุติฐานการกระจายตัวมีอัตราส่วนเท่ากับ 1:1 ในฤดูฝน ปี 2561 มีจำนวนทั้งหมด 123 ต้น พบต้นที่มีลักษณะดอกเกสรเพศผู้เป็นหมัน 58 ต้น ต้นที่มีลักษณะดอกสมบูรณ์เพศ 65 ต้น และในฤดูแล้ง ปี 2562 มีจำนวนทั้งหมด 188 ต้น พบต้นที่มีลักษณะดอกเกสรเพศผู้เป็นหมัน 97 ต้น ต้นที่มีลักษณะดอกสมบูรณ์เพศ 91 ต้น เมื่อทดสอบทั้ง 2 ฤดูพบว่าเป็นไปตามทฤษฎีที่ตั้งสมมุติฐานไว้ที่มีค่า χ^2 เท่ากับ 0.399 และ 0.191 และมีค่าความเป็นไปได้ 0.528 และค่าความเป็นไปได้ 0.662 ตามลำดับ แสดงว่ายอมรับสมมุติฐานที่ตั้งไว้ ซึ่งสอดคล้องกับ ประทุมพร และ ณัฐา (2552) ที่ได้ทำการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันของดอกดาวเรืองที่ไม่มีกลีบดอกของการผสมตัวเองของดาวเรืองรุ่นที่ 3 ที่มีลักษณะดอกเกสรเพศผู้เป็นหมันและดอกเกสรเพศผู้ปกติโดยคาดการว่าลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 คู่ มีการข่มแบบสมบูรณ์ และมีอัตราส่วน 3 : 1 จากการศึกษาพบว่ามีความเป็นเป็นไปได้อยู่ในเกณฑ์น่าเชื่อถือมาก เช่นเดียวกับธนฤทธิ์ (2546) รายงานการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันของบานชื่น จากการศึกษาพบว่า การกระจายตัวระหว่างต้นบานชื่นที่มีเกสรเพศผู้ปกติ ต่อต้นที่มีเกสรเพศผู้เป็นหมัน เท่ากับ 1:1 สรุปได้ว่าลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันถูกควบคุมโดยยีนตำแหน่งเดียว และเป็นพันธุ์แท้ลักษณะด้อย (homozygous recessive gene) และยังพบว่าลักษณะความเป็นหมันของดอกเกสรเพศผู้เป็นหมันถูกควบคุมด้วยยีนที่อยู่ในนิวเคลียส และดอกเกสรเพศผู้ไม่เป็นหมันถูกควบคุมโดยอัลลีลเด่น (dominant allele)

ตารางที่ 1 การกระจายตัวของลักษณะดอกสมบูรณ์เพศ และต้นที่มีลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันในประชากรรักษาความเป็นหมัน (maintainer population)

ฤดู	ฟีโนไทป์		ค่า χ^2 ของ	ค่าโอกาส
	ดอกสมบูรณ์เพศ	ดอกเกสรเพศผู้เป็นหมัน	อัตราส่วน 1:1	(P)
ปี 2561	65	58	0.399	0.528
ปี 2562	89	93	0.191	0.662

