

วิธีการเพาะเลี้ยงคัพภะคู่ผสมข้ามชนิดของผักกะหล่ำ

Embryo Culture of Interspecific Hybrid in *Brassica* spp.

ชวนพิศ อรุณรังสิกุล¹ สุมนธา นพรัตน์¹ และ ประเทือง ดอนสมไพร¹

Chuanpis Aroonrungsikul Sumontha Nopparatana and Prateang Donsompai

ABSTRACT

Vernalization of imbibed seed of *Brassica campestris* and *B. juncea* and one month old plant of *B. oleracea* were investigated at 5°C, continuous illumination for 30 and 45 days, respectively. Vernalization procedures and flowering synchronization were adjusted to enhance the flower buds for making interspecies pollination. Then, each pot plant was kept in growth cabinet which controlled 23–25°C and continuous light duration. Twenty days after pollination, the hybrid capsules were collected and embryos rescued into the modified MS medium addition with 10% (V/V) coconut juice, 300 mg/l casein hydrolysate, 0.1 mg/l NAA and 0.1 mg/l BA. Thirty days after culture the hybrid embryos between *B. campestris* x *B. oleracea*, *B. juncea* x *B. campestris*, *B. juncea* x *B. oleracea*, *B. campestris* x *B. juncea* were regenerated to plantlets. Phenotype character of the interspecific hybrids and their parents were examined, the electrophoresis banding pattern of esterase (EST), malate dehydrogenase (MDH), and alcohol dehydrogenase (ADH) pattern were revealed, as well,

Key words : *Brassica* spp., interspecific hybrid, embryo rescue, vernalization, electrophoresis

บทคัดย่อ

การชักนำให้ผักกะหล่ำออกดอก โดยการเพาะเมล็ด *Brassica campestris* (ผักกาดขาว) และ *B. juncea* (ผักกาดเขียว) วางในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 5°C ความชื้นสัมพัทธ์ 85% ให้แสงตลอด 24 ชม. เป็นเวลานาน 30 วัน สำหรับ *B. oleracea* (คะน้า) จะใช้ต้นอายุ 30 วัน ดำเนินการชักนำเป็นเวลานาน 45 วัน ย้ายต้นกะหล่ำลงในกระถางและดูแลในห้องควบคุมสภาพ

แวดล้อม ดำเนินการผสมข้ามชนิดในผักกะหล่ำดังกล่าว พบว่าคัพภะอายุ 20 วัน ของคู่ผสมระหว่าง *B. campestris* x *B. oleracea*, *B. juncea* x *B. campestris*, *B. juncea* x *B. oleracea* และ *B. campestris* x *B. juncea* สามารถเพาะเลี้ยงคัพภะในหลอดทดลองและกระตุ้นเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ภายในเวลา 30 วัน ตามลำดับ โดยใช้อาหารสูตร MS ดัดแปลงเติมด้วย casein hydrolysate 300 มก/ล, น้ำมะพร้าว 10% (โดยปริมาตร) NAA และ BA อย่างละ 0.1 มก/ล เพาะเลี้ยงคัพภะจนเป็น

1 งานเทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์พืช ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน นครปฐม

1 Seed Technology Unit, Central Laboratory and Greenhouse Complex, KURDI, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

ต้นอ่อน 15 วัน และเปลี่ยนมาใช้อาหารสูตร MS ที่ไม่มีฮอร์โมนอีก 15 วัน พบว่าคัพภะกลุ่มผสมสามารถเป็นต้นสมบูรณ์ มีลักษณะภายนอกที่ได้จากต้นพ่อ-แม่ร่วมกัน ส่วนลักษณะทางชีวเคมีซึ่งตรวจสอบด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าสามารถบอกความแตกต่างระหว่างกลุ่มผสมและพ่อ-แม่จากแถบสีเอ็นไซม์ esterase, malate dehydrogenase และ alcohol dehydrogenase.

