การพัฒนาประชากรชักนำการเกิดแฮพลอยด์ของข้าวโพดเขตร้อน

Population improvement of tropicalized maize haploid inducer

สุธาสินี สิงห์อูป[1] พีรนุช จอมพุก[2] สรรเสริญ จำปาทอง[3] และ ชูศักดิ์ จอมพุก[1*]

Suthasinee Singoup[1], Peeranuch Jompuk[2], Sansern Jampatong[3] and Choosak Jompuk[1*]

บทคัดย่อ

การใช้ดับเบิลแฮพลอยด์ในข้าวโพดไร่เป็นเครื่องมือที่ได้รับการยอมรับมากขึ้นสำหรับการพัฒนาสายพันธุ์แท้ เมล็ดแฮพลอยด์สามารถชักนำให้เกิดขึ้นโดยใช้สายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์และเพิ่มจำนวนโครโมโซมเพื่อสร้างสายพันธุ์แท้ดับเบิลแฮพลอยด์ จากนั้นปลูกและผสมตัวเองหนึ่งครั้งเพื่อขยายเมล็ดพันธุ์ วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อพัฒนาประชากรชักนำการเกิดแฮพลอยด์ที่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของประเทศไทยจากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์แท้ข้าวโพดไร่ของไทยที่ไม่ชักนำการเกิดแฮพลอยด์กับสายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์โดยใช้ข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ Ki 3, Ki 35 และ Ki 52 เป็นพันธุ์แม่ และใช้สายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์ คือ Stock 6 เป็นพันธุ์พ่อ ได้ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) 3 คู่ผสม นำเมล็ด F_1 มาปลูกฝักต่อแถว แล้วผสมข้ามต้นภายในแถวเป็นลูกชั่วที่ 2 (F_2) จากนั้นคัดเลือกเฉพาะเมล็ดที่มีเนื้อเยื่อแอลูโรนและสคิวเทลลัมเป็นสีม่วงมาปลูกและผสมตัวเอง 3 ชั่ว ได้สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 3 (S_3) เลือกสายพันธุ์ S_3 จาก S_2 ที่ทดสอบแล้วว่ามีเปอร์เซ็นต์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์กับลูกผสมเดี่ยว Kei 1303 × Ki 60 สูงสุด 5 สายพันธุ์จากแต่ละคู่ผสมมาสร้างประชากร จากนั้นนำไปประเมินอัตราชักนำการเกิดแฮพลอยด์กับลูกผสมเดี่ยวจำนวน 13 พันธุ์ พบว่ามีอัตราชักนำการเกิดแฮพลอยด์อยู่ระหว่าง 0.33-4.60 เปอร์เซ็นต์ ประชากรชักนำการเกิดแฮพลอยด์ที่พัฒนาขึ้นมีการเจริญเติบโตและลักษณะทางการเกษตรคล้ายกับข้าวโพดไร่ทั่วไป แต่มีเมล็ดกาบใบ และช่อดอกตัวผู้เป็นสีม่วง

คำสำคัญ: แฮพลอยด์ ดับเบิลแฮพลอยด์ สายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์ ข้าวโพด ประชากร

Abstract

The use of doubled haploids in a field maize is an increasingly recognized tool for inbred line development. The haploid seed can be induced by using haploid inducer and generated the double haploid line by chromosome doubling and selfing in a generation to increase the seed. The objective of this study was to develop a haploid-inducer population that well-adapted to Thailand's environment by crossing between Thai's corn inbred line (non-inducer)

[1] คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

[1] Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus

[2] คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[2] Faculty of Sciences, Kasetsart University

[3] ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[3] National Corn and Sorghum Research Center, Faculty of Agriculture, Kasetsart University

* Corresponding author. E-mail: agrcsj@ku.ac.th

Received: October 14, 2020; Revised: October 30, 2020; Accepted: November 23, 2020

and haploid inducer line. The crosses were made between 3 Kasetsart inbred lines (Ki), namely Ki 3, Ki 35, and Ki 52 as female parents and haploid inducer, which was Stock 6 as male parent obtaining 3 F_1-hybrids. F_1 seeds were planted in the ear-to-row method and crossed among plants in a row to produce the F_2 seeds. Then, the seeds with purple aleurone layer and scutellum in each cross were selected, planted, and self-pollinated for three consecutive generations, receiving S_3 lines. The haploid-inducer population was created from the best 5 S_3 lines in each cross, having a high haploid induction rate of their S_2 lines when crossing with Kei 1303 × Ki 60. The haploid induction rate of this population was measured by crossing with thirteen single cross hybrids. The results showed that the haploid induction rate was in a range of 0.33-4.60%. The growth and agricultural characteristics of this population were similar to the regular field maize, but its kernel, leaf sheath, and tassel were purple coloration.

