

ผลของ Zeatin และ IAA ต่อการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอของพริก โดยการเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์แบบปล่อยลอย

Effects of Zeatin and IAA on Pepper Embryogenesis by Shed-microspore Culture

สมสมัย ไยอ่อน^{1*} จุฑามาส คุ่มชัย¹ ยืนหยัด ธีระวัฒน์สกุล² และ วิณัน บัณฑิตย์^{1*}
Somsamai Yaioon^{1*}, Jutamas Kumchai¹, Yuenyad Teerawatsakul² and Weenun Bundithya¹

¹ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

¹Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

²บริษัท ฮอติเจนเนติกส์ รีเสิร์ช (เอส.อี. เอเชีย) จำกัด (อีสท์ เวสต์ ซีด) จ. เชียงใหม่ 50290

²Hortigenetics Research (S.E. Asia) Limited (East-West Seed), Chiang Mai 50290, Thailand

*Corresponding author: Email: somsamai.y@gmail.com

(Received: 11 November 2019; Accepted: 30 June 2020)

Abstract: Effects of zeatin and IAA on embryogenesis by shed-microspore culture was carried out on pepper genotype 17212 using anthers with 10% purple tip containing a mixed population of mid to uninucleate microspores. Plant growth regulators supplemented in the double layer media were 0.0, 0.1, 0.5, 1.0 mg/L zeatin with 0.0, 0.5, 0.8, 1.8 mg/L IAA. It was found that 0.1 mg/L zeatin and 0.5 mg/L IAA induced significantly highest 40.8% embryo and 35.9% regenerated plants. Ploidy levels of regenerated plants were determined by flow cytometry. It was found that 62% were haploid and 38% were spontaneous doubled haploid. Transferred shed microspore culture can be used efficiently for double haploid production in pepper.

Keywords: pepper regeneration, plant growth regulators, double haploid

บทคัดย่อ: ผลของ zeatin และ IAA ต่อการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอโดยการเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์แบบปล่อยลอยดำเนินการในพริกสายพันธุ์ 17212 โดยใช้ยับยั้งที่ส่วนปลายมีสีม่วง 10% ซึ่งมีไมโครสปอร์ในระยะระหว่าง mid และ uninucleate การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยงแบบ 2 ชั้น คือ zeatin 0.0, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 0.0, 0.5, 0.8 และ 1.8 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า zeatin 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดเอ็มบริโอสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ 40.8% และพัฒนาเป็นต้นได้ 35.9% นอกจากนี้การตรวจสอบชุดโครโมโซมด้วยวิธีโพลีไซโทเมทรีในต้นที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์ พบว่า เป็นแฮพลอยด์ 62% และดับเบิลแฮพลอยด์ 38% ดังนั้นการเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์แบบปล่อยลอยสามารถใช้ในการสร้างพริกดับเบิลแฮพลอยด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์แบบปล่อยลอย การเกิดเอ็มบริโอ ดับเบิลแฮพลอยด์ พริก

คำนำ

พริก (*Capsicum* spp.) จัดอยู่ในวงศ์ Solanaceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตร้อนของทวีปอเมริกาใต้ พริกมีโครโมโซม $2n = 24$ เป็นไม้พุ่มล้มลุกเนื้ออ่อน มีทั้งพันธุ์หลายฤดูและฤดูเดียว มีความผันแปรค่อนข้างมาก ทั้งลักษณะสี กลีบดอก ลำต้น ใบ และผล โดยผลพริกมีความผันแปรของรูปร่าง ขนาด และความเผ็ด พริกเป็นพืชที่มีดอกสมบูรณ์เพศ และสามารถผสมตัวเองได้ แต่มีโอกาสผสมข้ามดอกและก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ 9-36% (Rasmeethamwong, 1995) นอกเหนือจากการใช้ปรุงอาหารในรูปสดและแห้งแล้ว มีการนำพริกมาใช้ประโยชน์เพื่ออุตสาหกรรมอาหารและยา ในประเทศไทยพริกเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีปริมาณการผลิต การส่งออก และนำเข้าทั้งในรูปพริกสด พริกแปรรูปเพื่ออุตสาหกรรม และมีการใช้เมล็ดพันธุ์ในแต่ละปีเป็นมูลค่าที่สูงอย่างต่อเนื่อง (Techawongstien, 1994) ปัจจุบันเกษตรกรนิยมใช้เมล็ดพันธุ์ลูกผสม (hybrid variety) ซึ่งมีลักษณะที่ดีกว่าลูกผสมเปิด (open-pollination variety) เช่น มีความสม่ำเสมอของพันธุ์และให้ผลผลิตสูง อย่างไรก็ตามการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อสร้างสายพันธุ์แท้ลูกผสมจำเป็นต้องทำการผสมตัวเองหลายชั่วและใช้เวลานานมาก

