

การสร้างสายพันธุ์แท้ของพริกลูกผสมกลับข้ามชนิดระหว่าง CA758 กับ BC₂F₃ 758x80C₅(1) โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

Induction of double haploid lines from inter-specific backcross between CA758 and BC₂F₃ 758x80C₅(1) by anther culture

อัญชลี ธีโรจน์วิบูลย์^{1,3*}, พรพนัช มีกุล^{2,3} และ จุลภาค ชุ่มวงศ์^{1,2,3}

Anchalee Raweerotwiboon^{1,3*}, Pornpanuch Meekul^{2,3} and Julapark Chunwongse^{1,2,3}

บทคัดย่อ: พริกชี้ฟ้า (*Capsicum annuum*) CA758 เป็นพริกพันธุ์การค้าที่มีลักษณะอ่อนแอต่อโรคแอนแทรกโนส การผสมข้ามระหว่างพริก CA758 กับ พริก BC₂F₃ 758x80C₅(1) (*C. annuum* x *C. baccatum*) เพื่อถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคแอนแทรกโนสให้กับพริก CA758 โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริกที่เหมาะสมของคู่ผสมกลับข้ามชนิดระหว่างพริก CA758 กับพริก BC₂F₃ 758x80C₅(1) จากการศึกษาพบว่า สูตรอาหารชักนำซึ่งเดิมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4 -D ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. มีอัตราการเกิดต้นสูงสุด คือ 1.05 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบต้นพริกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรทั้งหมดด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด SSRs และเครื่องโพลีไซโตมิเตอร์ พบการเกิดต้นแฮพลอยด์และดัดเบิลแฮพลอยด์ (H:DH) ในสัดส่วน 1:1.3 และพริกที่เป็นต้นดิพลอยด์ทุกต้นเป็นต้นพริกดัดเบิลแฮพลอยด์ที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นเองในสภาพเพาะเลี้ยง

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร, ดัดเบิลแฮพลอยด์, พริก, โรคแอนแทรกโนส

ABSTRACT: A commercial pepper (*Capsicum annuum*) 'CA758' is susceptible to anthracnose disease. A backcross between CA758 and BC₂F₃ 758x80C₅(1) (*C. annuum* x *C. baccatum*) carrying anthracnose resistance are used for anther culture. The aim of this study was to identify the appropriate conditions of anther culture for interspecific backcross pepper between CA758 and BC₂F₃ 758x80C₅(1). The result showed that the highest frequency of plantlet regeneration was found to be 1.05 % on an induction medium (C medium) supplemented with 0.5 mg/l 2,4-D and 0.1 mg/l kinetin. Screening of plantlets for homozygosity with SSR markers and for ploidy level with a flow cytometer demonstrated that the ratio between haploid and double haploid plantlets was about 1:1.3. In addition, all of the diploid plants were spontaneous double haploid in our culture condition.

Keywords: anther culture, double haploid, pepper, anthracnose disease

¹ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

² ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

³ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรสำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand.