χ^2 0.05 = 3.84

จากการศึกษายีนที่ควบคุมความเป็นหมันของดาวเรือง โดยปลูกประชากร ที่รักษาความเป็นหมัน (maintainer population) พบว่าอัตราส่วนต้นที่มีดอกสมบูรณ์เพศ และดอกเพศผู้เป็นหมันคือ 1:1 จากการคำนวณค่า Chi-square ของอัตราส่วนประชากร ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยมีค่า χ^2 ที่คำนวณได้ 0.399 และ 0.191 ตามลำดับ น้อยกว่าค่า χ^2 ในตาราง ที่ P = *0.05* เท่ากับ 3.84 แสดงให้เห็นว่ายีนควบคุมความเป็นหมันของดาวเรือง ถูกควบคุมด้วยแอลลีลด้อย 1 ตำแหน่ง (single recessive gene) ซึ่งสอดคล้องกับศุภนารี (2551) ได้ทำการทดสอบการผสมข้ามระหว่างดอกดาวเรืองที่มีเกสรเพศผู้เป็นหมัน กับดอกที่มีเกสรเพศผู้ปกติ โดยคาดการณ์ว่าพันธุกรรมที่ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมัน อาจถูกควบคุมด้วยยีนเพียง 1 คู่ เมื่อทดสอบโดยใช้ไคสแคว์ มีอัตราส่วนของต้นดอกเกสรเพศผู้เป็นหมันและต้นดอกปกติ ในอัตราส่วนเท่ากับ 1:1 พบว่ามีความเป็นไปได้อยู่สูงมากซึ่งลักษณะนี้ อาจเกิดจากยีนในนิวเคลียส ประดิษฐ์ (2546) ทำการผสมพันธุ์ระหว่างแม่พันธุ์ที่มีเกสรเพศผู้เป็นหมันกับพ่อพันธุ์ที่เกสรเพศผู้ปกติ ลูกผสมที่เกิดขึ้นมีโอกาสเป็นลูกผสมที่มีอัตราส่วนต้นดอกเพศผู้เป็นหมัน กับดอกเพศผู้ปกติเท่ากับ 1:1 หรือการเป็นหมันเนื่องจากยีนในไซโตพลาสซึมและยีนในนิวเคลียสร่วมกัน และจากการศึกษาการผสมพันธุ์บานชื่นสายพันธุ์ดอกสีเหลืองเพื่อรักษาสายพันธุ์เกสรเพศผู้เป็นหมันของ จิราพร (2539) พบว่าอัตราส่วนของต้นที่มีเกสรเพศผู้ปกติต่อต้นที่มีเกสรเพศผู้เป็นหมัน มีอัตราส่วนเท่ากับ 1:1

การศึกษาการเจริญเติบโตของประชากรรักษาความเป็นหมัน

จากการทดสอบแบบ t-test พบว่าความสูงต้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ความกว้างทรงพุ่มของต้นดอกสมบูรณ์เพศเฉลี่ย 32.0 เซนติเมตร และความกว้างทรงพุ่มของต้นดอกเพศผู้เป็นหมันเฉลี่ย 34.3 เซนติเมตร และพบว่าความกว้างทรงพุ่มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2)

ผลการศึกษาความสูงและความกว้างทรงพุ่มของดาวเรือง เมื่ออายุประมาณ 60 วันหลังออกดอกแรก โดยวัดจากผิวดินจนถึงตายอด พบว่าความสูงของต้นดอกสมบูรณ์เพศเฉลี่ย 40.6 เซนติเมตร และความสูงของต้นดอกเพศผู้เป็นหมันเฉลี่ย 42.5 เซนติเมตร

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยความสูงต้น (ซม.) และความกว้างทรงพุ่ม (ซม.) ของดาวเรือง อายุ 60 วัน

ลักษณะดอก	จำนวนต้น	ความสูงต้น(ซม.)	ความกว้างทรงพุ่ม(ซม.)
ต้นดอกเพศผู้เป็นหมัน	97	42.5	34.3
ดอกสมบูรณ์เพศ	91	40.6	32.0
P-value		0.1028	0.0139

การทดลองที่ 2 การสืบค้นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับลักษณะเป็นหมัน

ผลการศึกษาการสืบค้นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับลักษณะเป็นหมันที่แสดงความแตกต่างระหว่างลักษณะต้นที่มีดอกสมบูรณ์เพศ และต้นที่มีลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมัน โดยทำการสืบค้นเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคเอสเอสอาร์และเทคนิคอาร์เอพีดี จำนวนทั้งหมด 556 หมายเลข แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนของเครื่องหมายโมเลกุลแบบ RAPD และเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR ที่ใช้ในการศึกษานี้

เครื่องหมาย (เทคนิค)	จำนวนเครื่องหมายทั้งหมด	จำนวนเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่าง	จำนวนเครื่องหมายที่ไม่แสดงความแตกต่าง
RAPD	520	14	506
SSR	36	0	36
รวม	556	14	542

การสืบค้นเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ (simple sequence repeat) จำนวน 36 เครื่องหมาย โดยมีไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 4 จากการสืบค้นพบว่าไม่มีความแตกต่างกันของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (monomorphic) ดังแสดงในภาพที่ 6

ตารางที่ 4 แสดงเครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ที่ใช้ในการสืบค้น

