การพัฒนาสายพันธุ์แท้ข้าวโพดโดยวิธีดับเบิ้ลแฮพลอยด์จากประชากร S_0 และ S_1

Development of Maize Inbred Lines by Doubled Haploid Method from S_0 and S_1 Populations

ศฎาวุฒิ กุลมณี[1,2] ประภา ศรีพิจิตต์[3] สุจินต์ เจนวีรวัฒน์[3,*] รัตติกาน เกิดผล[3] และ ธานี ศรีวงศ์ชัย[3]

Sadawud Koonmanee[1,2], Prapa Sripichitt[3], Sujin Jenweerawat[3,*], Rattikarn Kerdphol[3] and Tanee Sreewongchai[3]

[1] โครงการบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาเกษตรเขตร้อน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

[2] บริษัท เจริญโภคภัณฑ์เมล็ดพันธุ์ (อินเดีย) จำกัด เลขที่ 5/77 หมู่บ้านเอกไกเรดกูเดม ตำบลมูซูนูรู อำเภอกริสนา รัฐอันดราประเทศ ประเทศอินเดีย รหัส 521 213

[3] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

[1] Graduate Program in Tropical Agriculture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900

[2] Charoen Pokphand Seeds (India) Pvt. Ltd., Door No: 5/77, Akkireddy Gudem Village, Musunuru Mandal, Krishna Dist., Andra Pradesh, India, Pin: 521 213

[3] Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900

รับเรื่อง: สิงหาคม 2559 Received: August 2016

รับตีพิมพ์: ตุลาคม 2559 Accepted: October 2016

[*] Corresponding author: sujin.j@ku.th

ABSTRACT: Development of maize inbred lines by doubled haploid method using haploid inducer is lack of supporting data on selecting based population. The objective of this study was to compare efficiency of maize inbred line development by doubled haploid method from S_0 and S_1 populations. S_0 and S_1 populations of four populations (Q1, Q2, K3 and K4) were crossed with haploid inducer, PHI–3 inbred line. Haploid seeds, which expressed anthocyanin color marker in aleurone layer, were selected and germinated for four days. Then, the seedlings were selected for haploid (normal white root) again and treated with colchicine for 12 hours to double chromosome. After that, the seedlings were rinsed and transplanted to field plot. At flowering period, dihaploid plants with pollen shedding were selected and selfed to produce DHS_0–D1 and DHS_1–D1, respectively. The results showed that using S_0 and S_1 populations as based population gave haploid induction rate (HIR) of 5.4 and 6.4%, produced inbred lines for 25 and 128 lines, and used two and three seasons for inbred line development, respectively. Therefore, inbred line development by DHS_0 and DHS_1 methods can shorten the seasons used in inbred line development for eight and seven seasons as compared with conventional method. The results suggested that using S_1 population for crossing with haploid inducer can produce much more inbred lines as required.

Keywords: Maize, inbred line development, doubled haploid (DH), haploid inducer, S_1 population

Agricultural Sci. J. (2017) Vol. 48(2): 260–269 ว. วิทย. กษ. (2560) 48(2): 260–269