* Corresponding author: rdianr@ku.ac.th

บทนำ

พริกเป็นพืชผักสามารถพัฒนาสายพันธุ์โดยการประยุกต์ใช้วิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อผลิตต้นพืชดัดแปลงแฮพลอยด์ (double haploid plant) ซึ่งเป็นพืชสายพันธุ์แท้ (pure line) เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถผลิตพืชสายพันธุ์แท้ได้ภายในขั้นตอนเดียว ทำให้ประหยัดเวลาและทรัพยากรในการพัฒนาพันธุ์พืช วิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อสร้างสายพันธุ์แท้โดยทั่วไปต้องใช้เวลานานและแรงงานจำนวนมากในการผสมเกสร (Irikova et al., 2011) การเพาะเลี้ยงอับละของเกสร (anther culture) เพื่อผลิตต้นดัดแปลงแฮพลอยด์เป็นวิธีการที่ใช้อย่างกว้างขวางในพืชหลายจีโนไทป์ (genotypes) ปัจจุบันมีการใช้เทคนิคนี้ในการผลิตต้นดัดแปลงแฮพลอยด์มากกว่า 200 ชนิด (species) เช่น พืชในวงศ์ Solanaceae Cruciferae และ Graminae การผลิตพืชดัดแปลงแฮพลอยด์นี้สามารถใช้ประโยชน์ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์พืชและการสร้างแผนที่ยีน (gene mapping) ได้ โดยลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนด้อยจะสามารถแสดงออกได้เนื่องจากไม่ถูกยีนเด่นข่มนอกจากนี้ประชากรพืชที่ผลิตได้จะประกอบด้วยลักษณะของแต่ละต้นที่มีลักษณะที่แตกต่างกันเพราะแต่ละต้นพัฒนามาจากเซลล์สืบพันธุ์ที่แตกต่างกันจึงทำให้ประชากรพืชที่ได้มีลักษณะหลากหลาย (Germanà, 2011) ความสำเร็จของการชักนำให้เกิดต้นปกติในการเพาะเลี้ยงอับละของเกสรพริกนั้นขึ้นกับหลายปัจจัย ได้แก่ พันธุกรรม สภาพแวดล้อมของต้นที่เป็นแหล่งให้อับละของเกสร ระยะการพัฒนามาที่เหมาะสมของไมโครสปอร์สภาวะและองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง เป็นต้นซึ่งพันธุกรรมของพริกนับเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดที่เป็นข้อจำกัดด้านการผลิต จึงยังไม่มีวิธีการที่เป็นมาตรฐานและสร้างผลผลิตที่ดีกับทุกๆ สายพันธุ์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาและพัฒนาเทคนิคให้เหมาะสมกับสายพันธุ์พริกให้ผลิตต้นพืชที่ปกติจำนวนมาก

สำหรับพริกขี้นหนู CA758 เป็นพริกพันธุ์การค้า (*Capsicum annuum*) ที่ไม่ต้านทานโรคแอนแทรคโนส

การพัฒนาพริกสายพันธุ์นี้ให้มีความต้านทานโรคแอนแทรคโนสนั้นใช้แหล่งพันธุกรรมจากพริก PBC80 (*C. baccatum*) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การผสมพันธุ์พริกข้ามชนิด (speices) ระหว่างพริก *C. annuum* กับ พริก *C. baccatum* สายพันธุ์ PBC80 นั้น คัพภะของลูกผสมไม่สามารถเจริญเติบโตและพัฒนาได้ปกติตามธรรมชาติ ต้องใช้เทคนิค embryo rescue ช่วยชีวิตคัพภะของพริกลูกผสมชั่วที่ 1 (เฉลิมศรี, 2549) ต่อมาจึงนำลูกผสมชั่วที่ 1 นี้ ผสมกลับไปยังพริกขี้นหนู CA758 (*C. annuum*) เพื่อสร้างต้นพริก รุ่น BC₂F₂ และประเมินความต้านทานต่อโรคแอนแทรคโนส พบว่า มีความต้านทานการเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* (เฉลิมศรี, 2551) การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงอับละของเกสรพริกที่เหมาะสมของคู่ผสมกลับข้ามชนิดระหว่างพริก CA758 กับ พริก BC₂F₂ 758x80C₅ (1) (*C. annuum* x *C. baccatum*) ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถสร้างพริกขี้นหนูสายพันธุ์แท้ที่มีความต้านทานต่อโรคแอนแทรคโนส

