

ผลของระยะเวลาการเตรียมอับละอองเกสรร่วมกับความเข้มข้นของ 2,4-D
ต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริกลูกผสมชั่วที่ 1 พันธุ์ ‘ปากคลอง’
The Effect of Pretreatment Period and 2,4-D Concentration
on Anther Culture of Pepper Hybrid ‘Pak Klong’

พรพนัช มีกุล^{1*} วัฒนนิกรณ์ เทพโพธา¹ ทศนีย์ ดวงแยม² และศศิธร วรปิตรังสี²
Pornpanuch Meekul^{1*}, Wattananikorn Theppota¹, Tassanee Duangyam²
and Sasitron Vorapitirangsi²

¹ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย กรมวิชาการเกษตร เชียงราย 57180

²ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย กรมวิชาการเกษตร เชียงราย 57000

¹Chiangrai Highland Agricultural Research and Development Center, Department of Agriculture, Chiangrai, Thailand 57180

²Chiangrai Horticulture Research Center, Department of Agriculture, Chiangrai, Thailand 57000

*Corresponding author: panuch.318@gmail.com

Received: September 15, 2023

Revised: January 12, 2025

Accepted: February 19, 2025

Abstract

Double haploid lines are useful in generating material for parental line in hybrid development. This research was to study the effect of pretreatment period and 2,4-D concentration on anther culture of pepper conducted at Chiangrai Highland Agricultural Research and development Center during 2020-2021. Anther culture of F₁ hybrid chili pepper var. ‘Pak Klong’ was performed. Anthers containing microspores at the late uninucleate stage were collected and cultured on C medium supplemented with 0.1 and 0.3 mg/l of 2,4-D and 0.1 mg/l kinetin. The cultured plates were incubated at 35°C for 4, 6 and 8 days and moved to 25°C in the dark for 10 days. Then anthers were transferred to R medium containing 0.1 mg/l kinetin under 16 h day length. Forty days after culturing, embryos emerged from anthers which were transferred to the plant growth regulator free R medium. The highest number of embryos developed to plantlets was 5.8 plantlets/100 anthers when cultured on C medium containing 0.1 mg/l 2,4-D plus 0.1 mg/l kinetin in the dark at 35 °C or 6 day. Chloroplast counting could be used to determine the ploidy level. The investigation of whether diploid plants were derived from spontaneous chromosome doubling was done by using a microsatellite marker. The results revealed 18 haploid plants and 22 spontaneous double haploid from 1,270 anthers.

Keywords: double haploid lines, anther culture, pepper, pretreatment, 2,4-D

บทคัดย่อ

การสร้างสายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์เป็นวิธีการที่มีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากเป็นการลดระยะเวลาในการสร้างพืชสายพันธุ์แท้ การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเป็นวิธีการหนึ่งในการสร้างสายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์ งานวิจัยนี้ศึกษาผลของระยะเวลาการเตรียมอับละอองเกสรร่วมกับความเข้มข้นของ 2,4-D ต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริกหยวกลูกผสมชั่วที่ 1 พันธุ์ปากคลอง ดำเนินการ ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย ระหว่างปี พ.ศ. 2563-2564 นำอับละอองเกสรของพริกที่มีไมโครสปอร์อยู่ในระยะ late uninucleate เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับโคเคนตินความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4, 6 และ 8 วัน และนำไปเพาะเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 10 วัน จึงย้ายอับละอองเกสรลงบนอาหารสูตร R ที่เติมโคเคนติน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่มืด 16 ชั่วโมง และที่มืด 8 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อเพาะเลี้ยงประมาณ 40 วัน สังเกตพบเอ็มบริโอเกิดขึ้นจึงย้ายลงบนอาหารสูตร R ซึ่งไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าสูตรอาหารและระยะเวลาการเตรียมอับละอองเกสรที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ไมโครสปอร์มีการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอคืออาหารสูตร C ที่มี 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับโคเคนติน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 6 วัน โดยสามารถชักนำให้พัฒนาเป็นต้นได้ประมาณ 5.8 ต้นต่อ 100 อับละอองเกสร เมื่อตรวจสอบต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรด้วยการนับจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมและดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์ ได้ต้นแฮพลอยด์จำนวน 18 ต้น และได้ต้นดับเบิลแฮพลอยด์ที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นเองในสภาพเพาะเลี้ยง (spontaneous double haploid) จำนวน 22 ต้น จากการเพาะเลี้ยง 1,270 อับละอองเกสร