Keywords: haploid, double haploid, haploid inducer, corn, population

บทนำ

ปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทยทั้งภาครัฐและเอกชนมุ่งเน้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมเดี่ยว (single cross hybrid) ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับ 2 ขั้นตอนหลัก คือ 1) การสร้างสายพันธุ์แท้ (inbred line development) และ 2) การสร้างลูกผสม (hybrid) ปกติแล้วในขั้นตอนของการสร้างสายพันธุ์แท้จะทำโดยการผสมตัวเอง (selfing) ของสายพันธุ์ที่ต้องการปรับปรุงเป็นสายพันธุ์แท้ประมาณ 7-10 ชั่ว (generation) เพื่อให้ได้สายพันธุ์แท้ที่มีระดับความคงตัวทางพันธุกรรม (homozygosity) เข้าใกล้ 100 เปอร์เซ็นต์มากที่สุด ซึ่งต้องใช้เวลาในการพัฒนาสายพันธุ์แท้ประมาณ 3 ปี (Samphantharak, 2008) อย่างไรก็ตาม ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในภาคเอกชนได้นำสายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์ (haploid inducer) มาใช้กันมากขึ้น ด้วยกระบวนการดังกล่าวนี้จะทำให้ได้สายพันธุ์แท้ที่มีระดับความคงตัวทางพันธุกรรม 100 เปอร์เซ็นต์ภายใน 2-3 ชั่ว หรือใช้เวลาประมาณ 1 ปี (Chaikam, Molenaar, Melchinger, & Prasanna, 2019) ในส่วนของประเทศไทยมีบริษัทเอกชนบางบริษัทที่สามารถสร้างสายพันธุ์แท้ผ่านกระบวนการใช้สายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์ และพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมเดี่ยวพันธุ์การค้าที่มีผลผลิตเป็นที่ยอมรับของเกษตรกร อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์ที่นำมาใช้ประโยชน์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดของแต่ละบริษัทจะเป็นสายพันธุ์ที่มาจากต่างประเทศ และมีข้อตกลงของการนำไปใช้ประโยชน์ที่จำกัดภายในหน่วยงานเท่านั้น ในส่วนภาครัฐของประเทศไทยยังไม่มีรายงานการนำสายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์มาใช้ประโยชน์ในการสร้างสายพันธุ์แท้ สำหรับสายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์พันธุ์เริ่มต้นคือพันธุ์ Stock 6 (Coe, 1959) เป็นพันธุ์ที่สามารถขอเมล็ดพันธุ์จาก Maize Genetics Cooperation Stock Center (http://maizecoop.cropsci.uiuc.edu/) แบบให้เปล่า และสามารถนำมาใช้ประโยชน์โดยตรงในการชักนำให้เกิดเมล็ดแฮพลอยด์ หรือใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับปรับปรุงสายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์สายพันธุ์ใหม่ๆ ได้ แต่ Stock 6 เป็นข้าวโพดที่เจริญเติบโตได้ดีในเขตอบอุ่น (temperate zone) และมีอัตราการ

ชักนำการเกิดแฮพลอยด์ประมาณ 2.30 เปอร์เซ็นต์ (Coe, 1959) ในขณะที่พันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ใหม่ๆ จากหน่วยงานต่างๆ ที่ได้จดสิทธิบัตร (patent) พันธุ์พืช มีอัตราการชักนำการเกิดแฮพลอยด์ตั้งแต่ 3-16 เปอร์เซ็นต์ (Hu et al., 2016) สำหรับยีนที่ควบคุมอัตราการชักนำการเกิดแฮพลอยด์มีหลายยีนเป็นลักษณะทางปริมาณ (Chen et al., 2020) ดังนั้น การเพิ่มอัตราการชักนำการเกิดแฮพลอยด์ให้สูงขึ้นสามารถทำได้ทั้งวิธีปกติและใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (Prigge, & Melchinger, 2012; Hu et al., 2016; Chaikam et al., 2018; Chen et al., 2020) สายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์มีเครื่องหมายทางฟีโนไทป์ (phenotypic marker) ที่สำคัญคือการเกิดสีม่วงที่เนื้อเยื่อแอลูโรน (aleurone) และที่สคิวเทลลัม (scutellum) ซึ่งควบคุมด้วยยีนเด่น *R1-nj* (Coe, 1994) โดยเมล็ดแฮพลอยด์ (haploid kernel, n) จะเกิดสีม่วงที่เนื้อเยื่อแอลูโรนบริเวณด้านบนของเมล็ด แต่ถ้าเกิดสีม่วงทั้งเนื้อเยื่อแอลูโรนและสคิวเทลลัมจะเป็นเมล็ดดิพลอยด์ (diploid kernel, 2n) ในบางกรณี การประเมินเมล็ดแฮพลอยด์เกิดความคลาดเคลื่อนจากการนับเมล็ดดิพลอยด์เป็นเมล็ดแฮพลอยด์ซึ่งเรียกว่า false positive เช่น การสังเกตสีม่วงที่สคิวเทลลัมไม่ชัดเจนในเมล็ดข้าวโพดที่ค่อนข้างกลม ทำให้การคัดเลือกเมล็ดแฮพลอยด์ทำได้ยาก หรือพันธุ์ที่ต้องการปรับปรุง (donor parent) มียีนเด่น *C1-I* (Coe, 1962), *C2-Idf* (Della Vedova et al., 2005) หรือ *In1-D* (Coe, McCormick, & Modena, 1981) ซึ่งจะยับยั้งการสร้างสารแอนโทไซยานิน (anthocyanin inhibitor) ที่เกิดจากยีน *R1-nj* ของสายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์ ทำให้ไม่สามารถแยกเมล็ดแฮพลอยด์และดิพลอยด์ออกจากกันได้ ในกรณีที่ยีน *R1-nj* ของสายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์ไม่สามารถใช้แยกเมล็ดแฮพลอยด์และเมล็ดดิพลอยด์ออกจากกันได้อย่างชัดเจน การเพิ่มลักษณะรากแดง (red root) ในระยะต้นกล้าที่เกิดจากยีนสะสมสารแอนโทไซยานิน *purple 1 (Pl1)* ร่วมกับยีน *R1-nj* ในสายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์จะเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการจำแนกต้นอ่อนแฮพลอยด์ (รากขาว) ออกจากต้นอ่อนดิพลอยด์ (รากแดง) ก่อนที่จะเข้ากระบวนการเพิ่มชุดโครโมโซม (chromosome doubling) โดยยีน *Pl1* ซึ่งทำให้เกิดรากสีแดงในระยะแรกของการงอกที่อายุประมาณ 4 วัน เนื่องจากการสะสมสารแอนโทไซยานินที่รากภายใต้สภาวะไม่มีแสง (Chaikam, Martinez, Melchinger, Schipprack, & Boddupalli, 2016) นอกจากนี้การนำพันธุ์หรือสายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์ในข้าวโพดมาใช้ผลิตสายพันธุ์แท้ในประเทศไทยโดยตรงยังประสบกับปัญหาเรื่องการปรับตัวของสายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์ซึ่งสายพันธุ์ส่วนใหญ่เป็นข้าวโพดจากเขตอบอุ่น เมื่อนำมาปลูกในสภาพอากาศเขตร้อน (tropical zone) ทำให้การเจริญเติบโตไม่ดี ดังนั้น การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาประชากรชักนำการเกิดแฮพลอยด์ที่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของประเทศไทยจากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์แท้ข้าวโพดไร่ (non-haploid inducer line) ของไทยกับสายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์สายพันธุ์ Stock 6 (haploid inducer line)

