สำนักงานบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ระดับการประเมินคุณภาพ
☐ ดีเยี่ยม ☑ ดีมาก
☐ ดี ☐ ปานกลาง

การเลี้ยงต้นแฮพลอยด์จากออวุลของแตงกวา

สิริรักษ์ สำเภาแก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน
สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน

ชื่อเรื่อง

การเลี้ยงต้นแฮพลอยด์จากออวุลของแตงกวา

โดย

สิริรักษ์ สำเภาแก้ว

พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชลิต พงศ์ศุภสมิทธิ์)

วันที่ 1 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2553

กรรมการที่ปรึกษา .....

(อาจารย์ ดร.พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์)

วันที่ 1 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2553

กรรมการที่ปรึกษา .....

(รองศาสตราจารย์ ดร.นลินี รุ่งเรืองศรี)

วันที่ 1 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2553

ประธานกรรมการหลักสูตร .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรนุช เจริญกิจ)

วันที่ 1 เดือน ธค. พ.ศ. 2553

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จำเนียร ยศราช)

ประธานกรรมการบัณฑิตศึกษา

วันที่ 7 เดือน ธ.ค. พ.ศ. 2553

ชื่อเรื่อง การเลี้ยงต้นแฮพลอยด์จากออวุลของแตงกวา
ชื่อผู้เขียน นางสาวสิริรักษ์ สำเภาแก้ว
ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน
ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชลิต พงศ์ศุภสมิทธิ์

บทคัดย่อ

การผลิตพืชแฮพลอยด์โดยใช้วิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อออวุลเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับมานานและมีความสำคัญต่อการผลิดพืชแฮพลอยด์ เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาด้านพันธุ-ศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืช จากการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการพัฒนาไปเป็นต้นของออวุลที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์จากการเลี้ยงดอกเพศเมียก่อนบาน 1 วันของแตงกวาจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ NJ2 และแดงร้าน พบว่าพันธุ์ที่ตอบสนองต่อการเลี้ยงดีที่สุดคือ พันธุ์ NJ2 โดยมีความถี่ของเกิดเอ็มบริโอได้สูงสุดร้อยละ 6.90 สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของออวุลแตงกวาคืออาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสและย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม BAP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอจีนิกระยะ globular และเมื่อย้ายแคลลัสลงบนอาหารสูตร CBM (regeneration medium) ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเอ็มบริโอจีนิกแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นรากและพัฒนาเป็นระยะ heart-shape เมื่อย้ายลงบนอาหารสูตร CBM (regeneration medium) พบว่าชิ้นส่วนสามารถเปลี่ยนแปลง (differentiation) ไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้หลังการเลี้ยงนาน 1 สัปดาห์ การศึกษาด้านเซลล์วิทยาพบความผิดปกติของจำนวนโครโมโซม การตรวจนับจำนวนโครโมโซมในรากโดยใช้เทคนิค squash พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=14, 2n=7 และ polyploidy วิธีการหยดโปรโตพลาสต์แคลลัสมีจำนวนโครโมโซมแบบ mixoploid (2n=28, 2n=14 และ 2n=7) และต้นอ่อนมีจำนวนโครโมโซม 2n=14 และ 2n=7 การตรวจด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (flow cytometer) พบว่ายอดและรากมีจำนวนโครโมโซม 1, 2 และ 4 ชุด และแคลลัสมีจำนวนโครโมโซมแบบ aneuploid และ mixoploid

Title Induction of haploid plants from ovule cultures of cucumber (*Cucumis sativus* L.)

Author Miss Sirirak Sampaokaew

Degree of Master of Science in Horticulture

Advisory Committee Chairperson Assistant Professor Chalit Pongsupasamit

ABSTRACT

Haploid plant production using *in vitro* ovule cultures has long been recognized as an important tool for genetic studies and plant improvement. Factors affecting *in vitro* gynogenesis of female flowers obtained one day before anthesis of two cucumber varieties 'NJ2' and 'Tangran', were studied. It was found that unpollinated ovules of 'NJ2' gave the highest embryo formation frequency (6.90%) while the most suitable medium for the highest callus induction was the supplementation of 2.0 mg/l of 2,4-D and 1.0 mg/l of kinetin. Subculture of calli on MS medium supplemented with 2.0 mg/l of BAP led to differentiation of embryoids into globular structures, which later developed into heart-shaped stage and into roots after transfer to CBM regeneration medium supplemented with 0.05 mg/l of NAA and 0.2 mg/l BAP. Plantlets were obtained when embryoids were subsequently subcultured on growth regulator-free CBM regeneration medium for seven days. Chromosomal studies showed some numerical aberrations. Root-tip squash preparations showed diploid (2n=14), haploid (n=7) and polyploidy cells. Results from protoplast dropping technique on calli also showed mixoploidy of 4n, 2n and n while in plantlets, chromosome numbers of 14 and 7 were found. Flow cytometry analysis of root and shoot tissue gave haploid, diploid and tetraploid chromosome numbers whereas calli showed an aneuploid - mixoploid profile.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาอย่างดียิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ชลิต พงศ์ศุภสมิทธิ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.นลินี รุ่งเรืองศรี กรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ตลอดจนช่วยตรวจสอบ แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดีตลอดมา ผู้เขียนขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ คำแนะนำและกำลังใจตลอดระยะเวลาของการศึกษา สุดท้ายขอขอบพระคุณครอบครัว เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ที่เป็นกำลังใจ

ขอบคุณความไม่รู้ ที่ทำให้รู้วิธีลุกขึ้นสู้
ขอบคุณความล้มเหลว ที่ทำให้เกิดความเชี่ยวชาญ
ขอบคุณความผิดพลาด ที่ทำให้ฉลาดยิ่งกว่าเดิม
ขอบคุณคำวิพากษ์วิจารณ์ ที่ทำให้ผลิบานอย่างไร้ข้อตำหนิ
ขอบคุณความผิดหวัง ที่ทำให้ตั้งสติเพื่อลุกขึ้นมาใหม่
ขอบคุณความทุกข์ที่ ทำให้เรารู้ว่าความสุขมีค่าแค่ไหน
(ว วชิรเมธี)

สิริรักษ์ สำเภาแก้ว
ธันวาคม 2553

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
สารบัญตาราง	(8)
สารบัญภาพ	(10)
สารบัญตารางผนวก	(11)
สารบัญภาพผนวก	(12)
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
ลักษณะทั่วไปของแตงกวา	3
การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย	5
การเปลี่ยนแปลงโครโมโซมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์	6
พืชแฮพลอยด์ (haploid plants)	7
แตงกวาลูกผสม	11
การผลิตพืชแฮพลอยด์โดยกระบวนการเกิดแบบ Gynogenesis	13
ปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงพืชแฮพลอยด์	16
การพัฒนาไปเป็นต้นของกระบวนการเกิดแบบ Gynogenesis	24
ระดับชุดของโครโมโซม (ploidy level)	27
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	29
วัสดุอุปกรณ์	31
เวลาและสถานที่ทำการทดลอง	32
วิธีการทดลอง	

หน้า

บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 45
การทดลองที่ 1 การศึกษาสายพันธุ์แตงกวาที่มีผลต่อการเจริญเติบโต
ของออวุลแตงกวา 45
การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต
ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของออวุลแตงกวา 46
การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต
ที่มีผลต่อการพัฒนาของออวุลแตงกวา 57
การทดลองที่ 4 การศึกษาด้านเซลล์วิทยา 61
วิจารณ์ผลการทดลอง 68
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 81
สรุป 81
ข้อเสนอแนะ 82
บรรณานุกรม 83
ภาคผนวก 96
ภาคผนวก ก ปริมาณสารเคมีและผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ 97
ภาคผนวก ข ประวัติผู้วิจัย 107

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	แสดงระดับความเข้มข้นของ 2,4-D และ kinetin ที่เติมลงในอาหารแข็งสูตร MS เพื่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของออวุลแตงกวา	34
2	แสดงระดับความเข้มข้นของ 2,4-D และ kinetin ที่เติมลงในอาหารแข็งสูตร CBM เพื่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของออวุลแตงกวา	35
3	แสดงระดับความเข้มข้นของ NAA และ BAP ที่เติมลงในอาหารแข็งสูตร MS เพื่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของออวุลแตงกวา	36
4	แสดงระดับความเข้มข้นของ TDZ ร่วมกับการเติมถ่าน/ไม่เติมถ่านกัมมันต์ ในอาหารแข็งสูตร MS เพื่อการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอของออวุลแตงกวา	37
5	แสดงระดับความเข้มข้นของ NAA ร่วมกับ BAP หรือ kinetin เพื่อการพัฒนาของแคลลัสออวุลแตงกวา	38
6	เปอร์เซ็นต์ความถี่ของการเกิดเอ็มบริโอของออวุลแตงกวาสองสายพันธุ์	46
7	ผลของสูตรอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D และ/หรือ kinetin ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของออวุลแตงกวา	47
8	ผลของสูตรอาหาร CBM ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D และ/หรือ kinetin ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของออวุลแตงกวา	50
9	ผลของสูตรอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA และ/หรือ BAP ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของออวุลแตงกวา	53
10	ผลของสูตรอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม TDZ ร่วมกับการเติม/ไม่เติมถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) ต่อการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอของออวุลแตงกวา	56
11	ผลของสูตรอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA และ/หรือ BAP ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของออวุลแตงกวา	58

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	ดอกตัวเมียและส่วนประกอบต่าง ๆ ของดอกเพศเมียแตงกวา	4
2	รูปแบบการพัฒนาไปเป็นต้นของรังไข่หรือออวุลที่เลี้ยงเนื้อเยื่อ	26
3	พืชที่ใช้ในการทดลอง	31
4	การเกิดเอ็มบริโอของออวุลแตงกวาทั้งสองสายพันธุ์	46
5	แคลลัสที่เกิดจากการเลี้ยงออวุลของแตงกวาบนอาหารสูตรMS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	48
6	การตอบสนองของออวุลแตงกวาที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	49
7	ขนาดแคลลัสเฉลี่ยของออวุลแตงกวาที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	49
8	แคลลัสที่เกิดจากการเลี้ยงออวุลของแตงกวาบนอาหารสูตร CBM ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	51
9	การตอบสนองของออวุลแตงกวาที่เลี้ยงบนอาหารสูตร CBM ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	52
10	ขนาดแคลลัสเฉลี่ยของออวุลแตงกวาที่เลี้ยงบนอาหารสูตร CBM ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	52
11	แคลลัสที่เกิดจากการเลี้ยงออวุลของแตงกวาบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ร่วมกับ BAP ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	54
12	การตอบสนองของออวุลแตงกวาที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ร่วมกับ BAP ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	55
13	ขนาดแคลลัสเฉลี่ยของออวุลแตงกวาที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ร่วมกับ BAP ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	55
14	การชักนำให้เกิดเอ็มบริโอที่เกิดจากการเลี้ยงออวุลของแตงกวาบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม TDZ ร่วมกับการเติม/ไม่เติมถ่านกัมมันต์	57
15	ความถี่ของจำนวนเอ็มบริโอของออวุลแตงกวาที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม TDZ ร่วมกับการเติม/ไม่เติมถ่านกัมมันต์	57

ภาพ		หน้า
16	แคลลัสบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ร่วมกับ BAP หรือ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	59
17	ขนาดแคลลัสเฉลี่ยของออวุลแตงกวาที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ร่วมกับ BAP ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	59
18	การเจริญพัฒนาของแคลลัสไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์	61
19	จำนวนชุดโครโมโซมด้วยวิธีการตรวจนับจำนวนโครโมโซมในราก โดยใช้เทคนิค Accto-orcein squash	62
20	โครโมโซมของแคลลัสแตงกวาโดยการหยดโปรโตพลาสต์	64
21	โครโมโซมของต้นอ่อนแตงกวาโดยการหยดโปรโตพลาสต์	66
22	การตรวจสอบด้วยวิธีการโฟล ไซโตมิทรี (flow cytometry)	67

สารบัญตารางผนวก

ตารางผนวก		หน้า
1	แสดงปริมาณสารเคมีในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตรต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเลี้ยงออวุลของแตงกวา	98
2	วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติเปอร์เซ็นต์ความถี่การเกิดเอ็มบริโอ ของแตงกวาสองสายพันธุ์	99
3	วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของออวุลแตงกวา บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	100
4	วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติขนาดแคลลัสเฉลี่ยของออวุลแตงกวา บนอาหารสูตรMS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	100
5	วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติเปอร์เซ็นต์การตอบสนองของออวุลแตงกวา บนอาหารสูตร CBM (induction medium) ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	101
6	วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติขนาดแคลลัสของออวุลแตงกวา บนอาหารสูตร CBM (induction medium) ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	101
7	วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของออวุลแตงกวา บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ร่วมกับ BAP ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	102
8	วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติขนาดแคลลัสของออวุลแตงกวา บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ร่วมกับ BAP ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	102
9	วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติการเกิดเอ็มบริโอของออวุลแตงกวา บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม TDZ ร่วมกับการเติม/ไม่เติมถ่านกัมมันต์	103
10	วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติขนาดแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง โดยเติม NAA ร่วมกับ BAP หรือ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	103

สารบัญภาพผนวก

ภาพผนวก		หน้า
1	แสดงรายละเอียดและกลไกการทำงานของเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์	105
2	เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ รุ่น PAII (บริษัท Partec ประเทศเยอรมัน) ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน	106

บทที่ 1
บทนำ

แตงกวาเป็นพืชผสมข้าม (open-pollinated crop) ที่มีดอกเพศผู้และดอกเพศเมียแยกกันอยู่แต่อยู่บนต้นเดียวกัน (monoecious) การผสมเกสรจำเป็นต้องใช้แมลงเพื่อช่วยในการผสมเกสร ดังนั้นการผลิตสายพันธุ์ของแตงกวาจะต้องใช้แรงงานคนในการป้องกันโดยวิธีการคลุมตอกและช่วยผสมเกสร โดยเฉพาะการผลิตสายพันธุ์แท้ (pure line) ที่นำมาใช้ประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์ ในการสร้างสายพันธุ์แตงกวาลูกผสม (F_1 hybrid) พันธุ์ลูกผสมที่ได้มีข้อดีหลายอย่างเช่น ให้ผลผลิตสูง มีลักษณะบางอย่างที่ดีเด่นและมีความสม่ำเสมอในลักษณะต่าง ๆ การสร้างแตงกวาลูกผสมนั้นเกิดจากการผสมระหว่างสายพันธุ์แท้ตั้งแต่ 2-4 สายพันธุ์ เพื่อใช้ประโยชน์จากความดีเด่น (heterosis) ของลูกผสม

ปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพได้เข้ามามีบทบาทในการศึกษาวิจัยและการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่นการพัฒนาเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการผลิตต้นแฮพลอยด์ (haploid plant) เพื่อการผลิตพืชสายพันธุ์แท้ (homozygous line) (Evans *et al.* (2003 cited by Shalaby, 2007)) การสร้างสายพันธุ์แท้โดยวิธีธรรมชาติ (conventional) จะต้องทำการผสมตัวเองหลายชั่วเพื่อให้ยีนทุกคู่อยู่ในสภาพ homozygous ที่สูงเพียงพอซึ่งต้องใช้เวลานาน ซึ่งในกรณีของแตงกวานั้นต้องใช้เวลา 6-8 ปี (Gémes-Juhász *et al.*, 2002) อีกวิธีการหนึ่งคือการเลี้ยงรังไข่และออวุล (ovaries and ovule culture) ที่ยังไม่ได้รับการผสม วิธีการดังกล่าวจะช่วยลดระยะเวลาในการสร้างสายพันธุ์แท้ให้เหลือเพียง 1 ชั่ว การนำพืชแฮพลอยด์ไปเพิ่มโครโมโซมอีก 1 เท่า จะได้พืชที่เป็น homozygous diploid หากไม่มีการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติเกิดขึ้น พืชที่เป็น double haploid ที่ได้นี้จะมีระดับของ homozygosity มากกว่าสายพันธุ์บริสุทธิ์ (inbred line) ที่สร้างจากการผสมตัวเองหลายๆ ชั่ว (นพพร, 2546) เนื่องจากพืชแฮพลอยด์มีประโยชน์อย่างมากในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์และการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพของเทคนิคการเลี้ยงออวุล โดยกระบวนการเกิดแบบ gynogenesis ในสภาพที่ปลอดเชื้อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการผลิตพืชแฮพลอยด์จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อออวุลของแตงกวา
2. เพื่อศึกษาทางด้านเซลล์วิทยาในพืชแฮพลอยด์ของแตงกวา

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อออวุลของแตงกวาตั้งแต่การชักนำให้เกิดแคลลัสตลอดจนการพัฒนาไปเป็นต้นเพื่อการผลิตต้นแตงกวาที่เป็นแฮพลอยด์
2. ศึกษาด้านเซลล์วิทยาจากแคลลัสและต้นที่ได้จากการเลี้ยงออวุลแตงกวา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถผลิตแตงกวาแฮพลอยด์จากการเลี้ยงออวุลเพื่อสร้างแตงกวาสายพันธุ์แท้ (homozygous lines)
2. เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาทางพันธุศาสตร์และเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์พืชตระกูลแตงและพืชตระกูลอื่น ๆ

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ลักษณะทั่วไปของแตงกวา

แตงกวา (cucumber) มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายทั่วทุกภาคของประเทศและทั่วโลก มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cucumis sativus* L. มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด (diploid) โดยมีจำนวนโครโมโซมทั้งหมด 14 แท่ง (2n = 2x = 14) เป็นพืชฤดูเดียวอยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae (นิพนธ์, 2544) ซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกันกับแตงโม ฟักทอง มะระ น้ำเต้าและบวบ มีอายุตั้งแต่ปลูกจนถึงเก็บเกี่ยวสั้น โดยใช้เวลาเพียง 30-45 วันหลังจากปลูก มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดียหรือเอเชียใต้ มีการบันทึกประวัติการปลูกมานานประมาณ 3,000 ปีมาแล้ว แตงกวาได้แพร่กระจายมาทางตะวันตกมายังเอเชียไมเนอร์ตอนเหนือของทวีปแอฟริกาและทางตอนใต้ของทวีปยุโรป (ปราโมทย์, 2540) แตงกวาเป็นพืชผสมข้ามตามธรรมชาติโดยอาศัยลมและแมลงแต่พบอัตราการผสมตัวเอง 1-47 เปอร์เซ็นต์ โดยธรรมชาติมีดอกเพศผู้และดอกเพศเมียแยกดอกแต่อยู่ภายในต้นเดียวกัน (monoecious plant)

ลักษณะดอกเพศเมียของแตงกวา

ดอกเพศเมียส่วนใหญ่จะเจริญเป็นดอกเดี่ยว บนข้อของเถาใหญ่และเถาแขนง เกิดบริเวณมุมใบหรือข้อมีกลีบเลี้ยงสีเขียว 5 กลีบ กลีบดอกสีเหลือง 5 กลีบ ก้านเกสรเพศเมียอวบสั้น มียอดเกสรแบ่งเป็นสามส่วน รังไข่ปรากฏชัดเจน มีลักษณะกลมยาว 2-5 เซนติเมตร มีปุ่มนูนของหนามและขนชัดเจนในรังไข่มีช่องว่างสามช่อง ต่อมน้ำหวาน (nectary) มีลักษณะเป็นวงแหวนอยู่รอบฐานก้านเกสรเพศเมีย ส่วนของยอดเกสรเพศเมียมี 2-5 แฉก (Heimlich, 1927) (ภาพ 1) ดอกเพศเมียและดอกเพศผู้บานในตอนเช้าและพร้อมรับการผสมเกสร ดอกจะหุบตอนบ่ายภายในวันเดียวกัน การเกิดดอกเพศเมียนั้นขึ้นอยู่กับช่วงแสงและอุณหภูมิกล่าวคือ จะเกิดดอกเพศเมียมากกว่าดอกเพศผู้ในสภาพช่วงแสงสั้นและมีอุณหภูมิกลางคืนต่ำซึ่งตรงกับฤดูหนาวของเมืองไทย

ในปัจจุบันพันธุ์ที่ใช้ปลูกเพื่อการค้า (cultivar) และสายพันธุ์ที่ใช้เป็นพ่อ/แม่สำหรับผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วแรก (F_1 hybrid) จะมีการแสดงออกของตำแหน่งดอกเพศเมียได้ 4 กลุ่มคือ (นิพนธ์, 2544)

1. ดอกเพศเมียเจริญเฉพาะเถาหลัก (gynoecious main vine type)

2. ดอกเพศเมียเจริญในเถาหลักและเถาแขนง (gynoecious main and lateral vine type)

3. ดอกเพศเมียเจริญทั้งเถาหลักและเถาแขนงซึ่งเจริญจากเถาหลักทุกข้อ (quasi-gynoecious main and lateral vine type)

4. ดอกเพศเมียเจริญเฉพาะเถาแขนง (quasi-gynoecious lateral vine type)

นอกจากนี้พันธุ์ที่พัฒนาขึ้นใหม่มีเฉพาะดอกเพศเมียและสามารถติดผลได้โดยไม่มีการผสมเกสร (gynoecious parthenocarpy) แตงกวาจะมีอัตราการผสมข้ามสูง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอาศัยแมลง เช่น ผึ้งช่วยในการผสมเกสร ในแคนาดา จะใช้ผึ้งหนึ่งรังต่อแตงกวา 50,000 ต้น แต่สายพันธุ์แตงกวาที่ปลูกในเรือนโรงของยุโรปส่วนใหญ่จะเป็นแบบ gynoecious บางสายพันธุ์อาจจะเป็นต้นที่มีดอกเพศเมียเป็นส่วนใหญ่ (predominantly female type) และเป็น parthenocarpic type จึงไม่จำเป็นที่จะต้องผสมเกสร สายพันธุ์ในกลุ่มนี้จะต้องป้องกันไม่ให้มีการผสมเกสร เนื่องจากจะทำให้ผลบวม คุณภาพต่ำ

ภาพ 1 ดอกตัวเมียและส่วนประกอบต่าง ๆ ของดอกเพศเมียแตงกวา
ดอกเพศเมียของแตงกวา (A) ส่วนประกอบต่าง ๆ ของดอกเพศเมีย (B)

ที่มา: Heimlich L.F. 1927

ลักษณะต้นและดอกของแตงกวา

ลักษณะต้นและดอกของแตงกวามีอยู่หลายแบบเช่น (นิพนธ์, 2544)

Perfect or bisexual or hermaphroditic flower คือ ดอกสมบูรณ์ที่มีทั้งเกสรเพศผู้ (stamens) และเกสรเพศเมีย (pistil) อยู่ในดอกเดียวกันแต่อาจจะไม่มีกลีบเลี้ยงหรือกลีบดอก

Male or staminate flower คือ ดอกที่ไม่มีเกสรเพศเมีย

Female or pistilate flower คือ ดอกที่ไม่มีเกสรเพศผู้

Monoecious plant คือ ต้นที่มีดอกเพศผู้และดอกเพศเมียแยกกันแต่อยู่บนต้นเดียวกัน

Dioecious plant คือ ต้นที่มีเฉพาะดอกเพศผู้หรือดอกเพศเมีย

Androecious plant คือ ต้นที่มีเฉพาะดอกเพศผู้

Andromonoecious plant คือ ต้นที่มีทั้งดอกเพศผู้และดอกกระเทยอยู่บนต้นเดียวกัน

Gynoecious plant คือ ต้นที่มีเฉพาะดอกเพศเมีย

Gynomonoecious plant คือ ต้นที่มีดอกเพศเมียและดอกกระเทยอยู่บนต้นเดียวกัน

Predominantly female plant คือ ต้นที่มีดอกเพศเมียเป็นส่วนใหญ่

Hermaphroditic plant คือ ต้นที่มีทั้งดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่บนต้นเดียวกัน

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียในพืชที่มีดอกเกิดขึ้นได้หลายรูปแบบ โดยรูปแบบแรกซึ่งเป็นรูปแบบที่พบเห็นโดยทั่วไปนั้นเมื่อสิ้นสุดระยะการสร้างเมกะสปอร์ (megasporogenesis) รังไข่จะมีนิวเคลียสเหลืออยู่เพียง 1 นิวเคลียส และเมื่อสิ้นสุดระยะการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (megagametogenesis) รังไข่จะมีนิวเคลียส 8 นิวเคลียส เรียกการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียแบบนี้ว่า monosporic - 8 - nucleate (Maheshwari, 1950) โดยการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียมี 2 ขั้นตอนดังนี้

1. การสร้างเมกะสปอร์ (megasporogenesis) เริ่มจาก เซลล์ต้นกำเนิดสปอร์เพศเมีย (megasporocyte หรือ megaspore mother cell) ที่อยู่ภายในรังไข่ แบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) 2 ครั้งได้เมกะสปอร์ (megaspore หรือ meiospore) 4 เซลล์ เป็นการสิ้นสุดระยะการผลิตเมกะสปอร์ ซึ่งแต่ละเซลล์ก็คือ เมกะสปอร์ (Kalloo, 1988)

2. ระยะการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียหรือไข่ (megagametogenesis) เมกะสปอร์ 3 เซลล์จะสลายตัวไปเหลือไว้เพียง 1 เซลล์ ซึ่งจะแบ่งนิวเคลียสแบบไมโทซิส 1 ครั้งได้ 2 นิวเคลียส และเคลื่อนตัวแยกไปอยู่กันคนละขั้ว ในขณะเดียวกัน เซลล์จะขยายตัวใหญ่ขึ้นมีรูปร่างคล้ายรูปไข่ เรียกว่า ถุงเอ็มบริโอ (embryo sac or female gametophyte) นิวเคลียสแต่ละอันจะแบ่งตัวแบบไมโทซิสอีก 2 ครั้ง ทำให้แต่ละขั้วมี 4 นิวเคลียส หลังจากนั้น 1 นิวเคลียสจากแต่ละขั้วจะเคลื่อนตัวมารวมกันอยู่ตรงกลางเซลล์ ทำให้เหลือเพียง 3 นิวเคลียสในแต่ละขั้วเป็นการสิ้นสุดการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย โดย 2 นิวเคลียสที่อยู่บริเวณกลางเซลล์เรียกว่า polar nuclei ส่วน 3 นิวเคลียสที่อยู่ตรงข้ามกับ micropyle เรียกว่า antipodals และ 3 นิวเคลียสที่อยู่ใกล้กับ micropyle นั้นนิวเคลียสที่อยู่ตรงกลางเรียกว่า ไข่ (egg or female gametocyte) และอีก 2 นิวเคลียสที่อยู่ด้านข้างของเซลล์ไข่เรียกว่า synergids (Kalloo, 1988)

การเปลี่ยนแปลงโครโมโซมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์

การเปลี่ยนแปลงโยกย้ายโครโมโซม (chromosome manipulation) หรือการจัดรูปแบบใหม่ของโครโมโซม (chromosome remodeling) หมายถึง การเปลี่ยนแปลงโยกย้ายโครโมโซม ด้วยเทคนิควิธีการใดก็ตาม เพื่อให้เกิดผลทางพันธุกรรมที่ต้องการ (Morris, 1983 อ้างโดย ศิริพร, 2547)

ผลทางพันธุกรรมที่อาจเกิดขึ้น ได้แก่

1. การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของยีน
2. การรวมตัวของยีนจากพืชที่แตกต่างกัน 2 ชนิด
3. การย้ายยีนหนึ่งยีนหรือมากกว่าจากพืชป่าที่มีความสัมพันธ์กับพืชปลูก

เซลล์ร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะมีโครโมโซมอยู่เป็นคู่ สิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันจะมีจำนวนคู่แตกต่างกัน เมื่อแยกโครโมโซมแต่ละคู่ออกจากกันจะได้โครโมโซมที่เหมือนกัน 2 ชุด หรือที่เรียกว่า ดิพลอยด์ แทนด้วย 2n ในเซลล์สืบพันธุ์เนื่องจากผ่านกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) โครโมโซมแต่ละชุดแยกไปอยู่ในเซลล์ ทำให้เซลล์สืบพันธุ์มีโครโมโซมเพียงครึ่งหนึ่งของเซลล์ร่างกายหรือที่เรียกว่า แฮพลอยด์ แทนด้วย n

จากการกำเนิดและวิวัฒนาการ ทำให้พืชบางชนิดมีโครโมโซมในสภาพแฮพลอยด์เหมือนกับโครโมโซมดั้งเดิมของพืชนั้นหรือที่เรียกว่า จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (basic chromosome number) หรือโมโนพลอยด์ หรือจีโนมแทนด้วย x เช่น

1. ข้าวโพดมีโครโมโซมในเซลล์ร่างกายจำนวน 20 แท่ง

$2n = 2x = 20; x = 10$

2. ข้าวสาลีพวก common wheat มีโครโมโซมในเซลล์ร่างกายจำนวน 42 แท่ง

$2n = 6x = 42; x = 7$ โครโมโซมมาจาก 3 จีโนมคือ A, B และ D ในสภาพดิพลอยด์เขียนแสดงด้วย AABBDD โครโมโซมของจีโนมเดียวกันจะจับคู่กันในการแบ่งเซลล์ จีโนมที่มีความใกล้ชิดกันมากอาจจับคู่กันได้ (นพพร, 2546)

การลดจำนวนโครโมโซม

การลดจำนวนโครโมโซมจาก 2n ในเซลล์สืบพันธุ์เป็น 1n ในกระบวนการแบ่งตัวแบบไมโอซิส (meiosis) เพื่อสร้างหน่วยสืบพันธุ์ นับเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติเพื่อรักษาสภาพ 2n ในสิ่งมีชีวิตภายหลังกระบวนการปฏิสนธิ แต่บางครั้งพบว่าการลดจำนวนโครโมโซมจาก 2n เป็น 1n เกิดขึ้นในเซลล์ร่างกายได้ ถ้าเนื้อเยื่อที่มีเซลล์เหล่านี้สามารถขยายพันธุ์ได้จะได้ต้นพืชที่มีโครโมโซมเพียงชุดเดียว (n) เรียกว่า แฮพลอยด์ (haploid) (ศิริพร, 2547)

พืชแฮพลอยด์ (haploid plants)

พืชแฮพลอยด์ (haploid plants) คือ ต้นพืชที่มีโครโมโซมเพียงชุดเดียว (n) เท่ากับที่พบในเซลล์สืบพันธุ์ พืชแฮพลอยด์มีความสำคัญเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะการศึกษาการเหนี่ยวนำที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induction of mutation) และการสร้างพืชสายพันธุ์แท้ (homozygous plants) ซึ่งเป็นที่ต้องการในปริมาณมาก การใช้วิธีการแบบดั้งเดิม (conventional method) โดยการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อการผลิตพืชแฮพลอยด์นั้นมีความยุ่งยาก สิ้นเปลืองเวลา แรงงานและค่อนข้างไม่มีประสิทธิภาพ บางครั้งอาจต้องใช้เวลานานหลายปีเพื่อสร้างพืชสายพันธุ์บริสุทธิ์ (pure line) อย่างไรก็ตาม ได้มีการนำเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้อย่างชัดเจนเพิ่มสูงขึ้นซึ่งเทคนิคดังกล่าวทำให้ผลิตพืชแฮพลอยด์ได้มากยิ่งขึ้นสำหรับงานปรับปรุงพันธุ์พืช (Bajaj, 1990)

ประวัติและการค้นพบพืชแฮพลอยด์

Dorothy Bergner เป็นคนแรกที่ระบุถึงปรากฏการณ์ทางธรรมชาติของพืชแฮพลอยด์ในต้นลำโพง (*Datura stramonium*) ในปี ค.ศ. 1922 (Blakeslee, 1922) ต่อมาไม่นานได้มีรายงานในทำนองเดียวกันในยาสูบ (Clausen et al., 1924) ข้าวสาลี (Gains et al., 1926) และพืชชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิดในภายหลัง (Kimber et al., 1963) แต่ทว่าการพัฒนาวิธีการผลิตพืชแฮพลอยด์ภายในห้องปฏิบัติการได้เกิดขึ้นภายหลังจากนั้นโดยใช้เวลานานถึง 40 ปี เนื่องจากมีอุปสรรค

มากมายเข้ามาเกี่ยวข้อง Guha and Maheshwari (1964) ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงอับละอองเกสร (anther culture) ของต้นลำโพง ความสำเร็จในครั้งนี้ส่งผลให้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตพืชแฮพลอยด์ได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วรวมทั้งการพัฒนาเทคนิคการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นอีกเท่าตัว (chromosome doubling) จากพืชแฮพลอยด์ (n) ซึ่งเป็นหมันไปเป็นโฮโมไซกัส (homozygous) หรือเป็นพืชดับเบิลแฮพลอยด์ (2n) (Jensen, 1974)

พืชดับเบิลแฮพลอยด์ชนิดแรกๆ ที่มีความสำคัญที่นำมาปลูกคือ Rapeseed (*Brassica napus*) ในช่วงประมาณต้นปี ค.ศ. 1970 (Thompson, 1972) และข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) ในปี ค.ศ. 1980 (Ho and Jones, 1980) ถึงแม้ว่าสายพันธุ์ข้าวโพด (*Zea mays*) ที่เป็นดับเบิลแฮพลอยด์จะเคยประสบความสำเร็จมาก่อนแล้วในการผลิตเพื่อเป็นเชิงการค้า ซึ่งเป็นพืชแฮพลอยด์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (Chase, 1969)

ความสนใจพืชแฮพลอยด์ได้ปรากฏขึ้นมาอีกครั้งในการประชุมสัมมนาระหว่างประเทศเกี่ยวกับพืชแฮพลอยด์ในพืชชั้นสูงขึ้นเป็นครั้งแรกที่ประเทศแคนาดาในปี ค.ศ. 1974 (Kasha, 1974) ณ เวลานั้นเป็นโอกาสที่ดี มีผู้ที่มีชื่อเสียงเป็นจำนวนมากที่มีความรู้ความสามารถ ได้นำเรื่องเกี่ยวกับพืชแฮพลอยด์มานำเสนอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของพืชดับเบิลแฮพลอยด์ เนื่องจากว่าพืชดับเบิลแฮพลอยด์มีคุณค่าเป็นอย่างยิ่งในด้านพันธุศาสตร์และความต้องการทางด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชสายพันธุ์แท้

Riley (1974) ได้นำเสนอถึงสภาพการณ์ของงานวิจัยที่เกี่ยวกับพืชแฮ-พลอยด์ว่า "ผมเชื่อเป็นอย่างยิ่งว่าพืชแฮพลอยด์จะสามารถช่วยเหลืองานทางด้านการเกษตรและด้านการเพาะปลูกพืชได้อย่างมากมายในอนาคต แต่กระนั้นก็ดีสิ่งจำเป็นสูงสุดนอกเหนือจากความกระตือรือร้นเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชแฮพลอยด์แล้ว สิ่งสำคัญคือจำเป็นต้องปฏิบัติควบคู่ไปกับความระมัดระวังและความเหมาะสม..." เช่นเดียวกับการเลี้ยงอับละอองเกสรต้นลำโพงและการพัฒนาเทคนิคเพื่อการผลิตพืชดับเบิลแฮพลอยด์ในพืชชนิดอื่นๆ ซึ่งได้เห็นแล้วว่ามีความยุ่งยากและค่อนข้างใช้เวลา อีกทั้งการค้นคว้าวิจัยในด้านของเทคนิคการผลิตก็ลดลงอย่างมาก กลายเป็นเพียงแค่ประสบการณ์หรือการสังเกตเท่านั้น (โดยไม่อาศัยวิทยาศาสตร์หรือทฤษฎี) ผลที่ตามมาทำให้ความสนใจได้ลดน้อยลง โดยนักวิจัยและนักปรับปรุงพันธุ์พืชได้ให้ความสนใจเพียงผลผลิตสุดท้าย คือ สายพันธุ์ของพืชดับเบิลแฮพลอยด์หรือพืชสายพันธุ์แท้มากกว่าการพัฒนาเทคโนโลยีให้สามารถทำการผลิตพืชแฮพลอยด์ได้ง่ายยิ่งขึ้น

อย่างไรก็ตามเมื่อไม่นานมานี้วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีได้มีวิทยาการใหม่ๆ เข้ามา ทำให้การเข้าถึงวิธีการและการใช้ประโยชน์ของพืชแฮพลอยด์ทำได้ง่ายยิ่งขึ้นและได้ขยายกว้างออกไปมากขึ้น ความสนใจได้เกิดขึ้นอีกครั้งเกี่ยวกับพืชแฮพลอยด์ในพืชชั้นสูง ปัจจุบันนี้พืชแฮ-

พลอยด์และดับเบิลแฮพลอยด์ได้มีรายงานในพืชมากกว่า 200 ชนิด ที่มีความสัมพันธ์กันเกือบจะทุกตระกูลของอาณาจักรพืช โดยการศึกษาวิธีการผลิตพืชดับเบิลแฮพลอยด์ในพืชชนิดอื่นๆ ซึ่งได้อาศัยความหลากหลายที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Maluszynski et al., 2003)

การเกิดพืชแฮพลอยด์

สาเหตุการเกิดพืชแฮพลอยด์ อาจเกิดขึ้นได้เองในธรรมชาติหรือชักนำให้เกิดขึ้นได้หลายวิธีดังนี้

1. Gynogenesis ในกรณีนี้เซลล์ไข่ที่ไม่ได้รับการผสมมีการเจริญพัฒนาขึ้นมา สาเหตุหนึ่งอาจเนื่องมาจากการผสมเกสรเกิดขึ้นช้าหรือถูกชะลอไปหรือละอองเกสรฝ่อตายเช่น ถูกฉายรังสี เป็นต้น พบได้บ่อยในการผสมข้ามกันระหว่างชนิดและเป็นการนำเอาเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียมาเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น การเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่และออวุลที่ยังไม่ได้รับการผสม (unpollinated ovary or ovule culture) เป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ผลิตพืชแฮพลอยด์แทนการเลี้ยงอับเรณูเพราะต้นที่ได้มีลักษณะปกติและไม่เป็นหมัน (Keller and Korzun, 1996)

2. Androgenesis ในกรณีนี้นิวเคลียสของเซลล์ไข่อาจถูกกำจัดหรือทำลายไปก่อนเกิดการผสม ดังนั้นต้นแฮพลอยด์ที่เกิดขึ้นจึงมีเพียงนิวเคลียสจากเพศผู้ และเป็นการนำเอาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้มาเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น การเลี้ยงเนื้อเยื่ออับละอองเกสรและละอองเกสร (anther or pollen culture) วิธีนี้ประสบความสำเร็จในการชักนำต้นแฮพลอยด์ได้ในพืชหลายชนิด แต่ในธัญพืชนั้นต้นที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อมักมีอัตราต่ำ เป็นหมัน และมีลักษณะเผือกเป็นจำนวนมาก (ประภา, 2543)