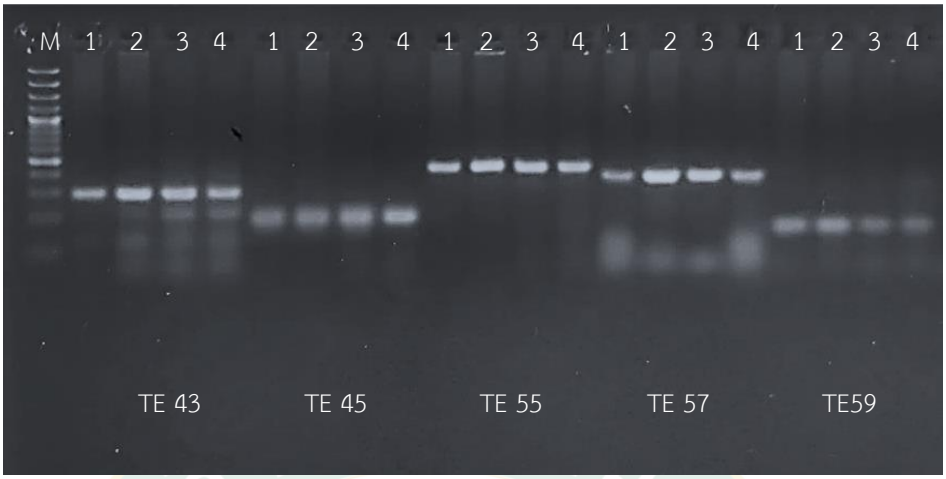
ไพร์เมอร์		ลำดับเบส (5'⟶ 3')
T14	Forward:	GACAGACACACGAGGTTTATTC
	Reverse:	AGACAACATCATTAGCATAGTCC
T17	Forward:	CAGACAGACAGAGATAGATTTAC
	Reverse:	CAGACAAATATAAAATAAGAT
T22	Forward:	CACACACACTCGCCTTCACTG
	Reverse:	ACACACTAAACCCTAACC
T31	Forward:	GAGAGAGGTTTAGAAATAGGG
	Reverse:	GGTAGGTTTGAAAGTATTTTGG
T34	Forward:	GAGAGAGGAGAAGAGGGGC
	Reverse:	GAGAGAGGCTAGATAGTCG
T52	Forward:	CACACCCACAGCCACAGC
	Reverse:	CACACACACCATTTTCATC
T76	Forward:	GAGAGAGAGAGAGCAAGGGG
	Reverse:	GTAGAGAGAGAAATCACCTC
T84	Forward:	GAGAGAGAGAGCTATGAGGC
	Reverse:	GAGAGAGAGAGTTAGGTTC
T93	Forward:	CACACACAAGACAAAAATATAC
	Reverse:	CACACACAGGGCTCATCTC
T101	Forward:	GGGTGAGGATCTACAATCAG
	Reverse:	GGTGGGGTGTGGTCAAAGG
T105	Forward:	GGGTGGGGTGGGGTGCAACC
	Reverse:	GGTGGGGTGATCCATAAC
TE02	Forward:	CAGCAGTAGTAGCAGCAGCA
	Reverse:	AATACGACACGAGCACGAA
TE11	Forward:	CGCCTAATTTGTTGCATGG
	Reverse:	ATGTCACCGCCAAAGGATT
TE12	Forward:	TTGAAGGCGAAAGTTGCAG
	Reverse:	GAACGAGCAAATCGAAGCA

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ไพร์เมอร์		ลำดับเบส (5'⟶ 3')
TE19	Forward:	AGGTCTTGTGCGTGTTGTTG
	Reverse:	TTGCTGCCGTTAGACACAGA
TE20	Forward:	CAGGCCATCAAACCATCTG
	Reverse:	CGACCCACACAAACTCCAC
TE21	Forward:	TGCTGCCTACTGCGAGTCTA
	Reverse:	GGCAACCCCTAAATTCAACA
TE27	Forward:	CGGTTTTCTGTCCTCCAAAA
	Reverse:	TTCCTTCTCCTTCATCCCTG
TE32	Forward:	CCACACCAAGTGCGAAATC
	Reverse:	GGGTAAAGGCACACCTCGT
TE35	Forward:	ACCCTCCTTGACCCTGTTG
	Reverse:	GGTGTTGTTGCTGCTTGCT
TE38	Forward:	CGGAAACGAACGAGTGAAGT
	Reverse:	GCGTATAAAATCCCTGCCCT
TE41	Forward:	GTTGAATACCTCGCTCGCA
	Reverse:	CCCTCTCATTTGTTTCCGC
TE43	Forward:	CAAGTGGCAGTGGTATCAAC
	Reverse:	GACCCAACCCCACTCTCTCT
TE45	Forward:	CTTCTTCTGCGTGATCTCAA
	Reverse:	CCCTGCCATACCCATATCT
TE55	Forward:	ACGTTGTTTCAGGTTGTCGG
	Reverse:	GGCGTTCGCTGTTCAAGATA
TE57	Forward:	GATGTGTTCCCTTGGTCTTTGT
	Reverse:	GTCCAGTCATCTCCACAGTCAA
TE59	Forward:	CCGGTTTGTGAAATCTGAAG
	Reverse:	CACAGCTAAACTCACGCACA
TE64	Forward:	CGCCTAATTTGTTGCATGG
	Reverse:	ATGTCACCGCCAAAGGATT