คำนำ

การปรับปรุงพันธุ์พืชผักสกุล *Brassica* มีหลายวิธี การผสมข้ามชนิด (interspecific hybridization) เป็นวิธีการหนึ่งที่จะใช้ปรับปรุงพันธุ์พืชกลุ่มนี้ได้ จำเป็นต้องทำการแยกเลี้ยงคัพภะอ่อนของกลุ่มผสมในหลอดทดลอง (in vitro culture) โดยอาศัยอาหารสังเคราะห์ สูตร MS, Nitsch and Nitsch (Inomata, 1979; Hossain et al., 1988) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้เพื่อวัตถุประสงค์หลายประการ เช่น ผักพันธุ์ HAKURAN เป็นกลุ่มผสมระหว่างผักกาดขาวปลีกับกะหล่ำปลี มีถิ่นฐานวิทยาระหว่างพ่อ-แม่ และต้านทานโรคเน่าคอดิน และโรคจากเชื้อแบคทีเรีย (Nishi, 1981) เป็นต้น การตรวจสอบจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา กายวิภาควิทยา ลักษณะเรณู ความสมบูรณ์ของเกสรตัวผู้และลักษณะพื้นผิวนอกของเกสร สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพ่อ-แม่ และลูกผสม สกุลกะหล่ำแบ่งตามลักษณะทางเซลล์วิทยาของ Yarnell (1956) สามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ cole, mustard group และ rape group ตามลักษณะของผิวใบและเนื้อใบที่แตกต่างกัน Inomata (1983) ตรวจสอบประสิทธิภาพการผสมข้ามและลักษณะของโครโมโซมของลูกผสมระหว่าง *B. campestris* กับ *B. oleracea* พบว่ามีความแตกต่างของลูกผสมช่วงที่ 1 ที่ผลิตชุดโครโมโซม 19, 38 และ 28 และสามารถให้ผลผลิตเป็นลูกผสม *B. napus* ที่มีเซลล์สืบพันธุ์ที่สมบูรณ์ทั้งสองประเภท

เทคนิคทางเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสกับไอโซไซม์ ก็สามารถนำมาใช้จำแนกลักษณะทางพันธุกรรมจำแนกสาย

พันธุ์ และงานการปรับปรุงพันธุ์ Coulthart and Denford (1982) ได้แสดงให้เห็นว่าเอ็นไซม์ phosphoglucumutase (PGM) สามารถใช้เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ-แม่ และลูกผสมข้ามชนิดของ *B. campestris*, *B. oleracea* และ *B. napus* นอกจากนี้เอ็นไซม์ leucine amino peptidase (LAP), phosphoglucose isomerase (PGI), aspartate amino transferase (AAT) และ 6-phosphoglucuronate dehydrogenase (6P) ก็สามารถแยกความแตกต่างของพืชผักสกุลกะหล่ำระหว่างพ่อแม่ และลูกผสมข้ามชนิดที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ของผักกะหล่ำ (Sundberg and Glimelius, 1986)

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาแนวทางความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคการผสมข้ามชนิด (Interspecific hybridization) กับการแยกเลี้ยงคัพภะ (embryo rescue) กับพันธุ์ผักกะหล่ำที่ใช้ในประเทศไทย เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ในก้าวต่อไป ตลอดจนดำเนินการพิสูจน์ผลของลูกผสมที่ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

เมล็ดพันธุ์ผักสกุลกะหล่ำ 3 ชนิด จำนวน 10 พันธุ์ ที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ กลุ่ม *B. campestris* ได้แก่ ผักกาดขาว (V_3) ผักกวางตุ้งดอก (V_4) ผักกาดขาวปลี (V_5) ผักกวางตุ้งต้นเขียว (V_6) ผักกาดฮ่องเต้ (V_7) กลุ่ม *B. juncea* ได้แก่ ผักกาดเขียวปลี (V_9) ผักกาดเขียวปลี (V_{12}) ผักกาดเขียว (V_{13}) และกลุ่ม *B. oleracea* ได้แก่ ผักคะน้าพันธุ์ใบ (V_{10}) ผักคะน้าพันธุ์ก้าน (V_{11})

เพาะเมล็ด *B. campestris* และ *B. juncea* ที่อุณหภูมิ 5°C ให้แสงตลอดวัน ด้วยตู้บ่มอุณหภูมิต่ำ (low temperature incubator) เป็นเวลานาน 30 วัน ส่วน *B. oleracea* จะใช้ต้นอ่อนอายุประมาณ 30 วัน นำมาชักด้วยวิธีการเดียวกันนาน 45 วัน แล้วย้ายลงปลูกในกระถางดินผสม ภายในห้องควบคุมอุณหภูมิ (growth chamber cabinet) ดำเนินการตอนเกสรตัวผู้