3. Parthenogenesis ในกรณีนี้เซลล์ไข่เจริญพัฒนาเป็นเอ็มบริโอและต้นใหม่โดยไม่ผ่านกระบวนการปฏิสนธิเกิดเป็นต้นพืชที่มีโครโมโซมชุดเดียว

4. Apogamy ในกรณีนี้เอ็มบริโอสามารถเจริญพัฒนาจากเซลล์สืบพันธุ์ (n) ที่ไม่ผ่านการปฏิสนธิหรือจากเซลล์ของนิวเซลลัส (2n) หรืออินเทกูเมนต์ (2n) ทำให้ได้ต้นพืชที่มีจีโนไทป์เหมือนเซลล์เดิมทุกประการ

5. Chromosome elimination การขจัดโครโมโซมทิ้งในกรณีนี้เกิดขึ้นหลังการผสมเกสรของพืชซึ่งมีความห่างทางสายพันธุ์ (species) เช่น การผสมข้ามระหว่างข้าวสาลี (*Triticum aestivum*, 2n = 42) กับข้าวโพด ในระหว่างการเลี้ยงเอ็มบริโอลูกผสมที่ได้ โครโมโซมของข้าวโพดจะถูกขจัดทิ้งไปอย่างรวดเร็ว ทำให้ได้ต้นแฮพลอยด์ของข้าวสาลี (ประภา, 2543) โดยส่วนมากมักใช้วิธีนี้ทางด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช

6. Irradiation or chemical treatment การฉายรังสีหรือสารเคมีซึ่งประสบความสำเร็จโดยฉายรังสีแกมมาในการผลิตพืชแฮพลอยด์ในแตงกวา (Sauton, 1989)

การใช้ประโยชน์จากพืชแฮพลอยด์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชและพันธุศาสตร์

เทคโนโลยีพืชแฮพลอยด์มีแนวโน้มที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากในงานเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทั้งคุณค่าในทางทฤษฎีและทางปฏิบัติซึ่งมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องทำให้การพัฒนาและการนำมาใช้ประโยชน์ทางเทคนิคพันธุวิศวกรรมโดยเฉพาะอย่างยิ่งชีวโมเลกุลพืชที่ทำได้ง่ายยิ่งขึ้น แฮพลอดย์มีประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชหลายประการ (ประภา, 2543) และ (Atanassov et al., 1995) คือ

1. การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมพืชแฮพลอยด์ทำให้ได้พืชที่มีโครโมโซมเหมือนกัน 2 ชุด (homozygous diploid) หรือเป็นสายพันธุ์แท้ หากไม่มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นสายพันธุ์แท้ (doubled haploid) ที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อจะใช้ระยะเวลาเพียง 1-2 ชั่ว ซึ่ง จะมีระดับของการเข้าสู่ homozygosity สูงกว่าการพัฒนาสายพันธุ์แท้ที่ได้จากการผสมตัวเองหลายๆ ชั่ว สายพันธุ์แท้ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของพืชแฮพลอยด์สามารถนำไปใช้ในการสร้างพันธุ์ลูกผสมต่อไป

2. พืชแฮพลอยด์มีประโยชน์ในการศึกษาการกลายพันธุ์ในพืช (mutagenesis) เนื่องจากสามารถสังเกตเห็นการกลายพันธุ์ที่เป็นลักษณะแฝงได้ทันที เพราะยีนทุกตำแหน่ง (loci) อยู่ในสภาพ hemizygous คือมีเพียง 1 อัลลีลในแต่ละตำแหน่ง (locus) ของยีนและสามารถแสดงลักษณะออกมาได้ทันทีเมื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมขึ้นอีกเท่าตัวเป็น homozygous diploid ซึ่งต่างจากการเกิดการกลายพันธุ์เนื่องจากลักษณะแฝงจะถูกข่มโดยยีนเด่นเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็น heterozygous

3. แฮพลอยด์ทำให้ง่ายต่อการคัดเลือกอัลลีลข่มเนื่องจากมีโครโมโซมเพียงชุดเดียว ยีนในแต่ละตำแหน่งจึงอยู่ในสภาพยีนเดี่ยวไม่มีคู่ของมัน ดังนั้นอัลลีลแฝงจะแสดงออกได้โดยการเพิ่มจำนวนโครโมโซมอีกหนึ่งเท่า เมื่อเทียบกับดิพลอยด์ที่ต้องผสมตัวเองหลายครั้งเพื่อให้เกิดการกระจายตัวของยีนก่อนจึงจะสามารถกำจัดอัลลีลแฝงได้

4. การกระจายตัวของโพลิแฮพลอยด์ (polyhaploid) ไม่ยุ่งยากซับซ้อน เช่นโพลิแฮพลอยด์ที่ได้มาจากออโทเททราพลอยด์ (autotetraploid) จะมีการกระจายตัวเหมือนกับไดโซมิก (disomic) ซึ่งการถ่ายทอดลักษณะจะต้องใช้จำนวนต้นพืชน้อยกว่า เททราพลอยด์ (tetraploid) ดังนั้นโพลิแฮพลอยด์สามารถพบลักษณะแฝงได้ง่ายกว่าพ่อแม่พันธุ์ที่เป็นโพลิพลอยด์ (polyploid) เมื่อคัดเลือกได้ต้นที่มีลักษณะดามต้องการแล้วจึงนำไปเพิ่มจำนวนโครโมโซมอีกหนึ่งเท่าตัวโดยใช้โคลชิซีนหรือผสมระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ที่ไม่มีการลดจำนวนโครโมโซม

5. แฮพลอยด์ช่วยในการผลิตสายพันธุ์แท้จากพืชที่มีกลไกป้องกันการผสมตัวเอง (self - incompatibility) ไม่สามารถผลิตสายพันธุ์แท้โดยทำให้เป็น double haploidโดยการเลี้ยงอับเรณูหรือรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสม

6. แฮพลอยด์เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของโพลิพลอยด์เนื่องจากในพอลิแฮพลอยด์ของพืชที่เป็นโมโนโซมิกที่มีชีวิตอยู่ได้และมีความสมบูรณ์พันธุ์สามารถใช้ในการบอกถึงความสัมพันธ์ของยีนและโครโมโซมได้ เช่น ในข้าวสาลีความสัมพันธ์ระหว่างยีนและโครโมโซมหาได้จากการวิเคราะห์โมโนโซมิกเพราะว่าพวกที่เป็นโมโนโซมิกหาได้ไม่ยากและง่ายต่อการเก็บรักษา

7. แฮพลอยด์เป็นประโยชน์ในการย้ายยีนระหว่างพืชต่างชนิด เช่นการผสมระหว่าง *Solanum* sp. ที่เป็นดิพลอยด์กับโพลิพลอยด์ของ *S. tuberosum* ซึ่งเป็นการย้ายยีนในระหว่างพวกหรือชนิดของมันฝรั่งได้

8. ช่วยขจัดปัญหาการเกิดความเสื่อมถอย (inbreeding depression) ของลักษณะอันเนื่องมาจากการผสมตัวเองของพืช โดยปกติการผสมตัวเองติดต่อกันหลาย ๆ ครั้ง โดยเฉพาะพืชที่มีพื้นฐานของจีโนไทป์แตกต่างกันมากๆ เช่น ลูกผสมจะทำให้ลักษณะที่ไม่ดีแสดงออกมาได้ แต่การสร้างพืชสายพันธุ์แท้จากลูกผสมชั่วที่ 1 โดยการนำอับละอองเกสรไปเลี้ยงจะได้ต้นพืชแฮพลอยด์ซึ่งเมื่อเราชักนำให้มีการเพิ่มจำนวนของโครโมโซมอีกเท่าตัวจะได้พืชสายพันธุ์แท้ในทันทีความเสื่อมถอยของลักษณะต่างๆ ที่เป็นผลมาจากการผสมตัวเองจึงไม่เกิดขึ้น

9. แฮพลอยด์โพรโทพลาสต์สามารถนำมาใช้เพื่อการผลิตพืชดิพลอยด์ปกติได้โดยตรงเกี่ยวกับลักษณะเฉพาะการรวมโพรโทพลาสต์ (somatic fusion) ของลักษณะที่มีค่าของลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันที่ควบคุมด้วยยีนในไซโตพลาสซึม (cytoplasmic male sterility) ทำให้สามารถประหยัดแรงงานและพื้นที่ได้ค่อนข้างมากเมื่อเปรียบกับการใช้วิธีการแบบดั้งเดิม

แตงกวาลูกผสม

เนื่องจากแตงกวาเป็นพืชผสมข้ามที่มีดอกเพศผู้และดอกเพศเมียแยกกันอยู่คนละดอกในต้นเดียวกัน การผสมเกสรจึงจำเป็นต้องใช้แมลงช่วยในการผสม ดังนั้นการผลิตสายพันธุ์แตงกวาจำเป็นต้องมีการปฏิบัติเพื่อป้องกันและช่วยในการผสม เช่น การคลุมดอก การผสมโดยใช้แรงงานคน โดยเฉพาะการผลิตสายพันธุ์แท้ (pure line) นั้น จำเป็นต้องปฏิบัติเช่นนี้ในทุกรุ่นที่ทำการคัดเลือก จึงจะได้สายพันธุ์แท้ที่สามารถนำมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการทำแตงกวาลูกผสม (พองาม, 2531)

ลูกผสม (hybrid) ในแง่ของวิธีการปรับปรุงพันธุ์ หมายถึง ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์แท้ที่แตกต่างกันไม่เกิน 4 สายพันธุ์ (ศิริพร, 2547) ลูกผสมเหล่านี้อาจแยกออกได้เป็น 3 ชนิด (สุทัศน์, 2539) คือ

1. ลูกผสมเดี่ยว (single cross) คือ ลูกผสมที่เกิดจากสายพันธุ์แท้ 2 สายพันธุ์
2. ลูกผสมสามทาง (three - way cross) คือ ลูกผสมที่เกิดจากสายพันธุ์แท้ 3 สายพันธุ์
3. ลูกผสมคู่ (double cross) คือ ลูกผสมที่เกิดจากสายพันธุ์แท้ 4 สายพันธุ์

ลูกผสมเดี่ยวเป็นพันธุ์ที่สามารถใช้ประโยชน์จากปฏิกิริยาของยีนทุกประเภทได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความสม่ำเสมอสูง สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ไม่ว่าจะเป็นพืชชนิดใดก็ตาม ถ้าหากมีกลไกที่เอื้ออำนวยนักปรับปรุงพันธุ์จะมุ่งไปที่การปรับปรุงพันธุ์ลูกผสมเดี่ยว (กฤษฎา, 2519) ซึ่ง Walden (1978) เป็นคนแรกที่รายงานถึงการผลิตลูกผสมเดี่ยวจากสายพันธุ์แท้ที่มียีนอยู่ในสภาพที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) เพื่อทำให้เกิดเฮตเทอโรซิส (heterosis) ได้สูงสุดและมีความสม่ำเสมอดีและยังมีงานวิจัยของนักปรับปรุงพันธุ์พืชหลายท่านได้แสดงให้เห็นว่า เมื่อนำสายพันธุ์แท้มาผสมกันจะได้ลูกผสมที่ดีกว่าพ่อแม่หรือลูกผสมแสดงลักษณะดีเด่น (hybrid vigor) ออกมา (สุทัศน์, 2539) ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ลูกผสมจึงเป็นเพียงการต่อยอดเพื่อใช้ประโยชน์จากการพัฒนาสายพันธุ์แท้ให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด (กฤษฎา, 2519) สายพันธุ์แท้ (inbred line) โดยปกติหมายถึง พืชผสมข้ามที่มียีนที่เหมือนกันมาจับคู่กันทุกคู่หรือยีนทุกคู่อยู่ในสภาพโฮโมไซกัส ในทางปฏิบัติพืชต้องมีการผสมตัวเองติดต่อกันมาไม่น้อยกว่า 6-7 ชั่ว จึงจะมีลักษณะใกล้เคียงกับสายพันธุ์แท้ ปัญหาสำคัญไม่ได้อยู่ที่การปลูกเพื่อผสมตัวเองตลอด 6-7 ชั่ว แต่อยู่ที่การคัดเลือกต้นที่ต้องการไว้ในแต่ละรุ่น ซึ่งมักพบว่ารุ่นหลังๆ แม้ว่าพืชมีความคงตัวทางพันธุกรรมสูงแต่อาจไม่มีต้นที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในเชิงการค้าได้เลย ดังนั้นจึงมีผู้คิดวิธีการนำเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเข้ามาประยุกต์เพื่อช่วยลดระยะเวลาในการผลิตสายพันธุ์แท้และสามารถผลิตต้นพันธุ์แท้ที่มีลักษณะหลากหลายได้ในเวลาเดียวกัน อีกทั้งต้นพันธุ์ที่ได้ยังเป็นต้นพันธุ์แท้ที่ต้องการ โดยใช้วิธีการเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ของพืช (พองาม, 2531) ซึ่งพืชทั่วไปเซลล์สืบพันธุ์จะมีเซลล์ซึ่งเป็นแฮพลอยด์ เพื่อชักนำให้เซลล์สืบพันธุ์พัฒนาไปเป็นต้นพืชแฮพลอยด์ที่มีจำนวนโครโมโซมชุดเดียวซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์พืช (Keller and Korzun, 1996)

การผลิตพืชแฮพลอยด์โดยกระบวนการเกิดแบบ Gynogenesis

Gynogenesis คือ เซลล์แฮพลอยด์ของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (female gametophyte) (เซลล์ไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสม) ถูกกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาในส่วนของเอ็มบริโอในกระบวนการชักนำซึ่งจะคล้ายกับ parthenogenesis

การผลิตพืชแฮพลอยด์โดยใช้การเลี้ยงเนื้อเยื่อออวุล (ovules culture) ได้เป็นที่ยอมรับกันมานาน นับว่าเป็นวิธีที่มีความสำคัญในการผลิตพืชแฮพลอยด์และพืชดับเบิลแฮพลอยด์ ซึ่งเป็น homozygous เพื่อการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืช (Shalaby, 2007)

นับตั้งแต่มีการค้นพบพืชแฮพลอยด์ในธรรมชาติขึ้นเป็นครั้งแรกในต้นลำโพงเมื่อปี ค.ศ. 1922 ได้มีการทดลองเป็นจำนวนมากเพื่อทำการชักนำให้เกิดการพัฒนาแบบ parthenogenic ของไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสม (unfertilized egg) หรือเซลล์อื่นๆ ของถุงเอ็มบริโอ (embryo sac) ได้มีการพยายามกันหลายวิธีและสามารถแบ่งวิธีการออกเป็น 2 แบบ (Yang and Zhou, 1982) คือ

1. *In vivo* คือการชักนำให้เกิดต้นแฮพลอยด์โดยใช้วิธีการกระตุ้นทางกายภาพ เคมี หรือชีวภาพ วิธีการนี้จำเป็นต้องอาศัยความรู้จากประสบการณ์ที่มีซึ่งมีความสำคัญที่จะนำมาซึ่งความสำเร็จ อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ก็ไม่สามารถพิจารณาได้หลายๆ ปัจจัยในเวลาเดียวกัน

2. *In vitro* คือการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยเริ่มต้นในประมาณปี ค.ศ. 1950 ที่โรงเรียน Maheshwarian ในวิชาเอ็มบริโอวิทยา (embryology) ของพืชซึ่งถือได้ว่าเป็นผู้ริเริ่มวิธีการอื่นๆ เพื่อการชักนำให้เกิดพืชแฮพลอยด์ในสภาพของการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ในการเลี้ยงออวุล (ovules) หรือรังไข่ (ovaries) ที่ยังไม่ได้รับการผสม(unfertilized) นักวิจัยได้มีความพยายามกันเป็นอย่างมากในการหาปัจจัยต่างๆ ในพืชหลายชนิดเช่น ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*)(Siddiqui, 1954), *Cooperia pedunculata* Herb. (Sachar and Kapoor, 1958), บัวตีน (*Zephyranthes*) (Sachar and Kapoor, 1959) และหอมหัวใหญ่ (*Allium cepa*) (Guha and Johri, 1966) เป็นต้น แต่การทดลองทั้งหมดที่กล่าวมานั้นก็ไม่สามารถประสบความสำเร็จ

ในขณะนั้นการเลี้ยงออวุลและรังไข่ (ovules and ovaries culture) แม้ว่าจะประสบกับความล้มเหลว แต่การเลี้ยงอับเกสร (anther culture) ในต้นลำโพงก็ได้ประสบความสำเร็จโดย Guha and Maheshwari ในปี ค.ศ.1964 งานวิจัยนี้ได้เป็นแรงจูงใจให้นักวิจัยมีความสนใจและเป็นผลให้การเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ได้รับความสนใจอีกครั้งหลังจากไม่ได้รับความสนใจมาเกือบ 10 ปี ต่อมาได้มีการเลี้ยงรังไข่ที่ยังไม่ผ่านการผสม (unfertilized ovaries) ของข้าวโพด (*Zea mays*) และออวุล (ovules) ของมะเขือยาว (*Solanum melongena*) และสังเกตการแบ่งเซลล์ของแฮพลอยด์

ในแคลลัส (Uchimiya et al.,1971) พวกเขาเชื่อว่าการชักนำให้เกิดต้นแฮพลอยด์จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อในเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียนั้นมีความเป็นไปได้

หลังจากปี 1970 เป็นต้นมา มีการนำการเลี้ยงรังไข่และออวุลมาใช้ประโยชน์มากขึ้น (Rangan, 1984) เนื่องจากการเลี้ยงรังไข่หรือออวุลที่ไม่ได้รับการผสมนั้นเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้ในการผลิตพืชแฮพลอยด์ แม้ว่าจะมีรายงานเกี่ยวกับเอ็มบริโอหรือเมล็ดที่พัฒนาจากเซลล์แฮพลอยด์ในถุงเอ็มบริโออยู่น้อยก็ตาม (Yang and Zhou, 1982)

จนกระทั่งได้มีรายงานการเลี้ยงรังไข่ที่สามารถชักนำให้เกิดต้นแฮพลอยด์ได้เป็นครั้งแรกในข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) (San Noeum, 1976) ต่อมาในข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) และยาสูบ (*Nicotiana labacum*) (Zhu and Wu,1979) ในปีเดียวกันนั้น Yan et al. (1979) ได้พบต้นแฮพลอยด์ที่มีลักษณะเผือก (albino) จากการเลี้ยงรังไข่ของข้าวสาลี De Beauville (1980), Zhou and Yang (1980) ได้ใช้วิธีการที่แตกต่างกันในการเลี้ยงรังไข่ของข้าว (*Oryza sativa*) งานวิจัยทั้งสองนี้ก็ได้ประสบความสำเร็จ ในช่วงเวลาเดียวกันนี้ การเลี้ยงออวุลได้ประสบความสำเร็จในยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) (Ran, 1980) และเยอบีรา (*Gerbera jamesonii*) (Cagnet-Sitbon , 1981) ต่อมา Van Geyt et al. (1987) ได้เลี้ยงรังไข่และออวุลที่ไม่ได้รับการผสมของชูการ์บีท (*Beta vulgaris* L.) และสามารถชักนำให้เกิดต้นแฮพลอยด์ได้ในอัตราที่สูงกว่าร้อยละ 95 ในเยอบีรา (*Gerbera jamesonii*) Miyoshi and Asakura (1996) สามารถชักนำต้นแฮพลอยด์ได้จากการเลี้ยงออวุลที่ไม่ได้รับการผสม ยิ่งกว่านั้นชนิดของพืชที่สามารถชักนำต้นแฮพลอยด์จากการเลี้ยงรังไข่และออวุลยังมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการนำการเลี้ยงรังไข่และออวุลมาใช้ในการผลิตต้นแฮพลอยด์ในพืชชนิดต่างๆ ได้อย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และการขจัดทิ้งโครโมโซมของการผลิดแฮพลอยด์ในหัวหอมใหญ่นั้นการเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการผลิตต้นแฮพลอยด์และสายพันธุ์แท้ได้ดี (Keller and Korzun, 1996)

ปัจจุบันการเลี้ยงรังไข่และออวุลเพื่อให้ได้ต้นแฮพลอยด์ใช้กันมากในต้นหอม (*Allium cepa*) ชูการ์บีท (*Beta vulgaris*) และไม้ยืนต้นบางชนิด

ในต้นหอม (*A. cepa*) gynogenesis ได้ใช้ในส่วนของตาดอก (flower bud) หรือรังไข่ (ovary) มาเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการทำ pre-treatment เป็นการนำอุณหภูมิมาประยุกต์ใช้และพบว่าอุณหภูมิในการเจริญเติบโตของต้นพืชที่นำมาเลี้ยงก่อนที่ดอกจะบานนั้นมีความสำคัญ ในการเลี้ยงนั้นประกอบด้วยกระบวนการ 2 ขั้นตอนคือ การเลี้ยงใน induction medium ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตและเลี้ยงต่อใน regeneration medium โดยลดปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตลง พืชทั้งหมดที่เกิดเป็นพืชแฮพลอยด์และนำมาดับเบิลโครโมโซมได้ต้นดับเบิลแฮพลอยด์ นำมาใช้

ในการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งไม่เพียงแต่จะได้ต้นที่เป็นสายพันธุ์แท้แล้วยังช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย ในต้นหอมนั้นใช้เวลา 2 ปี (Michalik et al., 2000) จากการชักนำพืชแฮพลอยด์จากลูกผสม F_1 ระหว่าง CMS shallot (หอมแดง) กับไซโตพลาสซึมของ *Allium galanthum* และต้นหอม (common onion) โดยการเลี้ยงดอกที่ยังไม่ได้รับการผสม สามารถชักนำให้เกิดต้น 25 ต้น จากเอ็มบริโอที่เกิดจากกระบวนการ parthenogenetic ซึ่งสามารถอยู่รอด 13 ต้นและพบว่า 11 ต้น เป็นต้นแฮพลอยด์ ($2n = x = 8$) และอีก 2 ต้นเป็นดับเบิลแฮพลอยด์ ($2n = 2x = 16$) ซึ่งต้นแฮพลอยด์และดับเบิลแฮพลอยด์ทั้งหมดมาจาก chloroplast DNA (cpDNA) และ mitochondrial DNA (mtDNA) จาก *A. galanthum* โดยคุณสมบัติการแบ่งตัวที่แตกต่างกันเป็นผลให้เห็นความแตกต่างระหว่างพืชแฮพลอยด์และดับเบิลแฮพลอยด์ซึ่งจะมีความแตกต่างในการรวมตัวกันของยีนจากหอมแดง (shallot) และต้นหอม (common onion) การ Crossing ของต้นแฮพลอยด์กับสายพันธุ์ของหอมแดง ต้นหอมหรือสายพันธุ์ที่สัมพันธ์กันอาจจะสามารถผลิตลูกผสม F_1 ที่ดีเด่นเพื่อการผลิตหัว (Endang, 2002)

ส่วนวิธีการที่ใช้ในซูการ์บีท (*B. vulgaris*) จะใช้วิธีการในทำนองเดียวกัน การทำ pre-treatment ในต้นหอม แม้ว่าในงานวิจัยนี้จะใช้ cold treatment กับการบานของดอก (ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสสัปดาห์ละครั้ง) ร่วมกับการใช้อุณหภูมิสูง (30 องศาเซลเซียส) ในระหว่างระยะการชักนำเพื่อการตอบสนองที่ดียิ่งขึ้น (Wremerth-Weich and Levell, 2003) ดับเบิลแฮพลอยด์ในซูการ์บีทได้มีการใช้ในงานด้านปรับปรุงพันธุ์ รวมทั้งการผลิตลูกผสม F_1 โดยใช้พ่อและแม่ที่เป็นดับเบิล- แฮพลอยด์ (Zakhariev and Kikindonov, 1997)

การเกิด gynogenesis สามารถชักนำโดยการฉายรังสีละอองเกสรตัวผู้ (Irradiated pollen technique) ได้ด้วยเช่นกัน (Winton and Stettler, 1974) งานวิจัยนี้มีผลให้ได้ต้นโดยการฉายรังสีละอองเกสรตัวผู้ที่มีความสัมพันธ์กันทางสายพันธุ์ (Sato et al., 2000) การศึกษาการเลี้ยง pseudofertilized ovule ของคาร์เนชั่น (*Dianthus caryophyllus* L.) เพื่อการผลิตพืชดับเบิลแฮพลอยด์ โดยการทำหมันตาดอกที่ได้รับการผสมแล้วและหยุดการทำงานของละอองเกสรโดยการฉายรังสี x-ray หลังจากนั้น 2 - 3 สัปดาห์ นำชิ้นส่วนของรังไข่มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 2 ไมโครโมล ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 2 ไมโครโมล และน้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์ พบว่าต้นที่ได้จากการเลี้ยง (R_0) จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความแตกต่างไปจากต้นแม่ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าต้นใหม่ที่ได้นี้ไม่ได้เกิดมาจากเซลล์ร่างกาย (somatic cells) โดยเซลล์ปลายรากของต้นใหม่ที่ได้จากการเลี้ยงนี้มีจำนวนโครโมโซมทั้งสองแบบคือ $2n = 30$ และ $2n = 15$ จากการสังเกตที่เซลล์ปลายราก พืชต้นใหม่ที่ได้จากการเลี้ยงที่มีความสมบูรณ์เมื่อนำมาผสมตัวเอง เมล็ดที่ได้ก็จะเป็น R_1 พืช R_1 ที่ได้จาก R_0 ในแต่ละต้นจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่

เหมือนๆ กันและเหมือนกันกับต้น R_0 ทุกประการ จากผลการทดลองครั้งนี้จึงสรุปได้ว่าต้น R_0 ที่ได้เป็นดับเบิลแฮพลอยด์

โดยส่วนมากต้นที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียจะพัฒนามาจากเซลล์ไข่ของถุงเอ็มบริโอ เช่น งานทดลองของ Ferant and Bouharmont (1994) ได้ศึกษาการพัฒนาของเซลล์แฮพลอยด์ภายในถุงเอ็มบริโอของชูการ์บีท พบว่าเมื่อเลี้ยงออวูลที่ไม่ได้รับการผสมเป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ เซลล์ไข่เท่านั้นที่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเอ็มบริโอ เช่นเดียวกับในทานตะวัน (*Helianthus annuus*) (Ferrie et al., 1995) โดยศึกษาถึงรายละเอียดของการพัฒนาของไข่ไปเป็นต้นในทานตะวัน แสดงให้เห็นถึงการพัฒนาที่คล้ายกับการพัฒนาของไซโกตปกติทั่วไป แม้ว่าสภาพของการเลี้ยงถูกชักนำให้บางเนื้อเยื่อของช่วงสปอโรไฟต์ (sporophytic) งอก (Yang et al., 1990) ส่วนในข้าวเอ็มบริโอที่ได้จากการเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมซึ่งอยู่ในสภาพแฮพลอยด์นั้นพัฒนามาจาก synergid ที่อยู่ภายในถุงเอ็มบริโอ (He and Yang, 1988) และในหัวหอมใหญ่เอ็มบริโอที่ได้จากการเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมซึ่งอยู่ในสภาพแฮพลอยด์นั้นพัฒนามาจาก antipodal ภายในถุงเอ็มบริโอ (Tian and Yang, 1989)

นอกจากนั้นยังใช้ในการผสมเกสรของต้นพ่อและแม่เพื่อให้เกิดต้นแฮพลอยด์โดยการชักนำด้วยวิธี gynogenetic ปัจจุบันการเกิด gynogenesis ได้รับการสนับสนุนในด้านเทคนิคน้อยมากเนื่องจากให้ประสิทธิภาพต่ำแต่คุณค่าของพืชแฮพลอยด์และดับเบิลแฮพลอยด์ในสายพันธุ์พืชนั้น ประสิทธิภาพทางด้านเทคนิคไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อการสร้างวิธีการที่มีความคุ้มค่าเหล่านี้

ปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงพืชแฮพลอยด์

1. จีโนไทป์และความสมบูรณ์ของพืช

การเลี้ยงอับเกสร (anther culture) มีความแตกต่างกันกับการเลี้ยงรังไข่และออวุลในการตอบสนองโดยเฉพาะความสมบูรณ์ของพืชตัวอย่าง จีโนไทป์ของพืชที่นำรังไข่มาเลี้ยงนั้นเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการชักนำให้รังไข่พัฒนาไปเป็นต้น โดยความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นของรังไข่จะขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (Keller and Korzun, 1996) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับพันธุ์พืชอีกด้วย เช่น ในการทดสอบระหว่างพันธุ์ปลูกของข้าว 12 สายพันธุ์คือ ข้าว *japonica* 9 สายพันธุ์ และข้าว *indica* 3 สายพันธุ์สามารถให้แคลลัสโดยการชักนำด้วยวิธี gynogenic ที่ 1.1-12 เปอร์เซ็นต์ คือ สายพันธุ์ 'Nang Ken No. 4' ซึ่งเป็นข้าว *japonica* แสดงให้เห็นว่าผลที่ได้แตกต่างกันอย่างสูงในการทดลอง (Zhou et al., 1982) เปอร์เซ็นต์ของแคลลัสจากการเลี้ยงรังไข่ในข้าวสาลี 4 สายพันธุ์ให้ค่าแตกต่างกันจาก 1.3-10.9 เปอร์เซ็นต์ (Zhu et al., 1981) เช่นเดียวกันกับหอมหัวใหญ่

เมื่อนำรังไข่ของหอมหัวใหญ่ที่มีจีโนไทป์แตกต่างกันคือ พันธุ์สังเคราะห์ (synthetic) พันธุ์ผสมเปิด (open-pollinated) สายพันธุ์อินเบรด (inbred) มาเลี้ยง พบว่าพันธุ์ที่ตอบสนองต่อการเลี้ยงดีที่สุดคือ สายพันธุ์อินเบรด รองลงมาคือพันธุ์สังเคราะห์และพันธุ์ผสมเปิดตามลำดับ (Geoffriau et al., 1997) และในการเลี้ยงรังไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสมในข้าวสาลีแป้งแข็ง (*Triticum durum* Desf.) จาก Tunisian 3 จีโนไทป์คือ 'Jenah Khotifa' , ' Hmira', 'Azizi' และพันธุ์ปลูกที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์ 3 สายพันธุ์คือ 'Karim', 'Khiar', 'Razzek' พบว่าจีโนไทป์มีผลต่อการพัฒนาของแคลลัสและต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระดับการเกิดเป็นต้นพืชที่ดีที่สุดคือ สายพันธุ์ 'Khiar' (3.5 เปอร์เซ็นต์), 'Hmira' (3.1 เปอร์เซ็นต์) และ 'Karim' (1.5 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ (Olfa and Hajer, 2007) ในยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) 2 สายพันธุ์มีผลให้ความถี่การชักนำที่สูงถึง 75 เปอร์เซ็นต์และ 80 เปอร์เซ็นต์ แต่ในสายพันธุ์อื่น คือ *N. rustica* เพียงแค่ 8 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น (Wu and Chen, 1982) ส่วนในเยอบีร่าพบว่า พันธุ์ที่แตกต่างกันจะตอบสนองต่อการเลี้ยงแตกต่างกัน แม้ว่าจะอยู่ในชนิดเดียวกันก็ตาม (Tosca et al., 1999) ในการเลี้ยงออวุลของเยอบีร่า (*Gerbera jamesonii*) 4 สายพันธุ์ เปอร์เซ็นต์ของแคลลัสโดยการชักนำด้วยวิธี gynogenic ที่ 8-17 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์ที่ออวุลเกิดเป็นต้นพืชที่ 0-5 เปอร์เซ็นต์ (Cagnet-Sitbon, 1981) ในการเลี้ยงรังไข่ของป่าน (*Linum usitatissimum* L.) ที่มีจีโนไทป์ต่างกัน 5 จีโนไทป์ จีโนไทป์ที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มี 3 จีโนไทป์ คือ 'Lirina', 'Barbara' และ 'Mikael' เท่านั้น (Burbulis et al., 2007) ใน summer squash (*Cucurbita pepo* L.) การเลี้ยงออวุล 12 จีโนไทป์ที่ตัดจากดอกเพศเมีย 1 วันก่อนดอกบาน มีความแตกต่างกันในการตอบสนองระหว่างจีโนไทป์ ลูกผสม 'Raad F_1' แสดงให้เห็นถึงเปอร์เซ็นต์การตอบสนองของออวุลสูงที่สุด 48.8 เปอร์เซ็นต์ และให้ค่าการเกิดเป็นต้นต่อจานเพาะเลี้ยง 15 ต้น จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าจีโนไทป์เป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลในการเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยกระบวนการเกิด gynogenesis

2. ระยะของถุงเอ็มบริโอ (embryo sac)

การสังเกตถุงเอ็มบริโออย่างตรงเวลาที่นำมาเลี้ยงนั้นไม่ใช่เรื่องง่าย การพิจารณาทางอ้อมโดยพิจารณาระยะของละอองเกสรตัวผู้จะมีความเป็นไปได้มากกว่า ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียที่มีความสำคัญเป็นอันดับสองรองจากปัจจัยของจีโนไทป์ คือ ระยะการพัฒนาของถุงเอ็มบริโอของรังไข่ โดยระยะการพัฒนาของถุงเอ็มบริโอของรังไข่ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเพื่อให้พัฒนาไปเป็นต้นคือ ระยะที่ถุงเอ็มบริโอมีนิวเคลียส 1-4 อัน (uninucleate - 4 nucleate stage) ถุงเอ็มบริโอที่สุกแก่แล้วนั้นความถี่ของการพัฒนาไปเป็นต้นจะลดลง (Sita, 1997) นอกจากนี้การกำหนดระยะของถุงเอ็มบริโอให้ผลดีกว่า ในข้าวบาร์เลย์รังไข่ที่มีถุงเอ็มบริโอ พัฒนาอยู่ในระยะที่มีนิวเคลียส 1-4 อัน สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอที่มีโครโมโซม

เพียงชุดเดียว (haploid embryo) ได้ (Mukhambetzhanov, 1997) ในข้าวและข้าวบาร์เลย์ผลงานวิจัยบางงานให้ผลที่ดีเพียงกับรังไข่ในระยะสุดท้ายเท่านั้น เช่น ถุงเอ็มบริโอที่ใกล้จะเจริญอย่างเต็มที่ (San Noeum, 1976 ; Asselin De Beauville, 1980; Wang and Kuang, 1981) เช่นเดียวกับงานทดลองของ Huang et al. (1982) ที่ได้เลี้ยงดอกที่ยังไม่ได้รับการผสมของข้าวบาร์เลย์และมีรังไข่พัฒนาอยู่ในระยะต่างๆ ตั้งแต่ระยะเมกะสปอร์จนถึงระยะที่ถุงเอ็มบริโอสุกแก่เต็มที่ พบว่ารังไข่ที่อยู่ในระยะเมกะสปอร์ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอได้ ส่วนรังไข่ที่มีถุงเอ็มบริโออยู่ในระยะที่มีนิวเคลียส 1 อัน จนถึงระยะถุงเอ็มบริโอสุกแก่เต็มที่สามารถพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอได้ ซึ่งรังไข่ที่อยู่ในระยะที่ถุงเอ็มบริโอสุกแก่เต็มที่ประกอบด้วยนิวเคลียส 8 อันนั้นสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ในความถี่สูงสุด ในทำนองเดียวกัน Ferrie et al. (1995) พบว่าเมื่อนำรังไข่หรือออวุลหรือตาดอกที่ไม่ได้รับการผสมของพืชมาเลี้ยงรังไข่ที่มีถุงเอ็มบริโอพัฒนาอยู่ในระยะที่มี 8 นิวเคลียสสามารถพัฒนาไปเป็นต้นแฮพลอยด์ได้ เนื่องจากแต่ละนิวเคลียสมีโครโมโซม 1 ชุด ในส่วนของออวุลของเยอบีร่ามีการตอบสนองก็ต่อเมื่อออวุลนั้นมีขนาดใหญ่มากกว่าครึ่งของโพรงรังไข่ (Cagnet-Sitbon, 1981) การเลี้ยงรังไข่ของยาสูบที่มีนิวเคลียสเดียว (Zhu et al., 1981; Wu and Chen, 1982) หรือสองนิวเคลียส (Wu and Chen,1982) ระยะของละอองเกสรเป็นผลให้ได้ต้นแฮพลอยต์คล้ายกับการขยายช่วงระยะของถุงเอ็มบริโอให้มากขึ้นเป็นการตอบสนองต่อการพัฒนาการชักนำโดยวิธีการ gynogenetic และการศึกษาระยะที่ดีที่สุดของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย การชักนำให้เกิด gynogenesis ในแตงกวา (*Cucumis sativus* L.) พืช gynogenic ของแตงกวาคองได้ประสบความสำเร็จโดยการเลี้ยงออวุลที่ยังไม่ได้รับการผสม บนพื้นฐานของการศึกษา histological ของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะพัฒนาที่ดีที่สุดสำหรับการชักนำให้เกิดแฮพลอยด์จะคล้ายกันกับระยะ cellularization ของการสร้างถุงเอ็มบริโอ เมื่อ nuclei อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมแล้ว ระยะการพัฒนาของถุงเอ็มบริโอที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงกวา คือ ระยะที่ polar nuclei ทั้ง 2 อันเคลื่อนตัวอยู่ตรงกลางภายในถุงเอ็มบริโอ โดยบางครั้งเยื่อหุ้มเซลล์จะมีการพัฒนารูปแบบและโครงสร้างของเซลล์จะแยกออกจากกัน (Gémes et al.,2002) แต่ Muren (1989) พบว่าการเลี้ยงดอกที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์ของหัวหอมใหญ่โดยนำดอกที่ถุงเอ็มบริโอพัฒนาอยู่ในระยะเมกะสปอร์ซึ่งภายในประกอบด้วยเซลล์ต้นกำเนิดสปอร์เพศเมียที่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ดี แต่ในกรณีทั้งหมดที่กล่าวมานี้จะให้ผลดีที่สุดที่ระยะสุดท้าย ซึ่งไม่เหมือนกันกับการเลี้ยงอับละอองเกสรซึ่งละอองเกสรที่เจริญเต็มที่จะไม่สามารถชักนำโดยกระบวนการ androgenesis ได้