วิธีการศึกษา

1. การพัฒนาสายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์

1.1 ผสมข้ามระหว่างข้าวโพดไร่สายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ (Kasetsart inbred, Ki) ซึ่งไม่สามารถชักนำการเกิดแฮพลอยด์ (non-haploid inducer) จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Ki 3, Ki 35 และ Ki 52 เป็นพันธุ์แม่กับสายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์ (haploid inducer) สายพันธุ์ Stock 6 (M741H; A1 A2 B1 C1 C2 Pl1 R1-nj) เป็นพันธุ์พ่อ ปลูกและผสมพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้เมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ของทั้ง 3 คู่ผสม

1.2 นำเมล็ด F_1 ของทั้ง 3 คู่ผสม มาปลูกแบบฝักต่อแถว (ear-to-row) เมื่อถึงระยะออกดอกผสมพันธุ์แบบข้ามต้นภายในแถวเดียวกันของแต่ละคู่ผสม เมื่อเมล็ดสุกแก่เก็บเกี่ยวฝักชั่วที่ 2 (F_2) ของแต่ละคู่ผสม แล้วคัดเลือกเฉพาะเมล็ดที่มีสีม่วง (purple) ซึ่งเป็นผลมาจากการสะสมสารแอนโทไซยานินที่เนื้อเยื่อแอลูโรน (aluerone layer) และที่สคิวเทลลัมจากฝักที่มีเมล็ดสีม่วงภายในฝักมากที่สุด โดยสุ่มเลือกเมล็ดสีม่วงฝักละประมาณ 50 เมล็ด จำนวน 10 ฝัก/คู่ผสม ปลูกและผสมพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3 นำเมล็ดสีม่วงชั่วที่ 2 (F_2) ที่เกิดจากพันธุกรรม *R1-nj* จากสายพันธุ์ Stock 6 ของทั้ง 3 คู่ผสม มาปลูกแบบฝักต่อแถว ที่แปลงปลูกพืชทดลอง ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อถึงระยะออกดอกได้ผสมพันธุ์แบบผสมตัวเอง (selfing) ได้เป็นสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) เมื่อเมล็ดสุกแก่เก็บเกี่ยวฝักและคัดเลือกเฉพาะฝักที่มีเมล็ดสีม่วงทั้งฝักเนื่องจากอิทธิพลของยีน *R1-nj* ของทั้ง 3 คู่ผสม

1.4 นำเมล็ดผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) ของทั้ง 3 คู่ผสม มาปลูกแบบฝักต่อแถวเมื่อถึงระยะออกดอกผสมตัวเองได้สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 2 (S_2) เมื่อข้าวโพดสุกแก่เก็บเกี่ยวสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 2 แล้วคัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์ที่ทุกฝักภายในแถวเดียวกันมีเมล็ดเป็นสีม่วงทั้งหมด ซึ่งแสดงว่าถูกควบคุมด้วยยีน *R1-nj* แบบที่เป็นโฮโมไซกัสโดมิเนนท์ (homozygous dominant) แล้ว

2. อัตราชักนำการเกิดแฮพลอยด์ (haploid induction rate, HIR)