ของต้นแม่ก่อนผสม 1 วัน (emasculatation) ถ่ายละออง เกสรจากต้นพ่อลงที่ดอกของต้นแม่ที่ตอนไว้ หลังผสม เกสรแล้ว 20 วัน เก็บฝักที่ได้มาพอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย clorox 10% และ 5% ตามลำดับเป็นเวลานาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาดหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำฝักที่ฆ่าเชื้อแล้วมาบันทึกขนาดความยาวของฝักกลุ่มผสม จำนวนคัพภะต่อฝักที่สามารถพัฒนาหลังจากผสมเกสรข้ามชนิดแล้ว 20 วัน ฆ่าฝักแยกเอาคัพภะอ่อนมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS คัดแปลง เพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 20°-28°ซ หลังจาก 7-10 วัน จะเมื่อคัพภะพัฒนาเป็นต้นอ่อนเปลี่ยนถ่ายลงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS จะต้นเจริญเติบโตได้ครบ 1 เดือน จึงย้ายลงปลูกในกระถางดินผสม เพื่อดำเนินการศึกษาลักษณะของต้น ได้แก่ ความสูงของต้น, สีใบ, รูปร่างใบ เป็นต้น ความสมบูรณ์ของเกสรตัวผู้ (pollen fertility) ณ วันดอกบานเต็มที่ โดยการย้อมสีเกสรด้วย acetocarmine ความเข้มข้น 1% และตรวจสอบด้วยแถบสีของเอ็นไซม์ ชนิดต่างๆ โดยเก็บใบอ่อนใบที่ 2-3 นับจากปลายยอด 30-50 มก. มาบดด้วย phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 M pH 7.5 หยดตัวอย่างลงบน polyacrylamide gel ที่มีความเข้มข้น 7.5% ผสมกับ Tris 36.6% TEMED 0.23% กรดเกลือความเข้มข้น 1 N pH 8.9 ผ่านกระแสไฟ 1.5 mA นาน 3-4 ชม. ภายใต้อุณหภูมิ 5-10°ซ. ย้อมสีเพื่อพิจารณาแถบสีของเอ็นไซม์ esterase (EST) malate dehydrogenase (MDH) และ alcohol dehydrogenase (ADH)

ผลและวิจารณ์

ความยาวของฝักกลุ่มผสมที่ได้อยู่ระหว่าง 13 ถึง 32 มม. จำนวนคัพภะต่อฝักจะผันแปรระหว่าง 1 ถึง 7 (Table 1) กลุ่มผสมระหว่าง *B. campestris* var. *parachinensis* กับ *B. juncea* มีจำนวน 622-770 คัพภะ จากจำนวน 50 ต้น แต่จำนวนคัพภะที่พัฒนาเป็นต้นได้เพียง 1-13 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของต้นกล้าที่สามารถ

ย้ายลงดินที่ปลูก 0.13-2.09 เท่านั้น ผลงานที่ผ่านมาคู่ผสมดังกล่าวสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนและต้นกล้าออกปลูก 17.5 ถึง 85.7% ตามลำดับ จากจำนวนคัพภะเพียง 80 คัพภะ (ชวนพิศ และคณะ, 2535) จำนวนคัพภะที่สามารถพัฒนาและอยู่รอดได้จะมีความสามารถแตกต่างกัน ตามชนิดและความยากง่ายของการผสมติดทางพันธุกรรม แม้ว่าศักยภาพการผสมติดจะสูง แต่การพัฒนาของคัพภะอาจชะงักได้ เนื่องจากความแตกต่างของพื้นฐานทางพันธุกรรมที่ต่างกัน สภาพแวดล้อมหลังการผสมเกสร และสภาพความสมบูรณ์ของต้นแม่ อาจส่งผลให้เกิดความล้มเหลวของพัฒนาการระยะแรกและส่งผลต่อเนื่องถึงระยะโตเต็มที่ (Namai et al., 1980; Allard, 1960) ส่วนผลงานของ Hossain et al., (1988) ศึกษาคู่ผสมข้ามระหว่าง *B. oleracea* กับ *B. campestris* ก็สามารถพัฒนาต้นอ่อนเพียง 0.67-4% จากจำนวนคัพภะ 150 คัพภะ สำหรับการศึกษาครั้งนี้ ไม่ประสบความสำเร็จในการผสมและพัฒนาของคัพภะระหว่างกลุ่มผสมดังกล่าว แต่ในกรณีที่เป็นกลุ่มผสมสลัฟพ่อแม่ประสบความสำเร็จอยู่บ้าง กล่าวคือจำนวนที่ได้มีจำนวนเพียง 1 ถึง 44 ซึ่งสามารถเจริญพัฒนาเป็นต้นอ่อนในหลอดทดลองเพียง 1-3 ต้น เท่านั้น (Table 1) Inomata (1978) รายงานว่าคู่ผสมระหว่าง *B. campestris* กับ *B. oleracea* ก็ประสบความสำเร็จต่ำ และไม่สามารถพบการพัฒนาเป็นต้นเลยเมื่อผสมสลัฟพ่อแม่ ซึ่งน่าจะเป็นผลจากปัญหาทางพันธุกรรมการเข้ากันไม่ได้ (Incompatibility) ของ *B. oleracea* ทำให้ละอองเกสรไม่สามารถเจริญเข้าสู่ style และไม่สามารถผ่าน micropyle ของส่วนสืบพันธุ์ต้นแม่ได้