วิธีการศึกษา

นำเมล็ดพันธุ์พริกลูกผสมกลับข้ามชนิดระหว่าง CA758 กับ BC₂F₂ 758x80C₅ (1) เพาะเมล็ดโดยแช่ในสารละลาย KNO₃ ความเข้มข้น 4% ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1-2 ชั่วโมง และล้างน้ำให้สะอาดก่อนเพาะเมล็ดบนกระดาษเพาะที่ชุ่มน้ำในสภาพมืดและเมื่อเกิดตุ่มรากจึงย้ายเมล็ดเพาะลงพีทมอส เก็บใบเลี้ยงมาสังเกตเอ็นเอตามวิธีการของ Fulton et al. (1995) และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบความเป็นลูกผสมของพริกคู่นี้โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย HpmsE032, GPMS93 และ GPMS159 ด้วยเทคนิค SSRs (Simple Sequence Repeats) จากนั้นจึงย้ายต้นกล้าลงปลูกในกระถางเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้ว และ 12 นิ้ว ตามลำดับสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดดอก อับละของเกสรและระยะการพัฒนามาของไมโครสปอร์ เพื่อใช้เป็นลักษณะบ่งชี้ในการคัดเลือกดอกที่มี

ระยะการพัฒนาของไมโครสปอร์ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับละองเกสรโดยศึกษาระยะการพัฒนาของไมโครสปอร์จากการย้อมด้วยสีDAPI (4'-6-diamidino-2 phenylindole) และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์การเพาะเลี้ยงอับละองเกสรดัดแปลงจากวิธีการของ Dumas de Vaulx et al. (1981) โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงสูตร C medium ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 0.3 และ 0.5 มก./ล. ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. จำนวน 4 สูตร ไม่เติมผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) และ จำนวน 4 สูตร เติมผงถ่านกัมมันต์ อัตรา 0.25 ก./ล. รวมทั้งสิ้น 8 สูตร ในอาหารทุกสูตรใช้ saccharose 30 ก./ล. pH 5.8 ใช้น้ำ 7 ก./ล. เมื่อสังเกตเห็นการพัฒนาของเอ็มบริโอบนอับละองเกสรจึงทำการย้ายเอ็มบริโอมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร R medium ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อการพัฒนาเป็นต้นอ่อนต่อไป บันทึกผลประสิทธิภาพการเกิดต้นจากจำนวนต้นทั้งหมดที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละองเกสรต่อจำนวนอับละองเกสรทั้งหมดที่เพาะเลี้ยง ต้นฟริกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละองเกสรทั้งหมดนำมาตรวจสอบความเป็นสายพันธุ์แท้และจำนวนชุดโครโมโซม โดยการเก็บใบอ่อนในสภาพ *Win vitro* มาทำการสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบด้วยเทคนิค SSRs และตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมด้วยเครื่อง Flow cytometer รุ่น PARTEC PA II

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การศึกษาระยะการพัฒนาของไมโครสปอร์

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดดอกอับละองเกสร และระยะการพัฒนาของไมโครสปอร์พบว่า ดอกฟริกที่มีการพัฒนาของไมโครสปอร์ในระยะ late-uninucleate เป็นส่วนมากกับ binucleate บางส่วนนั้น มีความสัมพันธ์กับลักษณะดอกที่มีกลีบดอกยาวพันกลีบเลี้ยงประมาณ 1/2 ของความยาวดอกและอับละองเกสรมีสีม่วงอ่อนประมาณ 3/4 ของอับละองเกสรและมีสีเขียวอ่อนประมาณ 1/4 ของ

อับละองเกสร ซึ่งเป็นระยะที่มีการพัฒนาของไมโครสปอร์เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงอับละองเกสร (Figure 1; A,B) ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดดอกอับละองเกสร และระยะการพัฒนาของไมโครสปอร์ของฟริกแต่ละชนิดมักจะแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์และชนิด จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาเพื่อหาระยะดอกที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและใช้เป็นข้อบ่งชี้ที่ดีในการกำหนดระยะการพัฒนาของไมโครสปอร์ (Sibi et al., 1979; Irikova et al., 2011) ซึ่ง Kim et al. (2004) รายงานว่าระยะของไมโครสปอร์ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับละองเกสรของฟริกคือระยะ late-uninucleate