นำเมล็ดของสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 2 (S_2) ที่คัดเลือกไว้มาปลูกในแปลงทดลองแบบฝักต่อแถวเพื่อทดสอบความสามารถในการชักนำการเกิดแฮพลอยด์ โดยใช้ข้าวโพดไร่ลูกผสมเดี่ยวคู่ผสม Kei 1311 × Ki60 เป็นพันธุ์ทดสอบ (tester) และสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 2 เป็นพันธุ์พ่อ ผสมพันธุ์แบบต้นต่อต้น (full sib) โดยผสมข้ามจำนวน 10 ฝัก/คู่ผสม ในขณะเดียวกันต้นที่ผสมข้ามไปยังพันธุ์ทดสอบ ก็จะผสมตัวเองเป็นสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 3 (S_3) คำนวณเปอร์เซ็นต์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์ (HIR) จากสมการที่ (1)

$$HIR = \frac{\text{Number of kernels with haploid embryo}}{\text{All kernels investigated}} \times 100 \quad (1)$$

3. การสร้างประชากรชักนำการเกิดแฮพลอยด์

3.1 นำสายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์ สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 3 (S_3) ของทั้ง 3 คู่ผสม คือ Ki 3 × Stock 6, Ki 35 × Stock 6 และ Ki 52 × Stock 6 ที่มีเปอร์เซ็นต์การชักนำการเกิดแฮพลอยด์สูงสุด 5

อันดับแรกของแต่ละคู่ผสมมาปลูกแบบฝักต่อแถว เมื่อถึงระยะออกดอกผสมข้ามระหว่างคู่ผสมแบบ chain cross โดยรวบรวมละอองเกสร (bulk pollen) จากแต่ละคู่ผสมแล้วนำไปผสมข้ามกับคู่ผสมอื่น ได้ 3 คู่ผสม คือ (Ki 3 × Stock 6 –S_3) × (Ki 35 x Stock 6 –S_3), (Ki 35 × Stock 6–S_3) × (Ki 52 × Stock 6 –S_3) และ (Ki 52 × Stock 6–S_3) × (Ki 3 × Stock 6 –S_3) เมื่อสุกแก่เก็บเกี่ยวฝักแล้วกะเทาะเมล็ดรวมกันในแต่ละคู่ผสม

3.2 สุ่มเมล็ดจากแต่ละคู่ผสม คู่ผสมละ 200 เมล็ด นำเมล็ดมารวมกันก่อนนำไปปลูกในแปลงทดลอง เมื่อข้าวโพดเจริญเติบโตที่อายุ 21 วัน ถอนแยกเหลือประชากร 300 ต้น ปล่อยให้ผสมเกสรภายในประชากรตามธรรมชาติ (random matting) ในสภาพอิสระ (isolation field) จากข้าวโพดพันธุ์อื่นๆ เมื่อถึงระยะสุกแก่ คัดเลือกฝักที่ดี (ทุกเมล็ดมีสีม่วง) จำนวน 40 ฝัก จากต้นที่คัดเลือกไว้ กล่าวคือ มีช่อดอกตัวผู้ขนาดใหญ่ มีละอองเกสรมาก การออกดอกตัวผู้และออกไหมใกล้เคียงกัน และมีสีกาบหุ้มดอกตัวผู้ (glume) และกาบใบ (leaf sheet) เป็นสีม่วง แล้วกะเทาะเมล็ดรวมกันเป็นประชากรชักนำการเกิดแฮพลอยด์

3.3 ปลูกประชากรชักนำการเกิดแฮพลอยด์ในแปลงทดลองเพื่อหาอัตราชักนำการเกิดแฮพลอยด์ โดยใช้พันธุ์ที่ต้องการสร้างเมล็ดแฮพลอยด์ หรือที่เรียกว่า donor parent จำนวน 13 พันธุ์ จากภาครัฐ 5 พันธุ์ ได้แก่ Suwan 5720, Suwan 5821 และ Kei1311 × Ki60 จากศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS 3) และ นครสวรรค์ 5 (NS 5) จากศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ กรมวิชาการเกษตร และพันธุ์จากภาคเอกชน 8 พันธุ์ ได้แก่ Pac 339 และ Pac 789 จากบริษัท แปซิฟิกเมล็ดพันธุ์ จำกัด CP 303 และ CP 639 จากบริษัท เจริญโภคภัณฑ์โปรดิ๊วส จำกัด S 7328 และ NK 6253 จากบริษัท ซินเจนทาซีดส์ จำกัด P 4546 จากบริษัท ไพโอเนียไฮเบรด (ไทยแลนด์) จำกัด และ GT 822 จากบริษัท โกลคอนดา เอเชีย จำกัด โดยใช้ประชากรชักนำการเกิดแฮพลอยด์เป็นพันธุ์พ่อ การผสมข้ามในแต่ละคู่ผสมทำ 2 ฝัก แล้วคำนวณหาอัตราการชักนำการเกิดแฮพลอยด์ ดังสมการในข้อ 2