คำสำคัญ: สายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์ การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร พริก การเตรียมอับละอองเกสร 2,4-D

คำนำ

พริกเป็นผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและความเป็นอยู่ของคนไทย มีการปลูกและใช้พริกเพื่อประกอบอาหารหรือแปรรูป ในอุตสาหกรรมอาหารและสัณดาสำคัญ เช่น แคปไซซินเพื่อใช้ในการแพทย์ แต่ปัญหาจากโรคและแมลงศัตรูพืชทำให้ผลผลิตต่ำและมีการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชปริมาณมาก การปรับปรุงพันธุ์พริกเพื่อให้ได้ลักษณะที่ต้องการ เช่น ต้านทานโรคหรือลักษณะที่ดีทางการเกษตรต้องใช้พื้นที่และแรงงานมาก และต้องใช้ระยะเวลานานในขั้นตอนการสร้างสายพันธุ์แท้ การสร้างสายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์ (double haploid) เป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์พืช เนื่องจากเป็นการสร้างพืชสายพันธุ์แท้ ที่ไม่มีการผสมของยีน ได้โดยตรงจากพริกสายพันธุ์ลูกผสม อย่างไรก็ตามการสร้างสายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริกนั้นความสำเร็จขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น พันธุกรรม ระยะการพัฒนาที่เหมาะสมของไมโครสปอร์ องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง และการเตรียมอับละอองเกสรก่อนการเพาะเลี้ยง (pretreatment) ซึ่งเป็นการกระตุ้นให้ไมโครสปอร์เปลี่ยนจากการพัฒนาเพื่อเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (gametophyte) เป็นพัฒนาเพื่อเป็นเซลล์ร่างกาย (sporophyte) การทำ pretreatment ทำได้ทั้งทางกายภาพ เช่น การใช้อุณหภูมิ หรือทางเคมี การใช้อุณหภูมิในการ pretreatment นิยมใช้อุณหภูมิต่ำ (4-10 องศาเซลเซียส) หรืออุณหภูมิสูง (30-35 องศาเซลเซียส) ระยะเวลาหนึ่ง ในพริก de Vaulx *et al.* (1981) พบว่าการใช้อุณหภูมิสูงมีผลดีต่อการเกิดเอ็มบริโอโดยเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรที่อุณหภูมิ 35

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน และ 8 วัน พบว่าการใช้อุณหภูมิสูงเป็นเวลา 8 วัน ส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอได้ดีกว่า 2 วัน อย่างเห็นได้ชัด Meekul and Chunwongse (2010) รายงานการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพริกชี้ฟ้าพันธุ์ '83-168' และ 'PEPAC25' พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้น 2,4-D ในอาหารชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอจะเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย แต่ที่ความเข้มข้นของ 2,4-D ระดับ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเอ็มบริโอมีการพัฒนาเป็นต้นปกติช้ากว่าเอ็มบริโอที่ได้จากสูตรอาหารที่มี 2,4-D 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยในสูตรอาหารที่เติม 2,4-D 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับโคเคนติน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการพัฒนาเป็นต้นพริก 9.5 ต้นต่อ 100 อับละอองเกสร และมีการพัฒนาเป็นต้นที่เร็วและสมบูรณ์

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของระยะเวลาการเตรียมอับละอองเกสรร่วมกับความเข้มข้นของ 2,4-D ในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของพริก เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พริกต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาระยะการพัฒนาของไมโครสปอร์