ลักษณะทางกายภาพของลูกผสมมีลักษณะที่คล้ายพ่อแม่ เช่น ความสูงของต้น ทรงต้นลักษณะของใบ สีใบ ความหนาของใบ ขนาดของใบ ขอบใบ ผิวใบ ตลอดจนก้านใบจะมีลักษณะผสมผสานระหว่างพ่อแม่ ซึ่งลักษณะโดยรวมจะมีความใกล้เคียงกับต้นแม่ เช่น *B. campestris* var. *chinensis* (V₇) กับ *B. juncea* (V₁₂) หรือ Hiroshimana (V₅) กับ Kobutabana

Table 1 Interspecific hybrids through embryo culture of *Brassica* spp.

Combination	Length of capsule (mm.)	No.embryo per capsule	No.embryo rescued	No.hybrid plantlet	%hybrid ^{1/} plant obtained
<i>B. campestris</i> var.					
<i>pekinensis</i>					
x <i>B. juncea</i> ^{b/}	16.67 ± 2.31	6.38 ± 2.07	239	1	0.42
x <i>B. juncea</i> ^{c/}	19.14 ± 2.39	6.47 ± 1.92	317	6	1.89
x <i>B. oleracea</i> var.					
<i>alboglabra</i> ^{f/}	13.74 ± 1.95	5.38 ± 1.80	86	1	1.16
<i>B. campestris</i> var.					
<i>parachinensis</i> ^{d/}					
x <i>B. juncea</i> ^{a/}	32.00 ± 2.93	7.68 ± 2.10	622	13	2.09
x <i>B. juncea</i> ^{c/}	29.68 ± 2.75	5.42 ± 1.89	770	1	0.13
<i>B. campestris</i> var.					
<i>parachinensis</i> ^{e/}					
x <i>B. oleracea</i> var.					
<i>alboglabra</i> ^{f/}	19.75 ± 0.87	6.29 ± 1.82	44	3	6.82
<i>B. campestris</i> var.					
<i>chinensis</i>					
x <i>B. juncea</i> ^{a/}	22.87 ± 2.38	4.58 ± 1.81	215	7	3.26
x <i>B. juncea</i> ^{c/}	21.31 ± 2.25	3.84 ± 1.69	189	5	2.65
x <i>B. oleracea</i> var.					
<i>alboglabra</i> ^{f/}	15.50 ± 1.98	2.00 ± 1.00	8	2	25.00
x <i>B. oleracea</i> var.					
<i>alboglabra</i> ^{g/}	20.50 ± 1.79	2.33 ± 1.00	1	1	100.00
<i>B. campestris</i> ^{h/}					
x <i>B. juncea</i> ^{c/}	22.77 ± 2.05	3.7 ± 1.09	37	16	43.24
<i>B. juncea</i> ^{a/}					
x <i>B. campestris</i> var.					
<i>pekinensis</i>	21.53 ± 2.30	3.43 ± 1.67	72	10	13.89
x <i>B. campestris</i> var.					
<i>parachinensis</i> ^{d/}	20.19 ± 2.57	3.73 ± 1.84	56	1	1.79

Table 1 (Continue)

Combination	Length of capsule (mm.)	No.embryo per capsule	No.embryo rescued	No.hybrid plantlet	%hybrid ^{1/} plant obtained
x <i>B. campestris</i> var. <i>parachinensis</i> ^{e/}	19.02 ± 2.07	2.85 ± 1.38	57	3	5.26
x <i>B. campestris</i> var. <i>chinensis</i>	20.25 ± 2.22	2.76 ± 1.25	57	19	33.33
<i>B. juncea</i> ^{c/}					
x <i>B. campestris</i> var. <i>pekinensis</i>	18.28 ± 1.63	2.70 ± 1.42	62	5	8.06
x <i>B. campestris</i> var. <i>parachinensis</i> ^{d/}	17.52 ± 1.83	2.16 ± 1.19	41	9	21.95
x <i>B. campestris</i> var. <i>parachinensis</i> ^{e/}	19.00 ± 1.82	3.21 ± 1.68	91	20	21.98
x <i>B. campestris</i> var. <i>chinensis</i>	20.27 ± 2.04	4.18 ± 1.63	163	44	26.99
x <i>B. oleracea</i> var. <i>alboglabra</i> ^{f/}	13.59 ± 1.97	3.38 ± 1.31	28	5	17.86

a/ Leaf Mustard (Head type) (V₉)

e/ Tsui-Sim Green stalk Cabbage (V₆)

b/ Mustard Green (V₁₂)

f/ Leaf Kailaan (Taiwan) (V₁₀)

c/ Kobutakana (V₁₃)

g/ Leaf Kailaan (Republic of China), (V₁₁)

d/ Flowering Stalk Chinese Cabbage (V₄)

h/ Hiroshimana (V₅)

$$1/ \% \text{ hybrid plant} = \frac{\text{No. of hybrid plant}}{\text{No. of embryo explant}} \times 100$$

Table 2 Plant height, petiole length (cm) and leaf characters of some interspecific hybrids.