บทคัดย่อ

การพัฒนาสายพันธุ์แท้ข้าวโพดโดยวิธีดับเบิ้ลแฮพลอยด์ที่ใช้แฮพลอยด์อินดิวเซอร์เป็นตัวชักนำให้เกิดพืชแฮพลอยด์นั้น ยังขาดข้อมูลสนับสนุนในการเลือกใช้ประชากรเริ่มต้นสำหรับการผสมกับแฮพลอยด์อินดิวเซอร์ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการพัฒนาสายพันธุ์แท้ข้าวโพดด้วยวิธีดับเบิ้ลแฮพลอยด์จากประชากร S_0 และ S_1 โดยผสมระหว่างประชากร S_0 และ S_1 ของข้าวโพด 4 ประชากร ได้แก่ Q1, Q2, K3 และ K4 กับแฮพลอยด์อินดิวเซอร์สายพันธุ์ PHI–3 คัดเลือกเมล็ดแฮพลอยด์ที่ปรากฏสีม่วงของแอนโทไซยานินบนเปลือกหุ้มเมล็ด นำไปเพาะความงอกเป็นเวลา 4 วัน และคัดเลือกต้นกล้าที่เป็นแฮพลอยด์อีกครั้ง ซึ่งเป็นต้นที่มีปลายรากสีขาวปกติ นำต้นกล้าแฮพลอยด์มาเพิ่มชุดโครโมโซมโดยแช่โคลชิซินเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างทำความสะอาดต้นกล้าแล้วย้ายลงแปลงปลูก เมื่อถึงระยะผสมเกสรเลือกต้นไดแฮพลอยด์ที่มีละอองเกสรและผสมตัวเองได้เป็นเมล็ด DHS_0–D1 และ DHS_1–D1 ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า การใช้ประชากรเริ่มต้น S_0 และ S_1 มีอัตราการชักนำให้เกิดแฮพลอยด์ 5.4 และ 6.4 เปอร์เซ็นต์ สร้างสายพันธุ์แท้ได้ 25 และ 128 สายพันธุ์ และใช้จำนวนฤดูปลูกสำหรับพัฒนาสายพันธุ์แท้ 2 และ 3 ฤดู ตามลำดับ ดังนั้นการพัฒนาสายพันธุ์แท้โดยวิธี DHS_0 และ DHS_1 สามารถย่นระยะเวลาในการพัฒนาสายพันธุ์แท้ได้ 8 และ 7 ฤดูเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน โดยควรใช้ประชากร S_1 ในการผสมกับแฮพลอยด์อินดิวเซอร์ เพื่อให้ได้สายพันธุ์แท้ที่ต้องการจำนวนมาก

คำสำคัญ: ข้าวโพด, การพัฒนาสายพันธุ์แท้, ดับเบิ้ลแฮพลอยด์, แฮพลอยด์อินดิวเซอร์, ประชากร S_1

บทนำ

ข้าวโพดเป็นพืชที่ปลูกและใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก และเป็นธัญพืชที่มีความสำคัญเป็นอันดับสาม รองจากข้าวสาลี และข้าว แต่ข้าวโพดมีผลผลิตรวมมากกว่าข้าวสาลี และข้าว (Office of Agricultural Economics, 2016) ข้าวโพดนำมาใช้เป็นอาหารมนุษย์ อาหารสัตว์ น้ำมันเชื้อเพลิง และอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย และยังเป็นพืชต้นแบบที่นำมาใช้ศึกษาด้านพันธุกรรมของพืช (Mladenovic *et al*., 2013) การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมได้เริ่มอย่างจริงจังเมื่อ Shull (1908) และ Shull (1909) ได้เสนอวิธีการพัฒนาสายพันธุ์แท้ (inbred line) และพันธุ์ลูกผสม (hybrid) ขึ้น โดยการพัฒนาพันธุ์ลูกผสมเริ่มจากพันธุ์ลูกผสมคู่ ลูกผสมสามทาง และลูกผสมเดี่ยวในยุคปัจจุบัน การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมมีขั้นตอนหลัก 2 ส่วน คือ 1) การพัฒนาสายพันธุ์แท้ (inbred line development) และ 2) การพัฒนาพันธุ์ลูกผสม (hybrid development) ในส่วนของการพัฒนาสายพันธุ์แท้มีหลายวิธีการขึ้นอยู่กับการเลือกใช้ของนักปรับปรุงพันธุ์และวัตถุประสงค์ของโครงการ เช่น วิธีผสมรวม (bulk method) วิธีบันทึกประวัติ (pedigree method) วิธีผสมรวมร่วมกับวิธีบันทึกประวัติ (bulk/pedigree method) วิธีประยุกต์ (modified breeding method) วิธีผสมกลับ (backcross method) วิธีหนึ่งเมล็ดต่อต้น (single seed descent) วิธีฝักต่อหลุมประยุกต์ (modified single hill method) และวิธีดับเบิ้ลแฮพลอยด์ (doubled haploid method) (Samphan–tharak, 2008; Curran, 2008) ในปัจจุบันวิธีการปรับปรุงพันธุ์เพื่อพัฒนาสายพันธุ์แท้และสร้างลูกผสมที่ใช้กันอย่างแพร่หลายคือ วิธีบันทึกประวัติ วิธีเมล็ดต่อต้นหรือฝักต่อหลุมประยุกต์ และวิธีดับเบิ้ลแฮพลอยด์ (Lee and