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ไพร์เมอร์		ลำดับเบส (5'⟶ 3')
TE70	Forward:	TTGAAGGCGAAAGTTGCAG
	Reverse:	GAACGAGCAAATCGAAGCA
TE71	Forward:	AGGTCTTGTGCGTGTTGTTG
	Reverse:	TTGCTGCCGTTAGACACAGA
TE73	Forward:	TCAAACGTCCCTCATCCAAC
	Reverse:	CCGAAGAAGTGAGATCCGTG
TE78	Forward:	GAGAGGATCTGGTGGGATGA
	Reverse:	GGTGGCTCCAAACTACCAAG
TE89	Forward:	TCCCCAACCGAACTATATGA
	Reverse:	ACTGAACCTGAAACATTGCC
TE92	Forward:	TCTAAAGTGAGCACCCTCGC
	Reverse:	TTGCAGCCAAAGAAAAGGTT
TE95	Forward:	AAGCACACTGGATCACAACG
	Reverse:	GATGGATGGGGTGTTTCTTG
TE97	Forward:	GCAATCCCAAACATGCACTA
	Reverse:	GTCACGACCAACGTCCAAG



ภาพที่ 6 การคัดกรองลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ในการแยกแตกต่างระหว่างลักษณะดอกสมบูรณ์เพศ และต้นที่มีลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมัน

หมายเหตุ Lane M คือ 100 bp Plus DNA ladder

Lane 1-2 คือ ดีเอ็นเอรายต้นของลักษณะดอกเพศผู้เป็นหมัน

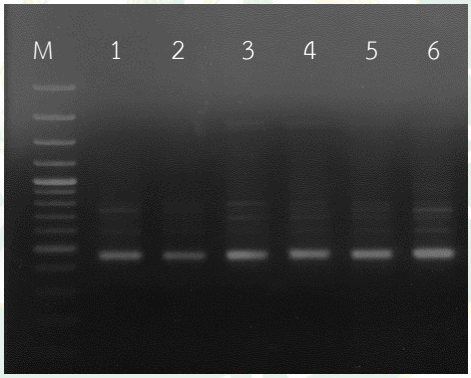
Land 3-4 คือ ดีเอ็นเอรายต้นของลักษณะดอกสมบูรณ์เพศ

การสืบค้นเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (random amplified polymorphic DNA) โดยใช้ไพร์เมอร์ของ Operon Technologies Inc (USA) ทั้งหมด 520 หมายเลข ได้แก่ชุด OPA, OPC, OPD, OPE, OPF, OPG, OPH, OPI, OPJ, OPK, OPL, OPM, OPN, OPO, OPR, OPS, OPT, OPU, OPV, OPW, OPX, OPY, OPZ, OPAH และ OPBH พบว่า มี 14 เครื่องหมาย ที่แสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (polymorphisms) ดังที่แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างต้นที่มีลักษณะ ดอกสมบูรณ์เพศ และต้นที่มีลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมัน

ไพร์เมอร์	ลำดับเบส
OPA-01	5’ CAGGCCCTTC 3’
OPA-07	5’ GAAACGGGTG 3’
OPA-08	5’ GTGACGTAGG 3’
OPD-02	5’ GGACCCAACC 3’
OPD-03	5’ GTCGCCGTCA 3’
OPK-15	5’ CTCCTGCCAA 3’
OPL-02	5’ TGGGCGTCAA 3’
OPM-16	5’ GTAACCAGCC 3’
OPN-06	5’ GAGACGCACA 3’
OPR-07	5’ ACTGGCCTGA 3’
OPS-03	5’ CAGAGGTCCC 3’
OPU-10	5’ ACCTCGGCAC 3’
OPW-01	5’ CTCAGTGTCC 3’
OPW-08	5’ GACTGCCTCT 3’