การเพาะเลี้ยงอับเรณู (anther culture) หมายถึงการนำอับเรณูที่มีเรณูอ่อน (young pollen) หรือ ไมโครสปอร์ (microspore) มาเพาะเลี้ยงเพื่อยับยั้งการพัฒนา male gametophyte ที่จะผสมกับไข่ แต่บังคับให้พัฒนาเป็นแคลลัสหรือเอ็มบริโอ การเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์แบบ

ปล่อยลอย (shed microspore culture) ใช้อาหาร 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นอาหารกึ่งแข็งและชั้นบนเป็นอาหารเหลวเพื่อกระตุ้นให้อับเรณูแตกและปล่อยไมโครสปอร์หลุดลอยอยู่ในอาหารเหลวภายใต้ความดันออสโมซิสสูง เพื่อลดการเกิดต้นจากเซลล์ร่างกาย ทำให้ง่ายต่อการพัฒนาไปเป็นแคลลัสหรือเอ็มบริโอ และพัฒนาเป็นต้นพืชที่มีโครโมโซมชุดเดียว (Johansson *et al.*, 1982)

ต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์แบบปล่อยลอย มีโครโมโซมเพียงชุดเดียว เมื่อใช้โคลชิซิน (colchicine) เพิ่มชุดโครโมโซมจะได้ต้นพืชที่มีโครโมโซมเหมือนกันสองชุด (double haploid plant หรือ dihaploid plant) เป็นพืชสายพันธุ์แท้ที่มียีนเหมือนกันทุกยีน (homozygous line) สามารถย่นระยะเวลาในการสร้างพืชสายพันธุ์แท้ได้ในชั่วเดียว เช่น การใช้เชื้อพันธุกรรมที่ผ่านการประเมินความต้านทานโรคมาผสมกับสายพันธุ์ดีที่อ่อนแอต่อโรค จากนั้นเพาะเลี้ยงลูกผสมชั่วที่ 1 เพื่อสร้างดับเบิลแฮพลอยด์แล้วนำไปประเมินในแปลงทดสอบของนักปรับปรุงพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว (Smitamana, 1999)

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) คือ สารที่พืชสังเคราะห์เพื่อใช้ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช โดยไซโทไคนินมีบทบาทในการควบคุมการสร้างอวัยวะ และกระตุ้นการแตกตาข้าง โดยช่วยกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวได้อย่างรวดเร็ว เร่งให้เนื้อเยื่อพืชเจริญไปเป็นยอดและต้น แต่ยับยั้งการเกิดราก ส่วนออกซินมีคุณสมบัติกระตุ้นการขยายขนาดของเซลล์ขั้วตาข้างไม่ให้เจริญและเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีความสามารถในการชักนำการเกิดรากได้ (Kaveeta, 1998) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Supena *et al.* (2006) พบว่า การใช้

ไซโทไคนิน (zeatin 2.5 ไมโครโมลาร์) ร่วมกับออกซิน (IAA 5 ไมโครโมลาร์) ในอัตราส่วนที่เหมาะสมสามารถชักนำไมโครสปอร์ให้เกิดเอมบริโอได้ 40.8% โดยเป็นเอมบริโอปกติ 22.6% และจากการนำแคลลัสของพืชมานำเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งที่ใช้ทำ feeder cells พบว่าสามารถเกิดเป็นยอดได้ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสัดส่วนของไซโทไคนินต่อออกซินสูง (zeatin:IAA เท่ากับ 20:1) ที่มีอยู่ในอาหารจะกระตุ้นการแบ่งเซลล์และชักนำให้เกิดยอดได้ (Kaveeta, 1998) การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเข้มข้นของ zeatin และ IAA ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์ของพริกแบบปลอดเชื้อในสภาพปลอดเชื้อ

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมต้นพริก

เพาะกล้าพริกสายพันธุ์ 17212 อายุ 1 เดือน แล้วย้ายลงปลูกในกระถางพลาสติกขนาด 8 นิ้ว x 12 นิ้ว บรรจุวัสดุปลูกพีทมอส:ขุยมะพร้าว (1:1) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และดูแลรักษาในห้อง phytotron ควบคุมอุณหภูมิ 25 °C ให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 9000 ลักซ์ และความชื้นสัมพัทธ์ 80% ให้น้ำทุก 2 วัน หลังจากย้ายปลูก 30-45 วัน จึงเริ่มเก็บดอกเพื่อใช้ในงานทดลอง

การเตรียมอาหาร 2 ชั้น

อาหารชักนำไมโครสปอร์ 2 ชั้น สูตร Nitsch and Nitsch (1969) หรือ NN ชั้นล่างเป็นอาหารกึ่งแข็งที่เติมผงวุ้น 6 กรัมต่อลิตร และผงถ่านกัมมันต์ 0.5 กรัมต่อลิตร ชั้นบนเป็นอาหารเหลว 1 มิลลิลิตร ที่เติม zeatin ร่วมกับ IAA โดยใช้ น้ำตาลมอลโตส 20 กรัมต่อลิตร pH 5.8