Combination	Leaf					Petiole length	Plant height
	Length (cm)	Width (cm)	Incision	Margin	Colour		
v4xv9	14.49 ± 1.52	8.41 ± 0.96	S	E	Green	7.11 ± 2.06	21.62 ± 5.36
v6xv10	10.80 ± 2.65	9.17 ± 0.76	L	E	Green	9.83 ± 2.02	22.75 ± 7.42
v7xv9	12.93 ± 1.90	7.95 ± 2.01	L	E	Light green	5.08 ± 0.49	23.75 ± 1.06
v7xv11	11.38 ± 1.03	10.00 ± 1.08	L	E	Green	6.68 ± 0.72	27.00
v9xv3	21.00 ± 2.35	12.00 ± 1.22	L	C	Light green	6.00 ± 3.08	17.00
v9xv7	12.67 ± 1.04	8.50 ± 0.50	L	C	Light green	4.67 ± 1.042	23.10 ± 7.41
v13xv4	14.31 ± 2.71	7.88 ± 1.51	L	C	Green	5.59 ± 0.99	22.20 ± 2.68
v13xv6	18.70 ± 2.61	8.96 ± 1.43	L	D	Green	5.86 ± 0.96	25.94 ± 2.03
v13xV7	15.94 ± 3.53	9.60 ± 1.87	L	C	Green	5.33 ± 1.59	20.77 ± 5.06
v13xv10	11.88 ± 1.55	6.88 ± 0.85	L	E	Green	7.00 ± 1.00	18.00

Sources : IBPGR (1990)

S = Sinuate

L = Lyrate

v₃ = *B. campestris* var. *pekinensis*v₆ = *B. campestris* var. *parachinensis*v₉ = *B. juncea*v₁₁ = *B. oleracea* var. *alboglabra*

E = Entrie

C = Crenate

D = Dentate

v₄ = *B. campestris* var. *parachinensis*v₇ = *B. campestris* var. *chinensis*v₁₀ = *B. oleracea* var. *alboglabra*v₁₃ = *B. juncea*

(V₁₃) มีทรงต้นแบบตั้ง (V₇, V₅) และแบบแผ่ (V₁₂, V₁₃) ส่วน *B. campestris* var. *parachinensis* (V₄) กับ *B. juncea* (V₉) หรือ *B. campestris* var. *chinensis* (V₇) กับ *B. juncea* (V₉) หรือ *B. oleracea* (V₁₁) กับ *B. campestris* var. *parachinensis* (V₆) และ *B. juncea* (V₉) กับ *B. campestris* var. *chinensis* (V₇) พบทรงต้นแบบตั้ง (Figure 1) ความสูงของต้นลูกผสมที่อายุ 2 เดือนหลังย้ายปลูกอยู่ระหว่าง 15–30 ซม. ซึ่งปลูกในกระถางดินผสม ภายใต้ห้องควบคุมสภาพแวดล้อม (Table 2) รูปร่างของใบ สีใบ ขอบใบ และขนาดของก้านใบ (Table 2, and Figure 2) สีของดอกลูกผสมส่วนใหญ่จะมีดอกสีเหลือง แม้ว่าลูกผสมที่มี *B. oleracea* เป็นต้นพ้องก็ตาม งานของ Hossain et al.

(1988) รายงานไว้คล้ายกันคือลูกผสม *B. oleracea* var. *capitata* กับ *B. campestris* var. *pekinensis* ให้ดอกสีเหลืองขณะที่ลูกผสมระหว่าง *B. oleracea* var. *alboglabra* กับ *B. campestris* var. *pekinensis* และ *B. oleracea* var. *capitata* กับ *Raphanus sativus* ให้ดอกสีขาว