Tracy, 2009; Jumbo *et al*., 2011) โดยเฉพาะวิธีดับเบิ้ลแฮพลอยด์ที่ใช้แฮพลอยด์อินดิวเซอร์ (haploid inducer) เป็นตัวชักนำให้เกิดพืชแฮพลอยด์นั้นเป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายในบริษัทเอกชนชั้นนำและหน่วยงานราชการบางแห่งในต่างประเทศ เนื่องจากเป็นวิธีการพัฒนาสายพันธุ์แท้ที่ทำให้สายพันธุ์มีระดับโฮโมไซกัส (homozygous) 100 เปอร์เซ็นต์ ในเวลารวดเร็วเพียง 2–3 ฤดู ในขณะที่วิธีการอื่นต้องใช้เวลาในการพัฒนาสายพันธุ์แท้ 7–8 ฤดู การพัฒนาสายพันธุ์แท้จากวิธีดับเบิ้ลแฮพลอยด์มี 4 ขั้นตอนหลัก คือ 1) ผสมระหว่างประชากรหรือเชื้อพันธุกรรมที่ต้องการพัฒนาสายพันธุ์แท้กับแฮพลอยด์อินดิวเซอร์ โดยให้แฮพลอยด์อินดิวเซอร์เป็นพันธุ์พ่อ 2) คัดเลือกไว้เฉพาะเมล็ดแฮพลอยด์ ซึ่งเมล็ดแฮพลอยด์จะมีสีม่วงที่ด้านบนของเอ็นโดสเปิร์ม ส่วนเอ็มบริโอมีสีขาว 3) เพิ่มชุดโครโมโซมของเมล็ดแฮพลอยด์ที่คัดเลือกไว้เพื่อให้ได้ต้นไดแฮพลอยด์ (dihaploid) และ 4) ปลูกต้นไดแฮพลอยด์และผสมตัวเองเพื่อเก็บเมล็ด เมล็ดที่ได้เรียกว่า เมล็ด D1 ซึ่งจะมีระดับโฮโมไซกัส 100 เปอร์เซ็นต์ (Prasana *et al*., 2012) แต่วิธีการนี้ยังขาดข้อมูลสนับสนุนในการเลือกใช้ประชากรเริ่มต้นสำหรับการผสมกับแฮพลอยด์อินดิวเซอร์ โดยประชากรเริ่มต้นที่มีการใช้เพื่อผสมกับแฮพลอยด์อินดิวเซอร์นั้นมีทั้งประชากร S_0 และประชากร S_1 ของแต่ละกลุ่มเฮตเทอโรซิส (heterotic group) ในการศึกษานี้เป็นการพัฒนาสายพันธุ์ภายในกลุ่มเฮตเทอโรซิสเพื่อเป้าหมายในการพัฒนาพันธุ์ลูกผสมต่อไป ประชากร S_0 ในที่นี้จึงหมายถึงลูกชั่ว F_1 ที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์ดี 2 สายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่มเฮตเทอโรซิสเดียวกัน และประชากร S_1 หมายถึงการนำประชากร S_0 มาผสมตัวเอง หรือการนำลูกชั่ว F_1 ที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์ดี 2 สายพันธุ์นั้นมาผสมตัวเอง ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการพัฒนาสายพันธุ์แท้ข้าวโพดด้วยวิธีดับเบิ้ลแฮพลอยด์จากประชากร S_0 และ S_1

อุปกรณ์ และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เชื้อพันธุกรรมข้าวโพด

