การชักนำต้นแฮพลอยด์และดับเบิลแฮพลอยด์ของแตงกวาลูกผสมด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงรังไข่

อัญชลี รวีโรจน์วิบูลย์[1] สมบูรณ์ บุญปรีชา[1] และ จุลภาค คุ้นวงศ์[2,3]
ANCHALEE RAWEEROTWIBOON[1] SOMBOON BUNPREECHA[1] AND JULAPARK CHUNWONGSE[2,3]
[1] ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนา กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140
[2] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140
[3] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

บทนำ

การสร้างแตงกวาสายพันธุ์แท้เพื่อผลิตลูกผสม จำเป็นต้องใช้เวลานานและทรัพยากรจำนวนมากในการผลิตเนื่องจากแตงกวาเป็นพืชผสมข้าม การประยุกต์ใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสร้างต้นแฮพลอยด์ (haploid) และดับเบิลแฮพลอยด์ (double haploid) เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถใช้สร้างแตงกวาสายพันธุ์แท้ได้ในระยะเวลาอันสั้น นับว่าเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการปรับปรุงสายพันธุ์แตงกวาและการศึกษาตำแหน่งของยีน

การสร้างต้นแฮพลอยด์และดับเบิลแฮพลอยด์ของแตงกวาโดยวิธีการเพาะเลี้ยงรังไข่ (ovary culture) รายงานครั้งแรกโดย Gémes-Juhász และคณะ (2002) ซึ่งพบว่ามีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาเป็นต้นได้แก่ พันธุกรรมของพืช อุณหภูมิและช่วงเวลาในการบ่มเพาะ องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง และ ระยะการพัฒนาของดอกเพศเมียที่เหมาะสม (Gémes-Juhász และคณะ, 2002; Diao และคณะ, 2009)

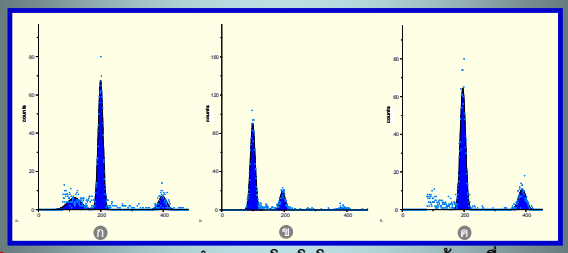
อุปกรณ์และวิธีการ

แตงกวาลูกผสม (F_1) สองสายพันธุ์ คือ DMSCh04 และ Ch04DMS ปลูกในกระถางที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้วภายใต้สภาพโรงเรือนพลาสติก ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ระหว่างเดือนพฤษภาคม - กันยายน 2551

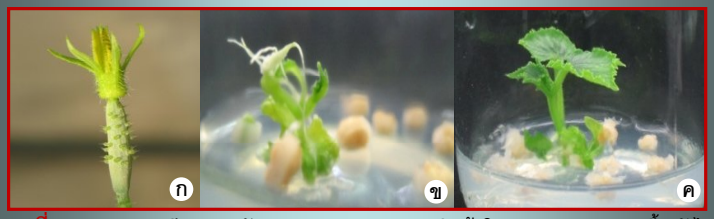
การเพาะเลี้ยงรังไข่ของแตงกวา ได้ทำการศึกษาหาระยะการพัฒนาของรังไข่ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 ระยะ คือ ระยะ 1 วันก่อนดอกบาน และระยะวันดอกบานร่วมกับการบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 28 หรือ 35 องศาเซลเซียส ช่วงเวลา 1 - 5 วัน การเพาะเลี้ยงรังไข่ตามวิธีการของ Gémes-Juhász และคณะ (2002) ต้นแตงกวาที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงรังไข่นำมาตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (Flow cytometer) และความเป็นสายพันธุ์แท้ด้วยการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SSRs (Simple Sequence Repeats) เพื่อจำแนกความแตกต่างระหว่างต้นแฮพลอยด์ ดับเบิลแฮพลอยด์ ออกจากต้นที่พัฒนาจากเซลล์ร่างกาย (Somatic cells) ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย

ผลและวิจารณ์

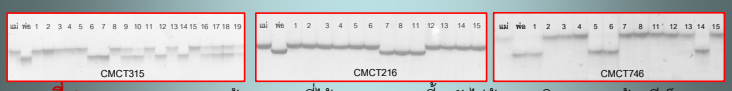
จากการศึกษาหาระยะการพัฒนาของดอกเพศเมียที่เหมาะสมร่วมกับการบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 28 หรือ 35 องศาเซลเซียส พบว่า ที่ ระยะ1 วันก่อนดอกบาน รังไข่มีการตอบสนองต่ออาหารเพาะเลี้ยงได้ดีและพัฒนาเป็นต้นได้ ขณะที่ดอกเพศเมียในระยะดอกบานไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ ในแตงกวาลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงรังไข่ และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มเพาะ คือ 35 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน การเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาลูกผสมสายพันธุ์DMSCh04 มีการเกิดต้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ และได้ต้นแตงกวาเมื่อตรวจด้วยเครื่อง Flow cytometer พบว่ามีโครโมโซม1 ชุด เป็นต้นแฮพลอยด์ สำหรับแตงกวาลูกผสมสายพันธุ์ Ch04DMS นั้นมีการเกิดต้น 2.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบต้นที่มีโครโมโซม 2 ชุด และเมื่อตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย พบว่าเป็นต้นดับเบิลแฮพลอยด์ โดยตรง หรือ spontaneous double haploid plant



ภาพที่ 3 แสดงผลการตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมของแตงกวาด้วยเครื่อง flow cytometer ก) จำนวนโครโมโซม 2 ชุด จากต้นควบคุม (control) ข) จำนวนโครโมโซม 1 ชุด จากต้นแฮพลอยด์ ค) แสดงจำนวนโครโมโซม 2 ชุด จากต้นดับเบิลแฮพลอยด์



ภาพที่ 1 ก)ดอกเพศเมียอายุ 1 วันก่อนดอกบาน ข,ค)การเกิดต้นโดยตรงจากการเพาะเลี้ยงรังไข่



ภาพที่ 2 แสดงการตรวจสอบต้นแตงกวาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ด้วยเทคนิค SSRs: ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย CMCT 315 CMCT 216 และ CMCT746

สรุป

วิธีการเพาะเลี้ยงรังไข่ ดอกเพศเมียอายุ 1 วันก่อนดอกบาน ร่วมกับการบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน สามารถชักนำการเกิดต้นแฮแพลอยด์และดับเบิลแฮพลอยด์ได้ในแตงกวาลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์ คือ DMSCh04 และ Ch04DMS โดยมีอัตราการเกิดต้น 2.5 และ 2.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

Diao, W.-P., Y.-Y. Jia, H. Song, X.-Q. Zhang, Q.-F. Lou and J.-F. Chen. 2009. Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers. Scientia Horticulturae.119(3): 246-251.

Gémes-Juhász A., P. Balogh and A. Ferenezy. 2002. Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on *in vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Cell Rep. 21:105 -111.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้