3. การทำ cold-treatment

การทำ cold-treatment มีข้อมูลจากงานวิจัยเพียงเล็กน้อย พบว่าอุณหภูมิไม่ว่าสูงหรือต่ำจะมีผลระงับการรวมตัวกันของเซลล์สืบพันธุ์และสามารถชักนำให้เกิดต้นแฮพลอยด์ได้ (Lynn et al., 1999; Razdan, 2003) การนำรังไข่หรืออออวุลที่ไม่ได้รับการผสมมาเก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิต่ำก่อนนำมาเลี้ยง (pre- treatment) หรือหลังการเลี้ยง (post-treatment) จะมีผลต่อการพัฒนาไปเป็นต้น จากงานวิจัยพบว่าการชักนำรังไข่ของข้าวให้เกิดต้นได้ เมื่อนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ 12-13 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 6 วันก่อนนำมาไว้ที่สภาพการเลี้ยงเนื้อเยื่อปกติ (Zhou and Yang, 1980) ในเยอบีร่าการทำ cold-treatment ของออวุลที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมงก่อนนำออวุลไปเลี้ยงพบว่าไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของแคลลัส (Cagnet-Sitbon, 1980) ในแตงกวาการนำดอกอ่อนมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4 และ 8 วัน ก่อนนำออวุลมาเลี้ยง พบว่าออวุลจากดอกอ่อนที่ไม่ผ่านความเย็น (0 วัน) ออวุลสามารถเกิดเอ็มบริโอได้ดีที่สุด แต่ออวุลที่ผ่านการทำ pre-treatment อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วันสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ในอัตราสูงสุด รองลงมาคือ 4, 2 และ 0 วัน ตามลำดับ (Metwally et al., 1998) จากงานทดลอง Muren (1989) พบว่าการทำ pre-treatment ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วันไม่มีผลต่อการชักนำให้ตอกของหัวหอมใหญ่ที่ไม่ได้รับการผสมสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ เช่นเดียวกับงานทดลองของ Schum et al. (1993) พบว่าการนำรังไข่ของผักชนิดหนึ่งที่คล้ายกับหัวหอมใหญ่ (*Allium porrum* L.) มาทำ post-treatment ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 3, 6 และ 12 วันไม่มีผลต่อการพัฒนาไปเป็นต้น อุณหภูมิต่ำที่ใช้นั้นดูเหมือนจะไม่มีผลต่อการเลี้ยงรังไข่และออวุล เช่นเดียวกับการเลี้ยงอับละอองเกสร (anther culture) ของแตงกวา การทำ pre-treatment และการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเป็นปัจจัยสำคัญของการเลี้ยงอับละอองเกสรให้ประสบความสำเร็จ อุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับสิ่งกระตุ้นบนแหล่งพันธุ์ (ecotype) เช่น แตงกวาจากพื้นที่เขตหนาวจะตอบสนองต่อการทำ cold shock ได้ดี ในทางตรงกันข้ามแตงกวาจากพื้นที่เขตร้อนจะตอบสนองต่อการทำ heat treatment ได้ดี (Song et al., 2007) เช่นเดียวกับการทำ heat treatment ในแตงกวาจากการเลี้ยงในที่มืดนาน 2-5 วัน ที่อุณหภูมิ 24, 28 หรือ 35 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถเพิ่มความถี่ของการเกิด gynogenesis ในระยะของการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียได้ดีที่สุด โดยอุณหภูมิที่ดีที่สุดที่ทำให้เกิดเป็นเอ็มบริโออยู่ที่ 35 องศาเซลเซียส ความถี่สูงสุดของการเกิด gynogenesis คือ 18.4 เปอร์เซ็นต์ และเกิดเป็นต้นสูงสุด คือ 7.1 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์เทคนิคการนับและแยกเซลล์ด้วยวิธี Flow cytometry พบว่า 87.7 เปอร์เซ็นต์ ของต้นพืชเป็นแฮพลอยด์ (Gémes et al., 2002) แต่ความสำเร็จจากการทำ cold treatment ก็มีอยู่บ้างจากการศึกษาในเวลาต่อมา Hassandakht and Compion (2002) พบว่าการนำดอกของหัวหอมใหญ่ไปทำ pre-treatment ที่

อุณหภูมิ 17 องศาเซลเซียส ก่อนการเลี้ยงสามารถชักนำรังไข่ให้สามารถพัฒนาไปแฮพลอยด์ได้ในอัตราที่สูง การศึกษาในข้าวสาลีได้ใช้รังไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสมทั้งหมด 12,000 รังไข่ โดยนำรวงดอกข้าวสาลีมาทำการ pre-treatment ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน หรือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในสารละลาย mannital (0.3 M) นาน 7 วัน ข้อเสนอแนะจากผลการทดลองคือ การทำ cold treatment เป็นเวลา 14 วัน ให้ผลดีกว่าการทำ cold treatment ในสารละลาย mannital (Olfa and Hajer, 2007) และผลของอุณหภูมิ (4 และ 32 องศาเซลเซียส) นาน 0, 4, 7 และ 12 วัน ในการศึกษาการเลี้ยงออวุล summer squash (*Cucurbita pepo* L.) ในลูกผสม 'Queen F_1' พบว่าออวุลที่บ่มไว้ที่ 4 หรือ 32 องศาเซลเซียส นาน 4 วันสามารถตอบสนองและให้ผลผลิต embryogenic ได้ดีที่สุด (Shalaby, 2007)

4. สูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยง

สูตรอาหารเบื้องต้น

งานวิจัยส่วนใหญ่ในช่วงก่อนปี ค.ศ.1950 มักนิยมใช้สูตรอาหาร Nitsch เพื่อการเลี้ยงรังไข่และออวุล อย่างไรก็ตามเมื่อ 70 ปีมานี้ การทดลองได้ประสบความสำเร็จเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Miller, MS หรือ N_6 การทดลองอย่างน้อยหนึ่งการทดลองได้มีการเปรียบเทียบผลของการเลี้ยงชิ้นส่วนในอาหารสูตรเบื้องต้นที่แตกต่างกัน ในการเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมจะต้องใช้อาหารถึง 2 สูตรด้วยกันเพื่อชักนำให้รังไข่พัฒนาไปเป็นต้น โดยสูตรแรกนั้นเป็นอาหารที่ชักนำ (induction) ให้รังไข่สร้างเอ็มบริโอ ซึ่งอาจจะเป็นอาหารสูตร MS หรือ N_6 จากนั้นจึงย้ายเอ็มบริโอที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารสูตรที่สองซึ่งจะช่วยให้เอ็มบริโอพัฒนาไปเป็นต้น (differentiation) โดยอาหารสูตร N_6 จะให้ผลดีที่สุด (Doctrinal et al., 1989) ในเยอบีร่า พบว่าการเลี้ยงในอาหารสูตร MS ให้ผลดีกว่าอาหารสูตร Knop and Heller (Cagnet-Sitbon, 1981) การเพิ่มวิตามิน B และไกลซีน (glycine) ในอาหารสูตร H จากการรายงานพบว่ามีผลให้เกิดการกระตุ้นความถี่ในการชักนำของการเลี้ยงรังไข่ของยาสูบ (Wu and Chen, 1982) นอกจากนี้สูตรอาหาร B5 จากการชักนำพืชแฮพลอยด์จากลูกผสม F_1 ระหว่าง CMS shallot (หอมแดง) กับไซโตพลาสซึมของ *Allium galanthum* และต้นหอม (common onion) โดยการเลี้ยงดอกที่ยังไม่ได้รับการผสม โดยเริ่มต้นเลี้ยงดอกที่ยังไม่ได้รับการผสมจำนวน 535 ดอก สามารถชักนำให้เกิดต้น 25 ต้น (Endang, 2002)

สารควบคุมการเจริญเติบโต

สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญและพัฒนาของออวุลหรือรังไข่ที่นำมาเลี้ยง ซึ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตที่นำมาใช้มีด้วยกัน

หลายชนิดได้แก่ สารในกลุ่มออกซิน สารในกลุ่มไซโทไคนิน นอกจากนั้นยังมีสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นๆ และสารประกอบอินทรีย์ที่ได้จากธรรมชาติ (บุญยืน, 2544) สมดุลของออกซินและไซโทไคนินมีความสำคัญมากในการควบคุมกระบวนการพัฒนาไปเป็นยอดรากหรือแคลลัสของเนื้อเยื่อที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เช่น ถ้าออกซินมีปริมาณสูงและไซโทไคนินมีปริมาณต่ำเนื้อเยื่อจะเจริญเป็นแคลลัสและราก แต่ถ้ามีปริมาณออกซินต่ำและมีปริมาณไซโทไคนินสูงเนื้อเยื่อเจริญเป็นยอดมาก (Skoog and Miller, 1957) สมดุลของออกซินและไซโทไคนินที่ใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับปริมาณฮอร์โมนที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อ ถ้าชิ้นส่วนเนื้อเยื่อมีฮอร์โมนชนิดใดชนิดหนึ่งมากก็อาจจะมีความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดนั้นในอาหารต่ำ เช่นในรังไข่มีปริมาณออกซินค่อนข้างสูง ดังนั้นอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงรังไข่ควรมีส่วนประกอบของไซโทไคนินสูงแต่ออกซินต่ำ (ไพบูลย์, 2524) ในการเลี้ยงรังไข่ของยาสูบได้มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด IAA ความเข้มข้น 0.5-1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Kinetin 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร (Zhu and Wu, 1979; Wu and Chen, 1982) Campion et al. (1990) ได้เลี้ยงรังไข่และดอกของหัวหอมใหญ่บนอาหารสังเคราะห์ โดยเติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ารังไข่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นแอพลอยด์ Keller and Korzun (1996) รายงานถึงการเลี้ยงออวุลที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์ของมันฝรั่งให้เจริญเป็นแคลลัสบนอาหารสังเคราะห์โดยเติม IAA ร่วมกับ kinetin ในการเลี้ยงออวุลของเยอบีร่าได้มีการเติมออกซิน (IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับไซโตไคนิน 2 ชนิด (BA และ Kinetin อย่างละ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าให้ผลดีที่สุด (Cagnet-Sitbon, 1981) Metwally et al. (1998) ได้เลี้ยงออวุลที่ไม่ได้รับการผสมของแตงกวาบนอาหารสังเคราะห์ที่มี 2, 4 - D ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 1, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าอาหารที่มี 2, 4 - D ความเข้มข้น 1 หรือ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ออวุลสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ในจำนวนที่มากกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ (0.1 หรือ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร) และในการเลี้ยงรังไข่ของแตงกวาการเติม TDZ บนอาหารชักนำ (induction media) หลังจากการชักนำจึงย้ายไปยังอาหารใหม่เพื่อการชักนำให้เกิดต้น (regeneration media) โดยเติม NAA และ BAP (Gémes et al., 2002) ใน summer squash (*Cucurbita pepo* L.) การเลี้ยงออวุลบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ Kinetin และ 2,4-D อย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นถึงเปอร์เซ็นต์การตอบสนองของออวุลสูงที่สุด 48.8เปอร์เซ็นต์ และให้ค่าการเกิดเป็นต้นต่อจานเลี้ยง 15 ต้น (Shalaby, 2007) ในพืชกลุ่ม graminaceous เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าว อ้อยและหญ้าอาหารสัตว์ ออกซินมีอิทธิพลเช่น เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (San Noeum, 1976) หรือ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (Wang and Kuang, 1981) ในข้าวบาร์เลย์เติม NAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อ

ลิตร (de Beauville, 1980) ในข้าวเติม MCPA (2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid) ความเข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร (Zhou and Yang, 1980) หรือ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (Kuo, 1982) ในข้าวสาลีเติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (Zhu and Wu, 1979) และการเลี้ยงรังไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสมของ *Psoralea corylifolia* การเติม abscisic acid (ABA) ความเข้มข้น 0.95-5.8 ไมโครโมล ลงในอาหารเพื่อเพิ่มค่าเฉลี่ยของเอ็มบริโอในระยะ cotyledonary พบว่าให้ค่าสูงสุดที่ 34.6 ± 0.7 จากการเริ่มต้นเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม BA ความเข้มข้น 0-8.8 ไมโครโมล อาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติมจิบเบอเรลลิน (GA_3) ความเข้มข้น 0.29-5.8 ไมโครโมล ส่งผลให้ความถี่ของการงอกของเอ็มบริโอสูงขึ้นที่ความถี่สูงสุด 66.7 เปอร์เซ็นต์ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม BA ความเข้มข้น 2.2 ไมโครโมลและ GA_3 ความเข้มข้น 4.3 ไมโครโมล (Chand and Sahrawat, 2007) จากการทดลองเปรียบเทียบในข้าว แสดงให้เห็นว่าเมื่อทำการเลี้ยงดอกที่ยังอ่อนในอาหารเหลวที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตนั้นไม่สำเร็จในการเพิ่มปริมาณของรังไข่ เช่น ในผลผลิตของแคลลัสโดยการชักนำด้วยวิธี gynogenetic การเพิ่มความเข้มข้นของ MCPA จากความเข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้รังไข่เกิดการขยายตัวแต่ออกซินที่ระดับสูง (2 มิลลิกรัมต่อลิตร) จะกระตุ้นการสร้างแคลลัสจากการเลี้ยงผนังรังไข่ค่อนข้างมากกว่าจากถุงเอ็มบริโอ เพราะฉะนั้นระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตทำให้เกิด gynogenesis เพิ่มมากขึ้นและสามารถยับยั้งการเพิ่มปริมาณของเนื้อเยื่อจากเซลล์ร่างกาย ซึ่งได้มีการพิจารณาถึงจุดวิกฤตในการเลี้ยงรังไข่ (Zhou and Yang 1980, 1982)

ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้ในการเลี้ยงรังไข่และออวุลคือ ในข้าวบาร์เลย์ 3-10 เปอร์เซ็นต์ ในข้าวสาลี 8-14 เปอร์เซ็นต์ ในข้าว 3-6 เปอร์เซ็นต์ ในยาสูบ 2 เปอร์เซ็นต์และในเยอบีร่า 3-6 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่มีความเข้มข้นที่แน่นอน ในการทดลองเปรียบเทียบนอกจากการรายงานในการเลี้ยงข้าวซึ่งในการทดลองใช้น้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์และ 9 เปอร์เซ็นต์ ปรากฏว่าไม่มีความเหมาะสมและเสนอแนะให้ใช้ความเข้มข้นที่ 3-6 เปอร์เซ็นต์ (Zhou and Yang 1980, 1982) เช่นเดียวกับการเลี้ยงรังไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสมของ *Psoralea corylifolia* ผลของน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้น 3-6 เปอร์เซ็นต์ของซูโครสหรือมอลโทส ส่งผลให้เกิดการงอกของเอ็มบริโอในสูตรอาหาร MS โดยเพิ่มมอลโทสส่งผลให้การงอกของเอ็มบริโอมีความถี่สูงขึ้น (Chand and Sahrawat, 2007) เช่นเดียวกับ Olfa and Hajer (2007) จากการเติมวิตามินและกลูตามีนและใช้น้ำตาลมอลโทสในอาหารเลี้ยงรังไข่ของข้าวสาลี ผลจากการศึกษานี้เป็นผลให้นักปรับปรุงพันธุ์ได้วิธีการในการผลิตข้าวสาลีสายพันธุ์แท้ในสองสามเดือนต่อมา นอกจากนี้ความเข้มข้นของน้ำตาลยังมี

ความสัมพันธ์กับจีโนไทป์ของพืชดังเช่น การเลี้ยงรังไข่ของป่าน (*Linum usitatissimum* L.) ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลให้ผลแตกต่างกันในการเลี้ยงรังไข่แต่ละจีโนไทป์และไม่มีความแตกต่างทางสถิติในบางจีโนไทป์ ในการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าจีโนไทป์นั้นมีอิทธิพลต่อการเกิดของแคลลัส ในการเลี้ยงรังไข่ของป่านและการที่จะให้ได้ผลดียิ่งขึ้นอาจจะกำหนดระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตและระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่ให้ผลดีในแต่ละจีโนไทป์ (Burbulis et al.,2007) ในฟัก (*Cucurbita pepo* L.) ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 3 ระดับ (30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร เป็นการทดสอบการเลี้ยงออวุลของสายพันธุ์พื้นเมือง (Eskandrani) ความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และออวุลที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS โดยเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุด ส่วนอาหารสูตร MS โดยเติมน้ำตาลซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ไม่สามารถให้ผลผลิตจากการเลี้ยงออวุลได้ (Shalaby, 2007)

อาหารเหลวและอาหารแข็ง

การทดลองเกือบจะทั้งหมดประสบความสำเร็จจากการใช้อาหารแข็ง ยกเว้นการทดลองเริ่มต้นในข้าวซึ่งมีการชักนำเป็น gynogenesis แต่ละอันบนอาหารแข็ง (De Beauville, 1980) หรืออาหารเหลว (Zhou and Yang, 1980) จากการเปรียบเทียบแสดงให้เห็นถึงความได้เปรียบของการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวมากว่าการเลี้ยงด้วยอาหารแข็ง (Zhou and Yang, 1980) Gürel et al. (2000) ได้เลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของชูการ์บีท เพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมบนอาหารที่เติม colchicine หรือ trifluralin พบว่า colchicine ให้จำนวนต้นที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นอีกหนึ่งเท่า (doubled haploid plant) สูงกว่า trifluralin ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดนี้เมื่อใส่ในอาหารเหลวมีประสิทธิภาพสูงกว่าเมื่อใส่ในอาหารแข็งที่เติมซูโครสและวุ้นตามลำดับ Muren (1989) ได้เลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของหัวหอมใหญ่บนอาหารสังเคราะห์ที่เติมวุ้น 0.6 เปอร์เซ็นต์พบว่า รังไข่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้

5. วิธีการเลี้ยง

ตามปกติการเลี้ยงรังไข่จะไม่เลือกทิศทางการวางของชิ้นส่วนบนอาหารแข็ง อย่างไรก็ตาม San Noeum (1976) ได้ตั้งข้อสังเกตถึงผลการทดลองที่ดีกว่าสามารถเกิดได้เมื่อเลี้ยงรังไข่โดยให้ส่วนของรังไข่ด้านข้างอยู่ต่ำกว่าพื้นผิวของอาหาร Wang and Kuang (1981) ได้เลี้ยงรังไข่ของข้าวบาร์เลย์ในแนวตั้งตรงด้วยการตัดผิวด้านนอกให้สัมผัสกับอาหาร นักวิจัยบางคนได้ใช้ตาดอกที่สมบูรณ์หรือชิ้นส่วนของดอกที่พอดีมาเลี้ยง (Maheshwari and Rangaswamy, 1965) ในข้าวพบว่าการเกิด gynogenesis ทีให้ผลดีที่สุดคือ เมื่อแกะเปลือกดอกกับเกสรเพศเมียและเกสรตัวผู้ที่

เชื่อมติดกันอยู่ออกจากฐานรองดอกมาเลี้ยงในอาหารเหลว การนำเฉพาะส่วนเกสรเพศเมียมาเลี้ยงเพียงเดี่ยวๆ พบว่าไม่สามารถชักนำให้เกิด gynogenesis ได้ (Zhou and Yang, 1980) ในข้าวบาร์เลย์การเลี้ยงดอกที่สมบูรณ์ในแนวตั้งฉากบนอาหารแข็งให้ผลดีกว่าการวางเกสรเพศเมียเพียงเดี่ยวๆ แบบไม่เลือกแนวการวาง (Huang et al., 1982) ในเยอบีร่าพบว่าการเลี้ยงรังไข่ทั้งหมดจะไม่ประสบความสำเร็จแต่การแยกเอาเฉพาะออวุลอย่างเดียวมาเลี้ยงจะประสบความสำเร็จได้ดีกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผนังรังไข่เป็นอุปสรรคในการเจริญไปเป็นต้นโดยผ่านแคลลัส (Cagnet - Sitbon, 1980)

6. สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง

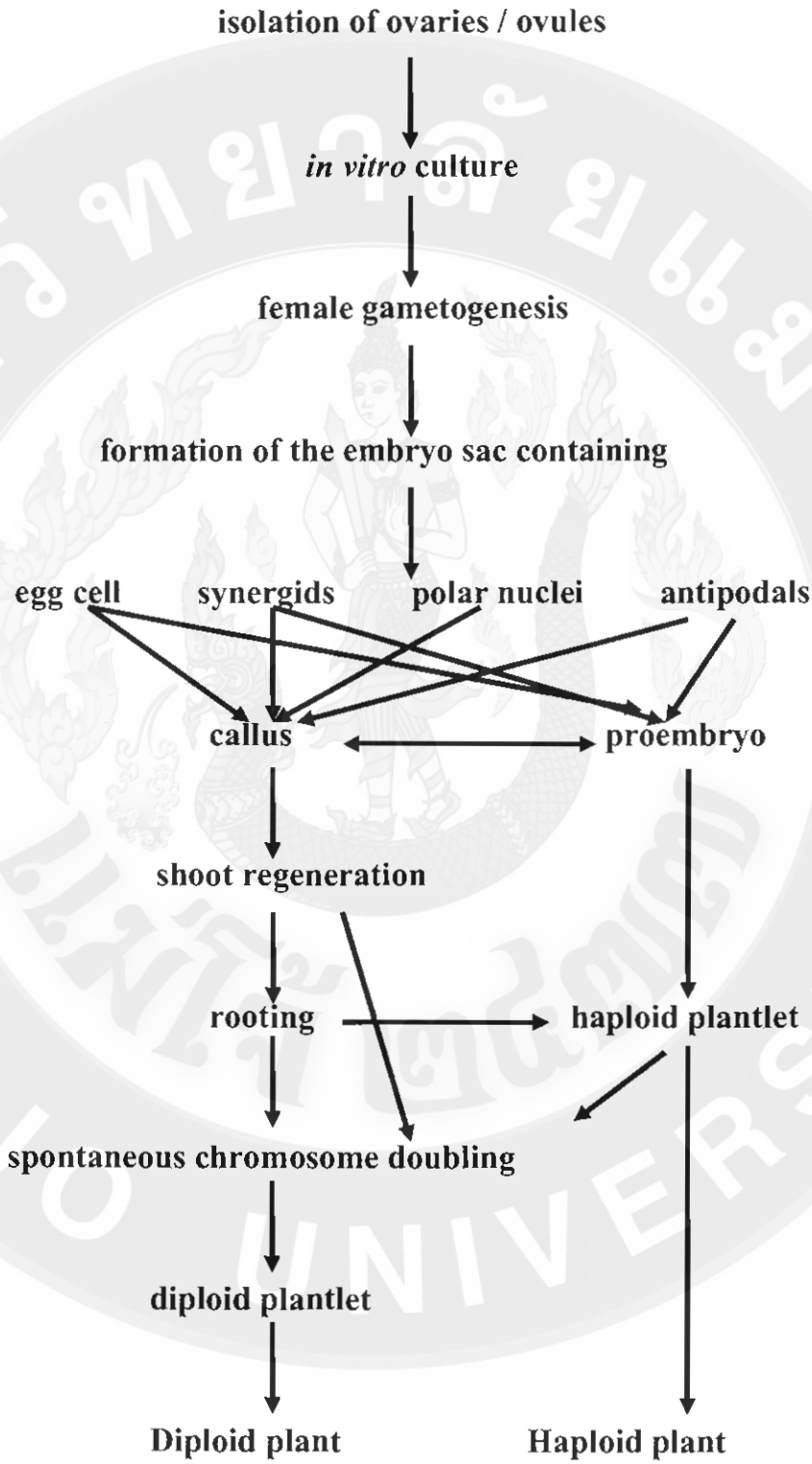
รังไข่หรือออวุลปกติจะถูกบ่มไว้ที่อุณหภูมิช่วง 25-28 องศาเซลเซียส ในที่มืด (Zhou and Yang, 1980) หรือที่แสงประมาณ 10-16 ชั่วโมง (Cagnet-Sitbon, 1981) ในช่วงแสงที่ 500, 1,000, 1,500, 2,000, หรือ 3,000 นาโนเมตร (nm) ซึ่งยังไม่มีรายงานการเปรียบเทียบที่ถูกต้องแน่ชัด (Yang and Zhou, 1982)

การพัฒนาไปเป็นต้นของกระบวนการเกิดแบบ Gynogenesis

ในการระยะแรกของการแบ่งเซลล์ของ gynogenic embryos โดยทั่วไปจะสังเกตได้ในสภาพปกติ รูปแบบของการกระบวนการเกิดเอ็มบริโอ (embryogenesis) ของพืชมีดอกนิวเคลียสของถุงเอ็มบริโอจะแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ไข่หรือทั้งไข่และ antipodals จะเริ่มพัฒนาในระยะการเลี้ยง 2-5 วัน อย่างไรก็ตามสภาวะในการเลี้ยงเนื้อเยื่อการชักนำให้เกิดเป็นเอ็มบริโออาจเกิดได้ไม่สมบูรณ์ เนื่องจากในพืชบางชนิด (spicies) ถุงรังไข่ที่เจริญเต็มที่รังไข่และออวุลยังไม่ได้รับการผสม (Kuo, 1982; Mól, 1992)

การเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์ให้พัฒนาไปเป็นต้นพืชนั้น ในระยะแรกๆ ของการเลี้ยงไข่ในถุงเอ็มบริโอจะแบ่งเซลล์และเจริญเป็นโปรเอ็มบริโอ (proembryo) (Rochon et al., 1998) ซึ่งโปรเอ็มบริโอจะประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีขนาดเล็กซึ่งอยู่ด้านบน (terminal cell) และกลุ่มที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ซึ่งอยู่ด้านล่าง (basal cell) คอยพยุงกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดเล็ก (Clark and Sheridan, 1986) ต่อมาโปรเอ็มบริโอจะแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้นและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เป็นรูปทรงกลม (globular shape) รูปหัวใจ (heart shape) รูปทอร์ปีโด (torpedo shape) และในที่สุดจะพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอหรือต้นอ่อน (Huang et al., 1982)

การเลี้ยงรังไข่หรือออวุลให้พัฒนาไปเป็นต้นนั้น รังไข่หรือออวุลอาจพัฒนาไปเป็นต้นโดยตรงหรือผ่านการเจริญไปเป็นแคลลัสก่อน (ภาพ 2) ภายหลังการเลี้ยงรังไข่ถุงเอ็มบริโอจะขยายขนาดใหญ่ขึ้นและภายในบรรจุไปด้วยเซลล์ไข่ synergids, polar nuclei และ antipodals เซลล์ต่างๆ เหล่านี้จะแบ่งเซลล์และเจริญไปเป็นโปรเอ็มบริโอซึ่งจะพัฒนาไปเป็นต้นแฮพลอยด์โดยตรง อย่างไรก็ตามเซลล์ต่างๆ ในถุงเอ็มบริโออาจแบ่งเซลล์กลายเป็นแคลลัสก่อน จากนั้นแคลลัสจึงพัฒนาไปเป็นยอด (shoot regeneration) แล้วยอดจึงสร้างรากได้เป็นต้นอ่อนและต้นแฮพลอยด์อาจมีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมขึ้นเท่าตัวในธรรมชาติกลายเป็นต้นดิพลอยด์ที่มีโครโมโซมสองชุด (Keller and Korzun, 1996) เช่น การเลี้ยงรังไข่ของหัวหอมใหญ่ให้พัฒนาไปเป็นแคลลัสแล้วจึงชักนำแคลลัสให้พัฒนาไปเป็นยอดและรากจนได้ต้นที่สมบูรณ์ (Kamstaityte and Stanys, 2002) หรือจากการเลี้ยงรังไข่ของข้าวโพดโดยชักนำรังไข่ให้พัฒนาไปเป็นต้นได้โดยตรงหรือพัฒนาผ่านแคลลัสแล้วจึงพัฒนาต่อไปเป็นต้น (Ham, 2000) แต่แคลลัสมักมีการเปลี่ยนแปลงของจีโนไทป์โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงแคลลัสไปเป็นระยะเวลานาน และจีโนไทป์ที่เปลี่ยนแปลงไปสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ ลักษณะที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของจีโนไทป์อาจเป็นลักษณะทางสรีรวิทยา (physiological character) หรือลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological character) (Skirvin, 1978) จากการเลี้ยงรังไข่ของมันฝรั่งบน induction medium เป็นเวลา 2 สัปดาห์พบว่าบริเวณรอยตัดของรังไข่เกิดแคลลัสขึ้นและเมื่อย้ายแคลลัสลง differentiation medium ภายใน 20 วัน globular calluses ปรากฏรากออกมา หลังจากย้ายลงบนอาหาร differentiation medium อีกสูตร ราก ที่ได้สามารถเกิดเป็นยอด (Tao et al., 1985) อย่างไรก็ตาม ปัญหาหนึ่งที่ยังคงมีในการพัฒนาไปเป็นต้นของการเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียคือการควบคุมการพัฒนาของโปรเอ็มบริโอในระหว่างกระบวนการเกิดเอ็มบริโอ เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการพัฒนาไปเป็นแคลลัส การเพิ่มปริมาณของ somatic tissues ทำให้ยากต่อการจำแนก gametophytic จาก sporophytic และอาจยับยั้งการเติบโตของเอ็มบริโอได้ (Keller and Korzun, 1996)



ภาพ 2 รูปแบบการพัฒนาไปเป็นต้นของรังไข่หรือออวุลที่เลี้ยงเนื้อเยื่อ

ที่มา: Keller and Korzun (1996)

ระดับชุดของโครโมโซม (ploidy level)

ระดับชุดของโครโมโซมสามารถประเมินได้โดยวิธีการที่แตกต่างกัน เช่น การนับจำนวนโครโมโซมปลายราก (Darlington, 1937) การนับปริมาณคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบ (Deuter, 1970) การตรวจสอบระดับชีวเคมี (biochemical marker) ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่สร้างขึ้นจากการศึกษาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ (isozyme) สำหรับการตรวจสอบเอนไซม์เป็นการตรวจสอบต้นที่ได้จากเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย รูปแบบของเอนไซม์เปรียบเทียบกับต้นที่ได้จากเซลล์ร่างกาย ถ้าต้นแม่เป็นเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) จะสัมพันธ์กันกับเอนไซม์ (Van Geyt et al., 1987) การวัดค่าปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีโฟลไซโตมิทรี (flow cytometry) โดยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (flow cytometer) และการตรวจสอบโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) โดยใช้เทคนิค SSRs (simple sequence repeats) หรือ microsatellites (Diao et al., 2009) เป็นเทคนิคที่อาศัยความแตกต่างของขนาดเบสที่ซ้ำกันซึ่งมีขนาด 1-5 เบส และใช้เทคนิค PCR (polymerase chain reaction) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ข้อดีของเทคนิคนี้ คือ สะดวก รวดเร็ว มีส่วนของเบสที่ซ้ำกันกระจายทั่ว genome เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดแบบข่มร่วมกัน (codominant) สามารถตรวจสอบความแตกต่างระหว่างเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) และโฮโมไซกัส (homozygous) มีความสามารถในการแยกความแตกต่าง (polymorphism) ได้สูงกว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดอื่น มีความคงตัวสูง (stability) และทำซ้ำได้ (reproducibility) (Powell et al., 1996)

ความถี่ของการเกิดเป็นต้นแฮพลอยด์จากการเลี้ยงรังไข่หรือออวุลมีความแปรปรวนสูง แม้ภายในสปีชีส์เดียวกันก็ให้ผลแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับจีโนไทป์และสภาวะของการทดลอง ดังรายงานการทดลองในหอมซึ่งมีความถี่หลากหลายระหว่าง 40 และ 88 เปอร์เซ็นต์ (Campion et al., 1992) ซึ่งคล้ายคลึงกันในเยอบีร่า (Cappadocia et al., 1988) และข้าว (Zhou et al., 1986) เปอร์เซ็นต์แฮพลอยด์ที่สูงกว่า (จนถึง 100 เปอร์เซ็นต์) ได้มีรายงานในอ้อย (Van Geyt and Jacobs, 1986) ในข้าวบาร์เลย์ พบว่ามีระดับแฮพลอยด์ 100 เปอร์เซ็นต์ (San Noeum, 1976)

การปรากฏระดับชุดโครโมโซมเป็น mixoploid (mixoploidy) อาจเนื่องมาจากความไม่คงตัวของ haploidy ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่าในระยะแรกของ gynogenesis จะเกิดการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม (polyploidization) (Keller, 1990) เช่นเดียวกับการเกิดเป็นต้นที่เป็น di-, tetra, และ polyploidy (Bornman, 1985) พืชดิพลอยด์ (diploids) สามารถเกิดได้จากเซลล์ร่างกายหรือพัฒนามาจากเซลล์สืบพันธุ์ที่ไม่ลดจำนวนโครโมโซมลงครึ่งหนึ่งเนื่องจากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสผิดปกติ (unreduced gametes) ทำให้ได้เซลล์สืบพันธุ์ที่เป็น 2n ต้นพืชที่เป็นโฮโมไซกัสสันนิษฐานได้ว่าเกิดเป็นต้นดิพลอยด์ได้โดยตรง (spontaneous diplodization) เท่านั้น Campion and

Azzimonti (1988) รายงานเปอร์เซ็นต์ของพืชดิพลอยด์ โดยเกิดจาก spontaneous diplodization ในอ้อยพบการเกิด spontaneous doubling 10 เปอร์เซ็นต์ (Lux et al., 1990)

ความคงตัวของ haploidy นั้นขึ้นอยู่กับรูปแบบการพัฒนาไปเป็นต้นของรังไข่และออวุล (gynogenesis) ที่เลี้ยง ความคงตัวของ haploidy มีการค้นพบในอ้อย (Bossoutrot and Hosemans, 1985) และผลงานวิจัยอื่นได้มีการศึกษาโครโมโซมของแคลลัสที่ได้จากออวุลที่ยังไม่ได้รับการผสมของอ้อยและต้นที่ได้จากแคลลัส พบว่าต้นที่ได้เป็น haplo-, di- และ tetraploid รวมทั้ง polyploidy และ aneuploidy ซึ่งพบในแคลลัส (Wang et al., 1991)

บทที่ 3
วิธีการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้มี 4 การทดลองคือ

การทดลองที่ 1 การศึกษาสายพันธุ์แตงกวาที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของออวุลแตงกวา

เป็นการศึกษาสายพันธุ์ของแตงกวา 2 สายพันธุ์คือแตงกวาลูกผสม F_1 พันธุ์ NJ2 และแตงร้าน โดยศึกษาความถี่ของการเกิดเอ็มบริโอในแต่ละสายพันธุ์

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของออวุลแตงกวา (induction medium)

2.1 สูตรอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ/หรือ kinetin

เป็นการศึกษาอิทธิพลของ 2,4-D และ/หรือ kinetin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของออวุลแตงกวา

2.2 สูตรอาหาร CBM (induction medium) ดัดแปลงโดยเติม 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ/หรือ kinetin

เป็นการศึกษาอิทธิพลของ 2,4-D และ/หรือ kinetin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (0, 2.0, 4.0, 6.0 และ 8.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของออวุลแตงกวา

2.3 สูตรอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม α -naphthalene acetic acid (NAA) และ/หรือ 6-benzyl amino purine (BAP)

เป็นการศึกษาอิทธิพลของ NAA และ/หรือ BAP ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของออวุลแตงกวา

2.4 อาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม Thidiazuron (TDZ) ร่วมกับการเติม/ไม่เติมถ่านกัมมันต์ (activated charcoal)

เป็นการศึกษาอิทธิพลของ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (0, 0.02, 0.04 และ 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับการเติม/ไม่เติมถ่านกัมมันต์

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการพัฒนาของออวุลแตงกวา (differentiation medium)

เป็นการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของออวุลแตงกวาโดยนำชิ้นส่วนที่ได้ผลการตอบสนองที่ดีบนอาหารมาเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ ที่เติม

3.1 สูตรอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม α-naphthalene acetic acid (NAA) และ 6-benzyl amino purine (BAP) หรือ kinetin

เป็นการศึกษาอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP หรือ kinetin ที่ความเข้มข้นต่างๆ (6, 7, 8, 9 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร)

3.2 การเจริญพัฒนาของแคลลัสไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ (regeneration plants)

เป็นการศึกษาสูตรอาหารที่สามารถพัฒนาแคลลัสไปเป็นต้นและรากที่สมบูรณ์ โดยการเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตรต่างๆ 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. อาหารสูตร MS
2. อาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม ความเข้มข้น BAP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
3. อาหารสูตร CBM (regeneration medium) ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร
4. อาหารสูตร CBM (regeneration medium)

การทดลองที่ 4 การศึกษาด้านเซลล์วิทยา

เป็นการศึกษาจำนวนโครโมโซมด้วยวิธีการตรวจนับจำนวนโครโมโซมในรากแคลลัสและต้นอ่อนร่วมกับการตรวจด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (Flow cytometer)

4.1 การศึกษาจำนวนชุดโครโมโซมด้วยวิธีการตรวจนับจำนวนโครโมโซมในราก โดยใช้เทคนิค Aceto-orcein squash

4.2 การศึกษาโครโมโซมของแคลลัสแตงกวาโดยการหยดโปรโตพลาสต์

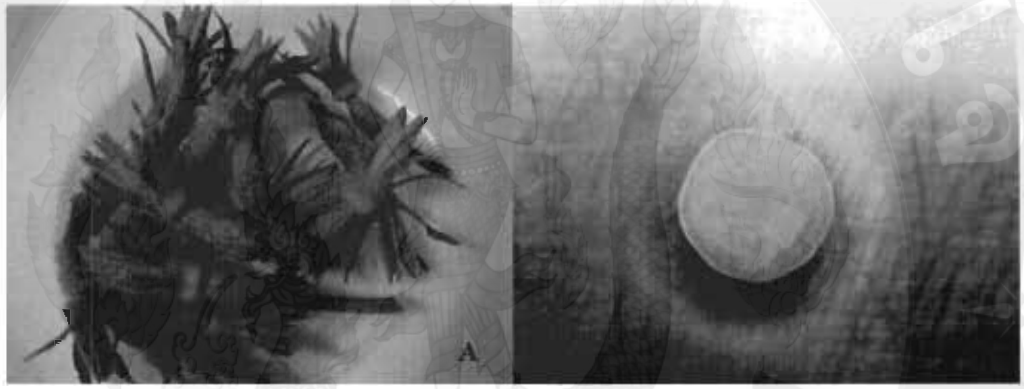
4.2.1 พรีทรีตเมนต์และระยะเวลาในการแช่เอนไซม์มิกซ์ที่เหมาะสม