เมื่อนำมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ซ้ำอีก พบว่า เครื่องหมาย OPA-01 แสดงรูปแบบลายพิมพ์คงเดิม และสามารถทำซ้ำได้ ในขณะที่ He *et al*. 2009 ได้จำแนกลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมัน และดอกสมบูรณ์เพศ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลแบบ ISSR จำนวน 38 หมายเลขและ SRAP 170 หมายเลข พบว่ามีเพียง เครื่องหมายแบบ SRAP 1 หมายเลขที่สามารถจำแนกความแตกต่างของลักษณะดอกโดยมีลำดับเบสดังนี้ me-4 : 5'-TGAGCTCAAACCGGACC-3' และ em-8 : 5'-GACTGCGTACGAATTAGC-3' แต่เมื่อนำไพร์เมอร์ดังกล่าวมาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลักษณะดอกในประชากรที่ทำการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างดังแสดงในภาพที่ 7 การตรวจสอบดีเอ็นเอตัวอย่างรายต้นของลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมัน และดอกสมบูรณ์เพศ ของเครื่องหมาย OPA-01 พบว่าสามารถแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ขนาดชิ้นส่วนประมาณ 620 bps ในการระบุลักษณะดอกทุกตัวอย่างรายต้นของดอกสมบูรณ์เพศ ในขณะที่ลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ขนาดชิ้นส่วน 700 bps ดังแสดงในภาพที่ 8 และ 9