1.1 ประชากรข้าวโพดที่ใช้เป็นกลุ่มสายพันธุ์แม่ ได้แก่ CPQ–1301 (Q1) และ CPQ–1302 (Q2) ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อพันธุกรรมที่เมล็ดเป็นแบบหัวแข็ง (flint type) หรือกึ่งหัวแข็ง (semi–flint type) เมล็ดค่อนข้างกลม สีสวย (สีส้ม สีส้มเหลือง หรือสีเหลืองส้ม) ทรงต้นเตี้ย ใบตั้ง ระดับการติดฝักสูงไม่เกินครึ่งหนึ่งของความสูงต้น ระบบรากและลำต้นแข็งแรง และที่สำคัญต้องให้ผลผลิตสูงสามารถผลิตเมล็ดในระดับการค้าได้

ประชากร Q1 คือ ลูก F_1 ระหว่างสายพันธุ์ดี 2 สายพันธุ์ (QA x QB) หรือประชากร S_0 โดยสายพันธุ์ QA มีความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ (northern corn leaf blight) ในระดับปานกลาง และต้านทานต่อโรคลำต้นเน่า (stalk rot) ในขณะที่สายพันธุ์ QB ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ แต่อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า (Charoen Pokphand Seeds (India) Pvt. Ltd., 2012)

ประชากร Q2 คือ ลูก F_1 ระหว่างสายพันธุ์ดี 2 สายพันธุ์ (QC x QB) หรือประชากร S_0 โดยสายพันธุ์ QC มีความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ (northern corn leaf blight) ในระดับปานกลาง และต้านทานต่อโรคลำต้นเน่า (stalk rot) (Charoen Pokphand Seeds (India) Pvt. Ltd., 2012)

1.2 ประชากรข้าวโพดที่ใช้เป็นกลุ่มสายพันธุ์พ่อ ได้แก่ CPK–1303 (K3) และ CPK–1304 (K4) ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อพันธุกรรมที่เมล็ดส่วนใหญ่เป็นแบบหัวบุบ (dent type) หรือ กึ่งหัวบุบ (semi–dent type) เมล็ดขนาดใหญ่และลึก ทรงต้นสูงปานกลาง ให้ปริมาณละอองเกสรมาก และสลัดละอองเกสรได้หลายวันเพื่อที่จะสามารถผสมกับสายพันธุ์แม่ได้ดี

ประชากร K3 คือ ลูก F_1 ระหว่างสายพันธุ์ดี 2 สายพันธุ์ (KA x KB) หรือประชากร S_0 โดยสายพันธุ์ KA ให้ลักษณะเมล็ดใหญ่ มีสมรรถนะการผสม

(combining ability) ดี แต่ไม่ต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ และระบบรากไม่ดี ในขณะที่สายพันธุ์ KB ให้ลักษณะเมล็ดใหญ่ ระบบรากดี ใบเขียวเข้ม ต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ แต่สมรรถนะการผสมไม่ดี (Charoen Pokphand Seeds (India) Pvt. Ltd., 2012)

ประชากร K4 คือ ลูก F_1 ระหว่างสายพันธุ์ดี 2 สายพันธุ์ (KA' x KC) หรือประชากร S_0 โดยสายพันธุ์ KA' เป็นสายพันธุ์พี่น้อง (sister line) กับสายพันธุ์ KA มีสมรรถนะการผสมดี แต่เมล็ดเป็นแบบหัวบุบมากเกินไป ต้นสูง ไม่ต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ และระบบรากไม่ดี ในขณะที่สายพันธุ์ KC ให้ลักษณะต้นเตี้ย เมล็ดใหญ่ ต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ แต่ให้ลักษณะฝักสั้นป้อม และแกนใหญ่ (Charoen Pokphand Seeds (India) Pvt. Ltd., 2012)

1.3 สายพันธุ์ข้าวโพดที่สามารถชักนำให้เกิดแฮพลอยด์ หรือแฮพลอยด์อินดิวเซอร์ ได้แก่ สายพันธุ์ PHI–3 มีลำต้น ใบ และเมล็ดสีม่วง

2. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ สารโคลชิซิน (colchicine 95% (HPLC), Powder) จากบริษัท Sigma–Aldrich Co. LLC., USA และ dimethyl sulfoxide (DMSO) จากบริษัท Merck Life Science Pvt. Ltd., India