4.2.2 ระยะเวลาในการแช่ไฮโปโทนิกที่เหมาะสม

4.3 การศึกษาโครโมโซมของต้นอ่อนแตงกวาโดยการหยดโปรโตพลาสต์

วัสดุอุปกรณ์

1. พืชที่ใช้ในการทดลองได้แก่ แตงกวาลูกผสม F_1 พันธุ์ NJ2 (ลูกผสมระหว่างพันธุ์ gynoecious 065035 x gynoecious 0650153 จากโครงการการศึกษาการแสดงเพศดอกของแตงกวา สาขาพืชผัก คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้) และพันธุ์แตงร้าน (บริษัทเจียไต๋ จำกัด) ที่ปลูกในสภาพโรงเรือนพลาสติก สาขาพืชผัก มหาวิทยาลัยแม่โจ้ โดยใช้ดอกเพศเมียก่อนบาน 1 วัน



ภาพ 3 พืชที่ใช้ในการทดลอง (A) ดอกแตงกวาเพศเมียก่อนบาน 1 วัน (B) รังไข่ของแตงกวา (ตัดขวาง)

2. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.1 ธาตุอาหารต่างๆ ตามสูตร MS และ CBM (ภาคผนวกที่ 1)

2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

2.2.1) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)

2.2.2) 6-benzyl amino purine (BAP)

2.2.3) α -naphthalene acetic acid (NAA)

2.2.4) Kinetin

2.2.5) Thidiazuron (TDZ)

3. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาโครโมโซม

5. อุปกรณ์ในการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

เวลา เริ่มดำเนินการ เดือนตุลาคม 2550
สิ้นสุด เดือนพฤษภาคม 2553

สถานที่ - อาคารปฏิบัติการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
- ห้องปฏิบัติการ Maejo-Leuven Biotechnology Project ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ (อาคารเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา) มหาวิทยาลัยแม่โจ้

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาสายพันธุ์แตงกวาที่เหมาะสมต่อการนำมาเลี้ยงออวุล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design CRD) โดยสายพันธุ์ที่นำมาศึกษามี 2 สายพันธุ์คือ แตงกวาลูกผสม F_1 พันธุ์ NJ2 และแตงกวาพันธุ์แตงร้าน รวมทั้งสิ้น 2 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 10 ซ้ำ

ทำการฟอกฆ่าเชื้อตอกเพศเมียก่อนบาน 1 วันของแตงกวา ด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาทีและต่อด้วยคลอรอกซ์ (clorox) 10 เปอร์เซ็นต์ + Tween-20® เป็นเวลา 5 นาทีแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร CBM (induction medium) ดัดแปลงโดยเติม TDZ ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 4 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน จากนั้นจึงย้ายลงอาหารสูตร CBM (regeneration medium) ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 3 กรัมต่อลิตร นำไปเลี้ยงไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซ็นส์ 36 W (Osram cool-white florescent tubes) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง

การบันทึกข้อมูล

ทำการบันทึกผลหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยบันทึกรายละเอียดดังนี้

1. บันทึกเปอร์เซ็นต์ความถี่ของการเกิดเอ็มบริโอ

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) โดยใช้ F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของออวุลแตงกวา (induction medium)

การทดลองที่ 2.1 สูตรอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ/หรือ kinetin

การวางแผนการทดลอง

จัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in Completely Randomized Design) โดยมีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และไคเนติน (kinetin) ที่ระดับความเข้มข้นแต่ละสารควบคุมการเจริญเติบโต 5 ระดับ คือ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งสิ้น 25 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 10 ซ้ำ (ดังตาราง 1)

ทำการฟอกฆ่าเชื้อดอกเพศเมียก่อนบาน 1 วันของแตงกวา ด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาทีและต่อด้วยคลอรอกซ์ (clorox) 10 เปอร์เซ็นต์ + Tween-20® เป็นเวลา 5 นาทีแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D และ kinetin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ นำไปเลี้ยงไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซ็นส์ 36 W (Osram cool-white florescent tubes) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง

ตาราง 1 แสดงระดับความเข้มข้นของ 2,4-D และ kinetin ที่เติมลงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงเพื่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของออวุลแตงกวา

2,4-D (mg/l)	kinetin (mg/l)				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
0	T1	T2	T3	T4	T5
0.5	T6	T7	T8	T9	T10
1.0	T11	T12	T13	T14	T15
1.5	T16	T17	T18	T19	T20
2.0	T21	T22	T23	T24	T25

การบันทึกข้อมูล

ทำการบันทึกผลหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยบันทึกรายละเอียดดังนี้

1. บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส
2. ขนาดและลักษณะของแคลลัส
3. จำนวนรากและยอดที่เกิดขึ้น

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) โดยใช้ F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 2.2 สูตรอาหาร CBM (induction medium) ดัดแปลงโดยเติม 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ/หรือ kinetin

การวางแผนการทดลอง

จัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in Completely Randomized Design) โดยมีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ 2,4-Diehlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ kinetin ที่ระดับความเข้มข้นแต่ละสารควบคุมการเจริญเติบโต 5 ระดับ คือ 0, 2.0, 4.0, 6.0 และ 8.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งสิ้น 25 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 10 ซ้ำ (ดังตาราง 2)

ทำการฟอกฆ่าเชื้อดอกเพศเมียก่อนบาน 1 วันของแตงกวา ด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาทีและต่อด้วยคลอรอกซ์ (clorox) 10 เปอร์เซ็นต์ + Tween-20® เป็นเวลา 5 นาทีแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร CBM ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D และ Kinetin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ นำไปเลี้ยงไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซ็นส์ 36 W (Osram cool-white florescent tubes) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง

ตาราง 2 แสดงระดับความเข้มข้นของ 2,4-D และ kinetin โดยเติมลงในอาหารสูตร CBM (induction medium) ดัดแปลง เพื่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของออวุลแตงกวา

2,4-D (mg/l)	kinetin (mg/l)				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
0	T1	T2	T3	T4	T5
0.5	T6	T7	T8	T9	T10
1.0	T11	T12	T13	T14	T15
1.5	T16	T17	T18	T19	T20
2.0	T21	T22	T23	T24	T25

การบันทึกข้อมูล

ทำการบันทึกผลหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยบันทึกรายละเอียดดังนี้

1. บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส
2. ขนาดและลักษณะของแคลลัส
3. จำนวนรากและยอดที่เกิดขึ้น

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) โดยใช้ F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 2.3 สูตรอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม α-naphthalene acetic acid (NAA) และ/หรือ 6-benzyl amino purine (BAP)

การวางแผนการทดลอง

จัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in Completely Randomized Design) โดยมีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ α-naphthalene acetic acid (NAA) และ/หรือ 6-benzyl amino purine (BAP) ที่ระดับความเข้มข้นแต่ละสารควบคุมการเจริญเติบโต 5 ระดับ คือ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งสิ้น 25 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 10 ซ้ำ (ดังตาราง 3)

ทำการฟอกฆ่าเชื้อดอกเพศเมียก่อนบาน 1 วันของแตงกวา ด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาทีและต่อด้วยคลอรอกซ์ (clorox) 10 เปอร์เซ็นต์ + Tween-20® เป็นเวลา 5 นาทีแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA และ BAP ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ นำไปเลี้ยงไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซ็นส์ 36 W (Osram cool-white florescent tubes) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง

ตาราง 3 แสดงระดับความเข้มข้นของ NAA และ BAP โดยเติมลงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงเพื่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของออวุลแตงกวา

NAA (mg/l)	BAP (mg/l)				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
0	T1	T2	T3	T4	T5
0.5	T6	T7	T8	T9	T10
1.0	T11	T12	T13	T14	T15
1.5	T16	T17	T18	T19	T20
2.0	T21	T22	T23	T24	T25

การบันทึกข้อมูล

ทำการบันทึกผลหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยบันทึกรายละเอียดดังนี้

1. บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส
2. ขนาดและลักษณะของแคลลัส

3. จำนวนรากและยอดที่เกิดขึ้น

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) โดยใช้ F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 2.4 อาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม Thidiazuron (TDZ) ร่วมกับการเติม/ไม่เติมถ่านกัมมันต์ (activated charcoal)

การวางแผนการทดลอง

จัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียลในแผนการทดลองสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in Completely Randomized Design) โดยมีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด Thidiazuron (TDZ) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.02, 0.04 และ 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมถ่าน/ไม่เติมถ่านกัมมันต์ รวมทั้งสิ้น 8 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 3 ซ้ำ (ดังตาราง 4)

ทำการฟอกฆ่าเชื้อดอกเพศเมียก่อนบาน 1 วันของแตงกวา ด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาทีและต่อด้วยคลอรอกซ์ (clorox) 10 เปอร์เซ็นต์ + Tween-20® เป็นเวลา 5 นาทีแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับการเติมถ่าน/ไม่เติมถ่านกัมมันต์ นำไปเลี้ยงไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซ็นส์ 36 W (Osram cool-white florescent tubes) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง

ตาราง 4 แสดงระดับความเข้มข้นของ TDZ ร่วมกับการมีถ่าน/ไม่มีถ่านกัมมันต์ ในอาหารสูตร MS ดัดแปลง เพื่อการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอของออวุลแตงกวา

ถ่านกัมมันต์	TDZ (mg/l)			
	0	0.02	0.04	0.06
ไม่มี	T1	T2	T3	T4
มี	T5	T6	T7	T8

การบันทึกข้อมูล

ทำการบันทึกผลหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยบันทึกรายละเอียดดังนี้

1. บันทึกเปอร์เซ็นต์ความถี่ของการเกิดเอ็มบริโอ

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) โดยใช้ F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการพัฒนาของออวุลแตงกวา (differentiation medium)

การทดลองที่ 3.1 สูตรอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม α-naphthalene acetic acid (NAA) ร่วมกับ 6-benzyl amino purine (BAP) หรือ kinetin

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) โดยสูตรอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP หรือ kinetin ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 6, 7, 8, 9 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งสิ้น 10 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 10 ซ้ำ (ดังตาราง 5)

จากการทดลองที่ 1.1 สูตรอาหารที่ออวุลมีการตอบสนองบนอาหารที่ดีคือ มีลักษณะสีเหลืองและเกาะกันหลวมๆ มาเลี้ยงต่อในอาหารสูตรอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP หรือ kinetin ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 6, 7, 8, 9 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเลี้ยงไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซ็นส์ 36 W (Osram cool-white florescent tubes) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง

ตาราง 5 แสดงระดับความเข้มข้นของ NAA ร่วมกับ BAP หรือ kinetin ที่เติมลงในอาหารสูตร MS ดัดแปลง เพื่อการพัฒนาของแคลลัสออวุลแตงกวา

NAA	BAP (mg/l)					BAP (mg/l)				
(mg/l)	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0
0.5	T1	T2	T3	T4	T5	T1	T2	T3	T4	T5

การบันทึกข้อมูล

ทำการบันทึกผลหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยบันทึกรายละเอียดดังนี้

1. บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส
2. ขนาดและลักษณะของแคลลัส
3. จำนวนรากและยอดที่เกิดขึ้น

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) โดยใช้ F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 3.2 การเจริญพัฒนาของแคลลัสไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ (regeneration plants)

เป็นการศึกษาสูตรอาหารที่สามารถพัฒนาแคลลัสไปเป็นต้นและรากที่สมบูรณ์ โดยนำแคลลัสที่มีสีเขียว เหลืองและมีลักษณะที่เกาะกันอย่างหลวมๆ ที่ได้จากสูตรอาหารต่างๆ นำมาเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ 4 ขั้นตอน ดังนี้

1. อาหารสูตร MS
2. อาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม BAP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
3. อาหารสูตร CBM (regeneration medium) ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร
4. อาหารสูตร CBM (regeneration medium)

นำไปเลี้ยงไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซ็นส์ 36 W (Osram cool-white florescent tubes) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง

บันทึกการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงของแคลลัสในแต่ละขั้นตอนหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์

การทดลองที่ 4 การศึกษาด้านเซลล์วิทยา

เป็นการศึกษาจำนวนชุดโครโมโซมด้วยวิธีการตรวจนับจำนวนโครโมโซมในรากแคลลัสและต้นอ่อน ร่วมกับการตรวจด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (Flow cytometer)

การทดลองที่ 4.1 การศึกษาจำนวนชุดโครโมโซมด้วยวิธีการตรวจนับจำนวนโครโมโซมในรากโดยใช้เทคนิค Aceto-orcein squash

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัดรากยาวประมาณ 1 เซนติเมตร

2. ย้ายรากลง PDB (1,4-Dichlorobenzene) 2 เปอร์เซ็นต์แช่ไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

3. ตรึงรากด้วย carnoy's solution เตรียมจาก 3 absolute ethanol: 1 glacial acetic acid) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. ล้างรากด้วยเอทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ก่อนเก็บไว้ในเอทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อาจเก็บไว้ได้นานหลายเดือน

5. ตัดปลายรากแช่ใน 1 N HCl เป็นเวลา 5 นาที

6. ย้อมด้วยสี aceto-orcein 1 เปอร์เซ็นต์ ปิดด้วยแผ่นสไลด์ เคาะเบาๆ ให้เซลล์มีการกระจายตัว กดสไลด์ นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์เพื่อหาเซลล์เดี่ยวที่มีโครโมโซมในระยะเมตาเฟสเพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซมในแต่ละเซลล์

การทดลองที่ 4.2 การศึกษาโครโมโซมของแคลลัสแตงกวาโดยการหยดโปรโต-พลาสต์

การทดลองที่ 4.2.1 พรีทรีตเมนต์และระยะเวลาในการแช่เอนไซม์มิกซ์ที่เหมาะสม

โดยการแช่แคลลัสลงในพรีทรีตเมนต์ 3 สูตร คือ อาหารเหลวสูตร MS อาหารเหลวสูตร MS ที่มีโคลชิซิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ อาหารเหลวสูตร MS ที่มี 8-hydroxyquinoline 0.05 เปอร์เซ็นต์

ระยะเวลาในการแช่เอนไซม์มิกซ์ 3 ระยะเวลาคือ 1, 2 และ 3 ชั่วโมง

อุปกรณ์และวิธีการ

แคลลัสแตงกวาที่นำมาใช้ในการทดลอง (plant material)

แคลลัสที่นำมาใช้ในการทดลองชักนำจากตอกแตงกวาเพศเมียก่อนบาน 1 วันที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตรและวุ้น 10 กรัมต่อลิตร ภายใต้อุณหภูมิ

25±2 องศาเซลเซียส แสงจากหลอดฟลูออเรสเซ็นส์ 36 W (Osram cool-white florescent tubes) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง

การเตรียมโครโมโซมโดยการหยดโปรโตพลาสต์ (protoplast dropping method)

1. นำก้อนแคลลัสขนาด 10 – 20 มิลลิกรัม ย้ายแคลลัสลงอาหารใหม่ สูตร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไว้ก่อนหน้า 5 – 7 วัน ใส่ลงในหลอดน้ำเย็นจัด (cold shock treatment) นาน ข้ามคืน

2. ย้ายลงในพรีทรีตเมนต์วางบนเครื่องเขย่านาน 5 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง โดยพรี - ทรีตเมนต์ 3 สูตร คืออาหารเหลวสูตร MS อาหารเหลวสูตร MS ที่มีโคลชิซิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ และอาหารเหลวสูตร MS ที่มี 8-hydroxyquinoline 0.05 เปอร์เซ็นต์

3. ย้ายลงในน้ำยาตรึงที่เตรียมใหม่ (เตรียมจาก 3 absolute ethanol: 1 glacial acetic acid) ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

4. เติมเอนไซม์มิกซ์ 100 ไมโครลิตร ปิดฝาแน่น วางไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1, 2 และ 3 ชั่วโมง (การเตรียมเอนไซม์มิกซ์ 10 มิลลิลิตร ใช้ 1000 unit of cellulase (Sigma C-1184 from *Aspergillus niger*) และ 650 unit of pectinase (Sigma P-4716 from *Aspergillus niger*) ลงใน 0.1 M Citrate Buffer (pH 4.6))

5. ใช้ yellow tip คนแคลลัสในเอนไซม์มิกซ์ โดยคน 2 รอบ

6. กรองเอาเซลล์/โปรโตพลาสต์ผ่านแผ่นกรอง ขนาด 60 mesh โดยล้างด้วย Sorbitol 0.6 M วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 70 x g 5 นาที เทส่วนบนทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง

7. เติม hypotonic solution 0.075 M KCl ผสมให้ทั่ว วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที ปั่นเหวี่ยงเหมือนเดิม เททิ้งส่วนบน

8. ค่อยๆ เติมน้ำยาตรึงที่เตรียมใหม่ วางทิ้งไว้ 10 นาที ปั่นเหวี่ยง 5 นาที เทส่วนบนทิ้ง เติมน้ำยาตรึง คนให้เข้ากันเบาๆ ปั่นเหวี่ยง ทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง สุดท้ายเติมน้ำยาตรึงเพียงเล็กน้อย

9. หยดเซลล์/โปรโตพลาสต์ลงบนแผ่นสไลด์เย็นและเปียก เมื่อสไลด์เกือบแห้งให้ dehydrate โดยจุ่มลงใน absolute ethanol ตากให้แห้ง แล้วย้อมสี Giemsa 5 เปอร์เซ็นต์ใน phosphate buffer pH 6.9

การทดลองที่ 4.2.2 ระยะเวลาในการแช่ไฮโปโทนิกที่เหมาะสม

โดยการแช่แคลลัสลงใน hypotonic solution 0.075 M KCl นาน 0, 5, 10 และ 15 นาที

อุปกรณ์และวิธีการ

แคลลัสแตงกวาที่นำมาใช้ในการทดลอง (plant material)

แคลลัสที่นำมาใช้ในการทดลองชักนำจากดอกแตงกวาเพศเมียก่อนบาน 1 วันที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตรและวุ้น 10 กรัมต่อลิตร ภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส แสงจากหลอดฟลูออเรสเซ็นส์ 36 W (Osram cool-white florescent tubes) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง

การเตรียมโครโมโซมโดยการหยดโปรโตพลาสต์ (protoplast dropping method)

1. นำก้อนแคลลัสขนาด 10-20 มิลลิกรัม ย้ายแคลลัสลงอาหารใหม่ ไว้ก่อนหน้า 5-7 วัน ใส่ลงในหลอดน้ำเย็นจัด (cold shock treatment) นานข้ามคืน

2. ย้ายลงในพรีทรีตเมนต์ อาหารเหลวสูตร MS ที่มี 8-hydroxyquinoline 0.05 เปอร์เซ็นต์ วางบนเครื่องเขย่านาน 5 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

3. ย้ายลงในน้ำยาตรึงที่เตรียมใหม่ (เตรียมจาก 3 absolute ethanol: 1 glacial acetic acid) ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

4. เติมเอนไซม์มิกซ์ 100 ไมโครลิตร ปิดฝาแน่น วางไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง (การเตรียมเอนไซม์มิกซ์ 10 มิลลิลิตร ใช้ 1000 unit of cellulase (Sigma C-1184 from *Aspergillus niger*) และ 650 unit of pectinase (Sigma P-4716 from *Aspergillus niger*) ลงใน 0.1 M Citrate Buffer (pH 4.6))

5. ใช้ yellow tip คนแคลลัสในเอนไซม์มิกซ์ โดยคน 2 รอบ

6. กรองเอาเซลล์/โปรโตพลาสต์ผ่านแผ่นกรอง ขนาด 60 mesh โดยล้างด้วย Sorbitol 0.6 M วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 70 x g 5 นาที เทส่วนบนทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง

7. เติม hypotonic solution 0.075 M KCl ผสมให้ทั่ว วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 0, 5, 10 และ 15 นาที ปั่นเหวี่ยงเหมือนเดิม เททิ้งส่วนบน

8. ค่อยๆ เติมน้ำยาตรึงที่เตรียมใหม่ วางทิ้งไว้ 10 นาที ปั่นเหวี่ยง 5 นาที เทส่วนบนทิ้ง เติมน้ำยาตรึง คนให้เข้ากันเบาๆ ปั่นเหวี่ยง ทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง สุดท้ายเติมน้ำยาตรึงเพียงเล็กน้อย

9. หยดเซลล์/โปรโตพลาสต์ลงบนแผ่นสไลด์เย็นและเปียก เมื่อสไลด์เกือบแห้งให้ dehydrate โดยจุ่มลงในแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ ตากให้แห้ง แล้วย้อมสี Giemsa 5 เปอร์เซ็นต์ใน phosphate buffer pH 6.9

การทดลองที่ 4.3 การศึกษาโครโมโซมของต้นอ่อนแตงกวาโดยการหยดโปรโต-พลาสต์

ต้นอ่อนแตงกวาที่นำมาใช้ในการทดลอง (plant material)

ต้นอ่อนที่นำมาใช้ในการทดลองชักนำจากดอกแตงกวาเพศเมียก่อนบาน 1 วันที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเกิดแคลลัสจึงย้ายลงอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สลับกับอาหารสูตร CBM (regeneration medium) ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส แสงจากหลอดฟลูออเรสเซ็นส์ 36 W (Osram cool-white florescent tubes) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง

การเตรียมโครโมโซมโดยการหยดโปรโตพลาสต์ (protoplast dropping method)

1. นำต้นอ่อน ย้ายแคลลัสลงอาหารใหม่ไว้ก่อนหน้า 5-7 วัน ใส่ลงในหลอดน้ำเย็นจัด (cold shock treatment) นานข้ามคืน

2. ย้ายลงในพรีทรีตเมนต์ อาหารเหลวสูตร MS ที่มี 8-hydroxyquinoline 0.05 เปอร์เซ็นต์ วางบนเครื่องเขย่านาน 5 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

3. ย้ายลงในน้ำยาตรึงที่เตรียมใหม่ (เตรียมจาก 3 absolute ethanol: 1 glacial acetic acid) ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

4. เติมเอนไซม์มิกซ์ 100 ไมโครลิตร ปิดฝาแน่น วางไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง (การเตรียมเอนไซม์มิกซ์ 10 มิลลิลิตร ใช้ 1000 units of cellulase (Sigma C-1184 from *Aspergillus niger*) และ 650 unit of pectinase (Sigma P-4716 from *Aspergillus niger*) ลงใน 0.1 M Citrate Buffer (pH 4.6))

5. ใช้ yellow tip คนต้นอ่อนในเอนไซม์มิกซ์ โดยคน 2 รอบ

6. กรองเอาเซลล์/โปรโตพลาสต์ผ่านแผ่นกรอง ขนาด 60 mesh โดยล้างด้วย Sorbitol 0.6 M วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 70 x g 5 นาที เทส่วนบนทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง

7. เติม hypotonic solution 0.075 M KCl ผสมให้ทั่ว วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที ปั่นเหวี่ยงเหมือนเดิม เททิ้งส่วนบน

8. ค่อยๆ เติมน้ำยาตรึงที่เตรียมใหม่ วางทิ้งไว้ 10 นาที ปั่นเหวี่ยง 5 นาที เทส่วนบนทิ้ง เติมน้ำยาตรึง คนให้เข้ากันเบาๆ ปั่นเหวี่ยง ทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง สุดท้ายเติมน้ำยาตรึงเพียงเล็กน้อย

9. หยดเซลล์/โปรโตพลาสต์ลงบนแผ่นสไลด์เย็นและเปียก เมื่อสไลด์เกือบแห้งให้ dehydrate โดยจุ่มลงในแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ ตากให้แห้ง แล้วย้อมสี Giemsa 5 เปอร์เซ็นต์ใน phosphate buffer pH 6.9

การทดลองที่ 4.4 วิธีการตรวจสอบด้วยวิธีการโฟล ไซโตมิทรี (Flow cytometry)

การเตรียมตัวอย่างของพืชเพื่อวิเคราะห์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (nuclear DNA analysis)

1. การแยกนิวเคลียสออกจากเนื้อเยื่อพืชโดยการสับ (chopping) เนื้อเยื่อพืชในน้ำยา hypotonic ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่ช่วยในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease) สามารถช่วยรักษาให้นิวเคลียสมีความสมบูรณ์ โดยนำใบอ่อนของแตงกวา เติม Extraction buffer 500 ไมโครลิตร สับให้ละเอียด ในการสับตัวอย่างควรระมัดระวังไม่ให้ตัวอย่างพืชซ้ำโดยใช้ใบมีดโกนใหม่ จากนั้นดูดสารแขวนลอยตัวอย่างกรองผ่านตัวกรองไนลอนขนาด 30-50 ไมโครเมตร

2. การย้อมนิวเคลียสด้วยสีย้อมดีเอ็นเอ (DNA specific fluorochromes) โดยเติม staining buffer (DAPI) 1 มิลลิกรัมลิตร ซึ่งเป็นสารเรืองแสงที่มีความสามารถในการย้อมดีเอ็นเอ ลงในสารแขวนลอยตัวอย่างที่กรองแล้ว

3. ทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอหรือจำนวนชุดโครโมโซมของตัวอย่างด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (PAII, Partec ประเทศเยอรมัน) (ภาพผนวก 2) โดยการตรวจวัดจากความเข้มของแสงฟลูออร์เรสเซ็นส์จากนิวเคลียสเดี่ยวๆ

ตัวอย่างตรวจสอบโดยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาการเลี้ยงออวุลของแตงกวา โดยการเลี้ยงบนอาหารชักนำ (induction medium) และย้ายลงอาหารเพื่อการพัฒนาของแคลลัสหรือเอมบริโอจีนิกแคลลัส (embryogenic callus) เพื่อการเกิดต้นพืชที่สมบูรณ์ ตลอดจนการศึกษาด้านเซลล์วิทยา โดยทำการศึกษาทั้งสิ้น 4 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 การศึกษาสายพันธุ์แตงกวาที่เหมาะสมต่อการนำมาเลี้ยงออวุล การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของสูตรอาหารดัดแปลงโดยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของออวุลแตงกวา (induction medium) การทดลองนี้แบ่งเป็น 4 การทดลองย่อย ดังนี้ คือ การทดลองที่ 2.1 สูตรอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ/หรือ kinetin การทดลองที่ 2.2 สูตรอาหาร CBM (induction medium) ดัดแปลงโดยเติม 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ/หรือ kinetin การทดลองที่ 2.3 สูตรอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม α -naphthalene acetic acid (NAA) และ/หรือ 6-benzyl amino purine (BAP) การทดลองที่ 2.4 อาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม Thidiazuron (TDZ) ร่วมกับการเติม/ไม่เติมถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาของออวุลแตงกวา (differentiation medium) โดยแบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้ การทดลองที่ 3.1 สูตรอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม α -naphthalene acetic acid (NAA) และ 6-benzyl amino purine (BAP) การทดลองที่ 3.2 การเจริญพัฒนาของแคลลัสไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ (regeneration plants) และการทดลองที่ 4 การศึกษาด้านเซลล์วิทยาโดยศึกษาจำนวนโครโมโซมด้วยวิธีการตรวจนับจำนวนโครโมโซมในราก แคลลัสและต้นอ่อนร่วมกับการตรวจด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (Flow cytometer)

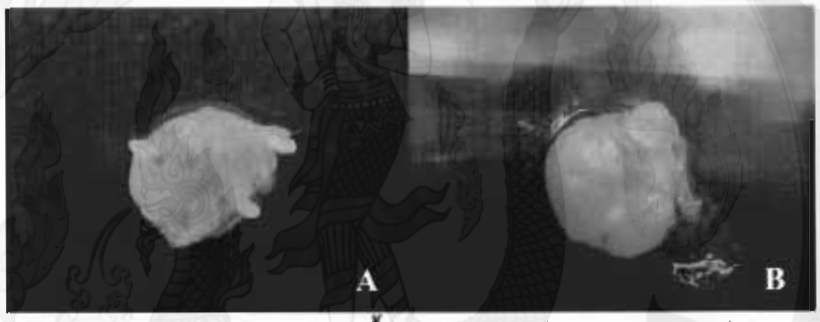
การทดลองที่ 1 การศึกษาสายพันธุ์แตงกวาที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของออวุลแตงกวา

จากการศึกษาสายพันธุ์แตงกวา 2 สายพันธุ์คือแตงกวาลูกผสม F_1 พันธุ์ NJ2 และแตงร้าน ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร CBM (induction medium) ดัดแปลงโดยเติม TDZ ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน จากนั้นจึงย้ายลงอาหารสูตร CBM (regeneration medium) ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า แตงกวาลูกผสม F_1 พันธุ์ NJ2 ทั้งหมดที่เลี้ยง 393 ชิ้น สามารถเจริญและพัฒนาเป็นเอ็มบริโอ

ได้ 27 ชิ้น หรือเท่ากับ 6.90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนพันธุ์แตงร้านที่เลี้ยงทั้งหมด 340 ชิ้น สามารถเจริญและพัฒนาเป็นเอ็มบริโอได้ 10 ชิ้น หรือเท่ากับ 2.91 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของการเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอคือมีลักษณะเป็นตุ่มสีขาวและชิ้นส่วนเกิดเป็นแคลลัส (ตาราง 6 ภาพ 4)

ตาราง 6 เปอร์เซ็นต์ความถี่ของการเกิดเอ็มบริโอของออวุลแตงกวาสองสายพันธุ์

สายพันธุ์	จำนวนรังไข่ที่เลี้ยง	จำนวนของรังไข่ที่ตอบสนอง	เปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอ
NJ2	393	27	6.90
แตงร้าน	340	10	2.91



ภาพ 4 การเกิดเอ็มบริโอของออวุลแตงกวาทั้งสองสายพันธุ์ (A) สายพันธุ์ NJ2 (B) สายพันธุ์แตงร้าน

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของออวุลแตงกวา (induction medium)

การทดลองที่ 2.1 สูตรอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ/หรือ kinetin

จากการศึกษาเลี้ยงออวุลของแตงกวา ก่อนบาน 1 วัน บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด 2,4-D และ/หรือ kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 5 ระดับคือ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 สัปดาห์เพื่อศึกษาถึงอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของออวุลแตงกวา พบว่าออวุลมีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้ดีที่สุดบนอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ออวุลมีการเจริญและพัฒนามากที่สุดเท่ากับ 61 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนที่เลี้ยง แคลลัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 1.07 เซนติเมตร แคลลัส

มีสีเหลืองลักษณะแบบเกาะกันหลวมๆ (friable callus) และสามารถชักนำให้เกิดรากได้รวม 2 ราก รองลงมาคืออาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ออวุลมีการเจริญและพัฒนาเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนที่เลี้ยง แคลลัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 1.06 เซนติเมตร แคลลัสมีสีขาวลักษณะแบบ friable callus ส่วนออวุลที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลงโดยเติม kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตเป็นแคลลัสน้อยที่สุด (ตาราง 7 ภาพ 5)

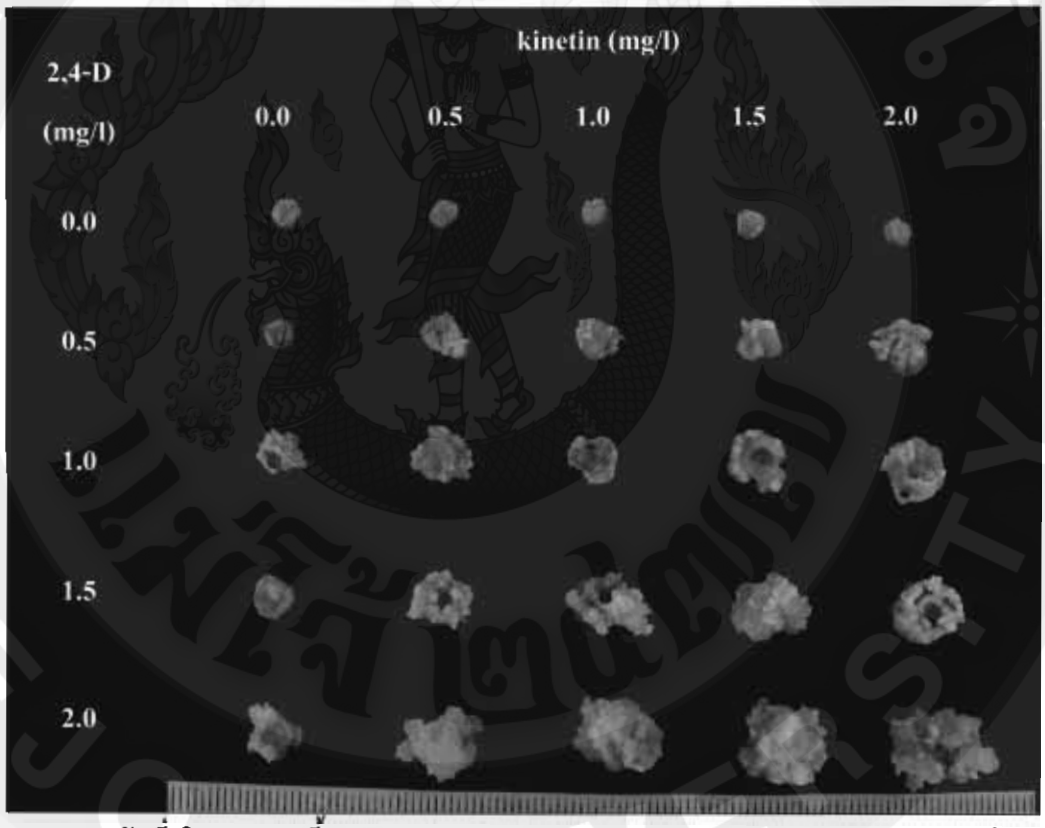
ตาราง 7 ผลของอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D และ/หรือ kinetin ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของออวุลแตงกวา เป็นเวลา 5 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต		การเจริญเติบโตของออวุล (เปอร์เซ็นต์)	การเกิดอวัยวะ		ขนาดแคลลัสเฉลี่ย (เซนติเมตร)	ลักษณะการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของออวุล
2,4-D (mg/l)	kinetin (mg/l)		ยอด	ราก		
0.0	0.0	0	0	0	0.47±0.05	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลและชีดตาย
0.0	0.5	0	0	0	0.47±0.05	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล (ตาย)
0.0	1.0	9	0	0	0.48±0.04	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล (ตาย)
0.0	1.5	10	0	0	0.50±0.05	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล (ตาย)
0.0	2.0	11	0	0	0.51±0.06	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล (ตาย)
0.5	0.0	25	0	0	0.58±0.08	ชิ้นส่วนไม่มีการเปลี่ยนแปลง
0.5	0.5	28	0	0	0.59±0.11	แคลลัสมีสีขาวเกาะกันอย่างหลวมๆ
0.5	1.0	30	0	0	0.63±0.18	แคลลัสมีสีขาวเกาะกันอย่างหลวมๆ
0.5	1.5	27	0	0	0.61±0.13	แคลลัสมีสีขาวเกาะกันอย่างหลวมๆ
0.5	2.0	31	0	1	0.68±0.19	แคลลัสมีสีขาวเกาะกันอย่างหลวมๆ
1.0	0.0	39	0	0	0.68±0.15	แคลลัสมีสีขาวเกาะกันอย่างหลวมๆ
1.0	0.5	34	0	0	0.84±0.34	แคลลัสมีสีขาวเกาะกันอย่างหลวมๆ
1.0	1.0	34	0	0	0.76±0.10	แคลลัสมีสีขาวเกาะกันอย่างหลวมๆ
1.0	1.5	41	0	0	0.81±0.10	แคลลัสมีสีขาวเกาะกันอย่างหลวมๆ
1.0	2.0	45	0	0	0.89±0.16	แคลลัสมีสีขาวเกาะกันอย่างหลวมๆ
1.5	0.0	50	0	0	0.70±0.14	แคลลัสมีสีขาวเกาะกันอย่างหลวมๆ
1.5	0.5	51	0	0	0.74±0.16	แคลลัสมีสีขาวเกาะกันอย่างหลวมๆ
1.5	1.0	36	0	0	0.92±0.10	แคลลัสมีสีขาวเกาะกันอย่างหลวมๆ
1.5	1.5	42	0	0	0.96±0.35	แคลลัสมีสีเหลืองเกาะกันอย่างหลวมๆ
1.5	2.0	54	0	1	0.85±0.19	แคลลัสมีสีขาวเกาะกันอย่างหลวมๆ
2.0	0.0	50	0	0	0.77±0.18	แคลลัสมีสีขาวเกาะกันอย่างหลวมๆ
2.0	0.5	55	0	0	1.06±0.26	แคลลัสมีสีเหลืองเกาะกันอย่างหลวมๆ
2.0	1.0	61	0	2	1.07±0.38	แคลลัสมีสีเหลืองเกาะกันอย่างหลวมๆ

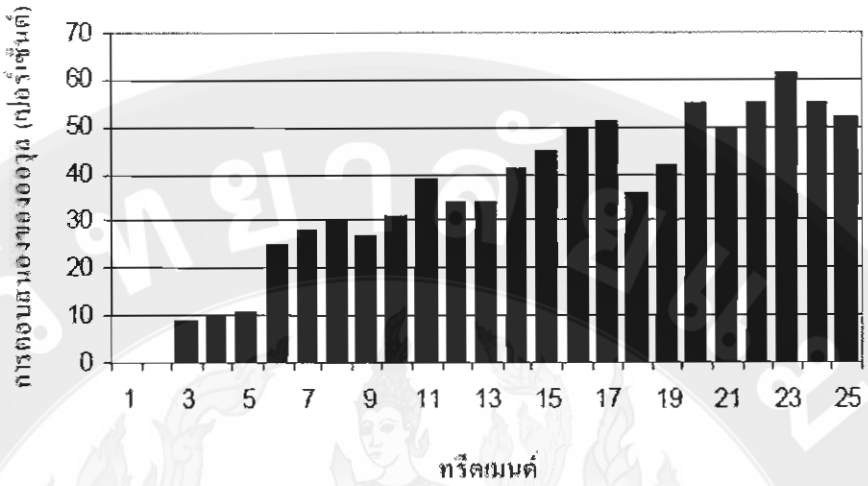
ตาราง 7 (ต่อ)

สารควบคุมการเจริญเติบโต		การเจริญเติบโตของออวุล (เปอร์เซ็นต์)	การเกิดอวัยวะ		ขนาดแคลลัสเฉลี่ย (เซนติเมตร)	ลักษณะการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของออวุล
2,4-D (mg/l)	kinetin (mg/l)		ยอด	ราก		
2.0	1.5	55	0	0	1.02±0.20	แคลลัสมีสีเหลืองเกาะกันอย่างหลวมๆ
2.0	2.0	52	0	0	1.01±0.35	แคลลัสมีสีเหลืองเกาะกันอย่างหลวมๆ