การเพาะเลี้ยงอับละองเกสร

จากการเพาะเลี้ยงอับละองเกสรของฟริกกลุ่มผสมกลับข้ามชนิด CA758 x BC₂F₃758x80C₅(1)(Table 1) พบว่า สูตรอาหารชักนำซึ่งเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มก./ล.ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. มีประสิทธิภาพการเกิดต้นสูงสุด คือ 1.05% รองลงมาคือสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.3, 0.1, และ 0.01 มก./ล. ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. ทั้ง 3 สูตร พบอัตราการเกิดต้นเท่ากับ 0.53, 0.43 และ 0.22 % ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าอัตราการเกิดต้นเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เพิ่มขึ้นตามลำดับ ขณะที่สูตรอาหารชักนำที่เติมผงถ่านกัมมันต์ทั้ง 4 สูตร มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดต้น 0-0.2% เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการเกิดต้นของฟริกบนอาหารชักนำที่เติมและไม่เติมผงถ่านกัมมันต์ซึ่งเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตปริมาณที่เท่ากันทุกสูตร พบว่า สูตรอาหารที่ไม่เติมผงถ่านกัมมันต์มีประสิทธิภาพการเกิดต้นที่ดีกว่าในการเพาะเลี้ยงอับละองเกสรของฟริกกลุ่มผสมกลับข้ามชนิด CA758 x BC₂F₃758x80C₅(1) นี้ แสดงว่าการทดลองนี้การใส่ผงถ่านกัมมันต์ในอาหารชักนำไม่ส่งเสริมการเกิดต้นในฟริกกลุ่มผสมนี้อาจเนื่องมาจากผงถ่านกัมมันต์สามารถดูดซับสารเคมีต่างๆและสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะสาร

2,4-D ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพการเกิดต้น นอกจากนี้พันธุกรรมของพริกเองก็น่าจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่ออาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้แตกต่างจากรายงานของ Supena et al. (2006) ที่พบว่าการเติมผงถ่านกัมมันต์ในอาหารเพาะเลี้ยงช่วยส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอ Johansson

(1983) ได้เคยรายงานว่าผงถ่านกัมมันต์จะช่วยดูดซับสารฟีนอล abscisic acid และสารต่างๆที่ปลดปล่อยออกมาจากเนื้อเยื่ออับละอองเกสรซึ่งยับยั้งการพัฒนาของคัพภะ รวมทั้งดูดซับสาร FeEDTA, pyridoxine, biotin, thiamine, folic acid, nicotine acid และ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่อยู่ในอาหาร

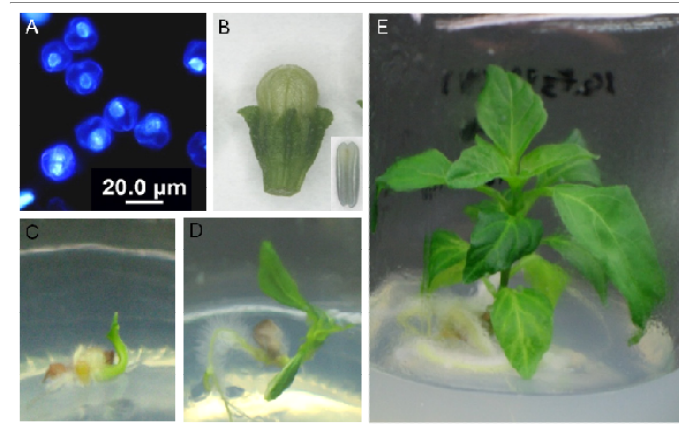


Figure 1 Anther culture in pepper between CA758 and BC₂F₃758x80C₅(1). **A.** Microspore development at late uninucleate. **B.** Pepper bud at the optimal stage for anther culture. **C,D.** Embryos emerging from the anthers showing roots and shoots. **E.** DH plantlets *in vitro* for transplanting.