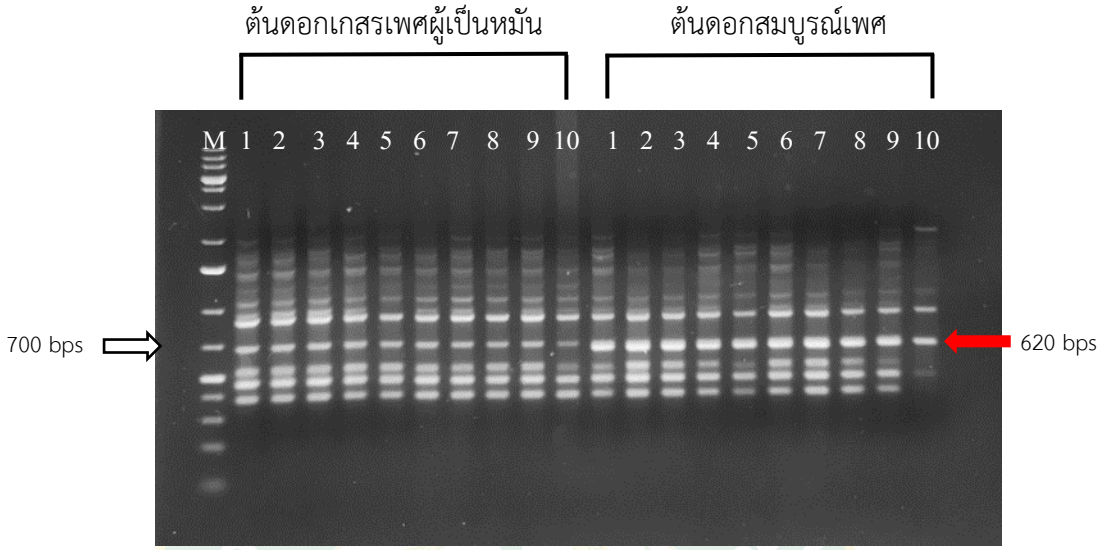


ภาพที่ 7 เครื่องหมายแบบ SRAP ที่นำมาตรวจสอบลักษณะ ดอกเพศผู้เป็นหมัน

หมายเหตุ Lane M คือ 100 bp Plus DNA ladder

Lane 1-3 คือ ดีเอ็นเอรายต้นของดอกเกสรเพศผู้เป็นหมัน

Lane 4-6 คือ ดีเอ็นเอรายต้นของลักษณะดอกสมบูรณ์เพศ

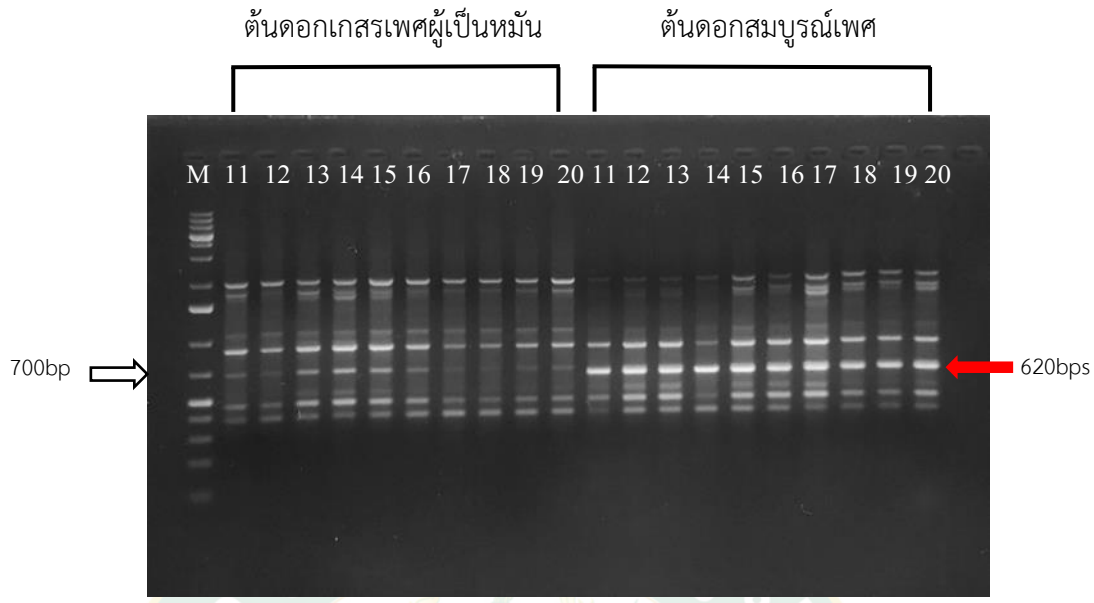


ภาพที่ 8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอรายต้น ต้นดอกเกสรเพศผู้เป็นหมัน (1-10) และต้นดอกสมบูรณ์เพศ (1-10) ของเครื่องหมาย OPA-01

หมายเหตุ Lane M = 1Kb Plus DNA ladder

Lane 1-10 = ดีเอ็นเอรายต้นของต้นดอกเกสรเพศผู้เป็นหมันต้นที่ 1-10

Lane 11-20 = ดีเอ็นเอรายต้นของต้นดอกสมบูรณ์เพศ ต้นที่ 1-10



ภาพที่ 9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอรายต้น ต้นดอกเกสรเพศผู้เป็นหมัน (11-20) และต้นดอกสมบูรณ์เพศ (11-20) ของเครื่องหมาย OPA-01

หมายเหตุ Lane M = 1Kb Plus DNA ladder

Lane 1-10 = ดีเอ็นเอรายต้นของต้นดอกเกสรเพศผู้เป็นหมันต้นที่ 11-20

Lane 11-20 = ดีเอ็นเอรายต้นของต้นดอกสมบูรณ์เพศ ต้นที่ 11-20

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

การทดลองที่ 1 การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของยีนควบคุมลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมัน

การถ่ายทอดลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันโดยทำการผสมพันธุ์ภายในประชากรรักษาความเป็นหมัน โดยใช้พันธุ์แม่ที่มีลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันที่มีลักษณะดอกแบบ apetalous ผสมกับพันธุ์พ่อที่มีลักษณะเกสรเพศผู้ปกติที่มีลักษณะดอกชั้นเดียว (single flower) ซึ่งทำการปลูกทดสอบ ในฤดูฝน ปี 2561 และ ฤดูแล้ง ปี 2562 มีอัตราการกระจายตัว โดยจำนวนต้นที่พบมีอัตราส่วนต้นดอกเกสรเพศผู้เป็นหมัน ต่อต้นที่มีลักษณะดอกสมบูรณ์เพศ เท่ากับ 1:1 พบว่าลักษณะเพศผู้เป็นหมันถูกควบคุมโดย ยีนตำแหน่งเดียว (single locus) และเป็นพันธุ์แท้ลักษณะด้อย (homozygous recessive gene) ทั้งนี้ยังพบว่าลักษณะความเป็นหมันของดอกเกสรเพศผู้เป็นหมันถูกควบคุมด้วยยีนที่อยู่ในนิวเคลียส GMS (genetic male sterility) และดอกชั้นเดียวสมบูรณ์เพศถูกควบคุมโดยอัลลีลเด่น (dominant allele)