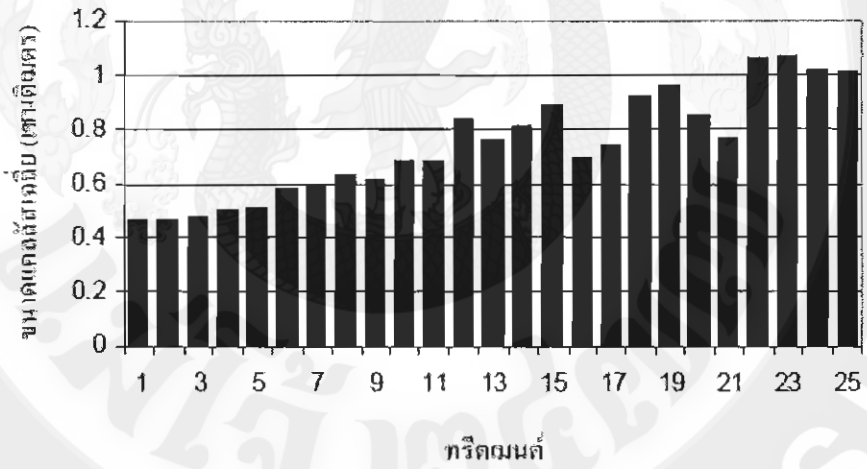
หมายเหตุ ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน



ภาพ 5 แคลลัสที่เกิดจากการเลี้ยงออวุลของแตงกวาบนอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์



ภาพ 6 การเจริญเติบโตของออวุลแตงกวาที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์



ภาพ 7 ขนาดแคลลัสเฉลี่ยของออวุลแตงกวาที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่าง เป็นเวลา 5 สัปดาห์

การทดลองที่ 2.2 สูตรอาหาร CBM (induction medium) ดัดแปลง โดยเติม 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) และ/หรือ kinetin

จากการศึกษาเลี้ยงออวุลของแตงกวาก่อนบาน 1 วัน บนอาหารสูตร CBM ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D และ/หรือ kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 5 ระดับคือ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 สัปดาห์เพื่อศึกษาถึงอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของออวุลแตงกวา พบว่า ออวุลมีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้ดีที่สุดบนอาหาร CBM ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยออวุลมีการเจริญและพัฒนา

มากที่สุดเท่ากับ 72 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนที่เลี้ยง แคลลัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 0.77 เซนติเมตร แคลลัสมีสีเหลืองลักษณะแบบเกาะกันหลวมๆ (friable callus) รอบชิ้นส่วน รองลงมาคืออาหารสูตร CBM ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ออวุลมีการเจริญและพัฒนาเท่ากับ 65 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนที่เลี้ยง แคลลัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 0.67 เซนติเมตร มีสีขาวฟู (ตาราง 8 ภาพ 8)

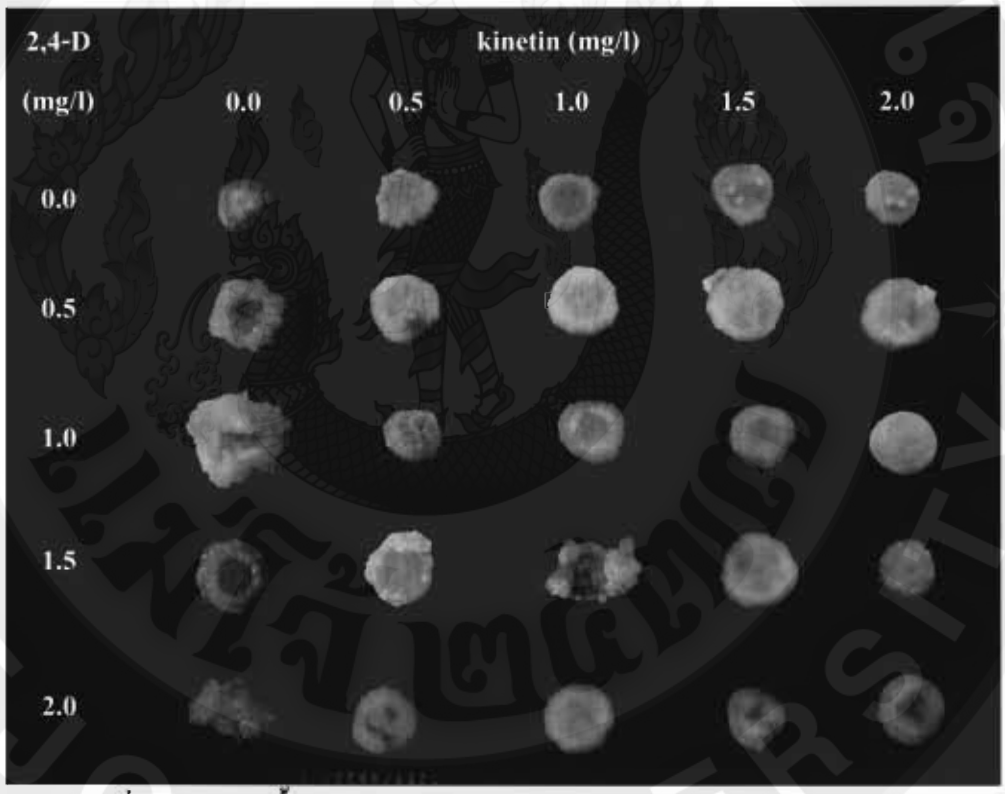
ตาราง 8 ผลของอาหารสูตร CBM (induction medium) ดัดแปลงโดย 2,4-D และ/หรือ kinetin ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของออวุลแดงกวา เป็นเวลา 5 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต		การเจริญเติบโตของออวุล (เปอร์เซ็นต์)	การเกิดอวัยวะ		ขนาดแคลลัสเฉลี่ย (เซนติเมตร)	ลักษณะการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของออวุล
2,4-D (mg/l)	kinetin (mg/l)		ยอด	ราก		
0.0	0.0	0	0	0	0.42±0.06	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล (ตาย)
0.0	0.5	0	0	0	0.46±0.05	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล (ตาย)
0.0	1.0	0	0	0	0.44±0.07	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล (ตาย)
0.0	1.5	32	0	0	0.52±0.06	เอ็มบริโองอกเป็นตุ่มสีขาว
0.0	2.0	39	0	0	0.50±0.08	เอ็มบริโองอกเป็นตุ่มสีขาว
0.0	2.0	39	0	0	0.50±0.08	เอ็มบริโองอกเป็นตุ่มสีขาว
0.5	0.0	16	0	0	0.57±0.09	แคลลัสมีสีเหลืองเกาะกันหลวมๆ รอบชิ้นส่วน
0.5	0.5	58	0	0	0.58±0.09	ชิ้นส่วนขยายขนาดเพิ่มมากขึ้น
0.5	1.0	53	0	0	0.59±0.09	ชิ้นส่วนขยายขนาดเพิ่มมากขึ้น
0.5	1.5	52	0	0	0.63±0.12	ชิ้นส่วนขยายขนาดเพิ่มมากขึ้น
0.5	2.0	65	0	0	0.67±0.09	แคลลัสมีสีขาวฟูเล็กน้อย
1.0	0.0	72	0	0	0.77±0.07	แคลลัสมีสีเหลืองเกาะกันหลวมๆ รอบชิ้นส่วน
1.0	0.5	59	0	0	0.69±0.07	แคลลัสมีสีขาวเกาะกันอย่างหลวมๆ
1.0	1.0	64	0	0	0.64±0.07	แคลลัสมีสีขาวฟูเล็กน้อย
1.0	1.5	64	0	0	0.58±0.08	ชิ้นส่วนขยายขนาดเพิ่มมากขึ้น
1.0	2.0	56	0	0	0.64±0.05	ชิ้นส่วนขยายขนาดเพิ่มมากขึ้น
1.5	0.0	10	0	0	0.48±0.06	แคลลัสมีสีเหลืองเกาะกันหลวมๆ รอบชิ้นส่วน
1.5	0.5	34	0	0	0.53±0.05	แคลลัสมีสีขาวฟูเล็กน้อย
1.5	1.0	59	0	0	0.59±0.06	แคลลัสมีสีเหลืองเกาะกันหลวมๆ
1.5	1.5	62	0	0	0.61±0.07	ชิ้นส่วนขยายขนาดเพิ่มมากขึ้น
1.5	2.0	65	0	0	0.61±0.07	ชิ้นส่วนขยายขนาดเพิ่มมากขึ้น
2.0	0.0	60	0	0	0.61±0.07	แคลลัสมีสีเหลืองเกาะกันหลวมๆ รอบชิ้นส่วน
2.0	0.5	59	0	0	0.60±0.07	ชิ้นส่วนขยายขนาดเพิ่มมากขึ้น
2.0	1.0	47	0	0	0.58±0.07	ชิ้นส่วนขยายขนาดเพิ่มมากขึ้น

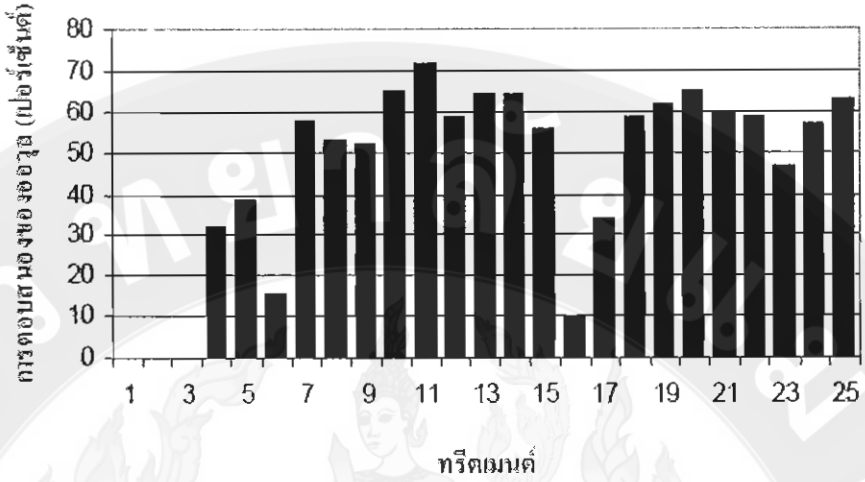
ตาราง 8 (ต่อ)

สารควบคุมการเจริญเติบโต		การเจริญเติบโตของออวุล (เปอร์เซ็นต์)	การเกิดอวัยวะ		ขนาดแคลลัสเฉลี่ย (เซนติเมตร)	ลักษณะการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของออวุล
2,4-D (mg/l)	kinetin (mg/l)		ยอด	ราก		
2.0	1.5	57	0	0	0.57±0.07	ชิ้นส่วนขยายขนาดเพิ่มมากขึ้น
2.0	2.0	63	0	0	0.58±0.08	ชิ้นส่วนขยายขนาดเพิ่มมากขึ้น

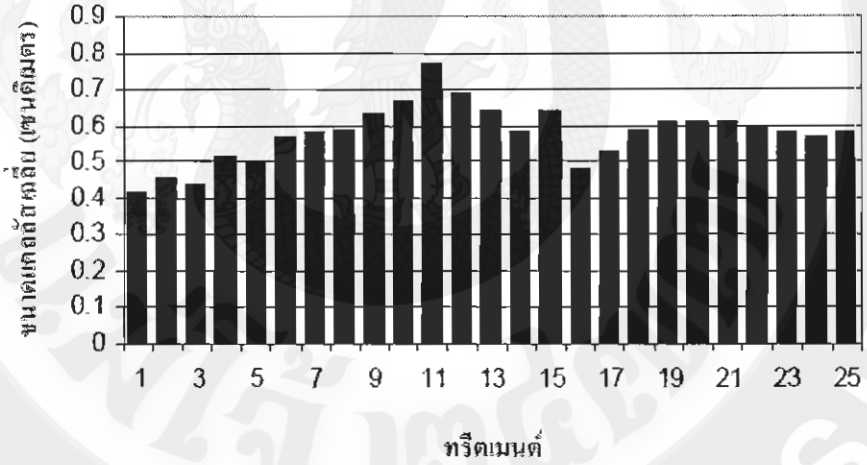
หมายเหตุ ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน



ภาพ 8 แคลลัสที่เกิดจากการเลี้ยงออวุลของแตงกวาบนอาหารสูตร CBM (induction medium) ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์



ภาพ 9 การเจริญเติบโตของออวุลแตงกวาที่เลี้ยงบนอาหารสูตร CBM (induction medium) ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์



ภาพ 10 ขนาดเซลล์เฉลี่ยของออวุลแตงกวาที่เลี้ยงบนอาหารสูตร CBM (induction medium) ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์

การทดลองที่ 2.3 สูตรอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม α -naphthalene acetic acid (NAA) และ/หรือ 6-benzyl amino purine (BAP)

จากการศึกษาเลี้ยงออวุลของแตงกวา ก่อนบาน 1 วัน บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA และ/หรือ BAP ที่ระดับความเข้มข้น 5 ระดับคือ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 สัปดาห์ เพื่อศึกษาถึงอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของออวุลแตงกวา พบว่าออวุลมีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้ดีที่สุดบนอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ออวุลมีการเจริญและพัฒนามากที่สุด

เท่ากับ 54 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนที่เลี้ยง แคลลัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 0.75 เซนติเมตร แคลลัสมีสีขาวครีมเกิดขึ้นรอบชิ้นส่วน มีลักษณะเกาะกันอย่างหลวมๆ รองลงมาคือ อาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ออวุลมีการเจริญและพัฒนาเท่ากับ 53 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนที่เลี้ยง แคลลัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 0.64 เซนติเมตร แคลลัสมีลักษณะสีเขียว คล้ายกำมะหยี่ (ตาราง 9 ภาพ 11)

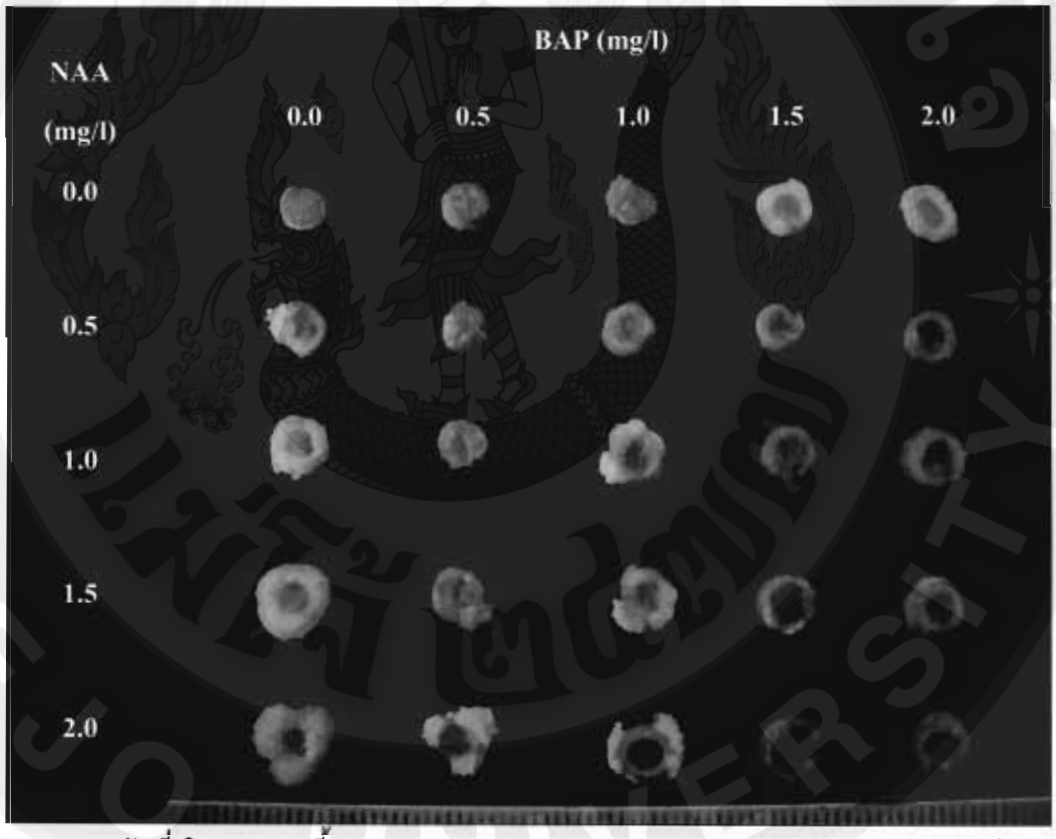
ตาราง 9 ผลของอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลงโดยเติม NAA และ/หรือ BAP ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของออวุลแตงกวา เป็นเวลา 5 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต		การเจริญเติบโตของออวุล (เปอร์เซ็นต์)	การเกิดอวัยวะ		ขนาดแคลลัสเฉลี่ย (เซนติเมตร)	ลักษณะการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของออวุล
NAA (mg/l)	BAP (mg/l)		ยอด	ราก		
0.0	0.0	0	0	0	0.46±0.05	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลและซีดตาย
0.0	0.5	4	0	0	0.47±0.05	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล
0.0	1.0	11	0	0	0.50±0.07	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเกิดแคลลัสเล็กน้อย
0.0	1.5	22	0	0	0.58±0.06	แคลัสสีขาวครีมรอบชิ้นส่วน
0.0	2.0	22	0	0	0.55±0.07	แกลัสสีขาวครีมรอบชิ้นส่วน
0.5	0.0	26	0	0	0.59±0.10	แคลลัสมีสีขาวฟูเล็กน้อยขอบชิ้นส่วน
0.5	0.5	20	0	0	0.59±0.07	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล
0.5	1.0	27	0	0	0.57±0.07	แคลลัสมีสีเขียวลักษณะคล้ายกำมะหยี่
0.5	1.5	30	0	0	0.57±0.07	แคลลัสมีสีเขียวลักษณะคล้ายกำมะหยี่
0.5	2.0	35	0	1	0.63±0.07	แคลลัสมีสีเขียวลักษณะคล้ายกำมะหยี่
1.0	0.0	39	0	0	0.58±0.06	แคลัสสีขาวครีมรอบชิ้นส่วน
1.0	0.5	29	0	0	0.55±0.07	แคลลัสมีสีขาวฟูเล็กน้อยขอบชิ้นส่วน
1.0	1.0	39	0	0	0.60±0.07	แคลลัสมีสีขาวฟูเล็กน้อยขอบชิ้นส่วน
1.0	1.5	41	0	0	0.60±0.07	แคลลัสมีสีเขียวลักษณะคล้ายกำมะหยี่
1.0	2.0	46	0	0	0.69±0.06	แคลลัสมีสีเขียวลักษณะคล้ายกำมะหยี่
1.5	0.0	49	0	0	0.71±0.07	แคลัสสีขาวครีมรอบชิ้นส่วน
1.5	0.5	38	0	0	0.64±0.05	แคลลัสมีสีขาวฟูเล็กน้อยขอบชิ้นส่วน
1.5	1.0	48	0	0	0.66±0.05	แคลลัสมีสีขาวฟูเล็กน้อยขอบชิ้นส่วน
1.5	1.5	53	0	0	0.64±0.05	แคลลัสมีสีเขียวลักษณะคล้ายกำมะหยี่
1.5	2.0	50	0	1	0.66±0.07	แคลลัสมีสีเขียวลักษณะคล้ายกำมะหยี่
2.0	0.0	54	0	0	0.75±0.10	แคลัสสีขาวครีมรอบชิ้นส่วนเกาะกันหลวมๆ
2.0	0.5	48	0	0	0.65±0.05	แคลลัสมีสีขาวฟูเล็กน้อยขอบชิ้นส่วน
2.0	1.0	45	0	2	0.63±0.07	แคลลัสมีสีขาวฟูเล็กน้อยขอบชิ้นส่วน

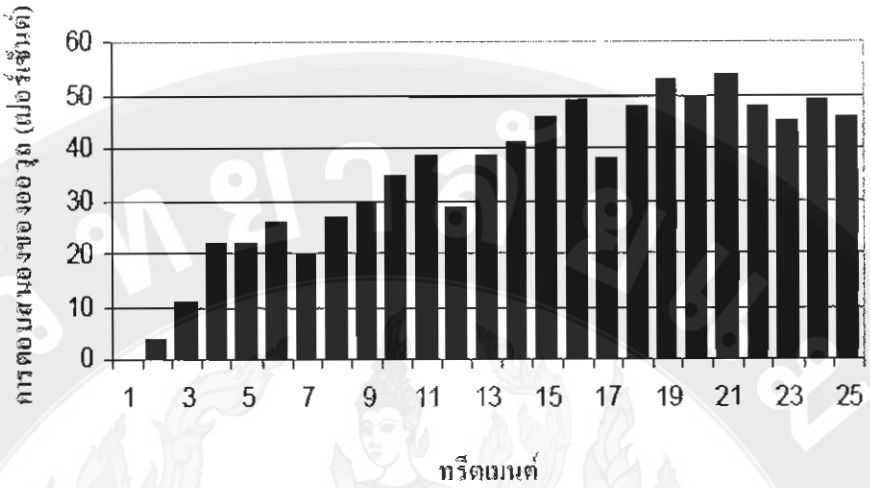
ตาราง 9 (ต่อ)

สารควบคุมการเจริญเติบโต		การเจริญเติบโตของออวุล (เปอร์เซ็นต์)	การเกิดอวัยวะ		ขนาดแคลลัสเฉลี่ย (เซนติเมตร)	ลักษณะการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของออวุล
2,4-D (mg/l)	kinetin (mg/l)		ยอด	ราก		
2.0	1.5	49	0	0	0.68±0.06	แคลลัสมีสีเขียวลักษณะคล้ายกำมะหยี่
2.0	2.0	46	0	0	0.66±0.06	แคลลัสมีสีเขียวลักษณะคล้ายกำมะหยี่

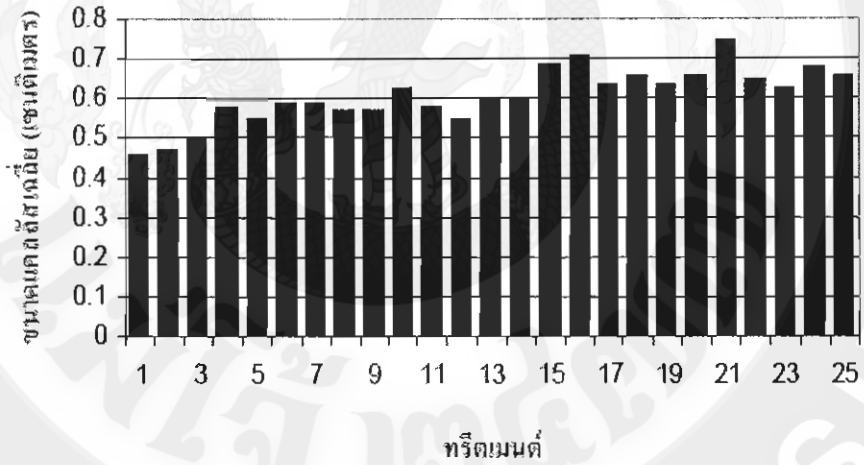
หมายเหตุ ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน



ภาพ 11 แคลลัสที่เกิดจากการเลี้ยงออวุลของแตงกวาบนอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ร่วมกับ BAP ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์



ภาพ 12 การเจริญเติบโตของออวุลแตงกวาที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ร่วมกับ BAP ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์



ภาพ 13 ขนาดแคลลัสเฉลี่ยของออวุลแตงกวาที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ร่วมกับ BAP ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์

การทดลองที่ 2.4 อาหารสูตร MS ดัดแปลง โดยเติม Thidiazuron (TDZ) ร่วมกับการเติม/ไม่เติมถ่านกัมมันต์ (activated charcoal)

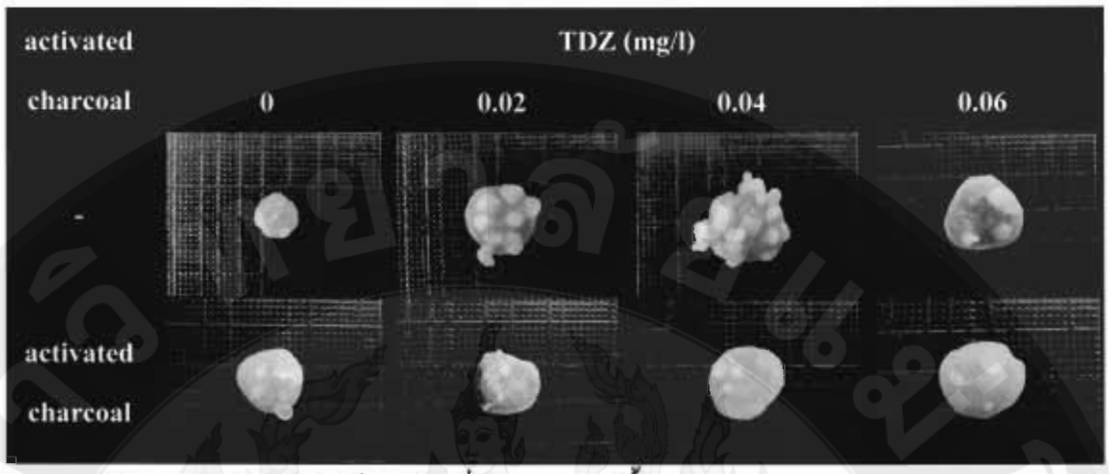
จากการเลี้ยงออวุลของแตงกวาก่อนบาน 1 วัน บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับคือ 0, 0.02, 0.04 และ 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติม/ไม่เติมถ่านกัมมันต์ เป็นเวลา 5 สัปดาห์เพื่อศึกษาถึงอิทธิพลของ TDZ และถ่านกัมมันต์ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของออวุลแตงกวา พบว่าออวุลมีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้ดีที่สุดบนอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม TDZ ความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร ออวุลมีความถี่ของการเกิดเอ็มบริโอสูง

ที่สุดเท่ากับ 78.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม TDZ ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร ออวุลมีความถี่ของการเกิดเอ็มบริโอเท่ากับ 65.20 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 10 ภาพ 14)

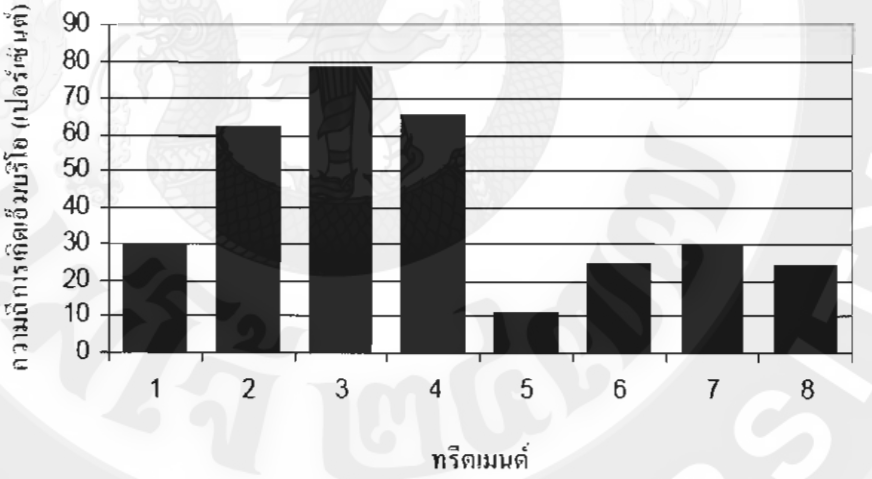
ตาราง 10 ผลของอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม TDZ ร่วมกับการเติม/ไม่เติมถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) ต่อการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอของออวุลแตงกวา เป็นเวลา 5 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	จำนวนออวุลที่เลี้ยง	จำนวนการเจริญพัฒนาของออวุล	ความถี่ของการเกิดเอ็มบริโอ (เปอร์เซ็นต์)
TDZ 0 mg/l	115	35	30.43±0.85
TDZ 0.02 mg/l	109	68	62.40±0.90
TDZ 0.04 mg/l	120	94	78.33±0.85
TDZ 0.06 mg/l	115	75	65.20±0.90
TDZ 0 mg/l + activated charcoal	125	14	11.20±0.80
TDZ 0.02 mg/l + activated charcoal	104	26	25.00±1.00
TDZ 0.04 mg/l + activated charcoal	115	34	29.57±0.85
TDZ 0.06 mg/l + activated charcoal	125	30	24.00±0.80

หมายเหตุ ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน



ภาพ 14 การชักนำให้เกิดเอ็มบริโอที่เกิดจากการเลี้ยงออวุลของแตงกวาบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม TDZ ร่วมกับการเติม/ไม่เติมถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) เป็นเวลา 5 สัปดาห์



ภาพ 15 ความถี่ของการเกิดเอ็มบริโอของออวุลแตงกวาที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม TDZ ร่วมกับการเติม/ไม่เติมถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) เป็นเวลา 5 สัปดาห์

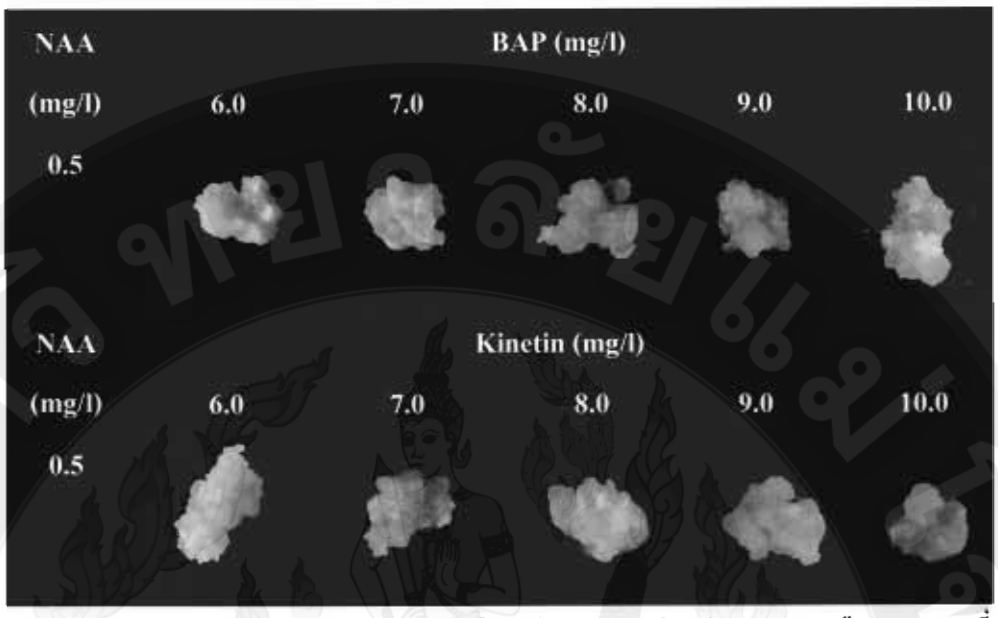
การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการพัฒนาของออวุลแดงกวา (differentiation medium)

การทดลองที่ 3.1 สูตรอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม α -naphthalene acetic acid (NAA) ร่วมกับ 6-benzyl amino purine (BAP) หรือ kinetin

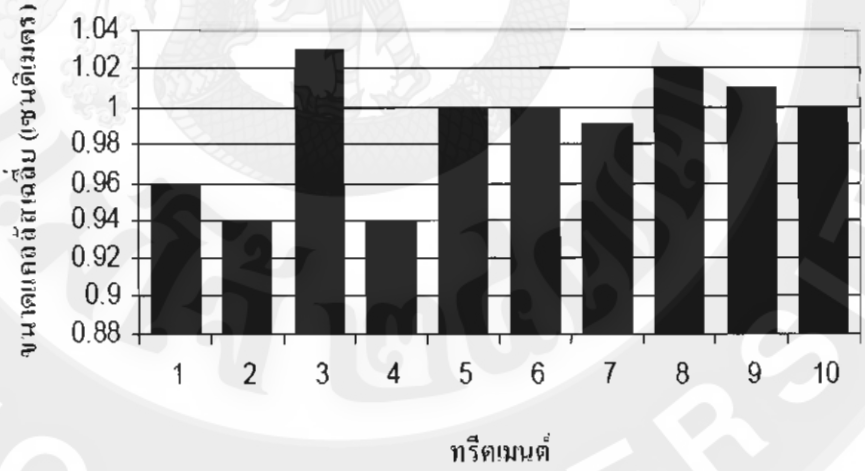
แคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงออวุลบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม 2, 4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีขนาดประมาณ 0.9-1.0 เซนติเมตร นำมาเลี้ยงต่อในอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP หรือ kinetin ความเข้มข้น 6, 7, 8, 9 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อการพัฒนาของแคลลัสไปเป็นยอด พบว่าแคลลัสมีสีขาวและเกาะกันอย่างหลวมๆ (white and friable callus) ไม่มีการเจริญพัฒนาไปเป็นยอดและราก โดยมีขนาดแคลลัสเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน (0.94-1.02 เซนติเมตร) (ตาราง 11 ภาพ 16)

ตาราง 11 ผลของอาหารสูตร MS ดัดแปลง โดยเติม NAA และ/หรือ BAP ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของออวุลแดงกวา เป็นเวลา 5 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	ขนาดแคลลัสเฉลี่ย (เซนติเมตร)	การเกิดอวัยวะ		ลักษณะของแคลลัส
		ยอด	ราก	
NAA 0.5 mg/l + BAP 6.0 mg/l	0.96	0	0	แคลลัสสีขาวเกาะกันหลวมๆ
NAA 0.5 mg/l + BAP 7.0 mg/l	0.94	0	0	แคลลัสสีขาวเกาะกันหลวมๆ
NAA 0.5 mg/l + BAP 8.0 mg/l	1.03	0	0	แคลลัสสีขาวเกาะกันหลวมๆ
NAA 0.5 mg/l + BAP 9.0 mg/l	0.94	0	0	แคลลัสสีขาวเกาะกันหลวมๆ
NAA 0.5 mg/l + BAP 10.0 mg/l	1.00	0	0	แคลลัสสีขาวเกาะกันหลวมๆ
NAA 0.5 mg/l + kinetin 6.0 mg/l	1.00	0	0	แคลลัสสีขาวเกาะกันหลวมๆ
NAA 0.5 mg/l + kinetin 7.0 mg/l	0.99	0	0	แคลลัสสีขาวเกาะกันหลวมๆ
NAA 0.5 mg/l + kinetin 8.0 mg/l	1.02	0	0	แคลลัสสีขาวเกาะกันหลวมๆ
NAA 0.5 mg/l + kinetin 9.0 mg/l	1.01	0	0	แคลลัสสีขาวเกาะกันหลวมๆ
NAA 0.5 mg/l + kinetin 10.0 mg/l	1.00	0	0	แคลลัสสีขาวเกาะกันหลวมๆ



ภาพ 16 แคลลัสบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ร่วมกับ BAP หรือ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์



ภาพ 17 ขนาดแคลลัสเฉลี่ยของออวุลแตงกวาที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ร่วมกับ BAP ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์

การทดลองที่ 3.2 การเจริญพัฒนาของแคลลัสไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ (regeneration plants)

แคลลัสแคลลัสที่มีสีเขียว เหลืองและมีลักษณะที่เกาะกันอย่างหลวมๆ ที่ได้จากสูตรอาหารต่างๆ นำมาเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ 4 ขั้นตอน ดังนี้

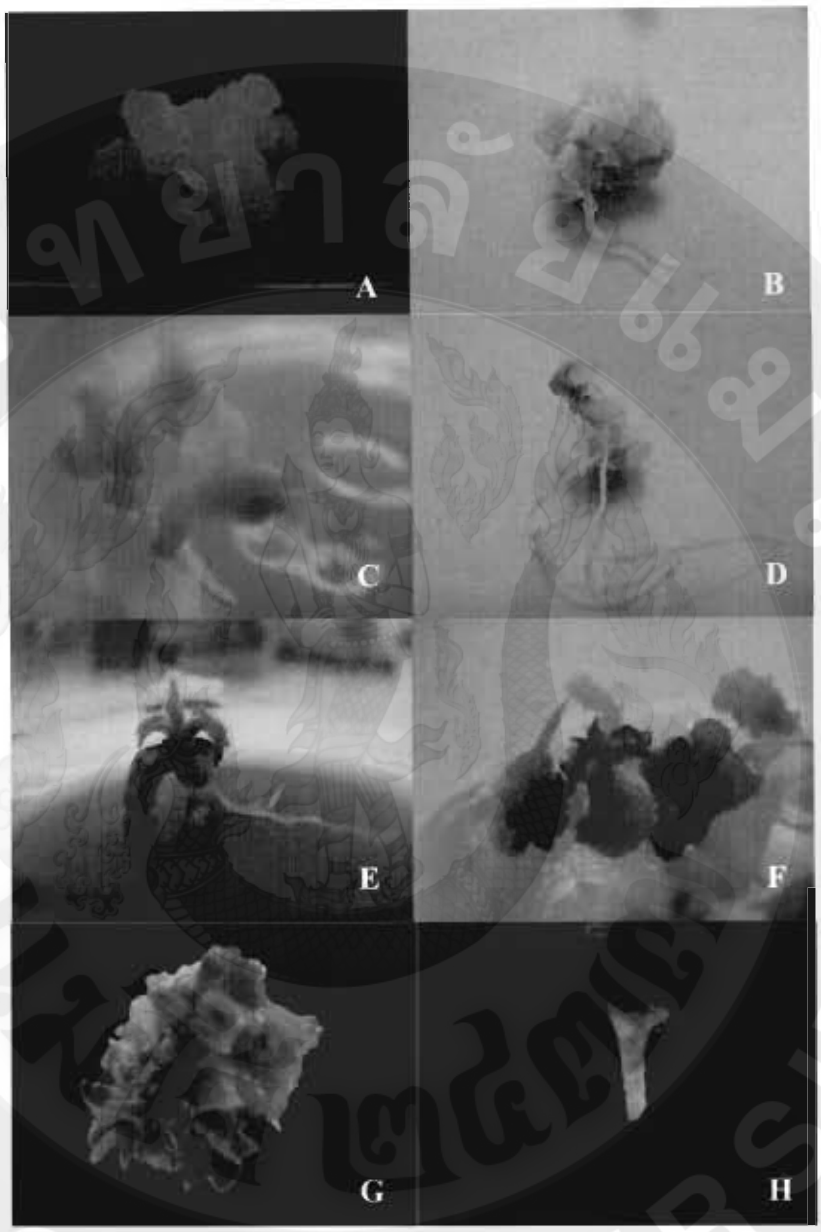
1.อาหารสูตร MS

2.อาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม BAP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.อาหารสูตร CBM (regeneration medium) ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.อาหารสูตร CBM (regeneration medium)