Table1 Efficiency of induction medium for plant regeneration in anther culture of inter-specific pepper between CA758 and BC₂F₃758x80C₅(1)

Induction medium	No. of cultured anthers	No. of regenerated plantlets				No. of plantlets per 100 cultured anther			
		H	DH	M	Total	H	DH	M	Total
C0.01	907	1	1	0	2	0.11	0.11	0.00	0.22
C0.01+AC	1,005	1	0	0	1	0.10	0.00	0.00	0.10
C0.1	929	1	3	0	4	0.11	0.32	0.00	0.43
C0.1+AC	622	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
C0.3	1,501	4	4	0	8	0.27	0.27	0.00	0.53
C0.3+AC	922	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
C0.5	1,339	6	7	1	14	0.45	0.52	0.07	1.05
C0.5+AC	1,019	0	2	0	2	0.00	0.20	0.00	0.20
	8,244	13	17	1	31	0.16	0.21	0.01	0.38

H- haploid; DH- double haploid; M- mixoploid; AC- activated charcoal; C- C medium supplement with 2,4-D concentration (mg/l)

ความแตกต่างของประสิทธิภาพการเกิดเอ็มบริโอ และต้นจากอับละอองเกสร (androgenesis) ขึ้นกับปัจจัยหลายประการ แต่ปัจจัยด้านพันธุกรรมของพืช นับว่ามีความสำคัญที่สุด รองมาคือสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง สำหรับการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของพริก *C. annuum* มีรายงานว่า เป็นชนิดที่มีประสิทธิภาพการเกิดต้นได้ดีที่สุด โดยพบว่าจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรพริกลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพริก '83-168' และ 'PEPAC25' (*C. annuum*) มีประสิทธิภาพการเกิดต้นสูงสุด 9.5 % (พรพนธ์ และ จุลภาค, 2553) สำหรับรายงานการศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของลูกผสมข้ามชนิด (inter-specific hybrid) โดย Nowaczyk et al. (2009) พบว่าพริกลูกผสมรุ่น F_2 ของ *C. frutescens* x *C. annuum* และ *C. frutescens* x *C. chinense* นั้นพบประสิทธิภาพการเกิดต้นเพียง 0.19 และ 0.49 % ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในครั้งนี้ จะเห็นว่าได้ว่าพริกลูกผสมกลับข้ามชนิดระหว่าง *C. annuum* กับ *C. baccatum* นั้น มีประสิทธิภาพการเกิดต้นบนอาหาร

ที่เหมาะสมสูงสุด 1.05 % และมีค่าเฉลี่ยของการเกิดต้นเท่ากับ 0.38 % จะเห็นได้ว่าการเกิดต้นของการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของพริกลูกผสมข้ามชนิด (inter-specific hybrid) นั้น มีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำเช่นกัน การศึกษาครั้งนี้ต้นพ่อแม่ที่เป็นแหล่งของยีนต้านทานโรคแอนแทรคโนส คือ $BC_2F_3 758 \times 80C_5(1)$ ซึ่งผ่านการคัดเลือกลักษณะความต้านทานโรคมานหลายรุ่น ดังนั้นอาจจะไม่ต้องผลิตต้นดับเบิลแฮพลอยด์จำนวนมาก สำหรับการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรค นอกจากนี้พริกที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงผ่านการผสมกลับและผสมตัวเองจนรุ่น F_2 นั้น อาจจะเป็นแหล่งพันธุกรรมที่ดีในการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีรายงานว่า ต้นดับเบิลแฮพลอยด์ที่ผลิตจากต้นแม่ลูกผสมรุ่น F_2 มีประสิทธิภาพการรวมตัวของยีนที่ดีกว่าต้นดับเบิลแฮพลอยด์ที่ผลิตจากต้นแม่ลูกผสมรุ่น F_1 ซึ่งทำให้โอกาสได้ต้นที่ผ่านการคัดเลือกมากขึ้นเนื่องจากการเพิ่มจำนวนของ recombinant จากการผสมตัวเองเพื่อสร้าง inbred line ในข้าวโพด (Bernardo, 2009) และพริก (Nowaczyk et al., 2009)