การเตรียมอับเรณู

เลือกดอกพริกที่มีปลายอับเรณูสีม่วง 10% โดยเก็บดอกในตอนเช้าจากห้อง phytotron บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และย้อมอับเรณูด้วยสี DAPI (Kim and Jang, 2000) เพื่อตรวจสอบระยะของไมโครสปอร์ ล้างดอกพริกด้วยน้ำยาล้างจาน ล้างฟองออกให้สะอาด ล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% นาน 30 วินาที และฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1% โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที ผึ่งดอกพริก 45-60 นาที ในตู้ปลอดเชื้อ บนกระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อ

การเพาะเลี้ยงอับเรณู

แกะอับเรณูจากกลีบเลี้ยงเพื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร NN 2 ชั้น บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 9 °C นาน 7 วัน ย้ายไปบ่มในที่มืดในห้องที่ควบคุมสภาพแวดล้อม อุณหภูมิ 28 ± 2 °C ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 2 เดือน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ประกอบด้วย 16 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ดอก ได้แก่ กรรมวิธีที่ 1 0.0 mg/L zeatin + 0.0 mg/L IAA กรรมวิธีที่ 2 0.0 mg/L zeatin + 0.5 mg/L IAA กรรมวิธีที่ 3 0.0 mg/L zeatin + 0.8 mg/L IAA กรรมวิธีที่ 4 0.0 mg/L zeatin + 1.8 mg/L IAA กรรมวิธีที่ 5 0.1 mg/L zeatin + 0.0 mg/L IAA กรรมวิธีที่ 6 0.1 mg/L zeatin + 0.5 mg/L IAA กรรมวิธีที่ 7 0.1 mg/L zeatin + 0.8 mg/L IAA กรรมวิธีที่ 8 0.1 mg/L zeatin + 1.8 mg/L IAA กรรมวิธีที่ 9 0.5 mg/L zeatin + 0.0 mg/L IAA กรรมวิธีที่ 10 0.5 mg/L zeatin + 0.5 mg/L IAA กรรมวิธีที่ 11 0.5 mg/L zeatin + 0.8 mg/L IAA กรรมวิธีที่ 12 0.5 mg/L zeatin + 1.8 mg/L IAA กรรมวิธีที่ 13 1.0 mg/L zeatin + 0.0 mg/L IAA กรรมวิธีที่ 14 1.0 mg/L zeatin + 0.5 mg/L IAA กรรมวิธีที่ 15 1.0 mg/L zeatin + 0.8 mg/L IAA และ กรรมวิธีที่ 16 1.0 mg/L zeatin + 1.8 mg/L IAA เมื่อสังเกตเห็นการพัฒนาของเอมบริโอจึงย้ายเอมบริโอมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นสมบูรณ์ (Supena *et al.*, 2006) และบันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดเอมบริโอ เมื่อเอมบริโอพัฒนาเป็นต้นอ่อน จึงบันทึกเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์ โดยบันทึกข้อมูลทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 2 เดือน เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance; ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's multiple range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS for Windows Version 23 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

นำต้นพริกจากการชักนำ 100 ต้น มาตรวจสอบหาปริมาณดีเอ็นเอตามวิธีของ Galbraith *et al.* (1983) ด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ Attune NxT ทำการบันทึกจำนวนโครโมโซม โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอ (DNA content) จากไลออนพริกดิพลอยด์ (2n) เทียบเป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาการชักนำให้ไมโครสปอร์พัฒนาเป็นเอ็มบริโอและการชักนำให้เอ็มบริโอพัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์ของพริก ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์แบบปล่อยลอย พบว่า กรรมวิธีที่เติม zeatin ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน ในอาหาร NN สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอและพัฒนาเป็นต้นได้ในทุกกรรมวิธี แต่มีประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอและต้นสมบูรณ์แตกต่างกัน (Table 1) โดยจากการทดลองนี้พบว่า สูตรอาหารที่มีความเหมาะสมสูงสุด คือ สูตรอาหารที่เติม zeatin 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (กรรมวิธีที่ 6) ซึ่งสามารถชักนำให้ไมโครสปอร์พัฒนาเป็นเอ็มบริโอมากที่สุดและชักนำให้เอ็มบริโอพัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์ได้มากที่สุด คือ 40.8 และ 35.9% ตามลำดับ รองลงมา ได้แก่ สูตรอาหารที่เติม zeatin 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร (กรรมวิธีที่ 7) ซึ่งสามารถชักนำเอ็มบริโอได้ 31.2% แต่ยังชักนำต้นสมบูรณ์ได้ 29% โดยพบว่าความเข้มข้นของ zeatin 0.1

มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อการชักนำการเกิดเอ็มบริโอและการพัฒนาไปเป็นต้นสมบูรณ์ได้ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ IAA จาก 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (กรรมวิธีที่ 5) เป็น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (กรรมวิธีที่ 6) พบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับการพัฒนาไปเป็นต้นสมบูรณ์ ส่วนการใช้ IAA เพียงอย่างเดียว (กรรมวิธีที่ 2-กรรมวิธีที่ 4) ส่งผลให้เกิดประสิทธิภาพการชักนำเอ็มบริโอและการพัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์ลดลง เทียบเท่ากับการที่ไม่เติม zeatin ร่วมกับ IAA เลย (กรรมวิธีที่ 1) และการใช้ zeatin 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว (กรรมวิธีที่ 5) ก็มีประสิทธิภาพการเกิดเอ็มบริโอและการพัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์ที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Supena *et al.* (2006) ในพริก พบว่า ไซโทไคนิน (zeatin) 2.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับออกซิน (IAA) 5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำไมโครสปอร์ให้เกิดเอ็มบริโอ 40.8% และเป็นเอ็มบริโอปกติ 22.6% ส่วนพืทุเนียที่นำแคลล์สมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้ทำ feeder cells พบว่า แคลล์สพืทุเนียสามารถเกิด

Table 1. Effects on zeatin and IAA concentrations on embryogenesis and plant regeneration by shed-microspore culture of pepper

Treatments		Embryogenesis ¹ (%)	Plant regeneration ¹ (%)
1	0.0 mg/L zeatin + 0.0 mg/L IAA	0.0 ^e	0.0 ^e
2	0.0 mg/L zeatin + 0.5 mg/L IAA	0.9 ^e	0.9 ^e
3	0.0 mg/L zeatin + 0.8 mg/L IAA	1.4 ^e	1.4 ^e
4	0.0 mg/L zeatin + 1.8 mg/L IAA	1.0 ^e	1.0 ^e
5	0.1 mg/L zeatin + 0.0 mg/L IAA	0.5 ^e	0.5 ^e
6	0.1 mg/L zeatin + 0.5 mg/L IAA	40.8 ^a	35.9 ^a
7	0.1 mg/L zeatin + 0.8 mg/L IAA	31.2 ^b	29.0 ^{ab}
8	0.1 mg/L zeatin + 1.8 mg/L IAA	11.2 ^d	10.6 ^d
9	0.5 mg/L zeatin + 0.0 mg/L IAA	4.4 ^{de}	4.4 ^{de}
10	0.5 mg/L zeatin + 0.5 mg/L IAA	20.8 ^c	19.2 ^c
11	0.5 mg/L zeatin + 0.8 mg/L IAA	30.0 ^b	27.0 ^b
12	0.5 mg/L zeatin + 1.8 mg/L IAA	7.6 ^{de}	7.6 ^{de}
13	1.0 mg/L zeatin + 0.0 mg/L IAA	2.8 ^{de}	2.8 ^{de}
14	1.0 mg/L zeatin + 0.5 mg/L IAA	6.8 ^{de}	6.5 ^{de}
15	1.0 mg/L zeatin + 0.8 mg/L IAA	6.8 ^{de}	6.6 ^{de}
16	1.0 mg/L zeatin + 1.8 mg/L IAA	7.6 ^{de}	7.6 ^{de}

¹ Data are expressed as mean values. Mean values with different letters in the same column differ significantly at $P \leq 0.05$

เป็นยอดได้ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสัดส่วนของไซโทไคนินสูงและออกซินต่ำ (zeatin:IAA เท่ากับ 20:1) ที่มีอยู่ในอาหารกระตุ้นการแบ่งเซลล์และชักนำให้เกิดยอดได้ (Kaveeta, 1998) การศึกษาของ Zhang *et al.* (2009) ที่รายงานว่า ออกซินสามารถยับยั้งการเกิดเอมบริโอจากการเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์ส่วนการใช้ไซโทไคนิน เช่น BA หรือ zeatin ในปริมาณต่ำช่วยชักนำให้เกิดเอมบริโอ แต่หากใช้ในปริมาณสูงไปยับยั้งการเกิดเอมบริโอและทำให้เอมบริโอมีลักษณะผิดปกติ นอกจากนี้ Nowaczyk and Kisiala (2006) รายงานว่า ไซโทไคนินและออกซินมีผลต่อการชักนำให้เกิดเอมบริโอ โดยความสามารถในการชักนำให้เกิดเอมบริโอขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไซโทไคนินที่นำมาใช้ เช่น BA, kinetin, TDZ และ zeatin การใช้ zeatin ในปริมาณที่พอเหมาะมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดเอมบริโอจากอับเรณูที่เพาะเลี้ยงได้ดีกว่า TDZ