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

1. การพัฒนาสายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์

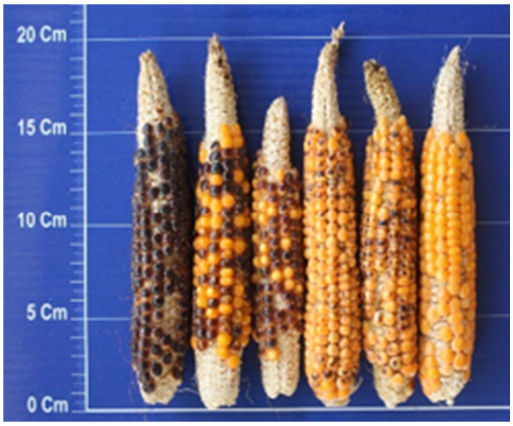
การผสมข้ามระหว่างข้าวโพดไร่สายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์กับสายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์ Stock 6 พบว่า สายพันธุ์ในชั่วที่ 2 (F_2) ของทั้ง 3 คู่ผสม มีสีเมล็ดในแต่ละฝักกระจายตัวเป็นเมล็ดสีม่วง (purple kernel) และเมล็ดสีเหลือง (yellow kernel) ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน (Table 1) เมล็ดสีม่วงเกิดจากอิทธิพลของยีน *R1-nj* ซึ่งเป็นยีนข่ม (dominant gene) บนโครโมโซมที่ 1 จำนวน 1 คู่ (Coe, 1994) ถ่ายทอดมาจากสายพันธุ์ Stock 6 มีผลต่อการสะสมสารแอนโทไซยานินใน 2 ส่วน คือ 1) บริเวณเนื้อเยื่อแอลูโรน ทำให้เห็นเมล็ดเป็นสีม่วง ซึ่งอาจเกิดเฉพาะบริเวณด้านบนหลังเมล็ด หรือเกิดสีม่วงปกคลุมทั้งเมล็ด 2) การเกิดสีม่วงที่บริเวณสคิวเทลลัม ในทางทฤษฎีแล้ว การกระจายตัวของสีเมล็ดในแต่ละฝักควรจะเป็นสัดส่วนเมล็ดสีม่วง 3 ส่วน และเมล็ดสีเหลือง 1 ส่วน แต่ผลที่ได้จากการทดลองแตกต่างไปจากทฤษฎี ทั้งนี้เมื่อทดสอบไคสแควร์ของสัดส่วนเมล็ดสีม่วง 3 ส่วน ต่อเมล็ดสีเหลือง 1 ส่วน พบว่าสัดส่วนเมล็ดสีม่วง : สีเหลือง ไม่เป็น 3 : 1 ด้วยความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.01$) การสะสมสารแอนโทไซยานินในเมล็ดที่แตกต่างกัน

ในแต่ละฝักหรือในแต่ละคู่ผสมอาจเป็นผลมาจากอิทธิพลของยีนที่มีในพันธุ์ทดสอบ เช่น ยีนเด่น *C1-I* (Coe, 1962), *C2-Idf* (Della Vedova et al., 2005) หรือ *In1-D* (Coe, McCormick, & Modena, 1981) ซึ่งจะยับยั้งการสร้างสารแอนโทไซยานินที่เกิดจากยีน *R1-nj* จากนั้นคัดเลือกเฉพาะเมล็ด F_2 ที่มีสีม่วงเนื่องจากยีน *R1-nj* ของทั้ง 3 คู่ผสมมาปลูกแล้วผสมตัวเองได้เป็นสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) คัดเลือกเฉพาะฝักที่มีสีม่วงทั้งฝักเท่านั้นไปปลูกต่อเพื่อผสมตัวเองเป็นสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 2 (S_2) แล้ว คัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์ที่ทุกฝักภายในแถวเดียวกันมีเมล็ดเป็นสีม่วงทั้งหมด (Figure 1a) ซึ่งแสดงว่ายีน *R1-nj* ของสายพันธุ์ดังกล่าวนี้เป็น homozygous dominant (*R1-nj*/*R1-nj*) แล้ว ส่วนฝักที่มีทั้งเมล็ดสีม่วงและขาว (Figure 1b-e) แสดงว่าเมล็ดสีม่วงเกิดจากยีน *R1-nj* เป็น homozygous dominant (*R1-nj*/*R1-nj*) หรือ heterozygous (*R1-nj*/*r1-nj*) ในขณะที่เมล็ดสีเหลือง (Figure 1f) เป็น homozygous recessive (*r1-nj*/*r1-nj*)

Table 1 Phenotypic ratios of kernel colors in F_2 generation from three ears in each cross illustrating the inheritance of *R1-nj*.

crosses	number of kernels			x^2 (3 purple : 1 yellow)
	total	purple kernels	yellow kernels	
Ki 5 × Stock 6-F_2-1	364	34	330	837**
Ki 5 × Stock 6-F_2-2	476	80	396	859**
Ki 5 × Stock 6-F_2-3	378	55	323	737**
Ki 35 × Stock 6-F_2-1	280	65	215	400**
Ki 35 × Stock 6-F_2-2	490	149	341	520**
Ki 35 × Stock 6-F_2-3	384	144	240	288**
Ki 52 × Stock 6-F_2-1	476	67	409	942**
Ki 52 × Stock 6-F_2-2	406	131	275	395**
Ki 52 × Stock 6-F_2-3	518	54	464	1,152**
sum	3,772	779	2,993	5,942**

Note: Where $x^2_{0.01(1)}$=6.63, ** = highly confidence that the goodness ratio was not 3 : 1 (P<0.01).