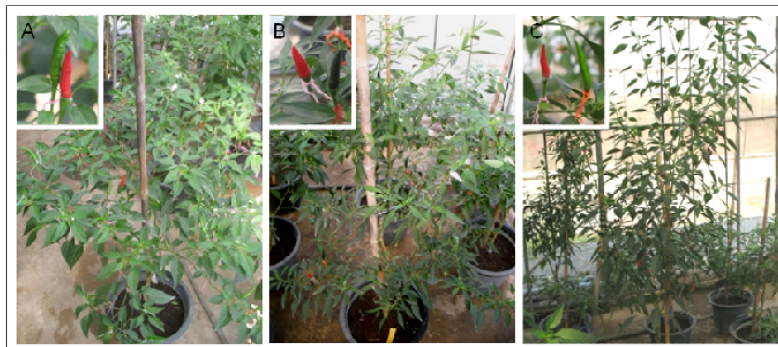


Figure 2 Double haploid lines were grown in greenhouse for seed production. A, B, C Growth and development of double haploid lines were differed in character and color in immature fruit

Table 2 The effectiveness of individual parent from $BC_2F_3 758 \times 80C_5(1)$ plants in anther culture

Plant no.	No. of cultured anthers	No. of plantlets		% of plantlets		Ratio
		H	DH	%H	%DH	H:DH
1	2,555	6	12	0.23	0.47	1:2
4	1,465	3	3	0.20	0.20	1:1
6	1,741	3	1	0.17	0.06	3:1
7	2,483	1	1	0.04	0.04	1:1
	8,244	13	17	0.16	0.21	1:1.3

H- haploid; DH- doubled haploid; M- mixoploid

การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของพริกลูกผสมกลับข้ามชนิด CA758 x BC₂F₃758x80C₅(1) จำนวน 8,244 อับละอองเกสร สามารถชักนำการเกิดต้นได้ 31 ต้น และเมื่อตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ร่วมกับตรวจสอบความเป็นสายพันธุ์แท้ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย SSRs (Table 1) พบต้นแฮพลอยด์ 13 ต้น ต้นดับเบิลแฮพลอยด์ 17 ต้น และต้นมิคโซพลอยด์ 1 ต้น หรือมีสัดส่วนการเกิดต้นแฮพลอยด์ต่อต้นดับเบิลแฮพลอยด์ (H:DH) โดยภาพรวมเท่ากับ 1: 1.3 โดยต้นดับเบิลแฮพลอยด์ที่ได้ทั้งหมดเกิดขึ้นเองในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ทำการศึกษาด้านพริกประเภท spontaneous doubled haploid ซึ่งเมื่อนำออกปลูกสามารถเจริญเติบโตได้ดี ตลอดจนลดขั้นตอนการปฏิบัติงานเพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของต้นแฮพลอยด์ที่มีโครโมโซมชุดเดียวให้มีจำนวนเป็นสองชุดด้วยสารเคมีทำให้ประหยัดเวลาและทรัพยากรในสร้างต้นดับเบิลแฮพลอยด์ สำหรับต้นดับเบิลแฮพลอยด์ที่ผลิตได้นี้ได้ย้ายออกปลูกเพื่อเก็บเมล็ดพันธุ์พบว่าแต่ละต้นมีความแตกต่างกันทั้งลักษณะการเจริญเติบโตของทรงต้น ใบ ดอก และผลซึ่งมีความแตกต่างทั้งรูปทรง และสีผลเมื่อยังไม่สุกแก่ (Figure 2) และเมื่อพิจารณาอัตราการเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรที่มาจากกลุ่มผสมซึ่งเกิดจากสายพันธุ์พ่อแม่ยกต้น พบว่า ต้นที่ 1 มีการเกิดต้นสูงสุดเท่ากับ 0.70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประกอบด้วยต้นแฮพลอยด์และดับเบิลแฮพลอยด์เท่ากับ 0.23 และ 0.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หรือในสัดส่วน 1:2 (H: DH) และพบการเกิดต้นจากทุกกลุ่มผสมที่ทำการเพาะเลี้ยง แสดงว่าพันธุกรรมของพริกแต่ละต้นมีอิทธิพลต่อการชักนำการเกิดต้นของพริกกลุ่มผสมกลับข้ามชนิดระหว่างพริก CA758 x BC₂F₃758x80C₅(1) (Table 2)