โดยในแต่ละขั้นตอนของการย้ายชิ้นส่วนแคลลัสลงบนแต่ละสูตรอาหาร พบว่าแคลลัสที่มีสีเขียว เหลืองและมีลักษณะที่เกาะกันอย่างหลวมๆ (ภาพ 18 A) นำมาเลี้ยงเพื่อการพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ โดยเลี้ยงแคลลัสลงบนอาหาร 4 ขั้นตอนคือ นำแคลลัสเลี้ยงบนอาหารสูตร MS หลังเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากได้ (ภาพ 18 B) ต่อมาย้ายแคลลัสลงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม BAP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อชักนำให้เกิดยอด จากการทดลองพบว่าแคลลัสมีการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอจีนิกแคลลัสในระยะ globular หลังเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ ย้ายแคลลัสลงบนอาหารสูตร CBM (regeneration medium) ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเอ็มบริโอจีนิกแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นรากและเอ็มบริโอจีนิกแคลลัสมีการพัฒนาเป็นระยะ heart-shape และเกิดรากเพิ่มขึ้น (ภาพ 18 C,D) ขั้นตอนสุดท้ายย้ายเอ็มบริโอจีนิกแคลลัสลงบนอาหารสูตร CBM (regeneration medium) พบว่าชิ้นส่วนสามารถเปลี่ยนแปลง (differentiation)ไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้หลังการเลี้ยงนาน 1 สัปดาห์ (ภาพ 18 E) และเกิดยอดเป็นจำนวนมากบนก้อนแคลลัส (ภาพ 18 F,G) และมีบางต้นอ่อนที่แยกออกมาจากกลุ่มแคลลัสเป็นต้นเดี่ยวๆ (ภาพ 18 H)

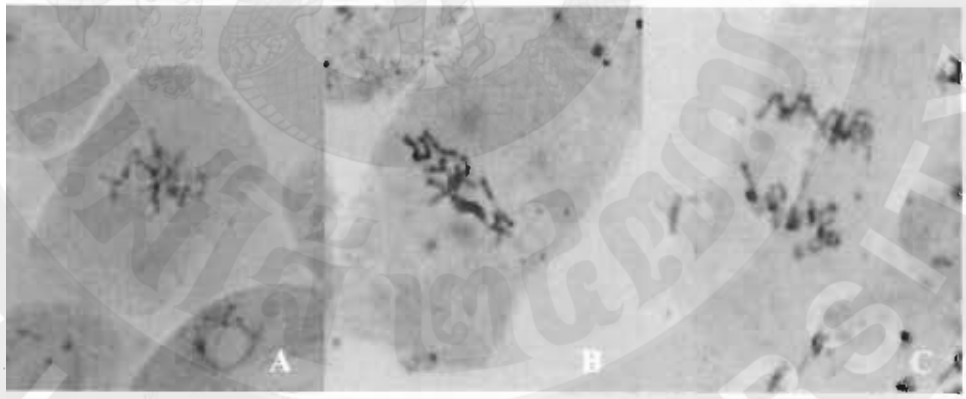


ภาพ 18 การเจริญพัฒนาของแคลลัสไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ (A) แคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันอย่างหลวมๆ (friable callus) (B) การเกิดรากของแคลลัส (C) แคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอจีนิกแคลลัสในระยะ globular และ heart-shape (D) การพัฒนาของเอ็มบริโอจีนิกแคลลัสไปเป็นต้น (E) ต้นแตงกวาที่เกิดจากการชักนำผ่านแคลลัส (F,G) ยอดเป็นกลุ่มที่เกิดบนแคลลัส (H) ต้นอ่อนที่แยกออกจากแคลลัสเป็นต้นเดี่ยวๆ

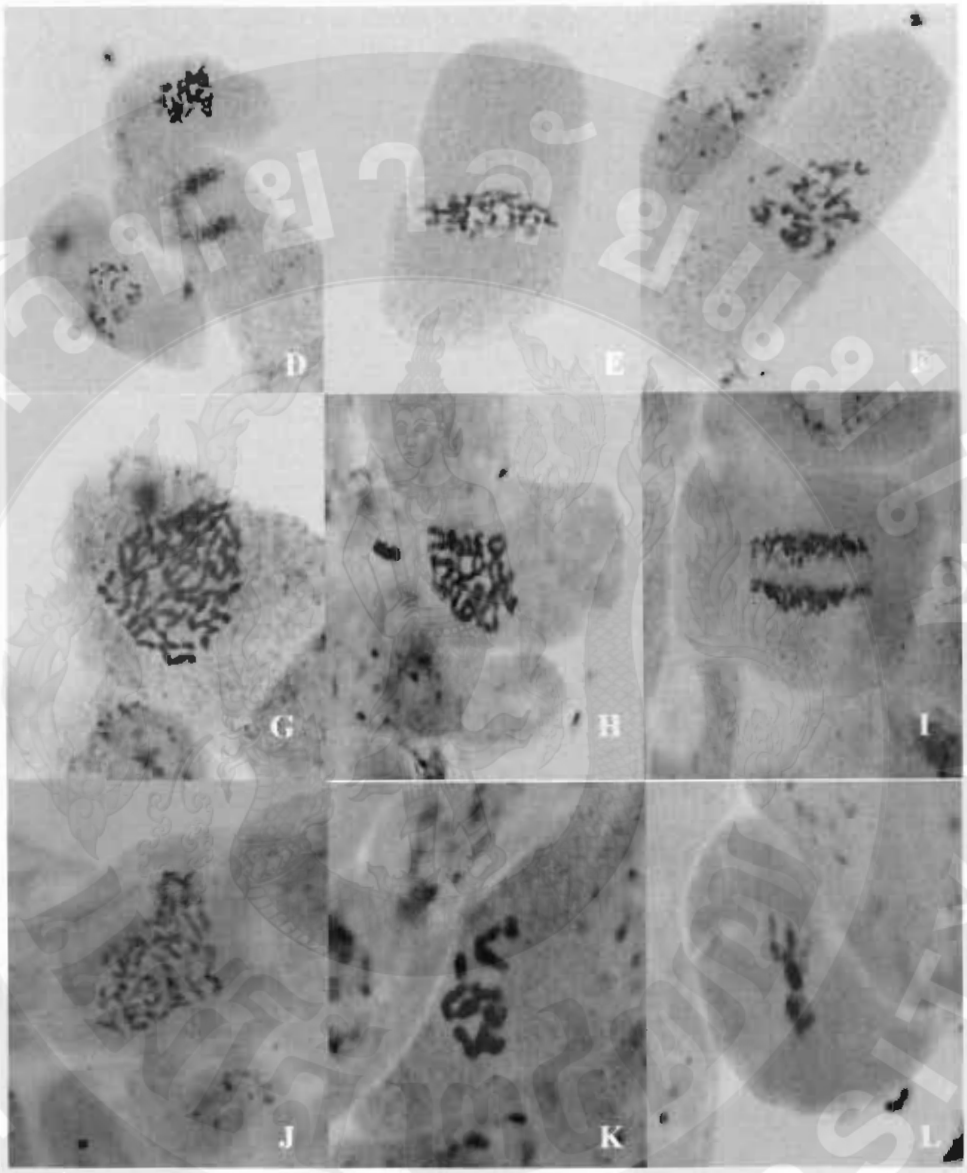
การทดลองที่ 4 การศึกษาด้านเซลล์วิทยา

การทดลองที่ 4.1 การศึกษาจำนวนชุดโครโมโซมด้วยวิธีการตรวจนับจำนวนโครโมโซมในรากโดยใช้เทคนิค Aceto-orcein squash

การศึกษาจำนวนโครโมโซมเพื่อเปรียบเทียบโครโมโซมของต้นแตงกวาปกติกับต้นที่เกิดจากการเลี้ยงออวุลของแตงกวา จากการทดลองเลี้ยงออวุลของแตงกวาสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้โดยผ่านแคลลัสหรือเอ็มบริโอจีนิกแคลลัส (embryogenic callus) โดยปกติของแตงกวามีจำนวนโครโมโซม 2n=14 (ภาพ 19 A-C) และเมื่อนำมาตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากรากที่เกิดบนแคลลัส พบว่ามีจำนวนโครโมโซมแบบ polyploid (ภาพ 19 D-J), 2n=14 (ภาพ 19 K) และ 2n=7 (ภาพ 19 L) แต่จากการนำรากของแตงกวาจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อออวุลมาศึกษาด้วยจำนวนโครโมโซมด้วยวิธีการตรวจนับจำนวนโครโมโซมในรากโดยใช้เทคนิค Aceto-orcein squash โครโมโซมที่ได้นับจำนวนได้ไม่ค่อยชัดเจน อีกทั้งโครโมโซมของแตงกวามีขนาดเล็กจึงยากต่อการศึกษา



ภาพ 19 จำนวนชุดโครโมโซมด้วยวิธีการตรวจนับจำนวนโครโมโซมในรากโดยใช้เทคนิค Aceto-orcein squash (A) จำนวนโครโมโซมของแตงกวาต้นปกติ 2n=14 (diploid) (B) จำนวนโครโมโซมของแตงกวาต้นปกติ 2n=14 ระยะ metaphase (C) จำนวนโครโมโซมของแตงกวาต้นปกติ 2n=14 (diploid) ระยะ anaphase (D-J) จำนวนโครโมโซม polyploid ของแตงกวาจากการเลี้ยงออวุล (K) จำนวนโครโมโซมของแตงกวาจากการเลี้ยงออวุล 2n=14 (L) จำนวนโครโมโซมของแตงกวาจากการเลี้ยงออวุล 2n=7



ภาพ 19 (ต่อ)

การทดลองที่ 4.2 การศึกษาโครโมโซมของแคลลัสแตงกวาโดยการหยดโปรโตพลาสต์

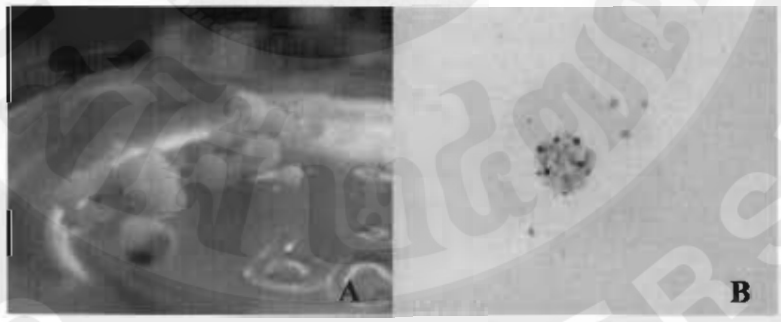
การทดลองที่ 4.2.1 พรีทรีตเมนต์และระยะเวลาในการแช่เอนไซม์มิกซ์ที่เหมาะสม

การศึกษาจำนวนโครโมโซมเพื่อเปรียบเทียบโครโมโซมของต้นแตงกวาปกติกับต้นที่เกิดจากการเลี้ยงออวุลของแตงกวาโดยการศึกษาโครโมโซมของแคลลัสแตงกวาโดยการหยดโปรโตพลาสต์ โดยการแช่แคลลัสลงในพรีทรีตเมนต์ 3 สูตร คือ อาหารเหลวสูตร MS อาหารเหลวสูตร MS ที่มีโคลชิซิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ และอาหารเหลวสูตร MS ที่มี 8-hydroxyquinoline 0.05 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาในการแช่เอนไซม์มิกซ์ 3 ระยะเวลาคือ 1, 2 และ 3 ชั่วโมง จากการศึกษาเทคนิคการเตรียมโครโมโซมโดยการหยดโปรโตพลาสต์ของแคลลัสแตงกวา (ภาพ 20 A) เพื่อ

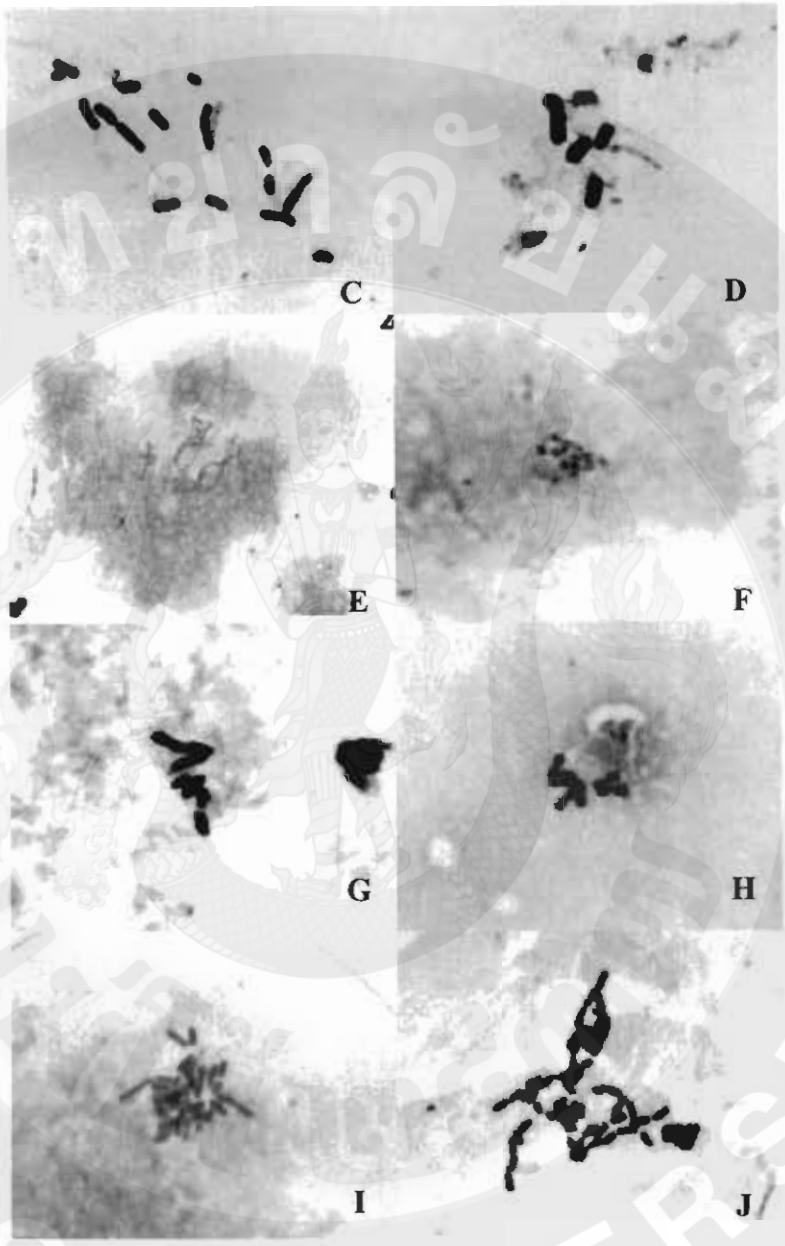
ศึกษาโครโมโซม พบว่าการพรีทรีตเมนต์ในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี ที่มี 8-hydroxyquinoline 0.05 เปอร์เซ็นต์ และย่อยแคลลัสในเอนไซม์มิกซ์ นาน 2 ชั่วโมงให้ผลดีที่สุดคือ สามารถได้โปรโต-พลาสต์สมบูรณ์ (ภาพ 20 B) โครโมโซมที่ได้มีการหดตัวสั้นเป็นแท่งเห็นได้ชัดเจน มีการย้อมติดสีดี สามารถตรวจนับจำนวนโครโมโซมได้ชัดเจนแต่โครโมโซมพองตัวมากเกินไปจากการแช่สารละลายไฮโปโทนิกที่นานเกินไป (ภาพ 20 C,D) จากการนับจำนวนโครโมโซมพบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=28, 2n=14 (ภาพ 20 C), 2n=7 (ภาพ 20 D) และโครโมโซมที่เป็น mixoploid

การทดลองที่ 4.2.2 ระยะเวลาในการแช่ไฮโปโทนิกที่เหมาะสม

จากการทดลองที่ 4.2.1 ผลจากการศึกษาพบว่าโครโมโซมที่ได้จะพองตัวมากเกินไปจากการแช่ลงในสารละลายไฮโปโทนิก (hypotonic solution 0.075 M KCl) จึงได้ทำการทดลองหาระยะเวลาที่เหมาะสมคือ แช่แคลลัสลงใน hypotonic solution 0.075 M KCl นาน 0, 5, 10 และ 15 นาที จากการทดลองพบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการแช่สารละลายไฮโปโทนิกคือ ที่ระยะเวลา 5 นาที โครโมโซมที่ได้มีขนาดพอดี สามารถมองเห็นและนับจำนวนโครโมโซมได้ดี พบโปรโตพลาสต์ที่อยู่ในระยะ prophase (ภาพ 20 E) โครโมโซมที่ได้ที่เป็น mixoploid มีจำนวนโครโมโซม 2n=14 (ภาพ 20 F), 2n=7 (ภาพ 20 G,H) และโครโมโซมที่เป็น polyploid (ภาพ 20 I,J)



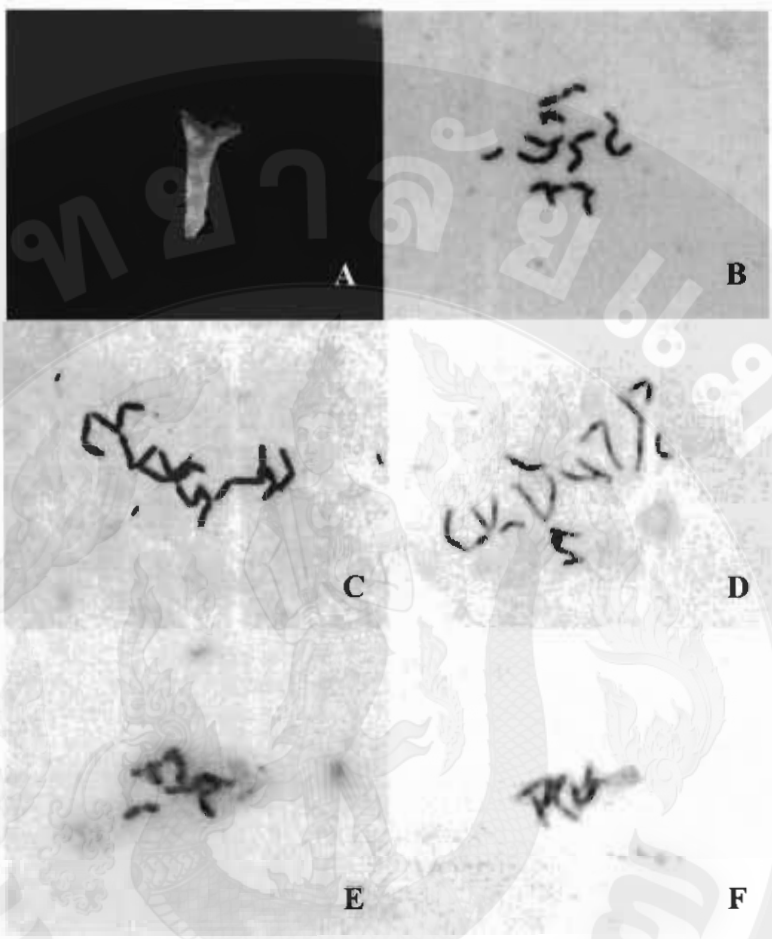
ภาพ 20 โครโมโซมของแคลลัสแตงกวาโดยการหยดโปรโตพลาสต์ (A) แคลลัสของออวุลแตงกวา (B) โปรโตพลาสต์จากแคลลัสแตงกวา (C) จำนวนโครโมโซมของแตงกวา 2n=14 (D) จำนวนโครโมโซมของแตงกวา 2n=7 (E) โปรโตพลาสต์ในระยะ prophase (F) จำนวนโครโมโซมของแตงกวา 2n=14 (G,H) จำนวนโครโมโซมของแตงกวา 2n=7 (I,J) โครโมโซมของแตงกวา polyploid



ภาพ 20 (ต่อ)

การทดลองที่ 4.3 การศึกษาโครโมโซมของต้นอ่อนแตงกวาโดยการหยดโปรโตพลาสต์

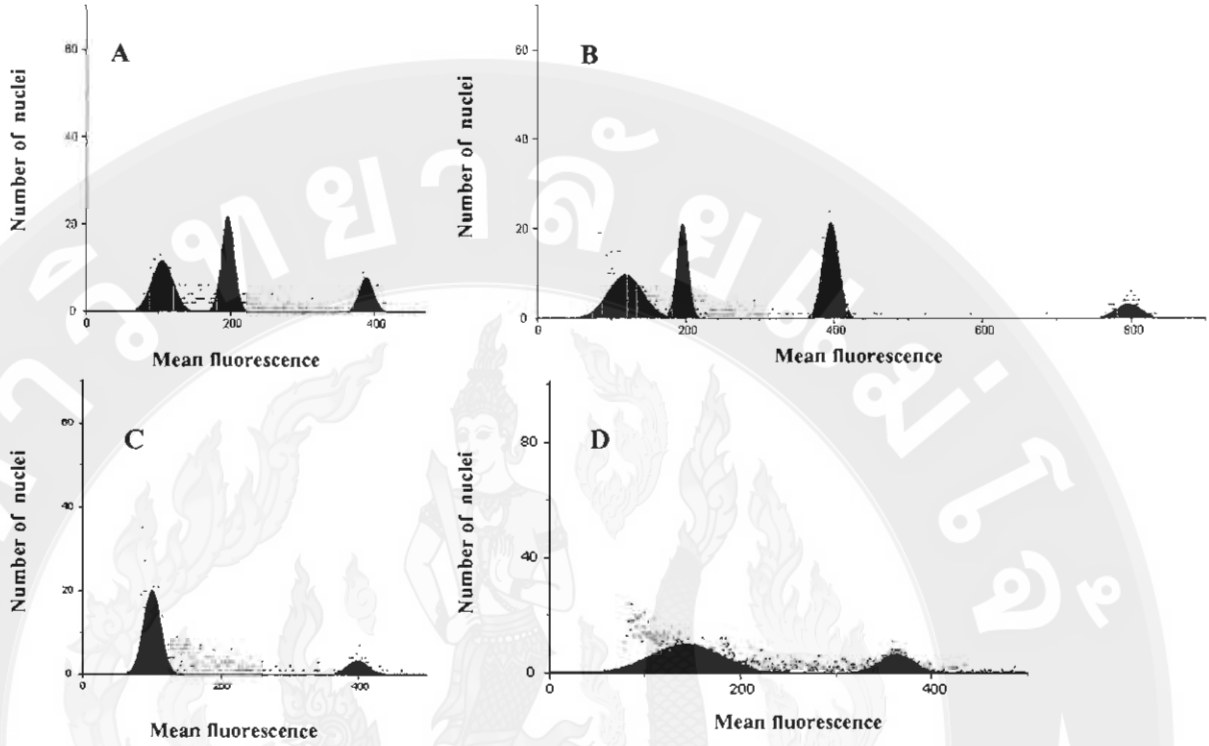
จากการศึกษาเทคนิคการเตรียมโครโมโซมโดยการหยดโปรโตพลาสต์ของต้นอ่อนแตงกวา พบว่าการนำต้นอ่อนมาใช้ศึกษาโครโมโซมด้วยเทคนิคการหยดโปรโตพลาสต์สามารถศึกษาโครโมโซมได้ชัดเจน โครโมโซมหดตัวสั้นและสามารถย้อมติดสีได้ดีจากการศึกษาพบจำนวนโครโมโซม 2n=14 (ภาพ 21 B-D) และ 2n=7 (ภาพ 21 E,F)



ภาพ 21 โครโมโซมของต้นอ่อนแตงกวาโดยการหยดโปรโตพลาสต์ (A) ต้นอ่อนของแตงกวา (B-D) จำนวนโครโมโซมของแตงกวา 2n=14 (E,F) จำนวนโครโมโซมของแตงกวา 2n=7

การทดลองที่ 4.4 วิธีการตรวจสอบด้วยวิธีการโฟล ไซโตมิทรี (flow cytometry)

เป็นการศึกษาจำนวนชุดโครโมโซมด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (flow cytometer) โดยการตรวจวัดจากความเข้มของแสงฟลูออร์เรสเซ็นต์จากนิวเคลียสเดี่ยว เมื่อเปรียบเทียบกับต้นปกติ (diploid) จากการนับจำนวนนิวเคลียส 2,030 นิวเคลียส จากส่วนของใบอ่อนที่เจริญเติบโตในโรงเรือนจากการเพาะเมล็ด (ภาพ 21A) ยอดที่ได้จากการเลี้ยงออวุลแตงกวาเมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์จากการนับจำนวนนิวเคลียส 2,514 นิวเคลียส พบว่ามีโครโมโซมจำนวน 1, 2 และ 4 ชุด (mixoploid) (ภาพ 19B) ส่วนรากที่ได้จากการเลี้ยงออวุลแตงกวาเมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์จากการนับจำนวนนิวเคลียส 1,937 นิวเคลียส พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 1 และ 4 ชุด (ภาพ 21 C) และแคลลัสเมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์จากการนับจำนวนนิวเคลียส 2,585 นิวเคลียส พบว่ามีจำนวนโครโมโซมแบบ aneuploid และ mixoploid (ภาพ 21 D)



ภาพ 22 การตรวจสอบด้วยวิธีการโฟลไซโตมิทรี (flow cytometry) (A) ใบอ่อนต้นปกติ (diploid) ที่เจริญเติบโตในโรงเรือนจากการเพาะเมล็ด (B) ยอดมีโครโมโซมจำนวน 1, 2 และ 4 ชุด (mixoploid) (C) รากมีจำนวนโครโมโซม 1 และ 4 ชุด (D) แคลลัสพบจำนวนโครโมโซมแบบ aneuploid และ mixoploid

วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาสายพันธุ์แตงกวาที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของออวุลแตงกวา

จากการทดลองศึกษาแตงกวาทั้งสองสายพันธุ์ คือแตงกวาลูกผสม F_1 พันธุ์ NJ2 และแตงร้าน เลี้ยงบนอาหารสูตร CBM (induction medium) ดัดแปลงโดยเติม TDZ ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 4 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน จากนั้นจึงย้ายลงอาหารสูตร CBM (regeneration medium) ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 3 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าแตงกวาลูกผสม F_1 พันธุ์ NJ2 สามารถเจริญและพัฒนาเป็นเอ็มบริโอได้สูงที่สุดเท่ากับ 6.90 เปอร์เซ็นต์ ออวุลมีการเจริญพัฒนาโดยมีลักษณะเป็นตุ่มกลมเล็กๆ สีขาว ส่วนพันธุ์แตงร้าน สามารถเจริญและพัฒนาเป็นเอ็มบริโอเท่ากับ 2.91 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของการเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอคือมีลักษณะเป็นตุ่มสีขาวและชิ้นส่วนเกิดเป็นแคลลัส จากการทดลองเอ็มบริโอไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากจีโนไทป์ของพืชที่นำรังไข่มาเลี้ยงนั้นเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการชักนำให้รังไข่พัฒนาไปเป็นต้น โดยความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นของรังไข่จะขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (Keller and Korzun, 1996) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับพันธุ์พืชอีกด้วย สอดคล้องกับ Gémes-Juhász *et. al.* (2002) ศึกษาการเลี้ยงรังไข่ของแตงกวา 6 สายพันธุ์ คือ 'Perez F_1', 'zD/4D', 'KS100', 'D20F2A5', 'E10D14' และ 'PerezML' ลงบนอาหารสูตร CBM (induction medium) ดัดแปลงโดยเติม TDZ ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตรน้ำตาล 4 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 18-35 องศาเซลเซียส นาน 1-5 วัน จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อลงอาหารสูตร CBM (regeneration medium) ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 3 กรัมต่อลิตร พบว่าแตงกวาแต่ละจีโนไทป์ให้ผลการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอแตกต่างกันโดยแตงกวาสายพันธุ์ 'Perez F_1' '7D/4C' และ 'KS10C' ให้ผลการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอสูงที่สุด และ Diao *et.al.* (2009) ศึกษาการเลี้ยงรังไข่ของแตงกวาลูกผสม F_1 6 สายพันธุ์คือ 'Jinlv', 'EC5', 'Biyu', 'Caoyou no.3', 'Yamei no.1' และ 'Jinchun' ลงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม TDZ 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ารังไข่ของแตงกวาสายพันธุ์ 'Jinchun' มีการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอสูงสุด 72.7 เปอร์เซ็นต์ แต่การพัฒนาไปเป็นต้นมีเปอร์เซ็นต์ต่ำ Shalaby (2007) ศึกษาผลของจีโนไทป์ใน summer squash (*Cucurbita pepo* L.) พบว่า การเลี้ยงออวุล 12 จีโนไทป์ที่ตัดจากดอกเพศเมีย 1 วันก่อนดอกบานมีความแตกต่างกันในการตอบสนองระหว่างจีโนไทป์ ลูกผสม Raad F_1 แสดงให้เห็นถึงเปอร์เซ็นต์การตอบสนองของออวุลสูงที่สุด 48.8 เปอร์เซ็นต์ และให้ค่าการเกิดเป็นต้นต่อจานเพาะเลี้ยง 15 ต้น เมื่อเปรียบเทียบ

การเกิดความถี่ของเอ็มบริโอทางสถิติของแตงกวาทั้งสองสายพันธุ์ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางผนวก 2)

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของออวุลแตงกวา (induction medium)

การทดลองที่ 2.1 สูตรอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ/หรือ kinetin

จากการทดลองเมื่อเลี้ยงออวุลลงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าออวุลมีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้ดีที่สุดบนอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ออวุลมีการเจริญและพัฒนามากที่สุดเท่ากับ 61 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนที่เลี้ยง แคลลัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 1.07 เซนติเมตร แคลลัสมีสีเหลืองลักษณะแบบเกาะกันหลวมๆ (friable callus) และสามารถชักนำให้เกิดรากได้รวม 2 ราก รองลงมาคืออาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinctin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ออวุลมีการเจริญและพัฒนาเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนที่เลี้ยง แคลลัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 1.06 เซนติเมตร แคลลัสมีสีขาวลักษณะแบบ friable callus และจากการทดลอง การเติม kinetin เพียงอย่างพบว่าชิ้นส่วนไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้เลย ส่วนการเติม 2,4-D พบว่าในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นออวุลจะมีการเจริญพัฒนาที่สูงขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Evans et al. (1981) ที่กล่าวว่าอาหารเริ่มต้นสำหรับการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจีนิกแคลลัส (embryogenic callus) นั้นต้องประกอบด้วย 2,4-D เป็นส่วนใหญ่และจากการทดลองการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่าสามารถให้แคลลัสที่ดีที่สุด ดังเช่นงานทดลองของ Metwally et al. (1998) ได้เลี้ยงออวุลของน้ำเต้า (*Cucurbita pepo* L.) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีเมื่อเลี้ยงออวุลลงในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1-5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในพืชกลุ่ม graminaceous (2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) (San Noeum, 1976) ในข้าวสาลี (2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) (Zhu and Wu, 1979) แต่การเติมออกซินที่ระดับความเข้มข้นสูงจะกระตุ้นให้เกิดแคลลัสจากผนังรังไข่ (ovary wall) มากกว่าที่เกิดจากถุงเอ็มบริโอ (embryo sac) ดังนั้นระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตจึงมีผลต่อการเพิ่มของกระบวนการ gynogenesis และยับยั้งการเพิ่มปริมาณของเนื้อเยื่อร่างกาย (somatic tissue) ซึ่งถือว่าเป็นปัญหาในการเลี้ยงรังไข่ (Zhou et al., 1982) และการเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรออวุลมีการตอบสนอง

ได้ดีที่สุดและเกิดแคลลัสที่มีการพัฒนาไปเป็นรากได้ โดยแคลลัสมีสีเหลืองและเกาะกันหลวมๆ ซึ่งการใช้ 2,4-D ร่วมกับ kinetin ในรายงานของ Shalaby (2007) พบว่าอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม ในการเลี้ยงออวุลของน้ำเต้าสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 15 ต้นต่อจานเพาะเลี้ยง สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด 2,4-D และ kinetin ได้มีการนำมาใช้ในการเลี้ยงออวุลหรือรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมซึ่งพบในพืชหลายชนิดเช่น เยอบีรา (2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร) (Cagnet-Sitbon, 1981) ยาสูบ (2,4-D ความเข้มข้น 0.5-1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin ความเข้มข้น 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร) (Wu and Chen, 1982) เป็นต้น เมื่อเปรียบเทียบการเจริญและพัฒนาไปเป็นแคลลัสของออวุลทางสถิติระหว่างออวุลที่มีการเจริญและพัฒนาไปเป็นแคลลัสสูงที่สุดกับที่เจริญและพัฒนารองลงมา พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแคลลัสเฉลี่ยทางสถิติระหว่างออวุลที่มีการเจริญและพัฒนาไปเป็นแคลลัสสูงที่สุดกับที่เจริญกับพัฒนารองลงมา พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางผนวก 3,4)

การทดลองที่ 2.2 สูตรอาหาร CBM (induction medium) ดัดแปลงโดยเติม 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ/หรือ kinetin

จากการทดลองเมื่อเลี้ยงออวุลลงบนอาหารสูตร CBM (induction medium) ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าออวุลมีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้ดีที่สุดบนอาหาร CBM ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ออวุลมีการเจริญและพัฒนามากที่สุดเท่ากับ 72 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนที่เลี้ยง แคลลัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 0.77 เซนติเมตร แคลลัสมีสีเหลืองลักษณะแบบเกาะกันหลวมๆ (friable callus) รองชิ้นส่วน รองลงมาคืออาหารสูตร CBM ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ออวุลมีการเจริญและพัฒนาเท่ากับ 65 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนที่เลี้ยง แคลลัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 0.67 เซนติเมตร แคลลัสมีสีขาวฟู และไม่สามารถชักนำให้เกิดอวัยวะ (organogenesis) เช่นยอดและรากได้ อีกทั้งการชักนำให้เกิดแคลลัสสามารถเกิดได้เฉพาะในอาหารที่เติม 2,4-D เท่านั้น การเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ชิ้นส่วนจะมีการขยายขนาดเพิ่มมากขึ้น มีแคลลัสเพียงเล็กน้อย จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการใช้อาหารสูตร CBM ในพืชตระกูลแตงมีน้อยมากและยังไม่เคยมีการใช้ร่วมกับ 2,4-D และ BAP ในขั้นตอนของการชักนำ (induction) มาก่อน มีเพียงการใช้ TDZ เท่านั้น เช่นเดียวกับการทดลอง Yilmaz (2005) เลี้ยงออวุลฟักทอง (*Cucurbita pepo* L.) ลงบนอาหารสูตร CBM ดัดแปลงโดยเติม TDZ ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่าออวุลมีการ

ขยายขนาดและแคลลัสมีการพัฒนาแต่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ ซึ่งแตกต่างจาก Gémes et al. (2002) ที่เลี้ยงแตงกวา (*Cucumis sativus* L.) บนอาหารสูตร CBM โดยเติม TDZ ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้มีการเกิดเป็น haploid embryo ในอัตราที่สูงและสามารถเกิดเป็นต้นได้ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญและพัฒนาไปเป็นแคลลัสของออวุลทางสถิติระหว่างออวุลที่มีการเจริญและพัฒนาไปเป็นแคลลัสสูงที่สุดกับที่เจริญและพัฒนารองลงมา พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และเมื่อเปรียบเทียบขนาดแคลลัสเฉลี่ยทางสถิติระหว่างออวุลที่มีการเจริญและพัฒนาไปเป็นแคลลัสสูงที่สุดกับที่เจริญกับพัฒนารองลงมา พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางผนวก 5, 6)

การทดลองที่ 2.3 สูตรอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม α -naphthalene acetic acid (NAA) และ/หรือ 6-benzyl amino purine (BAP)

จากการทดลองเมื่อเลี้ยงออวุลลงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ร่วมกับ BAP ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าออวุลมีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้ดีที่สุดบนอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ออวุลมีการเจริญและพัฒนามากที่สุดเท่ากับ 54 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนที่เลี้ยง แคลลัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 0.75 เซนติเมตร แคลลัสมีสีขาวครีมเกิดขึ้นรอบชิ้นส่วน มีลักษณะเกาะกันอย่างหลวมๆ รองลงมาคืออาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ออวุลมีการเจริญและพัฒนาเท่ากับ 53 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนที่เลี้ยง แคลลัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 0.64 เซนติเมตร แคลลัสมีลักษณะสีเขียว คล้ายกำมะหยี่ จากการทดลองการเติม NAA ที่ความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้นทำให้การตอบสนองของออวุลและขนาดแคลลัสเฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้น โดยการเติม NAA ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ออวุลมีการตอบสนองเฉลี่ยสูงที่สุด เช่นเดียวกับการเติม BAP ที่พบว่า ออวุลมีการตอบสนองเฉลี่ยสูงที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่จากการทดลองการเกิดแคลลัสจะเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยและสีเขียวคล้ายกำมะหยี่ แต่ยังไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นและรากได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากออวุลได้รับปริมาณออกซินสูงและไซโตไคนินต่ำจึงทำให้ออวุลมีการพัฒนาเป็นแคลลัส สมดุลของออกซินและไซโทไคนินที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น จึงมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับปริมาณฮอร์โมนที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อ ถ้าชิ้นส่วนเนื้อเยื่อมีฮอร์โมนชนิดใดชนิดหนึ่งมากก็อาจจะมีความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดนั้นในอาหารต่ำ (ไพบูลย์, 2524) เช่นในรังไข่มีปริมาณออกซินค่อนข้างสูง ดังนั้นอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงรังไข่ควรมีส่วนประกอบของไซโทไคนินสูงแต่ออกซินต่ำ ดังงานทดลองของ Campion et al. (1992) ได้เลี้ยงรังไข่และดอกของหัวหอมใหญ่บน