ความสมบูรณ์ของเกสรตัวผู้ในคู่ผสมข้ามชนิดมีเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ค่อนข้างต่ำ โอกาสที่จะเกิดดอกรูปร่างผิดปกติมาก การผสมตัวเองต่ำจนผสมไม่ได้ เมื่อพิจารณาความสมบูรณ์ของเกสรตัวผู้ในระยะดอกบานเต็มที่พบว่ามีเพียง 16.30 ถึง 51.58% ของกลุ่มผสม *B. campestris* var. *parachinensis* กับ *B. juncea* ส่วนคู่ผสมระหว่าง *B. campestris* var. *chinensis* และ var. *pekinensis* ที่ผสมกับ *B. juncea* นั้น มีความ



Figure 1 Phenotypic character of interspecific hybrids

- a = *B. oleracea* var. *alboglabra* x *B. campestris* var. *parachinensis*
- b = *B. juncea* x *B. campestris* var. *chinensis*
- c = *B. campestris* var. *chinensis* x *B. juncea*
- d = *B. juncea* x *B. campestris* var. *parachinensis* (right) and its reciprocal (left)

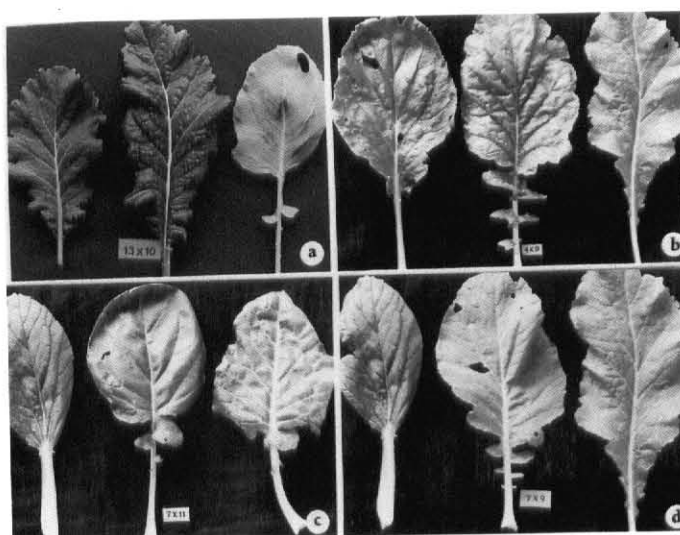


Figure 2 Leaf characters : shape, margin, basal and petiole of interspecific hybrids

- a = *B. juncea* x *B. oleracea* var. *alboglabra*
- b = *B. campestris* var. *parachinensis* x *B. juncea*
- c = *B. campestris* var. *chinensis* x *B. oleracea* var. *alboglabra*
- d = *B. campestris* var. *chinensis* x *B. juncea*