พันธุ์พริกที่ใช้ในการศึกษา คือ พริกหยวกลูกผสมชั่วที่ 1 พันธุ์ 'ปากคลอง' ของบริษัท เจียไต๋ จำกัด มีลักษณะผลยาว 10-12 เซนติเมตร ผลสีเขียวอมเหลือง ให้ผลผลิตดี ผลใหญ่ ผิวเรียบตึงเป็นพันธุ์ที่ตลาดต้องการ ศึกษาลักษณะสัณฐานของดอกพริกหยวกพันธุ์ปากคลองที่ภายในอับละอองเกสรมีไมโครสปอร์พัฒนาอยู่ในระยะ late uninucleate ซึ่งเป็นระยะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร ดังนั้น เก็บดอกพริกดอกตูมหลาย ๆ ขนาด ตั้งแต่ดอกที่มีกลีบเลี้ยงหุ้มกลีบดอกทั้งหมดไปจนถึงดอกที่ใกล้บานมีกลีบดอกเป็นสองเท่าของกลีบเลี้ยง ตรวจสอบระยะการพัฒนาของไมโครสปอร์ โดยย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนซ์ 4',6-diamidino-2-phenylindole

(DAPI) ซึ่งมีคุณสมบัติย้อมติดสีในนิวเคลียส ทำการบดอับละอองเกสรของดอกพริกแต่ละขนาดในสารละลาย DAPI ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วคั่วเศษอับละอองเกสรออก บ่มสไลด์ในที่มืด 10 นาที แล้วตรวจสอบระยะการพัฒนาของไมโครสปอร์ โดยพิจารณาจากตำแหน่งของนิวเคลียสในไมโครสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์กำลังขยาย 400 เท่า ณ ฝ่ายปฏิบัติการงานกล้องจุลทรรศน์และเครื่องถ่ายภาพ สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริก

การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริกทำโดยการพอกฆ่าเชื้อที่ผิวของดอกพริกแล้วแยกอับละอองเกสรออกจากดอก วางอับละอองเกสรบนอาหารชักนำให้เกิดเอ็มบริโอ คือ อาหารสูตร C (de Vaulx *et al.*, 1981) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับโคเคนตินความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4, 6 และ 8 วัน เพาะเลี้ยง 200 อับละอองเกสรขึ้นไปต่อหนึ่งระดับความเข้มข้น และนำไปเพาะเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 10 วัน จึงย้ายอับละอองเกสรลงบนอาหารสูตร R ที่เติมโคเคนติน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่มืด 16 ชั่วโมง และที่มืด 8 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อเพาะเลี้ยงประมาณ 40 วัน สังเกตพบเอ็มบริโอเกิดขึ้น จึงย้ายลงบนอาหารสูตร R ซึ่งไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อให้พัฒนาเป็นต้นพริกที่สมบูรณ์

การตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมต้นพริกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

นับจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม (guard cell) ของผิวใบพริกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร เพื่อตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซม ตามวิธีของ Arjunappa *et al.* (2015) ทำการลอกผิวใบด้านหลังใบพริกแล้ววางบนสไลด์ที่มีน้ำกลั่น ตรวจสอบด้วยกล้อง

จุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า โดยจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมของพริกแฮพลอยด์มีจำนวน 8-10 คลอโรพลาสต์ ส่วนพริกดิพลอยด์มี 16-20 คลอโรพลาสต์

ตรวจสอบ Spontaneous double haploid โดยใช้ ดีเอ็นเอเครื่องหมาย

การตรวจสอบ Spontaneous double haploid ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์ ได้นำต้นพริกส่งวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพพืช ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน วิธีการตรวจสอบทำการสกัดดีเอ็นเอของใบพริกของต้นดิพลอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร ตามวิธี Fulton *et al.* (1995) โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์ โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างในพริกหยวกลูกผสมชั่วที่ 1 พันธุ์ปากคลอง คือ CA516439 ซึ่งวางตัวอยู่บนกลุ่มลิงค์เจกกลุ่มที่ 10 (Wu *et al.*, 2009) ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลโพลีอะครีลาไมด์ 4.5 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิจัย

การศึกษาระยะการพัฒนาของไมโครสปอร์

การศึกษาลักษณะพื้นฐานของดอกพริกหยวกพันธุ์ปากคลอง ที่มีไมโครสปอร์พัฒนาอยู่ในระยะ late-uninucleate ทำโดยการย้อมสีนิวเคลียสด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ DAPI ผลการศึกษาพบว่า ขนาดของดอกตูมที่พัฒนาขึ้นสัมพันธ์กับการพัฒนาของไมโครสปอร์ภายในอับละอองเกสร ดอกตูมที่มีกลีบเลี้ยงหุ้มกลีบดอกทั้งหมดไมโครสปอร์ส่วนหนึ่งยังติดกันอยู่ในระยะ tetrad และส่วนใหญ่พบไมโครสปอร์รูปร่างกลม นิวเคลียสเรียงสัณฐานอยู่ตรงกลาง คือ ระยะ early uninucleate ส่วนดอกพริกที่ใกล้บาน อับละอองเกสรเป็นสีม่วง ไมโครสปอร์ภายในส่วนใหญ่จะพบ 2 นิวเคลียส ซึ่งผ่านการแบ่งตัวแบบไมโทซิสครั้งที่ 1 แล้ว หรือเรียกว่าระยะ binucleate ในส่วนลักษณะพื้นฐานของดอกพริกหยวกพันธุ์ปากคลองที่กลีบดอกพังกลิบล้างเล็กน้อยและอับละอองเกสรมีสีม่วงอ่อนด้านหนึ่ง (Figure 1) มีไมโครสปอร์ที่อยู่ในระยะ late-uninucleate พบนิวเคลียสติดกับผนังเซลล์ของไมโครสปอร์ เนื่องจากเป็นระยะที่แวคิวโอลขยายขนาดใหญ่เกือบเต็มทั้งเซลล์ นิวเคลียสเคลื่อนจนกระทั่งติดผนังเซลล์และเตรียมแบ่งตัวแบบไมโทซิสครั้งที่ 1 ดังนั้นจะเลือกดอกพริกที่มีลักษณะดังกล่าวนำไปเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

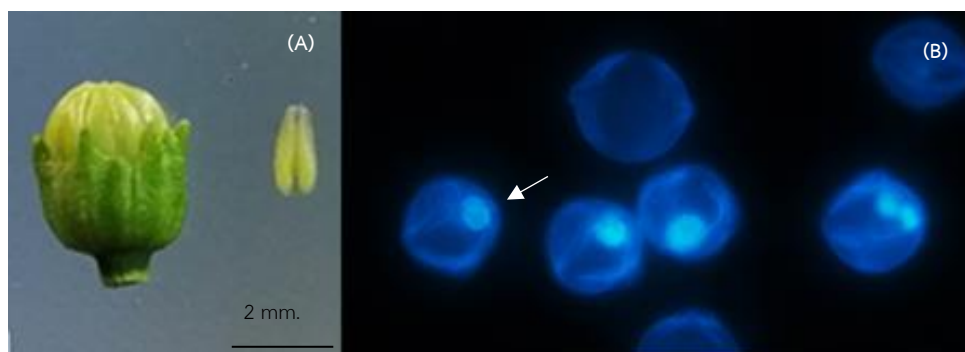


Figure 1 Flower buds of and anther ‘Pak Klong’ pepper containing microspores at the stage of late-uninucleate (A) and microspores in the late uninucleate stage stained with DAPI, examined by 400x fluorescence microscopy (B)

การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริก

ได้ศึกษาสถานะในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริก โดยใช้พริกหยวกพันธุ์ปากคลอง เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรในอาหารสูตร C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 หรือ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไคเนติน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 4, 6 หรือ 8 วัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเป็นเวลาประมาณ 40 วัน พบการเกิดเอ็มบริโอโดยไม่ผ่านแคลลัส (direct embryogenesis) เอ็มบริโอบางส่วนมีการพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์เมื่อย้ายลงอาหารสูตร R เป็นเวลาประมาณ 20-30 วัน (Figure 2) การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในอาหาร C ที่มี 2,4-D ทั้งสองระดับความเข้มข้น เป็นเวลา 8 วัน มีจำนวนต้นพริกที่เกิดขึ้นน้อยที่สุด การชักนำให้เกิดเอ็มบริโอในอาหารสูตร C ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.3

มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 4 วัน เกิดต้นพริก 5.1 ต้นต่อ 100 อับละอองเกสร ซึ่งเป็นสถานะที่เอ็มบริโอพัฒนาเป็นต้นสูงที่สุด ร้อยละ 50 และการเกิดต้นสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร C 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 6 วัน พบจำนวนต้นสูงที่สุดเท่ากับ 5.8 ต่อ 100 อับละอองเกสร (Table 1) ต้นพริกดิพลอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรจะต้องมีการตรวจสอบเซลล์ที่พัฒนาเป็นต้นพริก โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย เนื่องจากต้นดิพลอยด์ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรนั้นอาจเกิดจากการพัฒนาของผนังอับละอองเกสร ซึ่งมีพันธุกรรมเช่นเดียวกับต้นพริกที่ให้อับละอองเกสร หรืออาจเกิดการพัฒนาขึ้นจากเซลล์สืบพันธุ์ที่มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นเองในสภาพเพาะเลี้ยง (spontaneous chromosome doubling)

Table 1 Effect of pretreatment period and 2,4-D concentration on anther culture of pepper hybrid ‘Pak Klong’

Treatment	Day of heat treatment	No. of cultured anthers	No. of embryos produced	No. of regenerated plants	Plant regeneration percentage
2,4-D 0.1 mg/l + kinetin 0.1 mg/l	4	207	32	7	3.4
2,4-D 0.1 mg/l + kinetin 0.1 mg/l	6	226	34	13	5.8
2,4-D 0.1 mg/l + kinetin 0.1 mg/l	8	216	13	4	1.9
2,4-D 0.3 mg/l + kinetin 0.1 mg/l	4	214	22	11	5.1
2,4-D 0.3 mg/l + kinetin 0.1 mg/l	6	207	11	3	1.4
2,4-D 0.3 mg/l + kinetin 0.1 mg/l	8	200	10	2	1.0



Figure 2 Direct androgenesis embryo and haploid embryo (A,B); *In Vitro* regeneration and development of plantlets (C,D) and transplaning of *In Vitro* regenerated plantlets.

การตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมต้นพริกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

จากรายงานของ Arjunappa *et al.* (2015) ได้ศึกษาวิธีตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมต้นพริกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรโดยศึกษา 3 วิธี คือ 1) การนับจำนวนโครโมโซมที่ปลายรากพริก พบว่าต้นพริกแฮพลอยด์มีจำนวนโครโมโซม 12 แท่ง ส่วนดิพลอยด์มีโครโมโซม 24 แท่ง 2) การนับจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม ซึ่งต้นแฮพลอยด์มีจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม 8-10 คลอโรพลาสต์ ส่วนต้นดิพลอยด์มีคลอโรพลาสต์ 16-20 คลอโรพลาสต์ และ 3) การใช้เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ในการประเมินปริมาณดีเอ็นเอภายในเซลล์แล้ว

เปรียบเทียบกับปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างอ้างอิงที่ทราบจำนวนชุดโครโมโซม ผลการทดลองพบว่า ทุกวิธีสามารถใช้ตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมได้ การนับจำนวนโครโมโซมและการนับจำนวนคลอโรพลาสต์มีข้อดีกว่าการใช้โฟลไซโตมิเตอร์ คือ มีค่าใช้จ่ายที่น้อยกว่า ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ใช้การนับจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมในการตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมเบื้องต้น เนื่องจากทำได้ง่ายและรวดเร็ว โดยได้นำต้นพริกจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร จำนวน 40 ต้น ตรวจสอบพบต้นพริกที่คาดว่าจะเป็ต้นแฮพลอยด์ 18 ต้น และต้นพริกที่คาดว่าจะเป็ต้นดิพลอยด์จำนวน 22 ต้น (Figure 3)