อาหารสังเคราะห์ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ารังไข่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นแฮพลอยด์ การเติมสารควบคุมการเจริญร่วมกัน (NAA:BAP) จึงอาจเป็นจุดสำคัญที่จำเป็นต่อการการพัฒนาของ embryonic callus (Song et al., 2007) การเจริญพัฒนาและเกิดเป็นต้นพืชนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัส อย่างไรก็ตามพืชแต่ละชนิดย่อมมีความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน (Cai et al., 1992) การใช้ NAA และ BAP ได้มีการนำมาใช้ในการชักนำรังไข่และออวุลที่ยังไม่ได้รับการผสมในพืชหลายชนิดเช่นยาสูบ (Barendse et al., 1987), ชูการ์บีท (Ekrem, 1998), ป่าน (Burbulis, 2007) และแตงกวา (Suprunova and Shmykova, 2008) โดยเลี้ยงออวุลบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าออวุลมีการพัฒนาไปเป็นแคลลัสและเมื่อย้ายแคลลัสลงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นย้ายลงสูตรอาหาร MS พบว่ามีการพัฒนาไปเป็นยอดและต้นที่สมบูรณ์ได้ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญและพัฒนาไปเป็นแคลลัสของออวุลระหว่างออวุลที่มีการเจริญและพัฒนาไปเป็นแคลลัสสูงที่สุดกับที่เจริญและพัฒนารองลงมา พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และเมื่อเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแคลลัสเฉลี่ยทางสถิติระหว่างออวุลที่มีการเจริญและพัฒนาไปเป็นแคลลัสสูงที่สุดกับเจริญกับพัฒนารองลงมา พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางผนวก 7,8)

การทดลองที่ 2.4 อาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม Thidiazuron (TDZ) ร่วมกับการเติม/ไม่เติมถ่านกัมมันต์ (activated charcoal)

จากการทดลองเลี้ยงออวุลของแตงกวาบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด TDZ ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันร่วมกับการเติม/ไม่เติมถ่านกัมมันต์ พบว่าออวุลมีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้ดีที่สุดบนอาหาร MS ดัดแปลงโดยเติม TDZ ความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร ออวุลมีความถี่ของการเกิดเอ็มบริโอสูงที่สุดเท่ากับ 78.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม TDZ ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร ออวุลมีความถี่ของการเกิดเอ็มบริโอเท่ากับ 65.20 เปอร์เซ็นต์ การเติม TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับการไม่เติมถ่านกัมมันต์ พบว่าให้ความถี่ของจำนวนเอ็มบริโอสูงที่สุด เช่นเดียวกับ Diao et al. (2009) ที่เลี้ยงรังไข่ของแตงกวาบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการตอบสนองต่ออาหารสูงสุด 72.7 เปอร์เซ็นต์ อาจเนื่องมาจาก TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดหนึ่งที่นำมาใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

โดยเฉพาะในกระบวนการชักนำ somatic embryo (Joshi et al., 2008) การใช้ TDZ ได้ประสบความสำเร็จในพืชวงศ์กระบองเพชร (Cactaceae) โดยกระบวนการ gynogenesis (Garcia et al., 2009) อย่างไรก็ตามการศึกษาที่รายงานเกี่ยวกับการใช้ TDZ ในการชักนำให้เกิดแฮพลอยด์จากการเลี้ยงรังไข่นั้นมีน้อยมาก และถูกนำมาใช้ในการเลี้ยงรังไข่ของแตงกวาเป็นครั้งแรกโดย Gémes-Juhász et al. (2002) แต่จากการทดลองพบว่าการเกิดเอ็มบริโอและการพัฒนาไปเป็นต้นมีความถี่ที่ต่ำ การนำ TDZ มาใช้ได้ประสบความสำเร็จในอาหารเพื่อการชักนำให้เกิดต้น (regeneration medium) ในการเลี้ยง androgenetic embryoids ของแอปเปิ้ล (Hofer, 1995) การเติมถ่านกัมมันต์ลงในอาหารในการเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยกระบวนการ gynogenesis มีรายงานไม่มากและจากการทดลองการไม่เติมถ่านกัมมันต์พบว่าให้ผลดีกว่าการเติมผงถ่านกัมมันต์ซึ่งแตกต่างจาก Gurel et al. (2000) ที่ชักนำให้เกิดพืชแฮพลอยด์ด้วยวิธี gynogenesis ของ sugar beet (*Beta vulgaris*) พบว่าการเติมผงถ่าน 0.05 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติม BAP ลงในอาหารสูตร MS ให้ผลการตอบสนองสูงที่สุด (13 เปอร์เซ็นต์) และ Karunaratne and Periyapperuma (1989) พบว่าถ่านกัมมันต์เป็นปัจจัยสำคัญในการชักนำให้เกิดแคลลัสของมะพร้าว (*C. nucifera*) ในการเลี้ยงรังไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสมและทำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด การเติมถ่านกัมมันต์ร่วมกับวุ้นลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้นำมาใช้มากในการเพิ่มความถี่การชักนำเอ็มบริโอของละอองเกสรและมีรายงานถึงวิธีการที่มีผลต่อการเกิดเป็นต้นและการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเพื่อการผลิตพืชแฮพลอยด์ในผักกาด (*B. juncea*) (Prem et al., 2008) อย่างไรก็ตามหน้าที่หรือกลไกที่แน่ชัดในการเติมถ่านกัมมันต์เพื่อการชักนำกระบวนการเกิดเอ็มบริโอของละอองเกสรยังไม่เป็นที่แน่ชัด ได้มีงานวิจัยที่กล่าวถึงถ่านกัมมันต์ว่าอาจเป็นตัวกำจัดสารที่เป็นพิษต่อการเกิดต้นโดยกระบวนการ nonembryogenic ของละอองเกสร (Kott et al., 1988; Gland et al., 1988) ถ่านกัมมันต์สามารถดักก๊าซและด้วยเหตุนี้อาจไปยับยั้งเอทธิลีนหรือก๊าซอื่นๆ ที่ถูกปลดปล่อยจากเนื้อเยื่อที่เลี้ยง (Pan and Staden, 1998) ผลของการยับยั้งเอทธิลีนของถ่านกัมมันต์มีรายงานเกี่ยวกับการเพิ่มขึ้นของกระบวนการเกิดเอ็มบริโอในละอองเกสรของกะหล่ำปลี (*B. oleracea*) (Dias, 1999) เมื่อเปรียบเทียบความถี่ของการเกิดเอ็มบริโอทางสถิติระหว่างออวุลที่มีการเจริญและพัฒนาสูงที่สุดกับเจริญกับพัฒนารองลงมา พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางผนวก 9)

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการพัฒนาของออวุลแตงกวา (differentiation medium)

การทดลองที่ 3.1 สูตรอาหาร MS ที่เติม α-naphthalene acetic acid (NAA) ร่วมกับ 6-benzyl amino purine (BAP) หรือ kinetin

แคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงออวุลบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม 2, 4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีขนาดประมาณ 0.9-1.0 เซนติเมตร นำมาเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP หรือ kinetin ความเข้มข้น 6, 7, 8, 9 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อการพัฒนาของแคลลัสไปเป็นยอด พบว่าแคลลัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 0.94-1.02 เซนติเมตร และไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดและรากได้ แคลลัสที่ได้มีสีขาวและเกาะกันอย่างหลวมๆ (white and friable callus) ซึ่งแตกต่างกับ Chin and Scott (1977) รายงานถึงการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสจากชิ้นส่วนต่างๆ พบว่าชิ้นส่วนมีความต้องการของออกซินและไซโตไคนินร่วมกันโดยแคลลัสจากเอ็มบริโอที่เจริญเต็มที่จะเกิดได้จากอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.2-1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP หรือ kinetin ความเข้มข้น 5-10 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วน Cappadocia *et. al.* (1988) พบว่าการเติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kinetin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารให้ผลดีที่สุดในกระบวนการ gynogenesis ของเยอบีร่า Gémes-Juhász et al. (2002) ได้นำ NAA และ BAP มาใช้ในการเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (androgenesis) และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (gynogenesis) ของแตงกวาในขั้นตอนการเกิดต้น (regenaration) จากรายงานพบว่าสามารถชักนำรังไข่ของแตงกวาให้เกิดต้นได้โดยการเลี้ยงลงบนอาหารสูตร CBM (regeneration medium) ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร Song et al. (2007) สามารถชักนำให้เกิดต้นได้โดยกระบวนการ androgenesis ในแตงกวาโดยเลี้ยงลงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมล ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 13.32 ไมโครโมล เมื่อเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแคลลัสเฉลี่ยทางสถิติระหว่างแคลลัสที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางแคลลัสเฉลี่ยสูงที่สุดกับรองลงมา พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางผนวก 10)

การทดลองที่ 3.2 การเจริญพัฒนาของแคลลัสไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ (regeneration plants)

จากการนำแคลลัสที่มีสีเขียว เหลืองและมีลักษณะที่เกาะกันอย่างหลวมๆ ที่ได้จากสูตรอาหารต่างๆ นำมาเลี้ยงเพื่อการพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ ยอดที่ได้เกิดจากการเลี้ยงแคลลัสบนอาหาร 2 สูตร คือ MS และ CBM ดัดแปลงโดยย้ายเนื้อเยื่อลงบนอาหาร 4 ขั้นตอนคือ นำแคลลัสเลี้ยงบนอาหารสูตร MS พบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากได้ จากนั้นย้ายแคลลัสลงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม BAP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อชักนำให้เกิดยอด จากการทดลองพบว่าแคลลัสมีการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอจีนิกแคลลัสในระยะ globular หลังเลี้ยงนาน 4

สัปดาห์ จากนั้นย้ายแคลลัสลงบนอาหารสูตร CBM (regeneration medium) ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเอ็มบริโอจีนิกแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นรากและเอ็มบริโอจีนิกแคลลัสมีการพัฒนาเป็นระยะ heart-shape และเกิดรากเพิ่มขึ้น ขั้นตอนสุดท้ายย้ายเอ็มบริโอจีนิกแคลลัสลงบนอาหารสูตร CBM (regeneration medium) พบว่าชิ้นส่วนสามารถเปลี่ยนแปลง (differentiation)ไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้หลังการเลี้ยงนาน 1 สัปดาห์ และเกิดยอดเป็นจำนวนมากบนก้อนแคลลัส และมีบางต้นอ่อนที่แยกออกมาจากกลุ่มแคลลัสเป็นต้นเดี่ยวๆ จากการทดลองสังเกตได้ว่าเมื่อย้ายแคลลัสลงอาหารใหม่ในแต่ละสูตรแคลลัสจะมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องจากกลุ่มแคลลัสที่ไม่มีอวัยวะใดๆ เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะยอด รากหรือต้นกล้าที่สมบูรณ์ได้ โดยผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส (embryogenesis) การชักนำให้เนื้อเยื่อโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากเนื้อเยื่อที่ผ่านขั้นตอนของแคลลัสเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมากเนื่องจากเนื้อเยื่อตังกล่าวมักจะยากต่อการชักนำให้เกิดต้น ปัจจัยที่เกี่ยวข้องโดยตรงต่อกระบวนการเกิดต้นพืช นอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิด อายุหรือชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเลี้ยงแล้ว ยังขึ้นกับปัจจัยภายนอกอื่นๆ อีกเช่น ชนิดของอาหาร สภาวะสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับสัดส่วนที่แตกต่างกันของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 กลุ่มคือออกซิน (auxin) และไซโตไคนิน (cytokinin) (Skoog and Miller, 1957)

การทดลองที่ 4 การศึกษาด้านเซลล์วิทยา

การทดลองที่ 4.1 การศึกษาจำนวนชุดโครโมโซมด้วยวิธีการตรวจนับจำนวนโครโมโซมในรากโดยใช้เทคนิค Aceto-orcein squash

การศึกษาจำนวนโครโมโซมเพื่อเปรียบเทียบโครโมโซมของต้นแตงกวาปกติกับต้นที่เกิดจากการเลี้ยงออวุลของแตงกวาพบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=28, 2n=14 และ 2n=7 และ polyploidy เช่นเดียวกับ Diao et al. (2009) พบว่าจำนวนโครโมโซมของต้นแตงกวาที่มาจากการเลี้ยงออวุลมีจำนวนโครโมโซม 2n=7 (haploid plants), 2n=28 (tetraploid plants) และ 2n=14 (diploid plants) จากการตรวจนับจำนวนโครโมโซมในรากโดยใช้เทคนิค Aceto-orcein squash โครโมโซมที่ได้มีขนาดเล็ก ยากต่อการนับจำนวนโครโมโซม เช่นเดียวกับพืชตระกูลแตง (*Cucurbita*) ชนิดอื่นๆ ที่พบว่ามีโครโมโซมมีขนาดเล็กทำให้ยากต่อการนับจำนวนได้อย่างถูกต้องและมีรายงานไม่มากนักเกี่ยวกับการศึกษาด้านเซลล์วิทยาของพืชตระกูลนี้เนื่องจากการศึกษาด้านเซลล์วิทยานั้นทำได้ยาก (Varghese, 1973)

การทดลองที่ 4.2 การศึกษาโครโมโซมของแคลลัสแตงกวาโดยการหยดโปรโต-พลาสต์

การทดลองที่ 4.2.1 พรีทรีตเมนต์และระยะเวลาในการแช่เอนไซม์มิกซ์ที่เหมาะสม

จากการศึกษาโดยใช้วิธีการตรวจนับจำนวนโครโมโซมในรากโดยใช้เทคนิค Aceto-orcein squash นั้นการศึกษาจำนวนโครโมโซมทำได้ยากเนื่องจากโครโมโซมมีขนาดเล็กและรากที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อมีขนาดเล็กและมีจำนวนไม่เพียงพอต่อการศึกษา จึงได้ใช้วิธีการศึกษาโครโมโซมของแคลลัสแตงกวาโดยการหยดโปรโตพลาสต์ โดยใช้เอนไซม์มิกซ์ย่อยผนังเซลล์เพื่อเอาผนังเซลล์ออกทำให้เหลือเพียงเซลล์เดี่ยวที่ไม่มีผนังเซลล์ จากการทดลองพบว่าการพรีทรีตเมนต์ในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี 8-hydroxyquinoline 0.05 เปอร์เซ็นต์ และย่อยแคลลัสในเอนไซม์มิกซ์ นาน 2 ชั่วโมงให้ผลดีที่สุดคือ สามารถได้โปรโตพลาสต์สมบูรณ์ โครโมโซมที่ได้มีการหดตัวสั้นเป็นแท่งเห็นได้ชัดเจน มีการย้อมติดสีดี มีจำนวนโครโมโซม 2n=28, 2n=14, 2n=7 และโครโมโซมที่เป็น mixoploid

การทดลองที่ 4.2.2 ระยะเวลาในการแช่ไฮโปโทนิกที่เหมาะสม

จากการทดลองที่ 4.2.1 ผลจากการศึกษาพบว่าโครโมโซมที่ได้จะพองตัวมากเกินไปจากการแช่ลงในสารละลายไฮโปโทนิก จากการทดลองพบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการแช่สารละลายไฮโปโทนิกคือ ที่ระยะเวลา 5 นาที (0.075 M KCl) โครโมโซมที่ได้มีขนาดพอดีสามารถมองเห็นและนับจำนวนโครโมโซมได้ดี โครโมโซมที่ได้มีจำนวนโครโมโซม 2n=28, 2n=14, 2n=7 และโครโมโซมที่เป็น mixoploid เช่นเดียวกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแคลลัสที่นำมาศึกษาโครโมโซมเป็นแคลลัสที่มาจากการเลี้ยงดอกแตงกวาที่ยังไม่ได้รับการผสม โครโมโซมที่เป็น haploid, diploid และ tetraploid จึงเกิดขึ้นได้จากโปรโตพลาสต์ที่มาจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่านแคลลัส (Toriyama et al., 1986) เช่นเดียวกับ Miyoshi and Asakura (1996) พบว่าแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงออวุลของเยอบีรา (*Gerbera jamesonii*) มีจำนวนโครโมโซม haploid, diploid และ mixoploid และจากเทคนิคการหยดโปรโตพลาสต์ (protoplast dropping method) ทำให้สามารถมองเห็นโครโมโซมได้อย่างชัดเจนสามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ อีกทั้งข้อดีของเทคนิคดังกล่าวคือ เมื่อ pretreatment และแยกโปรโตพลาสต์แล้วสามารถเก็บรักษาไว้ได้ในตู้เย็นและนำมาเตรียมสไลด์ได้ทันทีตามต้องการ ซึ่งประหยัดเวลาในการเตรียมสไลด์ (Dolezel et al.,1998)

การทดลองที่ 4.3 การศึกษาโครโมโซมของต้นอ่อนแตงกวาโดยการหยดโปรโต-พลาสต์

จากการศึกษาโครโมโซมของแคลลัสแตงกวาโดยการหยดโปรโตพลาสต์แล้ว พบว่าวิธีการดังกล่าวสามารถนำมาใช้ได้ดีในต้นอ่อนของแตงกวาที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อออวุล พบว่าสามารถเห็นโครโมโซมได้ชัดเจน โครโมโซมมีการหดตัวสั้นและสามารถย้อมติดสีได้ดี พบจำนวนโครโมโซม 2n=14 และ 2n=7 ดังนั้นการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากแคลลัสและต้นอ่อนของแตงกวาโดยการหยดโปรโตพลาสต์ในเบื้องต้นได้ประสบความสำเร็จสามารถมองเห็นโครโมโซมของแตงกวาได้ชัดเจนซึ่งเป็นประโยชน์ในการศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์ในแคลลัสและส่วนอื่นๆ ของพืชในโครงการวิจัยและการปรับปรุงพันธุ์ของแตงกวาต่อไป

การทดลองที่ 4.4 วิธีการตรวจสอบด้วยวิธีการโฟล ไซโตมิทรี (Flow cytometry)

การศึกษาจำนวนชุดโครโมโซมด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (flow cytometer) โดยการตรวจวัดจากความเข้มของแสงฟลูออร์เรสเซ็นต์จากนิวเคลียสเดี่ยว จากการตรวจนับจำนวนนิวเคลียสประมาณ 2,000 นิวเคลียส พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับต้นปกติ (diploid) จากใบอ่อนที่เจริญเติบโตในโรงเรือนจากการเพาะเมล็ด เมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ยอดที่ได้จากการเลี้ยงออวุลมีโครโมโซมจำนวน 1, 2 และ 4 ชุด (mixoploid) ส่วนรากเมื่อตรวจสอบพบว่ามีจำนวนโครโมโซม 1 และ 4 ชุด และแคลลัสเมื่อตรวจสอบพบว่ามีจำนวนโครโมโซมแบบ aneuploid และ mixoploid รายงานการใช้วิธี flow cytometry เพื่อตรวจสอบต้นพืชแฮพลอยด์ที่ได้จากกระบวนการ androgenesis และกระบวนการ gynogenesis ได้นำมาใช้อย่างกว้างขวางทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Geoffriau et al., 1997) และใบเลี้ยงคู่ (Eeckhaun et al., 2006) ดังงานวิจัยในการเลี้ยงออวุลของเยอบีราก(กระถาง (*Gerbera jamesonii*) เมื่อตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมด้วยวิธี flow cytometry ของยอดที่ได้จากการเลี้ยงผ่านแคลลัส พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเป็น haploid (80.4%), diploid (15.2%) และ mixoploid (4.3%) มีจำนวนโครโมโซมทั้ง haploid และ diploid (Miyoshi and Asakura, 1996) จากการศึกษาต้นถั่วสายพันธุ์ Frisson ซึ่งมีประชากรจำนวนมากเมื่อนำโปรโตพลาสต์ของใบมาศึกษาด้วยวิธี flow cytometry ช่วยให้สามารถจำแนกต้นพืชที่เป็น tetraploid ได้ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ถั่ว (Ochatt, 2008) วิธี flow cytometry เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการวัดปริมาณดีเอ็นเอของพืชหลากหลายชนิดเนื่องจากมีความรวดเร็วสูงและสะดวก ใช้เวลาน้อย (Arumuganathan and Earle, 1991)

จากการศึกษาเลี้ยงออวุลของแตงกวาพบว่าสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้โดยผ่านแคลลัสและเมื่อศึกษาด้านเซลล์วิทยาพบว่าแคลลัสและต้นที่ได้มีความผิดปกติของจำนวน

โครโมโซม ซึ่งมีโครโมโซมแบบ aneuploid และ mixploid ที่มีโครโมโซมทั้ง haploid, diploid, และ tetraploid ความผิดปกติที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากกระบวนการ gynogenesis โดยผ่านแคลลัส (indirect gynogenesis) ซึ่งการเจริญพัฒนาของแคลลัสอาจเกิดขึ้นโดยตรงจาก egg cell, synergids, polar nuclei หรือ antipodals หรืออาจพัฒนามาจาก proembryo ทำให้ต้นที่ได้โดยผ่านการเกิดแคลลัสมีโครโมโซมที่เป็น haploid, diploid หรือ mixoploid (Reed, 2005) ดังเช่น Dryanovska (1985) ได้พบโครโมโซมในระยะเมทาเฟสเป็น diploid, haploid และ aneuploid ของแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงรังไข่และอับละอองเกสรของพืชตระกูลแตง จากการที่โครโมโซมของแคลลัสและต้นที่ได้จากแคลลัสมีจำนวนโครโมโซมที่เป็น diploid, mixoploid และ aneuploid นับว่าเป็นอุปสรรคสำคัญในกระบวนการ gynogenesis

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเซลล์สืบพันธุ์ (gametoclonal variation) อาจเกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม (เช่น polyploid หรือ aneuploid) หรือโครงสร้างโครโมโซม (เช่น duplication, deletions, translocation และ inversions เป็นต้น) ส่งผลให้แคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงออวุลเกิดความผิดปกติในระดับเซลล์ทำให้ไม่สามารถที่จะพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ gametoclonal variation ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการ gynogenesis เพื่อการสร้างพืชแฮพลอยด์ได้มีการศึกษาไม่มากนักพบมีรายงานในพืชกลุ่มธัญพืช (Reed, 2005) ในข้าวการเกิดความแปรปรวนจากต้นที่ได้จากการเลี้ยงอับละอองเกสรและจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่ามีความถี่ที่สูง (Oono, 1985) จากการศึกษาด้านเซลล์วิทยาในแคลลัสและต้นที่ได้จากการเลี้ยงอับละอองเรณูพบว่าจำนวนโครโมโซมนั้นมีความแปรปรวนสูง (Chen and Chen, 1980) จากการเลี้ยงโปรโทพลาสต์ของแคลลัสที่มาจากการเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวพบว่าต้นที่ได้เป็นแฮพลอยด์และดิพลอยด์ (Toriyama et. al., 1986) และจากการศึกษาของ Ogura et. al. (1987) โดยการนับจำนวนโครโมโซมในต้นข้าว 4 สายพันธุ์ที่ได้จากการเลี้ยงโพรโทพลาสต์ของแคลัสที่มาจากการเลี้ยงอับละอองเกสร พบว่าต้นข้าวโดยส่วนใหญ่จะมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์แต่มี 2 สายพันธุ์ที่มีจำนวนโครโมโซมแบบ tetraploid ซึ่งพบเป็นจำนวนมากในต้นที่เกิดจากแคลลัส ความผิดปกติของโครโมโซมสามารถเกิดขึ้นได้ในเซลล์และเนื้อเยื่อที่มาจากแคลลัสและต้นที่ได้โดยผ่านการเกิดแคลลัส ซึ่งอาจเกิดขึ้นจากส่วนประกอบของอาหาร (media composision) อายุของแคลลัส ธรรมชาติและลักษณะทางสัณฐานของแคลลัส พื้นฐานทางพันธุกรรมของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงเนื้อเยื่อและชนิดของอาหารเหลวหรือแข็งที่นำมาเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Singh, 1993) ความผิดปกติของโครโมโซมในแคลลัส ที่มีสาเหตุจากส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งส่วนประกอบของอาหารเป็นผลโดยตรงจากอิทธิพลของสารประกอบทางเคมีที่เติมลงในอาหาร จากรายงานส่วนใหญ่พบว่าความผิดปกติของโครโมโซมจะเกิดในระหว่างการพัฒนาไปเป็นต้น

ของการเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยสารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น 2,4-D (Shimada and Tabata., 1967), IAA (Nishiyama and Taira, 1966), NAA (Zhang et al., 1987) และ kinetin (Torrey, 1959) ความผิดปกติของโครโมโซมที่เกิดขึ้นในการเลี้ยงเนื้อเยื่อขึ้นอยู่กับชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่นำมาใช้ จากงานวิจัยพบว่า การใช้ 2,4-D จะชักนำให้เกิด polyploidy ได้มากกว่าการใช้ NAA (Kar and Sen, 1985) สารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งออกซินและไซโตไคนินเป็นผลให้โครโมโซมมีการเพิ่มขึ้นเท่าตัว (chromosome doubling) (Libbenga and Torry, 1973) โดยทั่วไปแคลลัสที่อายุมากจะสูญเสียความสามารถในการเกิดเป็นต้นเนื่องจากโครโมโซมมีการเปลี่ยนแปลงสูงภายในเนื้อเยื่อหรือมีการสะสมของจำนวนโครโมโซมที่เป็น aneuploid cells ทำให้ส่วนประกอบของโครโมโซมสูญเสียสมดุลของเซลล์ (Lavanin and Srivastava, 1988) แคลลัสที่มีอายุมากพบว่ามีความถี่ของโครโมโซมแบบ polyploidy และ aneuploid สูงและโครโมโซมมีระดับจาก haploid ถึง hypertetraploid (Novák, 1974) นอกจากนี้ความสามารถของแคลลัสในการเกิดลักษณะทางสัณฐานยังขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของโครโมโซมของเซลล์ จำนวนโครโมโซมที่สมดุลในแคลลัสเป็นสิ่งสำคัญต่อการเกิดเป็นต้นของแคลลัส ดังการศึกษาด้านเซลล์วิทยาของแคลลัสในข้าวบาร์เลย์ พบว่าโครโมโซมที่ได้เป็น diploid (2n=2x=14) มากที่สุดจากแคลลัสทั้งหมดที่ศึกษาเท่ากับ 74.1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบโครโมโซมที่เป็น haploid (2n=x=7), tetraploid (2n=4x=28), octoploid (2n=8x=56) และ triploid (2n=3x=21) ซึ่งเซลล์ที่มีโครโมโซมเหล่านี้พบในความถี่ที่ต่ำซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากความแปรปรวนจากแคลลัสไปเป็นแคลลัสจาการ subculture ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Singh, 1986) ความผิดปกติของโครโมโซมที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงโดยผ่านแคลลัสยังขึ้นอยู่กับพื้นฐานทางพันธุกรรมของพืชที่นำมาเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Ruíz et al., 1992) ดังรายงานการศึกษาโครโมโซมในแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของมันฝรั่งที่มีโครโมโซมแบบ monohaploid (2n=x=12) และ dihaploid (2n=2x=24) และ tetraploid (2n=4x=48) พบว่าเกิด polyploidization (1x→2x→4x→8x) ซึ่งเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในพืช monohaploid เมื่อเปรียบเทียบกับพืช dihaploid และ tetraploid หลังจาการเลี้ยงนาน 14 วัน พบมีจำนวนโครโมโซมแบบ monohaploid อยู่ในช่วง 12-96, dihaploid 24-48 และ tetraploid 45-200 ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากเซลล์ anueploid ระหว่างระดับ polyploidy 2 ระดับ (2x และ 4x ; 4x และ 8x) จากการขาดหายไปของโครโมโซม (chromosome elimination) หรือการเพิ่มขึ้นของโครโมโซม (chromosome addition) (Sree Ramulu et al., 1985) พืชดิพลอยด์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียอาจเป็นผลมาจากการเกิดการเพิ่มขึ้นเองอีกเท่าตัวตามธรรมชาติของชุดโครโมโซม (spontaneous doubling) ในระหว่างการเจริญพัฒนาของแคลลัส และการจำแนกระหว่าง homozygous dihaploid ที่เกิดจากการเพิ่มขึ้นเป็นเท่าตัวของโครโมโซม และ diploid ที่พัฒนาจากเซลล์ร่างกาย (somatic tissue) นั้นจำเป็นต้องใช้เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล (molecular

marker) ในการจำแนก Song et al. (2007) ศึกษาการเกิดต้นดับเบิลแฮพลอยด์โดยการเลี้ยงอับละอองเกสร (anther culture) ของแตงกวา พบว่าสามารถชักนำให้เกิดต้นได้จากการชักนำผ่านแคลลัส (embryonic callus induction) ต้นที่ได้เป็นต้นดับเบิลแฮพลอยด์ที่เกิดจากการเพิ่มขึ้นเองอีกเท่าตัวตามธรรมชาติของชุดโครโมโซมซึ่งพบได้ทั่วไปจากการเลี้ยงอับละอองเกสรและละอองเกสร (Rao and Suprassanna, 1996) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อละอองเกสรถูกชักนำผ่านแคลลัสโดยเลี้ยงลงบนอาหารสูตรชักนำที่เติม 2, 4-D และ Kinetin (Ernst et al., 1990) จากการศึกษาของ Song et al. (2007) พบต้นที่เป็นทั้ง mixoploid และ tetraploid ซึ่งตรวจพบระหว่างการเกิดเป็นต้นของแคลัสแต่แคลลัสที่ได้จากการทดลองพบว่าไม่ได้เกิดจากผนังของอับละอองเกสร (anther wall) กล่าวคือเกิดจากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเองหรือที่เรียกว่า spontaneous chromosome doubling

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการศึกษาสายพันธุ์แตงกวา สูตรอาหาร ชนิดและอัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ออวุลของแตงกวาเจริญและพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ตลอดจนการศึกษาด้านเซลล์วิทยา สรุปดังนี้

1. สายพันธุ์แตงกวาที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงออวุล คือแตงกวาลูกผสม F_1 พันธุ์ NJ2 โดยสามารถเจริญและพัฒนาเป็นเอ็มบริโอได้สูงที่สุดเท่ากับ 6.90 เปอร์เซ็นต์ ออวุลมีการเจริญพัฒนาโดยมีลักษณะเป็นตุ่มกลมเล็กๆ สีขาว

2. สูตรอาหาร ชนิดและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ออวุลของแตงกวาเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดคือ อาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ออวุลมีการเจริญและพัฒนามากที่สุดเท่ากับ 61 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนที่เลี้ยง แคลลัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 1.07 เซนติเมตร แคลลัสมีสีเหลืองลักษณะแบบเกาะกันหลวมๆ (friable callus) และสามารถชักนำให้เกิดรากได้ และการเลี้ยงออวุลลงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม TDZ ความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตรออวุลมีการเจริญพัฒนาของเอ็มบริโอสูงสุดคือ 78.33 เปอร์เซ็นต์

3. สูตรอาหาร ชนิดและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของออวุลแตงกวา คืออาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม BAP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิลิตร สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสของออวุลแตงกวาได้ดีและมีการพัฒนาของแคลลัสเป็นเอ็มบริโอจีนิกแคลลัสระยะ globular และเมื่อย้ายแคลลัสลงบนอาหารสูตร CBM (regeneration medium) ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เอ็มบริโอจีนิกแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นระยะ heart-shape และเป็นต้นที่สมบูรณ์เมื่อย้ายเอ็มบริโอจีนิกแคลลัสลงบนอาหารสูตร CBM (regeneration medium)

4. การศึกษาด้านเซลล์วิทยาเพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซมของราก แคลลัสและต้นอ่อนที่ได้จากการเลี้ยงออวุลของแตงกวาโดยวิธีการตรวจนับจำนวนโครโมโซมโดยใช้เทคนิค aceto-orcein squash วิธีการหยดโปรโตพลาสต์และการตรวจด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (flow cytometer) พบว่าวิธีการทั้งสามวิธีสามารถศึกษาจำนวนโครโมโซมได้ การศึกษาจำนวนโครโมโซมของรากโดยใช้เทคนิค aceto-orcein squash พบว่ามีจำนวนโครโมโซมแบบ 2n=14,

2n=7 และ polyploid การศึกษาจำนวนโครโมโซมของแคลลัสและต้นอ่อนโดยใช้วิธีการหยดโปรโตพลาสต์โดยการพรีทรีดเมนต์ในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี 8-hydroxyquinoline 0.05 เปอร์เซ็นต์ ย่อยแคลลัสในเอนไซม์มิกซ์ นาน 2 ชั่วโมง และแช่สารละลายไฮโปโทนิก (0.075 M KCl) นาน 5 นาที พบว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ดีและเห็นโครโมโซมได้ชัดเจนที่สุด เมื่อศึกษาโครโมโซมของแคลลัสพบว่ามีจำนวนโครโมโซมแบบ 2n=28, 2n=14 และ 2n=7 (mixoploid) และการศึกษาในต้นอ่อนของแตงกวาโดยการหยดโปรโตพลาสต์ พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=14 และ 2n=7 การตรวจสอบด้วยวิธีการโฟลไซโตมิทรี จากการศึกษาในยอดและรากพบว่ามีโครโมโซมจำนวน 1, 2 และ 4 ชุด (mixoploid) และการศึกษาในแคลลัสพบว่ามีจำนวนโครโมโซมแบบ aneuploid และ mixoploid

การเลี้ยงออวุลของแตงกวาเพื่อการผลิตพืชแฮพลอยด์ได้ประสบความสำเร็จ โดยสามารถชักนำให้เกิดต้นได้โดยผ่านแคลลัส (indirect gynogenesis) สามารถพบเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n=7 แต่จากการทดลองพบว่า แคลลัสและต้นพืชที่ได้มีจำนวนโครโมโซม diploid, polyploidy และ mixoploid ทำให้เกิดความผิดปกติในระดับเซลล์ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่พบในการเลี้ยงออวุลเพื่อการผลิตพืชแฮพลอยด์ ส่งผลให้แคลลัสมีการเจริญพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ต่ำ

ข้อเสนอแนะ

1. ในการเลี้ยงออวุลของแตงกวาสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้โดยการเลี้ยงออวุลลงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อได้แคลลัสจึงย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม BAP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสจะมีการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอจีนิกแคลลัส (embryogenic callus) จากนั้นย้ายลงบนอาหารสูตร CBM (regeneration medium) ดัดแปลงโดยเติม NAA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และสุดท้ายจึงย้าย embryogenic callus ลงบนอาหารสูตร CBM (regeneration medium)

2. ในการเลี้ยงออวุลของแตงกวาการชักนำให้เกิดต้นโดยผ่านแคลลัสทำให้ได้ต้นที่มีจำนวนโครโมโซมที่เป็น diploid, polyploid และ mixoploid ทำให้ได้กระบวนการเกิดต้น (gynogenesis) ไม่สมบูรณ์ เนื่องจากเกิดความผิดปกติในระดับเซลล์ การเลี้ยงออวุลของแตงกวาจึงควรชักนำให้เกิดเป็นเอ็มบริโอจากออวุลโดยตรง (direct gynogenesis) จึงควรมีการศึกษาถึงเทคนิคและปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงออวุลของแตงกวาต่อไป

บรรณานุกรม

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2519. **หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 418 น.

กันยารัตน์ ไชยสุต. 2532. **เซลล์พันธุศาสตร์และอนุกรมวิธานพืชสกุล *Zephyranthes***. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพฤกศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 260 น.

โกวิทย์ พัฒนาปัญญาสัตย์. 2539. **โฟลไซโทเมทรี.** กรุงเทพฯ: วงตะวัน. 283 น.

นิพนธ์ ไชยมงคล. 2544. **แตงกวา.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.agric-prod.mju.ac.th/vegetable/File_link/Cucumber.pdf (22 ตุลาคม 2549).

นพพร คล้ายพงษ์พันธุ์. 2546. **เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 261 น.

บุญยืน กิจวิจารณ์. 2544. **เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** พิมพ์ครั้งที่ 2. ขอนแก่น:โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา. 207 น.

ประภา ศรีพิจิตต์. 2543. **เซลล์พันธุศาสตร์ที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช.** กรุงเทพฯ. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 354 น.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. **เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์. 158 น.

ปราโมทย์ พรสุริยา. 2540. แตงกวาเพื่ออุตสาหกรรม. **ศูนย์บางพระ** 34: 11-15.

ปริญญา ขจัดพาล. 2546. **การผลิตข้าวโพด (*Zea mays* L.) ดับเบิลแฮพลอยด์โดยการเลี้ยงอับละอองเกสร**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 123 น.

พองาม เดชคำรณ. 2531. **การเลี้ยงอับเรณูของแตงกวาในสภาพปลอดเชื้อ** รายงานประจำปี 2531. ลำปาง: สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตร วิทยาลัยเทคโนโลยีและอาชีวศึกษา. 4 น.

ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. 2524. **หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.** กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 109 น.

วิทยา บัวเจริญ. 2527. **หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช**. กรุงเทพฯ: กรุงเทพสยามการพิมพ์. 72 น.

ศิริพร เหล่าเทิดพงษ์. 2527. **เอกสารประกอบการบรรยายวิชาปรับปรุงพันธุ์พืช**. เชียงใหม่: คณะผลิตกรรมการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้. 125 น.

ศิริพร พงศ์ศุภสมิทธิ์. 2547. **การปรับปรุงพันธุ์พืช**. เชียงใหม่: นพบุรีการพิมพ์. 253 น.

สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์. 2539. **การปรับปรุงพันธุ์พืช.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 335 น.

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541. **การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช**. กรุงเทพฯ:โรงพิมพ์อดิ-สรรค์. 133 น.

Arumuganathan, K. and E.D. Earle. 1991. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. **Plant Molecular Biology Reporter** 9(3):229-233.

Atanassov, A., N. Zagorska and D. Djiljanov. 1995. *In vitro* production of haploid plants, **World Journal of Microbiol. and Biotechnol** 11:400-408.

Bajaj, Y.P.S. 1990. **Haploids in crop improvement I**. New York: Springer-Verlag. 549 p.

Barendse, G. W. M., A. F. Croes and G. J. Wullems. 1987. Uptake and metabolism of NAA and BAP in explants of tobacco in relation to *in vitro* flower bud formation. **J.Plant Growth Regulation** 6:193-200.

Beauville, A.M. 1980. Obtention d'haploides *in vitro* a partir d'ovaires non feconds de Riz, *Oryza sativa L.* **C.R. Acad. Sci. (Paris)** 296 D:489-492.

Blakeslee, A.F. 1922. A haploid mutant in the Jimson weed, *Datura stramoniumI.* **Science** 55:646-647.

Bornman, C.H. 1985. Haploidization of sugar beet (*Beta vulgaris*) via gynogenesis. ***In Vitro.*** 1:3.

Bossoutrot, D. and D. Hosemans. 1985. Gynogenesis in *Beta vulgaris* L. from in vitro culture of unpollinated ovules to the production of double haploid plant in soil. **Plant Cell Rep** 4:300-303.

Burbulis, N., A. Blinstrubiene and R. Kupriene. 2007. Some factors affecting callus induction in ovary culture of flax (*Linum usitatissimum* L.). **Biologija** 53(2):21-23.