สรุป

การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของพริกลูกผสมกลับข้ามชนิด CA758 x BC₂F₃758x80C₅(1) สามารถชักนำการเกิดต้นพริกได้โดยตรง (direct embryogen-

esis) และพบว่าอาหารชักนำที่เดิมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4-D ความเข้มข้น 0.5 มก./ล.ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. มีแนวโน้มในการชักนำให้เกิดต้นได้ดีที่สุด คือ 1.05 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบความเป็นสายพันธุ์แท้ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด SSRs และตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ พบว่ามีจำนวนต้นแฮพลอยด์และดับเบิลแฮพลอยด์ (H:DH) ในสัดส่วน 1:1.3 ซึ่งต้นพริกดับเบิลแฮพลอยด์ทุกต้นเกิดจากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นเองในสภาพเพาะเลี้ยงหรือ spontaneous double haploid lines

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรสำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ ที่สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณ ผศ.ดร.เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ และ ดร.สิริกุล วะสี ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์พริกเพื่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี. 2549. การช่วยชีวิตคัพภะลูกผสมข้ามชนิดของพริก. รายงานการวิจัยพัฒนาและวิศวกรรม ฉบับสมบูรณ์ ประจำปี 2549. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
- เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี. 2551. การศึกษาความสามารถในการผสมและการต้านทานโรคแอนแทรคโนสของลูกผสมพริกข้ามชนิด. รายงานการวิจัยพัฒนาและวิศวกรรม ฉบับสมบูรณ์ ประจำปี 2551. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

- พรพนัช มีกุล และจุลภาค คูนวงศ์. 2553. การสร้างและตรวจสอบสายพันธุ์แท้ของพริกลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพริกพันธุ์ '83-168' และ 'PEPAC25' โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร. ว.วิทย์. 41(2):203-212.
- Bernardo, R. 2009. Should maize doubled haploids be induced among F_1 or F_2 plants?. Theor. Appl. Genet. 119:255-262.
- Dumas de Vault, R., 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 trgtiement 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 Mol. Biol. Rep.13 (3):207-209.
- Germanà, M. A. 2011. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. Plant Cell Rep. 30:839-857.
- Irikova, T., S. Grozeva, and V. Rodeva. 2011. Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) in vitro. Acta Physiol Plant 33:1559-1570.
- Johansson, L. 1983. Effects of activated charcoal in anther cultures. Physiol. Plant 59:397-403.
- Kim, M., J. Kim, M. Yoon, D.I. Choi, and K.M. Lee. 2004. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 77:63-72.
- Nowaczyk, P., D. Olszewska, and A. Kisiala. 2009. Individual reaction of *Capsicum* F_2 hybrid genotypes in anther cultures. Euphytica 168:225-233.
- Sibi, M., R. Dumas de Vault, and D. Chambonnet. 1979. Obtention de plantes haploïdes par androgenèse in vitro chez le Piment (*Capsicum annuum* L.). Ann. Amélior Plantes 29:583-606.
- Supena, E.D.J., S. Suharsono, E. Jacobsen, and J.B.M. Custers. 2006. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Rep. 25:1-10.