(a) (b) (c) (d) (e) (f)

Figure 1 Variation of kernel colors in S_2 ear of haploid inducer, (a) homozygous dominance (purple kernel, *R1-nj*/*R1-nj*), (b, c, d and e) mixed genotypes of homozygous dominant or heterozygous (purple kernels, *R1-nj*/*R1-nj* or *R1-nj*/*r1*-nj) and homozygous recessive (yellow kernel, *r1-nj*/*r1-nj*), and (f) homozygous recessive (yellow kernel, *r1-nj*/*r1-nj*).

2. อัตราชักนำการเกิดแฮพลอยด์

ใช้สายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 2 (S_2) เป็นพันธุ์พ่อจำนวน 10 สายพันธุ์ ต่อคู่ผสมไปผสมกับข้าวโพดไร่พันธุ์ลูกผสมเดี่ยว Kei 1311 × Ki 60 แบบต้นต่อต้น ได้เมล็ดทั้งหมดในแต่ละคู่ผสมอยู่ระหว่าง 4,000-5,000 เมล็ด (Table 2) โดยมีเมล็ดแฮพลอยด์ของแต่ละคู่ผสมดังนี้ คู่ผสม (Kei 1311 × Ki 60) x (Ki 5 × Stock 6–S_2) มีจำนวน 90 เมล็ด คู่ผสม (Kei 1311 × Ki 60) x (Ki 35 × Stock 6–S_2) มีจำนวน 67 เมล็ด และคู่ผสม (Kei 1311 × Ki 60) × (Ki 52 × Stock 6–S_2) มีจำนวน 130 เมล็ด คิดเป็นอัตราการชักนำการเกิดแฮพลอยด์ 1.97, 1.83 และ 2.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และคิดเป็นอัตราชักนำการเกิดแฮพลอยด์โดยเฉลี่ยเท่ากับ 2.15 เปอร์เซ็นต์ การจำแนกเมล็ดแฮพลอยด์ (n) จะพิจารณาจากเมล็ดมีสีม่วงเนื่องจากอิทธิพลของยีน *R1-nj* โดยจะพบสีม่วงในส่วนของเนื้อเยื่อแอลูโรนเท่านั้น ส่วนเมล็ดดิพลอยด์จะพบสีม่วงทั้งในส่วนของเนื้อเยื่อแอลูโรนและสคิวเทลลัม เนื่องจากมีการผสมข้ามระหว่างไข่ (egg) กับสเปิร์ม (sperm nuclei) ได้เป็นไซโกท (zygote) แล้วพัฒนาไปเป็นเอมบริโอที่เป็นดิพลอยด์ (2n) ส่วนเอมบริโอที่สคิวเทลลัมไม่มีสีม่วงจะมีเฉพาะโครโมโซมของไข่เท่านั้นที่พัฒนาไปเป็นเอมบริโอที่เป็นแฮพลอยด์ (n) (Coe, 1994) อัตราการชักนำการเกิดเมล็ดแฮพลอยด์มีค่าเฉลี่ย 2.15 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์เริ่มต้น Stock 6 ซึ่งมีอัตราชักนำการเกิดแฮพลอยด์ประมาณ 2.3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อปลูกในสภาพแวดล้อมเขตอบอุ่น (temperate zone) (Coe, 1959) แต่สายพันธุ์ Stock 6 เมื่อนำมาปลูกในประเทศไทยจะไม่สามารถเจริญเติบโตในสภาพปกติได้ทั้งนี้เนื่องจากสภาพแวดล้อมของไทยเป็นเขตร้อน

(tropical zone) จึงไม่สามารถใช้เป็นพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์ได้โดยตรง อย่างไรก็ตาม เมื่อนำมาผสมข้ามกับข้าวโพดไร่ของไทยและผ่านการคัดเลือกจนเป็นสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 2 พบว่า มีระยะเวลาการออกดอกทั้งตัวผู้และตัวเมียใกล้เคียงกับข้าวโพดลูกผสมเดี่ยวของไทย โดยมีวันออกดอกตัวผู้และไหมประมาณ 54 วัน (ไม่ได้แสดงข้อมูล) การเพิ่มอัตราการชักนำการเกิดแฮพลอยด์ให้สูงขึ้นมีแนวโน้มที่จะทำได้ ทั้งนี้เนื่องจากยีนที่ควบคุมอัตราชักนำการเกิดแฮพลอยด์มีหลายยีนเป็นลักษณะทางปริมาณ (Chen et al., 2020) การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีอัตราชักนำการเกิดแฮพลอยด์สูงแล้วนำมาผสมกันใหม่ หรือใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถทำได้ (Prigge, & Melchinger, 2012; Hu et al., 2016; Chaikam et al., 2018; Chen et al., 2020) และมีรายงานวิจัยที่กล่าวว่าสายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์สายพันธุ์ใหม่ๆ มีอัตราชักนำสูงขึ้นอยู่ระหว่าง 3-16 เปอร์เซ็นต์ (Hu et al., 2016)