Cagnet-Sitbon, M. 1981. Production of haploid *Gerbera jamesonii* plants by culture of unfertilized ovules. **Agronomie** 1:807-812.

Cai, Q., Szarejko I. and M. Maluszynski. 1992. The effect of sugars and growth regulators on embryoid formation and plant regeneration from barley anther culture. **Plant Breed** 109: 218-226.

Campoin, B. and C. Alloni. 1990. Induction of haploid plants in onion (*Allium cepa* L.) by *in vitro* culture of unpollinated ovules. **Plant Cell Tissue Org Cult.** 20: 1-6.

Campion, B. and M.T. Azzimonti. 1988. Evolution of ploidy level in haploid plants of onion (*Allium cepa*) obtained through *in vitro* gynogenesis. pp. 85-89. In **4 th EUCARPIA *Allium* Symposium.** Wellesbourne (UK), September 6-9, 1988.

Campion, B., M.T. Azzimonti and A. Falangna. 1992. Advances in haploid plant induction in onion (*Allium cepa* L.) through *in vitro* gynogenesis. **Plant Sci.** 86:97-104.

Cappadocia, M., L. Chretien and G. Laublin. 1988. Production of haploid in *Gerbera jamesii* via ovule culture: influence of fall versus spring sampling on callus formation and shoot regeneration. **Can. J. Bot.** 66:1107-1110.

Chand, S. and A. Sahrawat. 2007. Embryogenesis and plant regeneration from unpollinated ovary culture of *Psoralea corylifolia*. **Biologia Plantarum** 51(2): 223-228.

Chase, S.S. 1969. Monoploid and monoploid derivatives of maize (*Zea mays* L.). **Bot. Rev** 35:117-167.

Chen, C.C. and C.M. Chen. 1980. Changes in chromosome number in microspore callus of rice during successive subcultures. **Can. J. Genet. Cytol.** 22:607-614.

Chin, J.C. and K.J. Scott. 1977. Studies on the formation of roots and shoots in wheat callus cultures. **Annal Botany** 41: 473-481.

Clark, J.K. and W.F. Sheridan. 1986. Developmental profiles of the maize embryo - lethal mutants *dek22* and *dek23*. **J. Heredity.** 77: 83-92.

Clausen, R.E. and M.C. Mann. 1924. Inheritance in *Nicotiana tabacum*. V. The occurrence of haploid plants in interspecific progenies. Proc. Natl. **Acad. Sci. U. S. A.** 10:121-124.

Darlington, C.D. 1937. **Recent Advances in Cytology.** 2nd ed. London: Academic Press. 671 p.

Deuter, M. 1970. Some remarks on methods for the establishment of the degree of ploidy in sugar beet. **Genet. Pol.** 11: 219-225.

Diao, W.P., Y.Y. Jia and J.F.Chen. 2009. Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenetants using SSR markers. **HortSci**. 119: 246-251.

Dias, J.C.S. 1999. Effect of activated charcoal on *Brassica oleracea* microspore culture embryogenesis. **Euphytica**. 108: 65-69.

Doctrinal, M., R.S. Sangwan and B.S. Sangwan - Norreel. 1989. *In vitro* gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: Effect of plant growth regulators, temperature, genotypes and season. **Plant Cell Tissue Org Cult.** 17: 1-12.

Dolezel, J., M. Dolezelova, N. Roux and I. van Den Houwe. 1998. A novel method to prepare slides for high resolution chromosome studies in Musa spp. **Infomusa**. 7:3-4.

Doležel, J., J. Greilhuber and J. Suda. 2007. **Flow Cytometry with plant cells**. Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 455 p.

Dryanovska, O.A. 1985. Induced callus *in vitro* from ovaries and anthers of species from the Cucubitaeceae family. **C.R.Acad.Bulgare Sci.** 38:1243-1244.

Dyer, A. F. 1979. **Investigating chromosome**. London: Edward Arnold Ltd. 208 p.

Eeckhaut, T., L. Leus and J. van Huylenbroeck. 2006. Exploitation of flow cytometry for plant breeding. **Acta Physiol Plant**. 27:743-750.

Endang, S. 2002. Haploid induction from F1 hybrids between CMS shallot with *Allium galanthum* cytoplasm and common onion by unpollinated flower culture. **Euphytica** 125:139-144.

Ernst, S., K. Scheibner and M. Luckner. 1990. Androgenesis cell cultures and plants from anthers of *Digitalis lanata*. **J. Plant Physiol.** 137: 129-134.

Ekrem, G. 1998. Plant Regeneration from Unfertilized Ovaries of Sugar Beet (Beta vulgaris L.) Cultured *In Vitro*. **Tr. J. of Botany**. 22: 233-238.

Evans, D.A., W.R. Sharp and C.E. Flick. 1981. Growth and Behavior of Cell Culture:Embryogenesis and Organogenesis. pp. 45-113. In Thorpe T.A. (eds.) **Plant Tissne Culture. Method and Applications in Agriculture.** New York: Academic Press.

Ferant, V. and J. Bouharmont. 1994. Origin of gynogenetic embryos of *Beta vulgaris* L. **Sexual Plant Repro.** 7: 12-16.

Ferrie, A.M.R., C.E. Palmer and W.A. Keller. 1995. Haploid embryogenesis. pp. 309-344. In Trevor A.T. (eds.). ***In vitro* embryogenesis in plants.** Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic.

Forster, B.P., E. Heberle-Bors and A. Touraev. 2007. The resurgence of haploids in higher plants. **TRENDS in Plant Science** 12(8):368-375.

Gains, E.F. and H.C. Aase. 1926. A haploid wheat plant. Am. **J. Bot** 13:373-385.

Garcia, R.B., A. Cisneros, B. Schneider and N. Tel-Zur. 2009. Gynogenesis in the vine cacti *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). **Plant Cell Rep.** 28: 719-726.

Gémes-Juhász, A., P. Balogh and A. Ferenczy. 2002. Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on *in vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Cell Reports** 21(2): 105-111.

Geoffriau, E., R. Kahane and M. Rancillae. 1997. Variation of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L.). **Euphytica** 94: 37-44.

Geoffriau, E., R. Kahane, C. Bellamy and M. Rancillae. 1997. Ploidy stability and *in vitro* chromosome doubling in gynogenic clones of onion (*Allium cepa* L.). **Plant Sci.** 122:201-208.

Germana, M.A. and B. Chiancone. 2003. Improvement of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. Microspore-derived embryo induction and regeneration. **Plant Cell Reports.** 22: 181-187.

Gland, A., R. Lichter and H.G. Schweiger. 1988 Genetic and exogenous factors affecting embryogenesis in isolated microspore cultures of *Brassica napus*. L. **J Plant Physiol.** 132:613-617.

Guha, S. and S.C. Maheshwari. 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. **Nature** 204:497.

Guha, S. and B.M. Johri. 1966. *In vitro* development of ovary and ovule of *Allium cepa* L. **Phytomorphology** 16:353-364

Gürel, S., E. Gürel and Z. Kaya. 2000. Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) **Plant Cell Rep.** 19: 1155-1159.

Ham, L.H. 2000. *In vitro* gynogenesis. pp. 22-28. In **Second Annual Report of INCO - DC Project.** Hamberg: Germany University Press.

Hassandakht, M.R. and B. Campion. 2002. Low temperature, medium and genotype effect on the gynogenic ability of onion (*Allium cepa* L.) flowers culture *in vitro*. **Advances Horticultural Sci.** 16: 72-78.

He, C.P. and H.Y. Yang. 1988. An investigation on the stability of synergid apogamy and its condition in rice ovary culture. **J. Wuhan Bot. Res.** 6: 203-206.

Heimlich, L.F. 1927. The development and anatomy of the staminate flower of the cucumber. **Amer. Jour. Bot.** 14: 227-237.

Ho, K.M. and G.E. Jones. 1980. Mingo barley. Can. **J. Plant Sci.** 60:279-280.

Hofer, M. 1995. *In vitro* androgenesis in apple. **Gartenbauwissenschaft.** 60:12-15.

Huang, Q.F., H.Y. Yang and C. Zhou. 1982. Embryological observations on ovary culture of unpollinated young flowers in *Hordeum vulgare* L. **Acta Botanica Sinica** 24: 295-300.

Jensen, C.J. 1974. Chromosome doubling techniques in haploids. Pp 153-190. In Kasha, K.J. (ed.). **Haploids in Higher Plants. Advances and Potential. Proceedings of the First International Symposium.** Canada: Guelph University Press.

Joshi, M., K. Sujatha and S. Hazra. 2008. Effect of TDZ and 2, 4-D on peanut somatic embryogenesis and *in vitro* bud development. **Plant Cell Tiss Organ Cult.** 94:85-90

Kalloo. 1988. **Vegetable Breeding.** Vol. 1. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc. 213 p.

Kamstaityte, D. and V. Stanys. 2002. Pathways of onion regeneration *via* flower and ovary culture. **Zemdirbyste.** 78: 245-250.

Karunaratne, S. and K. Periyapperuma. 1989. Culture of immature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.): callus proliferation and somatic embryogenesis. **Plant Sci** 2: 247-53.

Kar, D.K. and S. Sen. 1985. Effect of hormone on chromosome behaviour in callus cultures of *Asparagus racemosus*. **Biol. Plant.** 27:6-9.

Kasha, K.J. 1974. **Haploids in Higher Plants.** Advances and Potential. Proceedings of the First International Symposium, Canada: Guelph University Press. 421 p.

Kasha, K.J. and K.N. Kao. 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Nature** 288, 874-876.

Keller, J. 1990. Culture of unpollinated ovuled, ovaries and flower buds in some species of the genus *Allium* and haploid induction *via* gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.) **Euphytica** 47: 241-247.

Keller, E.R.J. and L. Korzun. 1996. Ovary and ovule culture for haploid production. pp. 217-235. In J.S. Mohan and R.E. Sopory. (eds.). ***In vitro* Haploid Production in Higher Plants.** Vol. 1. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Kimber, G. and R. Riley. 1963. Haploid angiosperms. **Bot. Rev** 29:480-531.

Kott, L.S., L. Polsoni, B. Ellis and W.D. Beversdorf . 1988. Autotoxicity in isolated microspore cultures of *Brassica napus*. **Can J Bot** 66:1665-1670.

Kuo, C.S. 1982. The preliminary studies on culture of unfertilized ovary of rice *in vitro*. **Acta Bot. Sin** 24: 33-38.

Lavania, U. C. and S. Srivastava. 1988. Ploidy dependence of chromosomal variation in callus cultures of *Hyoscyamus muticus* L. **Protoplasma.** 145:55-58.

Libbenga, K. R. and J.G. Torry. 1973. Hormone-induced endoreduplication prior to mitosis in cultured pea root cortex cells. **Am J. Bot.** 60:293-299.

Lux, H., L. Herrmann and C. Wetzel. 1990. Production of haploid sugar (*Beta vulgaris* L.) by culturing unpollinated ovules. **Plant Breed.** 104: 177-183.

Lynn, J., H.T. Robinson and I.T. Puddephat. 1999. Influence of stock plant pre-treatment on gynogenic embryo induction from flower buds of onion. **Plant Cell Tissue Org. Cult.** 57: 145-148.

Maheshwari, P. 1950. **An Introduction to the Embryology of Angiosperms.** New York: McGraw-Hill. 453 p.

Maheswari, M.G. and N.S. Rangaswamy. 1965. Embryology in relation to physiology and genetics. pp. 219-321. In **Advance in botanical research.** Vol. 2. London: Acad. Press.

Maluszynski, M., K.J. Kasha and I. Szarejko. 2003. Published protocols for other crop plant species. pp. 309-336. In **Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Metwally, E.I., S.A. Moustafa, B.I. EI-Sawy, S.A. Haroun and T.A. Shalaby. 1998. Production of haploid plants from in vitro culture of unpollinated ovules of *Cucurbita pepo* L. **Plant Cell Tiss. Org Cult.** 52:117-121.

Michalik, B., A. Adamus and E. Nowak. 2000. Gynogenesis in Polish onion cultivars. **J. Plant Physiol** 156: 211-216.

Miyoshi, K. and N. Asakura. 1996. Callus induction, regeneration of haploid plants and chromosome doubling in ovule cultures of pot gerbera (*Gerbera jamesonii*). **Plant Cell Rep.** 16: 1-5.

Mól, R. 1992. *In vitro* gynogenesis in *Melandrium album*: from parthenogenetic embryo to mixoploid plants. **Plant Sci.** 81: 261-269.

Morris, R. 1983. Remodeling crop chromosome. pp. 109-129. In **The American Society of Agronomy, and the Crop Science Society of America**. Wisconsin: Madison Inc.

Mukhambetzhanov, S.K. 1997. Culture of nonfertilized female gametophytes *in vitro*. **Plant Cell Tissue Org. Cult.** 48: 111-119.

Muren, R.C. 1989. Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion. **HortSci.** 24: 833-834.

Nishiyama, I. and T. Taira. 1966. The effect of kinetin and indoleacetic acid on callus growth and organ formation in two species of *Nicotiana*. **Jpn. J. Jenet.** 41:357-365.

Novák, F.J. 1974. The changes of karyotype in callus cultures of *Allium sativum* L. **Caryologia.** 27:45-54.

Ochatt, S.J. 2008. Flow cytometry in plant breeding. **Cytometry A**. 73:581-598.

Ogura, H., J. Kyozuka and K. Shimamoto. 1987. Field performance and cytology of protoplast-derived rice (*Oryza sativa*): high yield and low degree of variation of four japonica cultivars. **Theor. Appl. Genet.** 74: 670-676.

Olfa, S. and S. Hajer. 2007. Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) through culture of unpollinated ovaries. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 91:125-133.

Oono, K. 1985. Putative homozygous mutation in regenerated plants of rice. **Mol. Gen. Genet.** 198:377-384.

Pan, M.J. and J.V. Staden. 1998. The use of charcoal in *in vitro* cultures-a review. **Plant Growth Reg** 26:155-163.

Powell, W., G.C. Machray and J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science.** 1:215-222.

Prem, D., K. Gupta and A. Agnihotri. 2008. Activated charcoal induced high frequency microspore embryogenesis and efficient doubled haploid production in *Brassica juncea*. **Plant Cell Tiss Organ Cult.** 93:269-282.

Ran, B.D. 1980. Induction of haploid plants from unfertilized tobacco ovules. **Zhongguo Yancao** (3):25-26.

Rao, P.S. and P. Suprassanna. 1996. Method to double haploid chromosome number. pp. 317-339. In Jain S.M., sopory S.K., Veilleux R.E. (eds.) ***In vitro* haploid production in higher plants**, vol 1. Dordrecht: Kluwer Academic Publ.

Rangan, T.S. 1984. Culture of ovaries. pp. 221-231. In I.K. Vasil, ed. **Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants.** Vol. 1. New York: Academic Press.

Razdan, M.K. 2003. **Introduction to Plant Tissue Culture.** 2nd ed. Enfield: Science Publishers, Inc. 275 p.

Reed, S.M. 2005. Haploid culture. pp. 225-234. In Trigiano, R.N. and D.J. Gray (eds.) .**Plant development and biotechnology**. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Riley, R. 1974. The status of haploid research. pp. 3-9. In Kasha, K.J. (eds.) **Advances and Potential. Proceedings of the First International Symposium. Haploids in Higher Plants**. Canada: Guelph University Press.

Robinson, R.W. and D.S. Decker-Walters. 1997. **Cucurbits**. Wallingford: CAB International. 226 p.

Rochon, E.M., F. Piola, E.L. Deunff and C. Dumas. 1998. *In vitro* development of maize immature embryos: a tool for embryogenesis analysis. **J. Exp. Bot.** 49: 839-845.

Ruíz, M.L., J. Rueda and A.M. Vázquez. 1992. Somatic embryogenesis, plant regeneration and somaclonal variation in berlay. **Plant. Cell. Tiss. Cult.** 28:97-101.

Sachar, R.C. and M. Kapoor. 1958. Influence ofkinetin and gibberellic acid on the test-tube seeds of *Cooperia pedunculata* Herb. **Naturwissenschaften** 45: 552-553.

Sachar, R.C. and M. Kapoor. 1959. *In vitro* culture of ovules of *Zephyranthes*. **Phytomorphology** 9:147-156.

San Noeum, L.H. 1976. Haploides d' *Hordeum vulgare* L. par culture *in vitro* d'ovaries non fecondés. **Ann. Amélior. Plantes** 26:751-754.

Sato, S., N. Katoh and M. Hagimori. 2000. Production of doubled haploid plants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by pseudofertilized ovule culture. **Scientia horticulturae (Sci. hortic.)** 83: 301-310.

Sauton, A. 1989. Haploid gynogenesis in *Cucumis sativus* induced by irradiated pollen. **Rep Cucurbit Genet Coop** 12: 22-23.

Schum, A., L. Mattiesch and K. Hofmann. 1993. Regeneration of dihaploids *via* gynogenesis in *Allium porrum* L. **Gartenbauwissenschaft**. 58: 227-232.

Shalaby, T.A. 2007. Factors affecting haploid induction through *in vitro* gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). **Scientia Horticulturae** 115:1-6.

Sharma, A. K. and A. Sharma. 1980. **Chromosome techniques : theory and practice**. Boston, USA: Butterworth & Co Ltd. 711 p.

Shimada, T. and M. Tabata. 1967. Chromosome number in cultured pith tissue of tobacco. **Jpn. J. Genet.** 42:195-201.

Siddigui, S.A. 1954. *In vitro* culture of ovules of *Nicotiana tabacum* L. var. NP. 31. **Naturwissenschaften** 51: 517.

Singh R.J. 1986. Chromosomal variation in immature embryo derived calluses of Barlay (*Hordeum vulgare* L.). **Theor. Appl. Genet.** 72:710-716.

Singh R.J. 1993. Chromosomal aberrations in cell and tissue culture derived calluses and their regenerants. pp 285-307. In Singh RJ, eds. **Plant Cytogenetics**. Boca Raton: CRC Press.

Sita, G.L. 1997. Gynogenic haploids *in vitro*. pp. 175-193. In S.M. Jain, S.K. Sopory and R.E. Veilleux, eds. ***In vitro* Haploid Production in Higher Plants.** Vol. 5. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Skoog, F. and C.O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symp. Soc. Exp. Biol.** 11: 118-123.

Skirvin, R.M. 1978. Natural and induced variation in tissue. **Euphytica**. 27: 241-266.

Song, H., Q.F. Lou and X.D. Luo. 2007. Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Cell Tissue and Organ Cultute** 90:245-254.

Sree Ramulu, K., P. Dijkhuis and B. de Groot. 1985. Patterns of DNA and chromosome variation during *in vitro* growth in various genotypes of potato. **Plant Sci.** 41:69-78.

Suprunova, T. and N. Shmykova. 2008. In vitro induction of haploid plants in unpollinated ovules, anther and microspore culture of *Cucumis sativus*. pp. 371-374. In Pitrat M. (ed). **Cucurbitaceae 2008, Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae**. France: Avignon.

Swiader, J.M., G.W. Ware and J.P. MacCollum Danville. 1996. **Commercial Cucumber Production**: **Interstate Publishers Inc** [Online]. Avialable http://www.lpl.arizona.edu/~bcohen/cucumbers/commercial.html (20 August 2007).

Tao, Z.R., M.S. Liu and Z.C. Zhu. 1985. *In vitro* production of haploid plantlets from unpollinated ovaries of potato. **Hereditas** 7: 5.

Thompson, K.F. 1972. Oil-seed rape. pp. 94-96. In **Reports of the Plant Breeding.** Cambridge: Cambridge University Press.

Tian, H.Q. and H.Y. Yang. 1989. Haploid enbryogeny and plant regerneration in unpollinated ovary culture of *Allium tuberosum*. **Acta Biol. Exp. Sin.** 22: 139-143.

Toriyama, K., K. Hinata and T. Sasaki. 1986. Haploid and diploid plant regeneration from protoplasts of anther callus in rice. **Theor.Appl. Genet.** 73: 16-19.

Torrey, J. G. 1959. Experiment modification of development in the root. pp 189-222. In D. Rudnick, eds. **cell organism and *Milieu*.** New York: Ronald Press.

Tosca, A., L. Arcara and P. Frangi. 1999. Effect of genotype and season on gynogenesis efficiency in *Gerbera*. **Plant Cell Tissue Org. Cult.** 59: 77-80.

Tutorvista. 2008. [Online] Available http://www.tutorvista.com/content/biology/biology-iv/flowering-plants-reproduction/sexual-reproduction.php (14 November 2008).

Uchimiya, H., T. Kameya and N. Takanashi. 1971. *In vitro* culture of unfertilized ovules in *Solanum melongena* and *Zea mays*. Jpn. **J. Breeding** 21: 247-250.

Van Geyt, J. and M. Jacobs. 1986. Induction of haploids of sugar beet by means of androgenesis and gynogenesis. **Bulletin de la Soc Botan De France.** 133: 83-92

Van Geyt, J., G.J. Speckmann and M. Jacobs. 1987. *In vitro* induction of haploid plant from unpollinated ovules and ovaries of the sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). **Theor. Appl. Genet.** 73: 920-925.

Varghese, B.M. 1973. **Studies on the cytology and evolution of south Indian Cucurbitaceae.** Doctor of Philosophy Dissertation. Kerala University. 134 p.

Walden, D.B. 1978. Maize Breeding and Genetics. New York : John Wiley and Sons, Inc. Cited by G.H., Shull. 1909. **A** pure line method of corn breeding. **Am. Breeders Assoc. Rep.** 5: 50-59.

Wang, C.C. and B.J. Kuang. 1981. Induction of haploid plants from the female gametophyte of *Hordeum vulgare* L. **Acta Botanica Sinica.** 23: 329-330.

Wang, S., A. Hang and T. Tsuchiya. 1991. Chromosome studies of callus tissues and regenerated plants from an unfertilized ovule culture of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). **J. Genet. Breed.** 45: 161-168.

Winton, L.L. and R.F. Stettler. 1974. Utilization of haploidy in tree breeding. pp. 259-273. In **Haploids in Higher Plants.** Advances and Potential. Proceedings of the First International Symposium. Canada: Guelph University Press.

Wremerth-Weich, E. and M.W. Levall. 2003. Doubled haploid production of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). pp. 255-263. In **Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual**. London: Kluwer Academic Publishers.

Wu, B.J. and K.C. Chen. 1982. Cytological and embryological studies on haploid plant production from cultured unpollinated ovaries of *Nicotiana tabacum* L. **Acta Bot. Sin.** 24: 125-129.

Yan, J.H., R.Z. Zhao and J.L. Cao. 1979. Induction of an embryo sac plantlet in *Triticum aestivum*. **J. Shanxi University (Natural Science Edition)** 3-4: 1-4.

Yang, H. Y. and C. Zhou. 1982. *In vitro* induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules. **Theor. Appl. Genet** 63:97-104.

Yang, H.Y., H. Yan and C. Zhou. 1990. *In vitro* production of haploids in *Helianthus*. pp. 472-498. In Y.P.S. Bajaj (ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry :Legumes and Oilseed Crops I.** Vol. 10. Berlin: Springer Verlag.

Yilmaz, Ö.E. 2005. **Obtaintion of haploid plant with ovarium culture in summer squash (*Cucurbita pepo* L.)**. Doctoral dissertation. Kahramanmaras University. 68 p.

Zakhariev, A. and G. Kikindonov. 1997. Possibilities of haploidy application in the sugar beet breeding. **Plant Sci** 34:28-30.

Zhang, D. L., K.Q. Li and L.F. Hao. 1987. Chromosome aberration and ploidy equilibrium of *Vicia faba* in tissue culture. **Thero. Appl. Genet.** 75:132-137.

Zhou, C. and H.Y. Yang. 1980. *In vitro* induction of haploid plantlets from unpollinated young ovaries of *Oryza sativa* L. **Acta Genet. Sin** 7: 287-288.

Zhou, C., H.Y. Yang and S. Cai. 1982. Factors affecting callus formation in unpollinated ovary culture of rice. pp. 79-87. In **Proc. Workshop on potentials of plant cell and tissue culture techniques for improvement of cereal crops**. Beijing: Science Press.

Zhou, C., H. Yang, H. Tian, Z. Liu and H. Yan. 1986. *In vitro* culture of unpollinated ovaries in *Oryza sativa* L. pp. 165-181. In H. Hu and H. Yang (eds). **Haploid of Higher Plants *In vitro*.** Berlin: Springer Verlag.

Zhu, Z.C. and H.S. Wu. 1979. *In vitro* induction of haploid plantlets from the unpollinated ovaries of *Triticum aestivum* and *Nicotiana tabacum*. **Acta Genet. Sin** 6:181-183.

Zhu, Z.C., H.S. Wu, Q.K. An and Z.Y. Liu. 1981. Induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of *Triticum aestivum* cultured *in vitro*. **Acta Genet. Sin.** 8:386-390.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ปริมาณสารเคมีและผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ

ตารางผนวก 1 แสดงปริมาณสารเคมีในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตรต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเลี้ยงออวุลของแตงกวา หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร

ชนิดสารเคมี	MS	CBM (induction medium)	CBM (regeneration medium)
NH_4NO_3	1650	450	450
KNO_3	1900	950	950
$MgSO_4.7H_2O$	370	185	185
KH_2PO_4	170	-	-
KH_4PO_3	-	75	75
$CaCl_2$	440	160	160
$Ca(NO_3).4H_2O$	-	25	25
$NaH_2PO_4.H_2O$	-	19	19
$(NH_4)_2SO_4$	-	17.5	17.5
KCl	-	3.5	3.5
$MnSO_4.4H_2O$	22.3	20	20
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	4	4
H_3BO_3	6.2	4	4
KI	0.83	0.7	0.7
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.2	0.2
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.016	0.016
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.016	0.016
Na_2EDTA	37.3	37.3	37.3
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	27.8	27.8
Myo-inositol	100	80	100
Nicotinic acid	0.5	1	1.5
Pyridoxine	1	2	3
Thiamine	2	1	1.5
Glycine	-	0.1	0.2
Biotin	-	0.05	1

ตารางผนวก 1 (ต่อ)

ชนิดสารเคมี	MS	CBM (induction medium)	CBM (regeneration medium)
Ca-pantothenate	-	0.5	1
Ascorbic acid	-	-	20
L-proline	-	-	100

ตารางผนวก 2 วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติเปอร์เซ็นต์ความถี่การเกิดเอ็มบริโอของแตงกวาสองสายพันธุ์

Source of Variation	d.f.	SS	MS	F
Treatment	1	79.6	79.6	23.38**
Error	18	61.29	3.40	
Total	19	140.89		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

C.V. = 37.62%

ตารางผนวก 3 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของออวุลแตงกวาบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

Source of Variation	d.f.	SS	MS	F
Treatment	24	76553.60	3189.73	23.85**
2,4-D	4	71173.60	17793.40	133.05**
Kinetin	4	1105.60	276.40	2.07^{ns}
2,4-D x Kinetin	16	0.67	0.04	2.00*
Error	225	30090	133.73	
Total	249	16.53		

หมายเหตุ * = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99%
ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
C.V. = 33.19%

ตารางผนวก 4 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติขนาดเคลลัสเฉลี่ยของออวุลแตงกวาบนอาหารสูตรMS ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

Source of Variation	d.f.	SS	MS	F
Treatment	24	8.95	0.37	11.09**
2,4-D	4	7.53	1.88	133.05**
Kinetin	4	0.75	0.19	5.59**
2,4-D x Kinetin	16	0.67	0.04	1.24^{ns}
Error	225	7.57	0.03	
Total	249	16.53		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99%
ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
C.V. =24.74%

ตารางผนวก 5 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติเปอร์เซ็นต์การตอบสนองของออวุลแตงกวาบนอาหารสูตร CBM (induction medium) ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

Source of Variation	d.f.	SS	MS	F
Treatment	24	126794.54	5283.11	54.31**
2,4-D	4	711829.42	17957.35	184.61**
Kinetin	4	20709.04	5177.26	53.22**
2,4-D x Kinetin	16	34256.10	2141.00	22.01**
Error	225	21886.10	97.27	
Total	249	148680.64		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

C.V. = 21.50%

ตารางผนวก 6 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติขนาดแคลลัสของออวุลแตงกวาบนอาหารสูตร CBM (induction medium) ดัดแปลงโดยเติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

Source of Variation	d.f.	SS	MS	F
Treatment	24	1.52	0.06	11.20**
2,4-D	4	1.03	0.26	45.89**
Kinetin	4	0.03	0.01	1.55^{ns}
2,4-D x Kinetin	16	0.44	0.03	4.94**
Error	225	1.27	0.01	
Total	249	2.78		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

C.V. =12.98%

ตารางผนวก 7 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของออวุลแตงกวาบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ร่วมกับ BAP ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

Source of Variation	d.f.	SS	MS	F
Treatment	24	56095.90	2337.33	31.62**
NAA	4	47415.90	11853.98	160.38**
BAP	4	4667.90	1166.98	15.79**
NAA x BAP	16	4012.10	250.76	3.39**
Error	225	16630	73.91	
Total	249	72725.90		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

C.V. = 24.65%

ตารางผนวก 8 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติขนาดแคลลัสของออวุลแตงกวาบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ร่วมกับ BAP ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

Source of Variation	d.f.	SS	MS	F
Treatment	24	1.20	0.05	11.10**
NAA	4	0.84	0.21	46.72**
BAP	4	0.10	0.03	5.76**
NAA x BAP	16	0.25	0.01	3.53**
Error	225	1.01	0.004	
Total	249	2.21		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

C.V. = 11.03%

ตารางผนวก 9 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติการเกิดเอ็มบริโอของออวุลแดงกวาบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม TDZ ร่วมกับการเติม/ไม่เติมถ่านกัมมันต์ (activated charcoal)

Source of Variation	d.f.	SS	MS	F
Treatment	7	12337.07	1762.44	2322.82**
TDZ	3	3570.61	1190.20	1568.64**
activated charcoal	1	8059.33	8059.33	10621.9**
TDZ x activated charcoal	3	707.13	235.71	310.65**
Error	16	12.14	0.76	
Total	23	12349.21		

หมายเหตุ ** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

C.V. = 2.14%

ตารางผนวก 10 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติขนาดแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยเติม NAA ร่วมกับ BAP หรือ kinetin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

Source of Variation	d.f.	SS	MS	F
Treatment	9	0.09	0.01	1.74^{ns}
Error	90	0.53	0.01	
Total	99	0.62		

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

C.V. = 7.72%

การตรวจนับจำนวนชุดโครโมโซมพืชด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

โฟลไซโตเมทรี (flow cytometry)

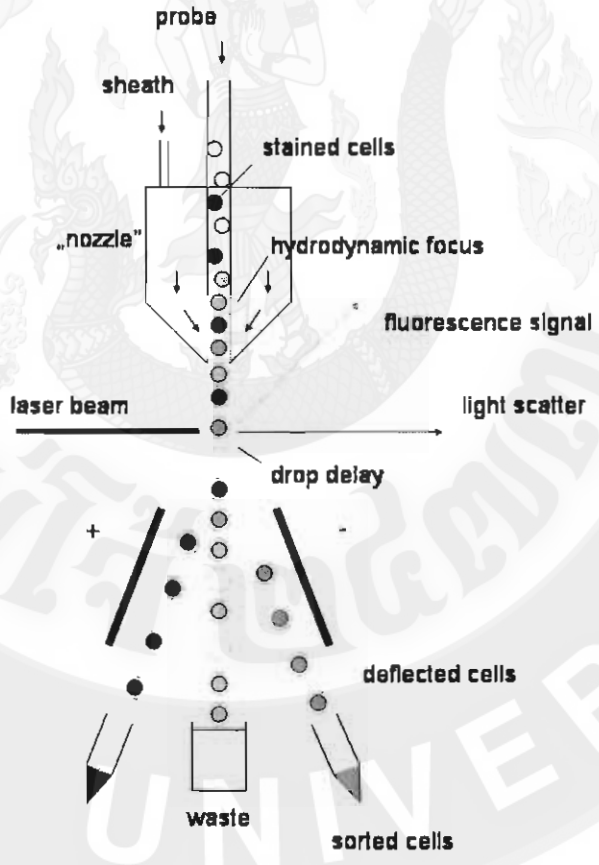
โฟลไซโตเมทรี (flow cytometry) เป็นการวิเคราะห์เซลล์โดยใช้เครื่องโฟลไซโต-มิเตอร์ที่ใช้สำหรับกระบวนการในการตรวจนับจำนวนและศึกษาความแตกต่างของเซลล์หรืออนุภาค โดยเป็นการตรวจวิเคราะห์ลักษณะต่างๆ ของเซลล์หลายชนิดพร้อมๆ กัน ซึ่งเซลล์ที่สกัดออกมานั้นจะอยู่ในรูปแขวนลอยและในการวิเคราะห์จะทำขณะที่เซลล์เคลื่อนที่ผ่านลำแสงเลเซอร์เป็นเซลล์เดี่ยวๆ แรงดันจะบังคับให้อนุภาคในหลอดแก้วไหลเป็นเส้นตรง เรียกว่า hydrodynamic focusing อยู่ในช่องโฟล (flow chamber) อนุภาคของเซลล์จะไหลผ่านลำแสงเลเซอร์ เมื่อลำแสงเลเซอร์กระทบอนุภาคของเซลล์ที่ย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนส์จะดูดซับพลังงานจากแสงและจะเกิดการปลดปล่อยพลังงานแสงออกมาซึ่งจะมีเครื่องเปลี่ยนสัญญาณทำให้เกิดการเปลี่ยนสัญญาณคลื่นแสงเหล่านั้นให้เป็นคลื่นไฟฟ้าทำให้บอกขนาดของอนุภาคหรือจำนวนอนุภาคได้ (โกวิทย์, 2539) ซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญ 3 ส่วน คือ (Dolezel, 2007)

1. ระบบของเหลวและการไหลของเซลล์ (fluidics and flow cell) โดยอนุภาคของตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์จะอยู่ในรูปสารแขวนลอยซึ่งจะเคลื่อนที่ผ่านท่อแก้วควอตซ์ขนาดเล็กโดยอาศัยการใช้แรงดันอากาศให้กับตัวกลางของเหลวที่เป็น isotonic solution ในที่นี้เรียกว่า sheath fluid ทำให้สารละลายนี้ไหลไปพร้อมกับเซลล์ที่ต้องการศึกษา โดยสารละลายจะพาเซลล์ให้ไหลผ่านมาเป็นเซลล์เดี่ยวๆ เรียงกันเป็นเส้นตรง โดยเซลล์ที่ต้องการตรวจวัดจะอยู่ตรงกลางและมี sheath fluid ล้อมรอบ (ภาพ) โดยจะใช้อัตราการเคลื่อนที่ของ sheath fluid เท่ากับ 1 m/s เป็นอัตราเร็วที่ทำให้ตัวอย่างเสถียร ตัวอย่างและ sheath จะไม่เข้ามาผสมรวมกันในขณะเคลื่อนที่ผ่าน flow channel ทำให้วิเคราะห์ผลได้ถูกต้อง ซึ่งในการไหลของเซลล์ถ้าไม่ไหลเป็นเส้นตรงจะทำให้รูปร่างของเซลล์ที่เกิดจากการกระทบของเลเซอร์ผิดรูปไป อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของเซลล์จะเคลื่อนที่ประมาณ 10,000-15,000 เซลล์ต่อวินาที

2. ระบบของแสง (light sensing or optics) ประกอบด้วยแหล่งกำเนิดของพลังงานแสงกระจกชนิดต่างๆ เลนส์รวมทั้งอุปกรณ์รับแสงที่เกิดจากสารเรืองแสงที่ถูกกระตุ้น เมื่อเซลล์ไหลผ่านกระทบเข้ากับแสงเลเซอร์ หรือแสงยูวี เงาที่เกิดจากเซลล์ที่บังแสงจะเป็นสัดส่วนกับขนาดของเซลล์ forward scatter (FSC) สำหรับอนุภาคต่างๆ เมื่อกระทบกับแสงที่ส่องผ่านจะหักเหทำมุมออกจากแสงเลเซอร์เป็นมุมต่างๆ เรียกการหักเหนี้ว่า side scatter (SSC) เซลล์ใดที่ภายในมีอนุภาคมากจะมีการสะท้อนของแสงมากทำให้แสงที่วัดได้แปรผันกับจำนวนของอนุภาค สำหรับเซลล์ที่ย้อมด้วยสารเรืองแสงเมื่อกระทบกับแสงเลเซอร์ก็จะเกิดการกระตุ้นสารเรืองแสง (excitation) ขึ้น โดยเมื่อสารเรืองแสงถูกกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์นั้นจะทำให้อิเล็กตรอนของสารเรืองแสงมีพลังงาน

สูงขึ้น หลังจากนั้นเมื่ออิเล็กตรอนกลับสู่สถานะปกติจะปล่อยพลังงานออกมา (emission) ทำให้วัดการเรืองแสงได้โดยใช้อุปกรณ์วัดแสงที่ช่วงคลื่นต่างๆ กันออกมาเป็นสีต่างๆ เรียก fluorescence (FL) เช่น FL1, FL2 และ FL3 ซึ่งหมายถึง สีฟลูออเรสเซนส์ สีเขียว สีส้มและสีแดง ตามลำดับ

3. ระบบอิเล็กทรอนิกส์ (eletronics) เป็นการเปลี่ยนแปลงสัญญาณของคลื่นแสงให้เป็นสัญญาณทางไฟฟ้า โดยผ่านตัวต้านทาน ซึ่งปริมาณของกระแสไฟฟ้าและความต่างศักย์ของไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนกับจำนวนสัญญาณที่มีอยู่ทำให้เครื่องวัดออกมาเป็นคลื่นไฟฟ้า เมื่อสัญญาณคลื่นแสงที่ได้จากการวัด FSC, SSC หรือการเรืองแสงของ fluorescence ถูกเปลี่ยนเป็นสัญญาณทางอิเล็กทรอนิกส์แล้วถูกเก็บรวบรวมข้อมูลเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป



ภาพผนวก 1 แสดงรายละเอียดและกลไกการทำงานของเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

ภาพผนวก 2 เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ รุ่น PAII (บริษัท Partec ประเทศเยอรมัน)
ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

MAEJO UNIVERSITY

ภาคผนวก ข

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาวสิริรักษ์ สำเภาแก้ว

เกิดเมื่อ 22 กันยายน 2527

ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2538 ประถมศึกษา โรงเรียนบ้านชะอวด จังหวัดนครศรีธรรมราช

พ.ศ. 2545 มัธยมศึกษา โรงเรียนจุฬาภรณราชวิทยาลัย จังหวัดนครศรีธรรมราช

พ.ศ. 2550 ปริญญาตรี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่