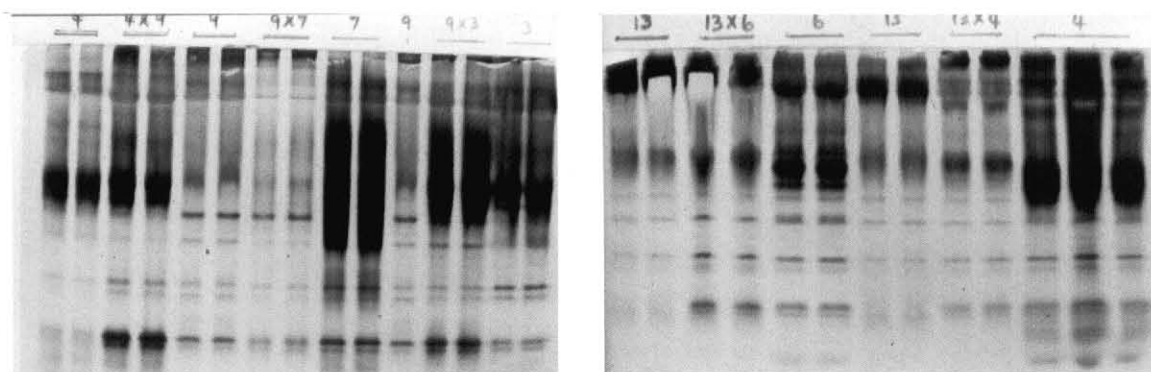


Figure 3 Esterase banding pattern of the interspecific hybrids and their parents

4 and 6 = *B. campestris* var. *parachinensis*

7 = *B. campestris* var. *chinensis*

9 = *B. juncea*

13 = *B. juncea*

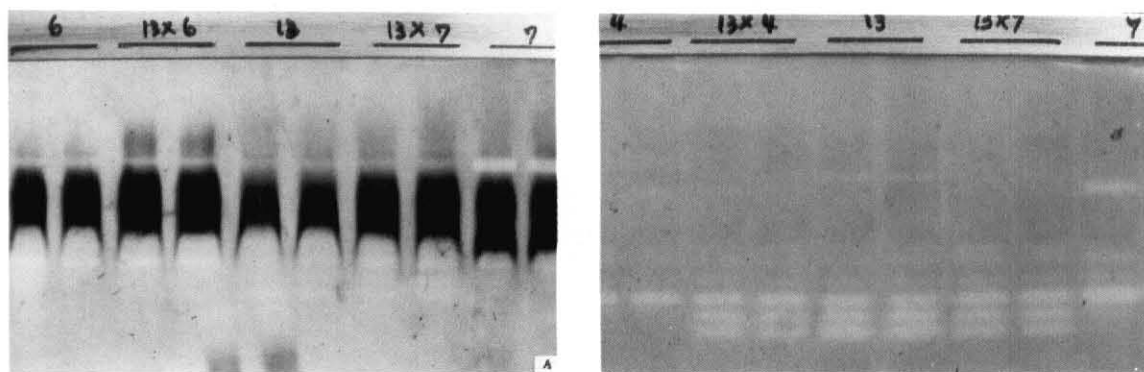


Figure 4 The banding pattern of malate dehydrogenase (MDH) (A) and alcohol dehydrogenase (ADH) (B) of the interspecific hybrids and their parents.

Table 3 Pollen fertility percentage of some interspecific combinations.

Combination	Pollen fertility
B. campestris var. parachinensis ^{c/} x B. juncea ^{b/}	51.58
B. campestris var. chinensis x B. juncea ^{b/}	35.50
B. campestris var. parachinensis ^{d/} x B. juncea ^{a/}	16.30
B. campestris var. pekinensis ^{f/} x B. juncea ^{c/}	49.00
B. juncea c/ x B. oleracea var. alboglabra ^{g/}	56.00

a/ Leaf Mustard (Head type)

e/ Tsui-Sim Green Stalk Cabbage

b/ Mustard Green

f/ Hiroshimana

c/ Kobutakana

g/ Leaf Kailaan (Taiwan)

d/ Flowering Stalk Chinese Cabbage

สมบูรณ์ของเกสรตัวผู้เพียง 35.5 และ 49.0% ตามลำดับ (Table 3) ปัญหาความสมบูรณ์ของเกสรตัวผู้ต่ำนั้นพบได้ในกรณีของการผสมข้ามชนิด เช่น *B. campestris* กับ *B. oleracea* เกสรตัวผู้ส่วนมากจะเป็นหมัน และมีความสมบูรณ์เพียง 27% (Inomata, 1980) นอกจากนี้ยังมีความแปรปรวนมากทั้งขนาดของดอก ความยาวช่อดอก ช่วงเวลาการออกดอกและมักแสดงการผสมตัวเองต่ำไม่ติดเมล็ด (U, 1935)

การใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส สามารถบอกความเป็นกลุ่มผสมได้ชัดเจนขึ้น โดยเฉพาะเอ็นไซม์ EST (Figure 3) MDH และ ADH (Figure 4) จำนวนของแถบสีของเอ็นไซม์ดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างพ่อ-แม่และลูกผสม ในลูกผสมบางคู่ จะแสดงแถบสีของเอ็นไซม์ที่คล้ายและใกล้เคียงกับต้นแม่มากกว่าต้นพ่อ เนื่องจากลักษณะพันธุกรรมเด่นของต้นแม่

(maternal effect) ตัวอย่าง เช่น แถบสีเอ็นไซม์ esterase ของกลุ่มผสมระหว่าง *B. juncea* x *B. campestris* var. *chinensis* (Figure 3) สำหรับผักสกุลกะหล่ำสามารถแยกสายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้เอ็นไซม์อื่นนอกเหนือจากที่กล่าวมาได้แก่ peroxidase, lactate dehydrogenase (LDH), acid phosphatase (AP), glutamate dehydrogenase (GDH) และ carbonic anhydrase (CA) (Nakamura, 1977) ส่วน glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-P) และ glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) สามารถให้เห็นความแตกต่างได้ปานกลาง (ชวนพิศ และคณะ, 2535) นอกจากนั้นเอ็นไซม์ phosphoglucomutase (PGM) สามารถใช้เปรียบเทียบลูกผสมกับพ่อ-แม่ได้ดีเช่นกัน (Coulthart and Denford, 1982)