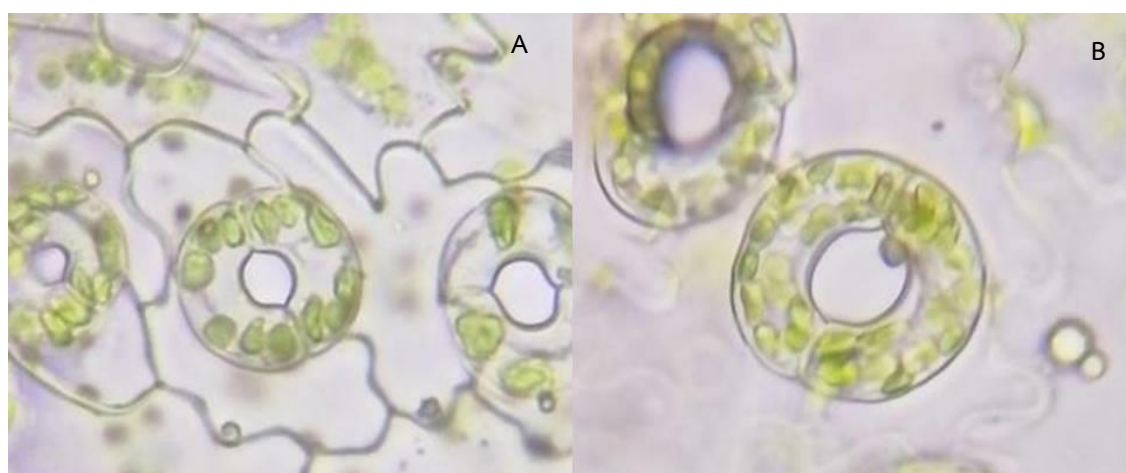


Figure 3 The guard cells of putative haploid plant (A) and putative diploid plant (B) demonstrate the difference in number of chloroplasts

การตรวจสอบ spontaneous double haploid โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย

การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ สามารถแยกต้นดิพลอยด์ที่เกิดจากการพัฒนาของเซลล์ร่างกายของอับละอองเกสร หรือจากเอ็มบริโอพัฒนามาจากเซลล์สืบพันธุ์ที่เพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นเองในสภาพเพาะเลี้ยง (spontaneous

chromosome doubling) ได้โดยการเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอของต้นดิพลอยด์ที่ได้กับแถบดีเอ็นเอของต้นที่ให้อับละอองเกสร โดยต้นดิพลอยด์ที่เกิดจากการพัฒนาจากเซลล์ร่างกายของอับละอองเกสรได้มาจากการรวมของเซลล์สืบพันธุ์ของแม่และพ่อ ดังนั้นควรมีแถบดีเอ็นเอของทั้งแม่และพ่อ ส่วนต้นพริกที่พัฒนาจากเซลล์สืบพันธุ์ที่เพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นเอง

ในสภาพเพาะเลี้ยงนั้นจะมีแถบดีเอ็นเอเป็นแถบเดียว ซึ่งอาจจะเป็นแถบใดเพียงแถบหนึ่งก็ได้ จากผลการตรวจสอบพบว่า แถบดีเอ็นเอของพริกพันธุ์ปากคลอง ซึ่งเป็นลูกผสมชั่วที่ 1 (ตัวอย่างที่ 20) พบแถบดีเอ็นเอสองแถบ ตำแหน่งที่ 170 และ 160 คู่เบส ตามลำดับ (Figure 4) ส่วนต้นพริกที่พัฒนาจากเซลล์สืบพันธุ์ที่เพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นเองในสภาพเพาะเลี้ยงนั้น มีแถบดีเอ็นเอเป็นแถบเดียว จากการทดสอบต้นพริกดิพลอยด์ จำนวน 19 ต้น (ตัวอย่างที่ 1 ถึง 19) ไม่พบ