Table 2 Haploid induction rates (HIR) calculated from the average of 10 ears in each cross using the phenotypic marker (*R1-nj*) of the S_2 generation on a donor parent, Kei 1311 × Ki 60.

crosses	number of kernels			HIR (%)
	total	diploid (2n)	haploid (n)	
(Kei 1311 × Ki 60) × (Ki 5 × Stock 6–S_2)	4,648	4,558	90	1.97
(Kei 1311 × Ki 60) × (Ki 35 × Stock 6–S_2)	4,053	3,986	67	1.83
(Kei 1311 × Ki 60) × (Ki 52 × Stock 6–S_2)	5,062	4,932	130	2.64
average				2.15

3. การสร้างประชากรชักนำการเกิดแฮพลอยด์

ประชากรชักนำการเกิดแฮพลอยด์ (HI_Pop) ที่พัฒนามาจากสายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์ชั่วที่ 3 (S_3) จาก 3 คู่ผสม มีค่าเฉลี่ยวันออกดอกตัวผู้ 52 วัน วันออกดอกตัวเมีย 55 วัน ความสูงต้น 190 เซนติเมตร ความสูงฝัก 120 เซนติเมตร มีช่อดอกตัวผู้ค่อนข้างใหญ่และมีละอองเกสรดีมาก เมล็ดและเอมบริโอมีสีม่วงเนื่องจากยีน *R1-nj* กาบใบและช่อดอกตัวผู้มีสีม่วงเนื่องจากการสะสมสารแอนโทไซยานินที่เป็นผลมาจากการทำงานร่วมกันของยีน *B1* (booster 1) และยีน *Pl1* (purple 1) นอกจากนี้ ยีน *Pl1* ยังทำให้เกิดรากสีแดงในระยะต้นอ่อนได้ด้วย (Chaikam, Martinez, Melchinger, Schipprack, & Boddupalli, 2016) ปกติแล้วพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์ส่วนใหญ่จะเป็นสายพันธุ์แท้ (Trentin, Frei, & Lübberstedt, 2020) ยกเว้นพันธุ์ ZMK1 เป็นประชากร (Shatskaya, 2010) และพันธุ์ RWS/RWK-76 เป็นลูกผสมเดี่ยว (Geiger, & Gordillo, 2009) โดยประชากรชักนำการเกิดแฮพลอยด์มีช่วงเวลาการโปรยละอองเกสรค่อนข้างยาวกว่าสายพันธุ์แท้และลูกผสม (Trentin, Frei, & Lübberstedt, 2020) อัตราชักนำการเกิดแฮพลอยด์ของประชากรเมื่อนำละอองเกสรของประชากรชักนำการเกิดแฮพลอยด์ไปผสมกับพันธุ์ลูกผสมเดี่ยว 13 พันธุ์ พบว่า มีอัตราชักนำการเกิดแฮพลอยด์อยู่ระหว่าง 0.33-4.60 เปอร์เซ็นต์

และมีค่าเฉลี่ย 1.73 เปอร์เซ็นต์ (Table 3) คู่ผสมระหว่าง (Kei 1311 × Ki60) × HI_Pop มีอัตราชักนำการเกิดแฮพลอยด์สูงสุด 4.60 เปอร์เซ็นต์ ความแตกต่างของอัตราชักนำการเกิดแฮพลอยด์เป็นผลมาจากพันธุกรรมของพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์ พันธุกรรมพื้นฐานของพันธุ์แม่ (Eder, & Chalyk, 2002) และอุณหภูมิของสภาพแวดล้อม (Geiger, 2009) อัตราชักนำการเกิดแฮพลอยด์ของการทดลองนี้ ส่วนหนึ่งมาจากพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์ เนื่องประชากรชักนำการเกิดแฮพลอยด์ได้พัฒนามาจากสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 3 ที่มีอัตราชักนำการเกิดแฮพลอยด์สูงกับคู่ผสม Kei 1311 × Ki60 และอีกส่วนหนึ่งมาจากพันธุ์ลูกผสมเดี่ยวที่มีพันธุกรรมพื้นฐานแตกต่างกัน ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์ให้มีอัตราชักนำการเกิดแฮพลอยด์สูงและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง ควรมีการทดสอบกับตัวทดสอบที่มาจากหลายแหล่งพันธุกรรม แล้วเลือกสายพันธุ์ชักนำการเกิดแฮพลอยด์ที่ดีมารวมไว้เป็นประชากร

Table 3 Haploid induction rates (HIR) calculated from the average of two ears in each cross using the phenotypic marker (*R1-nj*) from the haploid inducer population on the different single cross hybrids.

crosses	number of kernels			HIR (%)
	total	diploid (2n)	haploid (n)	
Suwan 5720 × HI_Pop	600	594	6	1.00
Suwan 5821 × HI_Pop	470	458	12	2.55
NS 3 × HI_Pop	390	384	6	1.54
NS 5 × HI_Pop	400	397	3	0.75
(Kei 1311 × Ki60) × HI_Pop	500	477	23	4.60
Pac 339 × HI_Pop	600	598	2	0.33
Pac 789 × HI_Pop	467	465	2	0.43
CP 303 × HI_Pop	600	584	16	2.67
CP 639 × HI_Pop	580	572	8	1.38
S 7328 × HI_Pop	480	478	2	0.42
NK 6253 × HI_Pop	377	375	2	0.53
P 4546 × HI_Pop	500	495	5	1.00
GT 822 × HI_Pop	360	358	2	0.56
average				1.37