จากการศึกษาการเจริญเติบโต พบว่าต้นที่มีเกสรเพศผู้เป็นหมันมีขนาดของทรงพุ่มใหญ่กว่าต้นที่มีดอกสมบูรณ์เพศ หรือต้นที่มีลักษณะดอกชั้นเดียว

การทดลองที่ 2 การสืบค้นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับลักษณะความเป็นหมัน

การสืบค้นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับลักษณะเป็นหมันโดยใช้เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุลแบบอาร์เอพีดี (random amplified polymorphic DNA) เพื่อค้นหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับลักษณะความเป็นหมัน จากไพร์เมอร์จำนวนทั้งหมด 520 หมายเลข พบว่าไพรเมอร์ OPA-01 สามารถแยกความแตกต่างของลักษณะดอกเกสรเพศผู้เป็นหมันและดอกสมบูรณ์เพศดอกชั้นเดียว โดยสามารถตรวจสอบกับดีเอ็นเอตัวอย่างรายต้นของลักษณะดอกเกสรเพศผู้เป็นหมัน20 ต้น และดอกสมบูรณ์เพศ 20 ต้นได้

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับลักษณะความเป็นหมันมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 700 bps และสามารถนำไปใช้คัดเลือกในระยะต้นกล้าได้ต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กฤษณพงศ์ ศรีพงษ์พันธุ์กุล. 2543. **การประยุกต์ใช้โมเลกุลเครื่องหมายสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืช.** รายงานการประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาวประจำปี 2543นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. หน้า 15-22.

จิราพร เที่ยงเจริญ. 2539. **การคัดเลือกและรักษาสายพันธุ์เกสรตัวผู้เป็นหมันในบานชื่นสายพันธุ์ดอกสีเหลือง**. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 19 หน้า.

จุลภาค คุ้นวงศ์. 2543. **ความจำเป็นของลายพิมพ์ดีเอ็นเอกับการจดทะเบียนพันธุ์พืช**. วารสารเคหการเกษตร 24(5): 174-176.

ชยพร แอคะรัจน์. 2544. **หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช(ภาคทฤษฎีและปฏิบัติการ)**. สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตกาฬสินธุ์, กาฬสินธุ์. 197 หน้า.

ธนฤทธิ์ โภคา 2546. **การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมและวิธีการรักษาสายพันธุ์ลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันของบานชื่น**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาพืชสวน ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ : 75 หน้า.

นพพร คล้ายพงษ์พันธุ์. 2546. **เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 261หน้า.

นิรนาม. 2551. **“โรคดาวเรือง”** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา www.marigoldthai.com/index.php (15 พฤศจิกายน 2562).

นันทิยา วรรธนะภูติ. 2545. **คู่มือการปลูกไม้ตัดดอก**. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พริ้นติ้งเฮาส์, 248 หน้า.

บุญหงษ์ จงคิด. 2548. **หลักและเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช**. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัย-ธรรมศาสตร์, 176 น.

ปกป้อง ป้อมฤทธิ์ วรรณภา เสนาดี และสุภาพร เส็งสมาน. 2561. **ดาวเรืองไม้ตัดดอกอุตสาหกรรมทำเงิน**. วารสารเคหการเกษตร. 42: 63-85.

ปรัชญา รัศมีธรรมวงศ์. 2543. **ไม้ตัดดอก.** หนังสือเฉพาะกิจในเครือนิตยสารไม่ลองไม่รู้. 38-47.

ประดับพันธุ์ สกุลพิทยา. 2539. **ไม้ตัดดอก.** สำนักพิมพ์อักสรสยามการพิมพ์. กรุงเทพฯ. 99 หน้า.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2546. **พันธุศาสตร์.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 398 หน้า.

ประทุมพร ขอดแก้ว และ ณัฐา โพธาภรณ์ 2552. **การถ่ายทอดลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันของดอกดาวเรืองที่ไม่มีกลีบดอก.** วารสารเกษตร. 25(2): 95-99.

ปราโมทย์ สฤษดิ์นิรันด์. 2540. **ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ (male sterility)**. เอกสารประกอบการสอนวิชาปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 5 หน้า.