ต้นพริกที่พัฒนามาจากเซลล์ร่างกายของอับละอองเกสร แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการเพาะเลี้ยงนี้สามารถชักนำการพัฒนาเอ็มบริโอจากละอองเกสรเท่านั้น จากนั้นได้ทำการย้ายต้นพริกดับเบิลแฮพลอยด์ปรับสภาพและปลูกในโรงเรือนเพื่อเก็บเมล็ดพันธุ์ โดยลักษณะทางสรีระของพริกดับเบิลแฮพลอยด์แต่ละต้นแตกต่างกันทั้งขนาดผล รูปร่างผล เป็นแบบสามเหลี่ยมหรือรียาวๆ หรือดังใน Figure 5 ลักษณะการติดผลที่ผลขึ้นหรือผลห้อยลง

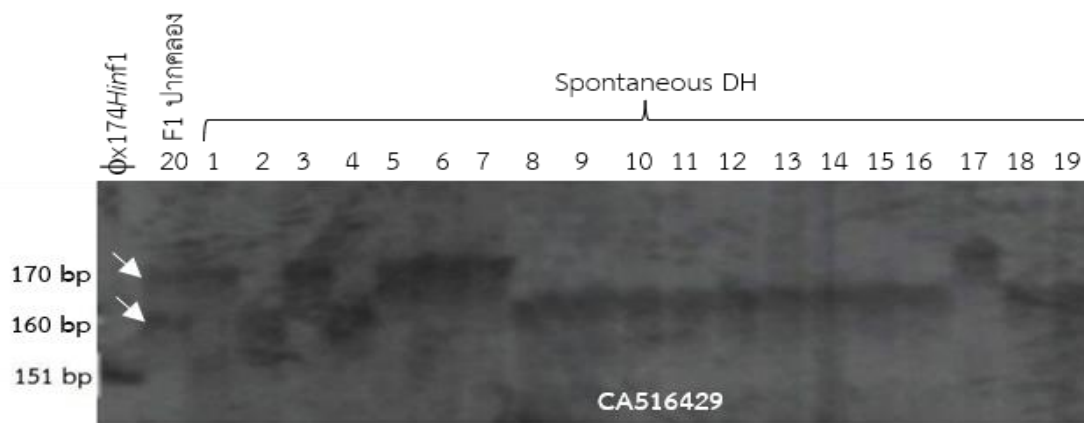


Figure 4 Determination of diploid plants obtained from anther culture using microsatellite DNA marker CA516439



Figure 5 Anther culture derived plants grown in the greenhouse

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการศึกษาระยะเวลาการเตรียมอับละออง เกสรร่วมกับความเข้มข้นของ 2,4-D ต่อการเพาะเลี้ยง อับละอองเกสรพริกหยวกลูกผสมชั่วที่ 1 พันธุ์ปากคลอง พบว่าการใช้ pretreatment ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน เพอร์เซ็นต์การเกิดต้นลดลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานของ de Vault *et al.* (1981) ที่รายงานว่า การใช้สภาวะดังกล่าวสามารถเพาะเลี้ยง อับละอองเกสรพริกผลใหญ่หลายพันธุ์ โดยสามารถชักนำ ให้เกิดต้นได้ 5-40 ต้นต่อ 100 อับละออง ซึ่งอาจเกิดจาก พันธุกรรมของต้นพริกที่แตกต่างกัน ถึงแม้ว่าการศึกษา ครั้งนี้จะมีเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นไม่มากนัก แต่ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเป็นวิธีการที่ ไม่ซับซ้อน ไม่ต้องใช้อุปกรณ์หรือเครื่องมือที่ทันสมัย หากมี การศึกษาต่อไปถึงปัจจัยอื่น ๆ ซึ่งมีผลต่อการพัฒนา เป็นต้น เช่น การเพิ่มองค์ประกอบอื่น ๆ ของอาหารชักนำ เช่น ผงถั่ว หรือกรดอะมิโนบางชนิด อาจเพิ่ม ประสิทธิภาพการชักนำให้พัฒนาเป็นต้นเพิ่มขึ้นได้

การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมขึ้นเองในสภาพ เพาะเลี้ยงเป็นประโยชน์ต่อการสร้างสายพันธุ์ดับเบิล แฮพลอยด์ เนื่องจากสามารถลดขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชุด โครโมโซมโดยใช้สารเคมีได้ ซึ่งเป็นสภาวะที่พบได้ในการ เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพืชหลายชนิด การศึกษาในครั้งนี้ พบการเกิด spontaneous double haploid สูงที่สุด ร้อยละ 50 ซึ่งสูงกว่าการศึกษาของ Meekul (2010) เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริกลูกผสมชั่วที่ 1 ('83-168'x 'PEPAC25') พบการเกิดร้อยละ 20 Seguí-Simarro and Nuez (2008) ศึกษาการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม ขึ้นเองในสภาพเพาะเลี้ยงรายงานว่า อาจเกิดได้ 3 วิธี คือ endoreduplication, nuclear fusion และ endomitosis โดยสภาพแวดล้อม เช่น สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม ออกซิน สภาวะเครียดต่าง ๆ ที่ใช้ในการ pretreatment มีผลต่อการเพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นเองในสภาพ เพาะเลี้ยงอับละอองเกสร ส่วนพันธุกรรมของพืชอาจจะ เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผล อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาเพื่อให้ มีข้อมูลสนับสนุนที่มากเพียงพอต่อไป

สรุปผลการวิจัย

จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริกหยวก ลูกผสมชั่วที่ 1 พันธุ์ปากคลอง สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ไมโครสปอร์มีการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอ คือ อาหารสูตร C ที่มี 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ ไคเนติน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 6 วัน โดยสามารถชักนำให้พัฒนาเป็น ต้นได้ 5.8 ต้นต่อ 100 อับละอองเกสร และเอ็มบริโอที่ได้ จากอาหารสูตรนี้มีการพัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์ในระยะเวลา สั้น เมื่อตรวจสอบต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร ด้วยการนับจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม และการใช้ ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ ได้ต้น แหพลอยด์จำนวน 18 ต้น และได้สายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์ ที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นเองในสภาพ เพาะเลี้ยง (spontaneous double haploid) จำนวน 22 ต้น

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยในครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและ นวัตกรรม (สกว.) ปี พ.ศ. 2564 เรื่องการปรับปรุงพันธุ์ และเทคโนโลยีการผลิตพริกหวาน

เอกสารอ้างอิง

Arjunappa, H.M. K.P. Sateesh and L.D. Prema. 2015. Studies on ploidy analysis and chromosome doubling in androgenic plants of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). **International Journal of Agriculture Innovations and Research** 4(4): 2319–1473.

de Vaulx, R.D., D. Chambonnet and E. Pochard. 1981. Culture in *vitro* d'anthers de piment (*Capsicum annuum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des trgtitement à + 35°C. **Agronomie** 1: 859–864.

Fulton, T.M., J. Chunwongse and S.D. Tanksley. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. **Plant Molecular Biology Reporter** 13(3): 207–209.

Meekul, P. 2010. **Production of Double Haploid Lines from Anthers of F₁ Hybrid Pepper**. Master Thesis. Kasetsart University. 57 p. [in Thai]

Meekul, P. and J. Chunwongse. 2010. Production and verification of double haploid lines derived from F₁ hybrid pepper cvs. '83-168' and 'PEPAC25' by anther culture. **Agricultural Science Journal** 41(2): 203–212. [in Thai]

Seguí-Simarro, J.M. and F. Nuez. 2008. Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. **Cytogenetic and Genome Research** 120: 358–369.

Wu, F., N.T. Eannetta, M. Mazourek, M.M. Jahn and S.D. Tanksley. 2009. A COSII genetic map of the pepper genome provides a detailed picture of synteny with tomato and new insights into recent chromosome evolution in the genus *Capsicum*. **Theoretical Applied Genetics** 118: 1279–1293.