และ kinetin ทั้งนี้ zeatin มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ ควบคุมการสร้างอวัยวะ และกระตุ้นการแตกตาข้าง โดยช่วยกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวได้อย่างรวดเร็วแรงให้เนื้อเยื่อพืชเจริญไปเป็นยอดและต้น แต่ยับยั้งการเกิดราก ใช้ได้ดีเมื่อใช้ร่วมกับออกซิน ส่วน IAA เป็นสารกลุ่มออกซินมีคุณสมบัติกระตุ้นการยืดยาวของเซลล์ และเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีความสามารถในการชักนำการเกิดยอดและรากได้ (Kaveeta, 1998)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไมโครสปอร์ที่พัฒนาเป็นเอมบริโอและพัฒนาไปเป็นต้นสมบูรณพบว่า เมื่อเลือกดอกพริกที่มีอับเรณูที่มีปลายสีม่วงประมาณ 10% ของอับเรณู (Figure 1A) และเป็นระยะไมโครสปอร์ที่เหมาะสม คือ ระยะ uninucleate (Figure 1B) มาเพาะเลี้ยง เมื่อผ่านไป 14 วัน พบว่า ไมโครสปอร์แตกออกจากอับเรณูและไมโครสปอร์กำลังพัฒนาเป็น

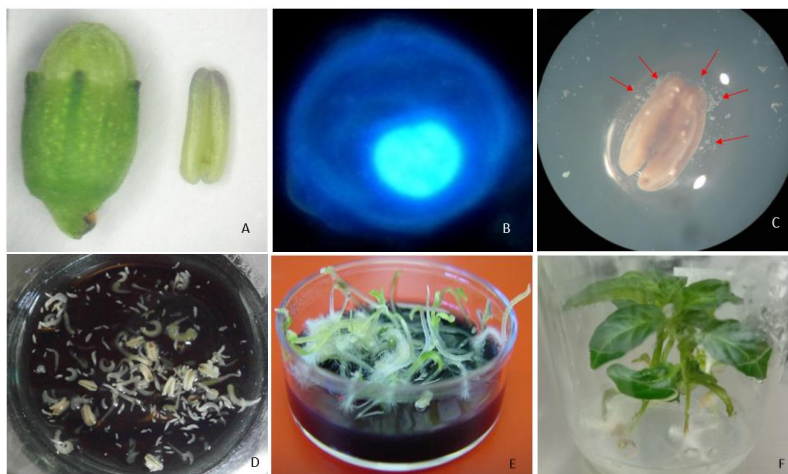


Figure 1. Effects on zeatin and IAA on embryo and plant responding by shed-microspore culture of pepper genotype 17212

- A) Pepper bud and anther with 10% purple tip containing a mixed population of mid to uninucleate microspores, which is at the optimal stage for shed microspore culture
- B) Microspore at the optimal stage with development at mid uninucleate
- C) Separated microspore after shed microspore culture for 14 days
- D) Developing microspore to embryo via shed microspore culture
- E) Developing embryo to regenerated plant from haploid plants
- F) Regenerated pepper plant prepared for flow cytometry assay

เอมบริโอ (Figure 1C-D) ต่อมาเอมบริโอพัฒนาเป็นใบเลี้ยง (Figure 1E) ที่พัฒนาเป็นต้นสมบูรณ (Figure 1F) โดยใบอ่อนนี้สามารถใช้ตรวจสอบจำนวนโครโมโซมด้วยวิธีโพลไซโทมิเตอร์ต่อไป

จากการศึกษาระยะเวลาการชักนำเอมบริโอให้พัฒนาเป็นต้นสมบูรณด้วยสูตรอาหาร NN ที่เติม zeatin ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน พบว่า การใช้ zeatin ร่วมกับ IAA ที่แตกต่างกันส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของไมโครสปอร์ให้พัฒนาเป็นเอมบริโอและพัฒนาไปเป็นต้นสมบูรณอย่างชัดเจน โดยที่สูตรอาหารที่เติม zeatin 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (กรรมวิธีที่ 6) ซึ่งประสิทธิภาพในการชักนำให้เอมบริโอพัฒนาเป็นต้นสมบูรณได้มากที่สุด (Table 2) และพบการเจริญของเอมบริโอหลังการเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารชักนำเป็นเวลา 14 วัน และมีจำนวนต้นสมบูรณเกิดใหม่เพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอในทุก 2 สัปดาห์ที่บันทึกผลการทดลอง (14-56 วัน) นอกจากนี้ การเกิดต้นสมบูรณมากที่สุดพบในวันที่ 28 ของการทดลอง ทั้งนี้เกิดจาก ในช่วงเวลา 14-28 วันแรกของการเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์ฟริกกลงในอาหารเหลวสองชั้น