สรุป

การใช้เทคนิคการผสมข้ามชนิด ด้วยการเพาะเลี้ยงคัพภะลูกผสมข้ามชนิดในผักสกุลกะหล่ำที่ใช้ปลูกในประเทศไทยมีความเป็นไปได้ด้วยอาหารสูตร MS ดัดแปลงเติมด้วย casein hydrolyate 300 มก./ล, น้ำมะพร้าว 10% (โดยปริมาตร) NAA และ BA อย่างละ 0.1 มก./ล โดยจำเป็นต้องอาศัยการกระตุ้นให้มีดอกด้วยอุณหภูมิ 5°C. เป็นเวลานาน 30 ถึง 45 วัน เพื่อให้การออกดอก ก่อนการผสมข้ามและแยกคัพภะมาเลี้ยงในหลอดทดลอง กลุ่มผสมข้ามชนิดที่สามารถเจริญเป็นต้นได้และย้ายลงปลูกในกระถางดินได้แก่ กลุ่มผสมระหว่าง *B. campestris* x *B. juncea*, *B. juncea* x *B. campestris*, *B. campestris* x *B. oleracea* และ *B. juncea* x *B. oleracea* ความหลากหลายของลูกผสมข้ามชนิดที่ได้สามารถตรวจสอบได้จาก ความสมบูรณ์ของเกสรตัวผู้ ลักษณะทางกายภาพของต้น ตลอดจนการใช้ Isozyme pattern ของเอ็นไซม์ esterase, malate dehydrogenase, alcohol dehydrogenase

เอกสารอ้างอิง

- ชวนพิศ อรุณรังสิกุล, เกษม พิถี, พรพันธ์ ภู่อ้อมพันธุ์ และศิริพร ชุมแสงโชติสกุล. 2535. การเพาะเลี้ยงคัพภะของลูกผสมพืชสกุล *Brassica* V. การศึกษาหาวิธีการตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดของผักสกุล *Brassica* ในรายงานผลการวิจัยประจำปี 2535 โครงการการเพาะเลี้ยงคัพภะลูกผสมพืชสกุล *Brassica*. สถาบันวิจัยแลพัฒนาฯ. 15 น.
- Allard, R.W. 1960. Principles in Plant Breeding. John Wiley & Sons Inc., New York. 485 p.
- Coulthart, M. and K.E. Denford. 1982. Isozyme studies in *Brassica*. 1. Electrophoretic techniques for leaf enzymes and comparison of *B. napus*, *B. campestris* and *B. oleracea* using phosphoglucumutase. Can. J. Plant Sci. 62 : 621-630.
- Hossain, M.M., H. Inden and T. Ashira. 1988. Intergeneric and interspecific hybrids through *in vitro* ovule culture in the Cruciferae. Plant Sci. 58 : 121-128.
- Inomata, N. 1978. Production of interspecific hybrids in *Brassica campestris* x *B. oleracea* by culture *in vitro* of excised ovaries. I. Development of excised ovaries cultures. Japan J. Genetics. 53(3) : 161-173.
- Inomata, N. 1979. Production of interspecific hybrids in *Brassica campestris* x *B. oleracea* by culture *in vitro* of excised ovaries. II. Development of excised ovaries on various culture media. Japan J. Breeding. 29 : 115-120.
- Inomata, N. 1980. Hybrid progenies of the cross, *Brassica campestris* x *B. oleracea*. I. Cytogenetical studies on F1 hybrids. Japan. J. Genetics. 55(3) : 189-202.
- Inomata, N. 1983. Hybrid progenies of the cross, *Brassica campestris* x *B. oleracea*. II. Crossing ability of F1 hybrids and their progenies. Japan J. Genetics. 58 : 433-449.
- Nakamura, S. 1977. Studies on the determination of species and cultivars on the basis of electrophoretic pattern of seed protein and seed enzymes. I. *Brassica* spp. radish and *cucurbita* spp. J. Japan Soc. Hort. Sci. 46(1) : 32-47. (In Japanese).
- Namai, H., M. Sarashinia and T. Hosoda. 1980. Interspecific and intergeneric hybridization breeding in Japan. pp. 191-201 In S. Tsunoda, K. Hinata and C. Gomez Canipo (eds.). *Brassica* Crops and Wild Allies Biology and Breeding. Japan Scientific Societies Press. Tokyo.
- Nishi, H. 1981. HAKURAN an interspecific hybridization between Chinese cabbage and common cabbage. pp. 385-391 In N.S. Taleker and T.D. Griggs (eds) Chinese Cabbage. Proc. First Intl. Symp. AVRDC, Shanhu, Taiwan.
- Sundberg, E. and K. Glimelius. 1986. A method for production of interspecific hybrids within *Brassicaceae* via somatic hybridization, using resynthesis of *Brassica napus* as a model. Plant Sci. 43 : 155 : 162.
- U, N. 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. Japan J. Bot. 7 : 389-452.
- Yarnell, S.H. 1956. Cytogenetics of the vegetable crops. II. Crucifers. Bot. Rev. 22 : 81-166.