สรุป

1. การปรับปรุงประชากรชักนำการเกิดแฮพลอยด์ (HI_Pop) เพื่อปลูกในประเทศไทยประสบความสำเร็จ เมื่อนำไปทดสอบกับพันธุ์ข้าวโพดไร่ลูกผสมเดี่ยวที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมจากภาครัฐและเอกชน จำนวน 13 พันธุ์ มีอัตราชักนำการเกิดแฮพลอยด์อยู่ระหว่าง 0.33-4.60 เปอร์เซ็นต์

2. การเจริญเติบโตและลักษณะทางการเกษตรของประชากรชักนำการเกิดแฮพลอยด์ที่สร้างขึ้นนี้คล้ายกับข้าวโพดไร่ทั่วๆ ไป สามารถปรับตัวกับสภาพแวดล้อมประเทศไทยได้ดี แต่มีเมล็ด กาบใบ และช่อดอกตัวผู้เป็นสีม่วง

คำขอบคุณ

การทำวิจัยในครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปี 2563 เรื่อง การพัฒนาประชากรแฮพลอยด์อินดิวเซอร์ของข้าวโพดเขตร้อน

เอกสารอ้างอิง

Chaikam, V., Martinez, L., Melchinger, A. E., Schipprack, W., & Boddupalli, P. M. (2016). Development and validation of red root marker-based haploid inducers in maize. *Crop Science, 56*(4), 1678-1688.

Chaikam, V., Nair, S. K., Martinez, L., Lopez, L. A., Utz, H. F., Melchinger, A. E., & Boddupalli, P. M. (2018). Marker-assisted breeding of improved maternal haploid inducers in maize for the tropical/subtropical regions. *Frontiers in Plant Science, 9,* 1527-1541.

Chaikam, V, Molenaar, M., Melchinger, A. E., & Prasanna, M. B. (2019). Double haploid technology for line development in maize: Technical advances and prospects. *Theor Appl Genet, 132,* 3227-3243.

Chen, C., Xiao, Z., Zhang, J., Li, W., Li, J., Liu, C., & Chen, S. (2020). Development of *in vivo* haploid inducer lines for screening haploid immature embryos in maize. *Plants, 9,* 739-749.

Coe, E. H. (1959). A line of maize with high haploid frequency. *The American Naturalist, 93*(873), 381-382.

Coe, E. H. (1962). Spontaneous mutation of the aleurone color inhibitor in maize. *Genetics, 47*(6), 779-783.

Coe, E. H., McCormick, S., & Modena, S. (1981). White pollen in maize. *Heredity, 72,* 318-320.

Coe, E. H. (1994). Anthocyanin genetic. In M. Freeling, & V. Walbot (Eds.), *The Maize Handbook Springer Lab Manual* (pp. 279-281). New York: Springer.

Della Vedova, C. B., Lorbiecke, R., Kirsch, H., Schulte, M. B., Scheets, K., Borchert, L. M., Scheffler, B. E., Wienand, U., Cone, K. C., & Birchler, J. A. (2005). The dominant inhibitory chalcone synthase allele C2-Idf (inhibitor diffuse) from *Zea mays* (L.) acts via an endogenous RNA silencing mechanism. *Genetics, 170*(4), 1989-2002.

Eder, J., & Chalyk, S. (2002). *In vivo* haploid induction in maize. *Theor Appl Genet, 103,* 703-708.

Geiger, H. H. (2009). Doubled haploid. In J. L. Bennetzen, & S. Hake (Eds.), *Handbook of Maize* (pp. 641-657). New York: Springer.

Geiger, H. H., & Gordillo, G. A. (2009). Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica, 54,* 485-499.

Hu, H., Schrag, T. A., Peis, R., Unterseer, S., Schipprack, W., Chen, S., Lai, J., Yan, J., Prasanna, B. M., Nair, S. K., Chaikam, V., Zavalishina, A., Scholten, S., Schön, C.C., & Melchinger, A. E. (2016). The genetic basis of haploid induction in maize

identified with a novel genome-wide association method. *Genetics, 202*(4), 1267-1276.

Prasanna, B. M., Chaikam, V., & Mahuku, G. (2012). *Double haploid technology in maize breeding: Theory and practice*. Mexico City: CIMMYT.

Prigge, V., & Melchinger, A. E. (2012). Production of haploids and doubled haploids in maize. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 877*, 161-172.

Samphantharak, K. (2008). *Plant breeding: fundamentals, methods and concepts*. Bangkok: Kasetsart University. (in Thai)

Shatskaya, O. A. (2010). Haploinductors isolation in maize: Three cycles of selection on high frequency of induction of matroclinal haploids. *Agric. Biol, 7,* 79-86.

Trentin, U. H., Frei, U. K., & Lübberstedt, T. (2020). Breeding maize maternal haploid inducers. *Plants, 9*(5), 614.