ไมโครสปอร์ที่ถูกปล่อยลอยในความลึกของอาหารและระยะของไมโครสปอร์ที่เหมาะสมจะได้รับสภาพเครียดที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดเอมบริโอ ซึ่งทำให้เกิดเปอร์เซ็นต์ต้นสมบูรณสูงสุดในช่วงระยะเวลา 28 วัน หลังการเพาะเลี้ยง

จากผลการทดลองการชักนำให้เกิดเอมบริโอของฟริกโดยการเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์แบบปล่อยลอยเป็นวิธีที่ดีกว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูแบบดั้งเดิม (ตามวิธีการของบริษัทสอทิเจนเนติกส์ รีเสิร์ช (เอส.อี. เอเชีย)) ที่ชักนำให้เกิดเอมบริโอได้ดีที่สุดเพียง 1-2% เพราะการเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์แบบปล่อยลอย สามารถชักนำยอดและรากได้ในเวลาเดียวกัน ทำให้ลดขั้นตอนและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงอับเรณูเพื่อให้ได้เอมบริโอและต้นสมบูรณในระยะเวลาสั้น (Supena *et al.*, 2006)

การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องโพลไซโทมิเตอร์

เทคนิคโพลไซโทเมตรีเป็นเทคนิคหนึ่งที่ยอมรับใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็ว และในการทดลองนี้พบว่า เมื่อเปรียบเทียบกับต้นดิพลอยด์ (diploid) ที่ได้จากการเพาะ

Table 2. Evaluation of plant regeneration with different concentrations of zeatin and IAA by shed-microspore

Treatments	Regenerated plants ¹ (%)				Total of regenerated plants ¹ (%)
	14 days	28 days	42 days	56 days	
1 0.0 mg/L zeatin + 0.0 mg/L IAA	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0.0 ± 0.000 ^a
2 0.0 mg/L zeatin + 0.5 mg/L IAA	0 ± 0 ^a	0.3 ± 0.153 ^a	0.3 ± 0.153 ^a	0.3 ± 0.153 ^a	0.9 ± 0.458 ^a
3 0.0 mg/L zeatin + 0.8 mg/L IAA	0.2 ± 0.133 ^a	0.4 ± 0.163 ^a	0.4 ± 0.163 ^a	0.4 ± 0.163 ^a	1.4 ± 0.521 ^a
4 0.0 mg/L zeatin + 1.8 mg/L IAA	0.2 ± 0.133 ^a	0.4 ± 0.163 ^a	0.2 ± 0.133 ^a	0.2 ± 0.133 ^a	1.0 ± 0.365 ^a
5 0.1 mg/L zeatin + 0.0 mg/L IAA	0.1 ± 0.1 ^a	0.2 ± 0.133 ^a	0.1 ± 0.1 ^a	0.1 ± 0.1 ^a	0.5 ± 0.401 ^a
6 0.1 mg/L zeatin + 0.5 mg/L IAA	8 ± 1.202 ^d	11.7 ± 1.359 ^e	8 ± 1.095 ^d	8.2 ± 1.095 ^d	35.9 ± 4.175 ^e
7 0.1 mg/L zeatin + 0.8 mg/L IAA	6.9 ± 1.169 ^d	7.5 ± 1.108 ^d	7.7 ± 1.174 ^d	6.9 ± 1.174 ^d	29.0 ± 4.320 ^{de}
8 0.1 mg/L zeatin + 1.8 mg/L IAA	2.5 ± 0.734 ^b	2.8 ± 0.917 ^{bc}	2.8 ± 0.917 ^b	2.5 ± 0.917 ^b	10.6 ± 3.222 ^b
9 0.5 mg/L zeatin + 0.0 mg/L IAA	1.1 ± 0.433 ^{ab}	1.1 ± 0.433 ^{ab}	1.1 ± 0.433 ^{ab}	1.1 ± 0.433 ^{ab}	4.4 ± 1.733 ^{ab}
10 0.5 mg/L zeatin + 0.5 mg/L IAA	4.5 ± 1.222 ^c	4.6 ± 1.108 ^c	5.1 ± 1.251 ^c	5 ± 1.251 ^c	19.2 ± 4.699 ^c
11 0.5 mg/L zeatin + 0.8 mg/L IAA	6.8 ± 1.428 ^d	6.9 ± 1.402 ^d	6.8 ± 1.373 ^{cd}	6.5 ± 1.373 ^{cd}	27.0 ± 5.487 ^d
12 0.5 mg/L zeatin + 1.8 mg/L IAA	1.9 ± 0.277 ^{ab}	1.9 ± 0.277 ^{ab}	1.9 ± 0.277 ^{ab}	1.9 ± 0.277 ^{ab}	7.6 ± 1.108 ^{ab}
13 1.0 mg/L zeatin + 0.0 mg/L IAA	0.7 ± 0.26 ^{ab}	0.7 ± 0.260 ^{ab}	0.7 ± 0.26 ^{ab}	0.7 ± 0.26 ^{ab}	2.8 ± 1.041 ^{ab}
14 1.0 mg/L zeatin + 0.5 mg/L IAA	1.4 ± 0.34 ^{ab}	1.7 ± 0.367 ^{ab}	1.7 ± 0.367 ^{ab}	1.7 ± 0.367 ^{ab}	6.5 ± 1.392 ^{ab}
15 1.0 mg/L zeatin + 0.8 mg/L IAA	1.5 ± 0.477 ^{ab}	1.7 ± 0.448 ^{ab}	1.7 ± 0.44 ^{ab}	1.7 ± 0.448 ^{ab}	6.6 ± 1.790 ^{ab}
16 1.0 mg/L zeatin + 1.8 mg/L IAA	1.9 ± 0.407 ^{ab}	1.9 ± 0.407 ^{ab}	1.9 ± 0.407 ^{ab}	1.9 ± 0.407 ^{ab}	7.6 ± 1.628 ^{ab}