พูลทรัพย์ สุภา. 2534. **การศึกษาลักษณะและการประเมินประชากรดาวเรืองในภาคเหนือของประเทศไทย.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. 134 หน้า.

วัลลภ พรหมทอง. 2541. **ไม้ดอกยอดฮิต.** สำนักพิมพ์มติชน. กรุงเทพฯ. 115 หน้า.

ศุภนารี ณ มา. 2551. **การถ่ายทอดลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันในดาวเรือง.** วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต(เกษตรศาสตร์) ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 83 หน้า.

สมเพียร เกษมทรัพย์. 2532. **เทคโนโลยีการผลิตและธุรกิจไม้ตัดดอก.** ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 398 หน้า.

สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง. 2543. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 269 หน้า.

สายชล เกตุษา. 2531**. เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวของดอกไม้.** ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 291 หน้า.

สุรพล จันทร์เรือง. มปป. **ดาวเรือง คุณค่าสมุนไพร และไม้ดอกไม้ประดับ จากระดับครัวเรือน สู่ระดับโลก.** ศูนย์หนังสือมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 131 หน้า.

สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์. 2528. **การปรับปรุงพันธุ์พืช.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 368 หน้า.

สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์. 2552. **การปรับปรุงพันธุ์พืช.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 259 หน้า.

สุรินทร์ ปิยโชคณากุล. 2543. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น.** กรุงเทพฯ: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 282 หน้า.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 282 หน้า.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรที่ 3 จังหวัดอุดรธานี. 2562. **“ไม้ตัดดอกริมโขง” สินค้าพืชทางเลือกที่น่าสนใจ สร้างรายได้งาม ของจังหวัดหนองคาย** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.oae.go.th. (4 ธันวาคม 2562).

อภิชาติ วรรณวิจิตร. 2550. **เครื่องหมายโมเลกุลและการใช้ประโยชน์.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://dna.kps.ku.ac.th/m-crop/Chapter2_DNA_markers.html. (4 ธันวาคม 2562).

อภิชาต ศรีสอาด และ พัชรี สำโรงเย็น. 2560. **ดาวเรือง.** กรุงเทพฯ: นาคา อินเตอร์มีเดีย. 104 หน้า.

Bailey, L.H. 1963. **The Standard Cyclopedia of Horticulture,** Vol. III. New York : Macmillan Co.Ltd.

Bharathi, T., USHA, Jawaharlal, M, Kannan, M, Manivannan, N and Raveendran, M. 2014. **Screening of African marigold (*Tagetes erecta* L.) for novelty**. Asian Journal of Horticulture, 9(2), 492-495.

Bolz, G. 1961. **Genetisch-Zuchterische Untersuchungen Bei *Tagetes*.II.** Herstellung, Genetik Und Verwendung rontgeninduzierter Mutanten in der Zuchtung. Eitschrift for Phlanzenzuchtung-Journal if plant breeding, 45(2), 121-142.

Doyle, J. and Doyle.J. 1987. **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.** Phytochem. Bull., 19(11-15).

Goldsmith, G.A. 1968. **Current developments in the breeding of F_1hybrid annuals.** HortScience, 3(4), 269-271.

He, Y.H., Ning G.G., Sun, Y.L., Qi, Y.C. and Bao M.Z. 2009. **Identification of a SCAR marker linked to a recessive male sterile gene (*Tems*) and its application in breeding of marigold (*Tagetes erecta*)**. Plant Breeding. 128(1): 92–96.

Kaul, Mohan L.H. 1988**. Male Sterility in Higher Plants**. Springer, 353-354.

Towner, JW. 1961. **The inheritance of Femina, a male-sterile character in *Tagetes erecta*.** Proc Amer Soc Hort Sci California: AAS—Pocific Davis, p 2.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวพันทิภา โพธิ์พันธุ์
เกิดเมื่อ	24 พฤศจิกายน 2535
ประวัติการศึกษา	พ.ศ.2553 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนชัยนาทพิทยาคม จังหวัดชัยนาท พ.ศ.2558 วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) พืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
ประวัติการทำงาน	2558-2562 ผู้ช่วยนักวิจัยโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ105 แบบรวบยอดยีน ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ไม่ไวแสง และใช้น้ำน้อย มูลนิธิชัยพัฒนา มหาวิทยาลัยแม่โจ้