¹ Data are expressed as mean value ± SD. Mean values with different letters in the same column differ significantly at $P \leq 0.05$

เมล็ดจากโรงเรือน พบว่า ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์เป็นแฮพลอยด์ 62% ($1C=n=12$) ที่ฮิสโทแกรมของนิวเคลียสพริกมีค่าปริมาณดีเอ็นเอน้อยกว่า 200 และเป็นดับเบิลแฮพลอยด์ 38% ($2C=2n=24$) ที่ฮิสโทแกรมของนิวเคลียสพริกมีค่าปริมาณดีเอ็นเอน้อยกว่า 200 (Figure 2) ซึ่งผลสอดคล้องกับการศึกษาการใช้เทคนิคโฟลไซโทเมทรีในพริก *Capsicum annuum* L. ในการตรวจสอบชุดโครโมโซมของการสร้างต้นดับเบิลแฮพลอยด์ โดย Gyulai *et al.* (2000) พบว่า ต้นพริกที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูเป็นแฮพลอยด์ 64.5 %

($1C=n=12$) ดับเบิลแฮพลอยด์ 32.6% ($2C=2n=24$) เทตราพลอยด์ 0.6% ($4C=4n=48$) และอนุพลอยด์ 3.2% Dumas de Vaulx *et al.* (1981) ตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมของพริกจากการเลี้ยงอับเรณูด้วยโฟลไซโทมิเตอร์ พบว่า เกิดแฮพลอยด์สูงที่สุด 64.5% ($1C=n=12$) ส่วนการศึกษาของ Gemesne *et al.* (2001) ศึกษาการเลี้ยงอับเรณูของพริกหวานโดยไม่ผ่านแคลลัส (direct embryogenesis) พบแฮพลอยด์สูงที่สุด 68.5% ดับเบิลแฮพลอยด์ 29.8% เทตราพลอยด์ 0.7% และอนุพลอยด์ 1%

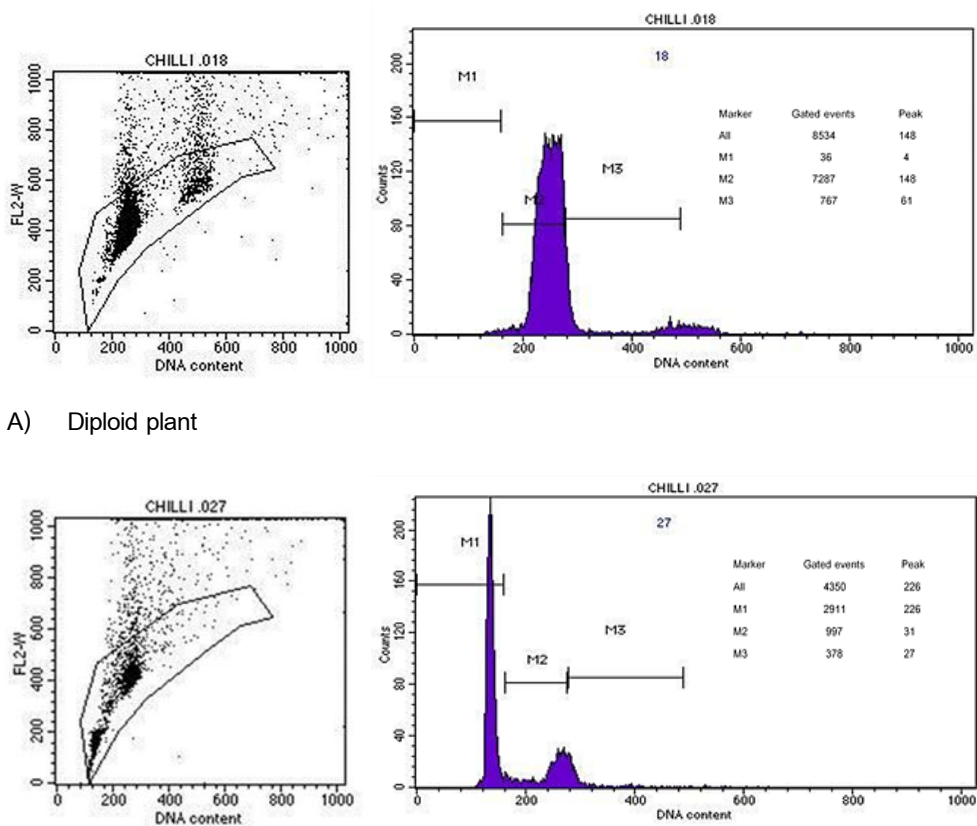


Figure 2. Flow cytometric analyses of (A) diploid plants and (B) haploid plant

สรุป

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตไซโทไคนิน (zeatin) และออกซิน (IAA) สามารถชักนำให้ไมโครสปอร์ของพริก 17212 เกิดเอ็มบริโอและพัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุดในอาหาร NN 2 ขั้น ที่เติม zeatin เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอ 40.8% และ 35.9% เป็นต้นที่สมบูรณ์สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องฟลูออโรมิเตอร์พบว่า ต้นพริกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์แบบปล่อยลอย เป็นแฮพลอยด์ 62% (1C=n=12) และดับเบิลแฮพลอยด์ 38% (2C=2n=24)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บริษัท ฮอทิเจนเนติกส์ รีเสิร์ช (เอส.อี. เอเชีย) จำกัด (กลุ่มบริษัท อีสท์ เวสต์ ซีด) ฝายปฏิบัติการชีววิทยาของเซลล์และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จ. เชียงใหม่ ที่สนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Dumas de Vaulx, R., D. Chambonnet and E. Pochard. 1981. *In vitro* of pepper (*Capsicum annuum* L.) anthers: High rate plant production from different genotypes by + 35 °C treatments. *Agronomie* 1(10): 859-864.

Galbraith, D.W., K.R. Harkins, J.M. Maddox, N.M. Ayres, D.P. Sharma and E. Firoozabady. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220(4601): 1049-1051.

Gemesne, J., A.M. Petus, G. Venczel, L. Zatyko, G. Gyulai and M. Cseplo. 2001. Genetic variability of anther donor versus spontaneous doubled haploid descendants and colchicine induced doubled haploid

sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) lines. *Acta Horticulturae* 560: 149-152.

Gyulai, G., J.A. Gemesne, Z. Sagi, G. Venczel, P. Pinter, Z. Kristof, O. Torjek, L. Heszky, S. Bottka, J. Kiss and L. Zatyko. 2000. Doubled haploid development and PCR-analysis of F1 hybrid derived DH-R2 paprika (*Capsicum annuum* L.) lines. *Journal of Plant Physiology* 156(2): 168-174.

Johansson, L., B. Andersson and T. Eriksson. 1982. Improvement of anther culture technique: activated charcoal bound in agar medium in combination with liquid medium and elevated CO₂ concentration. *Physiologia Plantarum* 54(1): 24-30.

Kaveeta, R. 1998. *Tissue Culture*. Kasetsart University Press, Bangkok. 219 p. (in Thai)

Kim, M.Z. and I.C. Jang. 2000. Rapid assessment of microspore development stage in pepper using DAPI and ferric chloride. *Journal of Plant Biotechnology* 2(3): 129-134.

Nitsch, J.P. and C. Nitsch. 1969. Haploid plants from pollen grain. *Science* 163(3862): 85-87.

Nowaczyk, P. and A. Kisiala. 2006. Effect of selected factors on the effectiveness of *Capsicum annuum* L. anther culture. *Journal of Applied Genetics* 47(2): 113-117.

Rasmeethamwong, P. 1995. *How to Grow and Propagate Pepper*. 3rd ed. Petchkarat Publishing, Bangkok. 104 p. (in Thai)

Smitamana, P. 1999. *Plant Tissue Culture: Technique and Application*. Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai. 141 p. (in Thai)

Supena, E.D.J., S. Suharsono., E. Jacobsen and J.B.M. Clusters. 2006. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in

- Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Reports 25(1): 1-10.
- Techawongstien, S. 1994. Pepper Breeding and Production. Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok. 57 p. (in Thai)
- Zhang, Y.L., L.G. Zhang, H.M. Zhang and L.Z. Zhang. 2009. Studies on embryoid induction of isolated microspore and plantlet formation in precocious chinese cabbage. Journal of Gansu Agricultural University 44(3): 45-49.
-