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการผสมพันธุ์ข้าวโพด ได้แก่ ถุงกระดาษสีน้ำตาลสำหรับคลุมช่อดอกเพศผู้ (tassel bag) และถุงกระดาษไขสีขาวสำหรับคลุมช่อดอกเพศเมีย (glassine bag) ที่เย็บกระดาษ (stapler) และลวดเย็บกระดาษ (staple)

วิธีการ

1. ปลูกประชากร S_0 ของทั้ง 4 ประชากร ได้แก่ Q1, Q2, K3 และ K4 โดยปลูกประชากรละ 1,000 ต้น แล้วนำละอองเกสรของแฮพลอยด์อินดิวเซอร์สายพันธุ์ PHI–3 มาผสมกับต้นที่เลือกของแต่ละประชากรจำนวน 500 ต้น เก็บเกี่ยวฝักจำนวน 500 ฝัก แล้วนำมาตรวจสอบชนิดของเมล็ด โดยจำแนกเป็นเมล็ดดิพลอยด์ เมล็ดแฮพลอยด์ และเมล็ดที่เกิดจากการผสมตัวเองหรือผสมข้ามกับพันธุ์อื่น (Rotarenco and Dicu, 2012) แล้วเลือกเฉพาะเมล็ดแฮพลอยด์ซึ่งเรียกเป็นเมล็ด DHS_0 (Figure 1) ส่วนต้นที่เหลือของแต่ละประชากรอีก 500 ต้น ทำการผสมตัวเองและเลือกฝักที่สมบูรณ์ 250 ฝัก ได้เป็นเมล็ดสายพันธุ์ S_1 ของแต่ละประชากร จำนวน 250 สายพันธุ์

2. ปลูกเมล็ดสายพันธุ์ S_1 ของแต่ละประชากร จำนวน 250 สายพันธุ์ แบบฝักต่อแถว โดยปลูกแถวละ 10 ต้น เพื่อใช้เป็นต้นแม่สำหรับผสมกับละอองเกสรของแฮพลอยด์อินดิวเซอร์สายพันธุ์ PHI–3 แล้วเก็บฝักที่ติดเมล็ดดีที่สุดแถวละ 2 ฝัก นำมาตรวจสอบชนิดของเมล็ด และคัดเลือกเมล็ดแฮพลอยด์ออกมา ซึ่งเรียกเป็นเมล็ด DHS_1 โดยมีวิธีการเช่นเดียวกันกับในข้อ 1 (Figure 1)

3. นำเมล็ดแฮพลอยด์ DHS_0 และ DHS_1 ที่ได้จากประชากร S_0 และ S_1 ของแต่ละประชากร มาเพาะความงอกบนกระดาษเพาะเป็นเวลา 4 วัน คัดเลือกต้นกล้าที่เป็นต้นแฮพลอยด์อีกครั้ง โดยเลือกเฉพาะต้นที่มีปลายรากสีขาวปกติ ส่วนต้นกล้าที่มีปลายรากสีม่วงให้คัดทิ้ง เนื่องจากเป็นต้นกล้าที่เกิดจากการปฏิสนธิระหว่างสายพันธุ์กับแฮพลอยด์อินดิวเซอร์ หลังจากนั้นนำต้นกล้าที่เป็นแฮพลอยด์ซึ่งยังอยู่ในระยะที่ใบยังไม่คลี่มาเพิ่มชุดโครโมโซม โดยแช่ในสารผสมของโคลชิซินความเข้มข้น 0.06 เปอร์เซ็นต์ และสาร dimethyl sulfoxide (DMSO) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตามวิธีการของ Prasana *et al*. (2012) หลังจากนั้นล้างทำความสะอาดต้นกล้าแล้วย้ายลงแปลงปลูก เมื่อถึงระยะผสมเกสรให้เลือกต้นที่มีละอองเกสรและผสมตัวเอง (Figure 2) เมล็ดที่ได้เรียกว่า เมล็ด DHS_0–D1 และ DHS_1–D1 ตามลำดับ

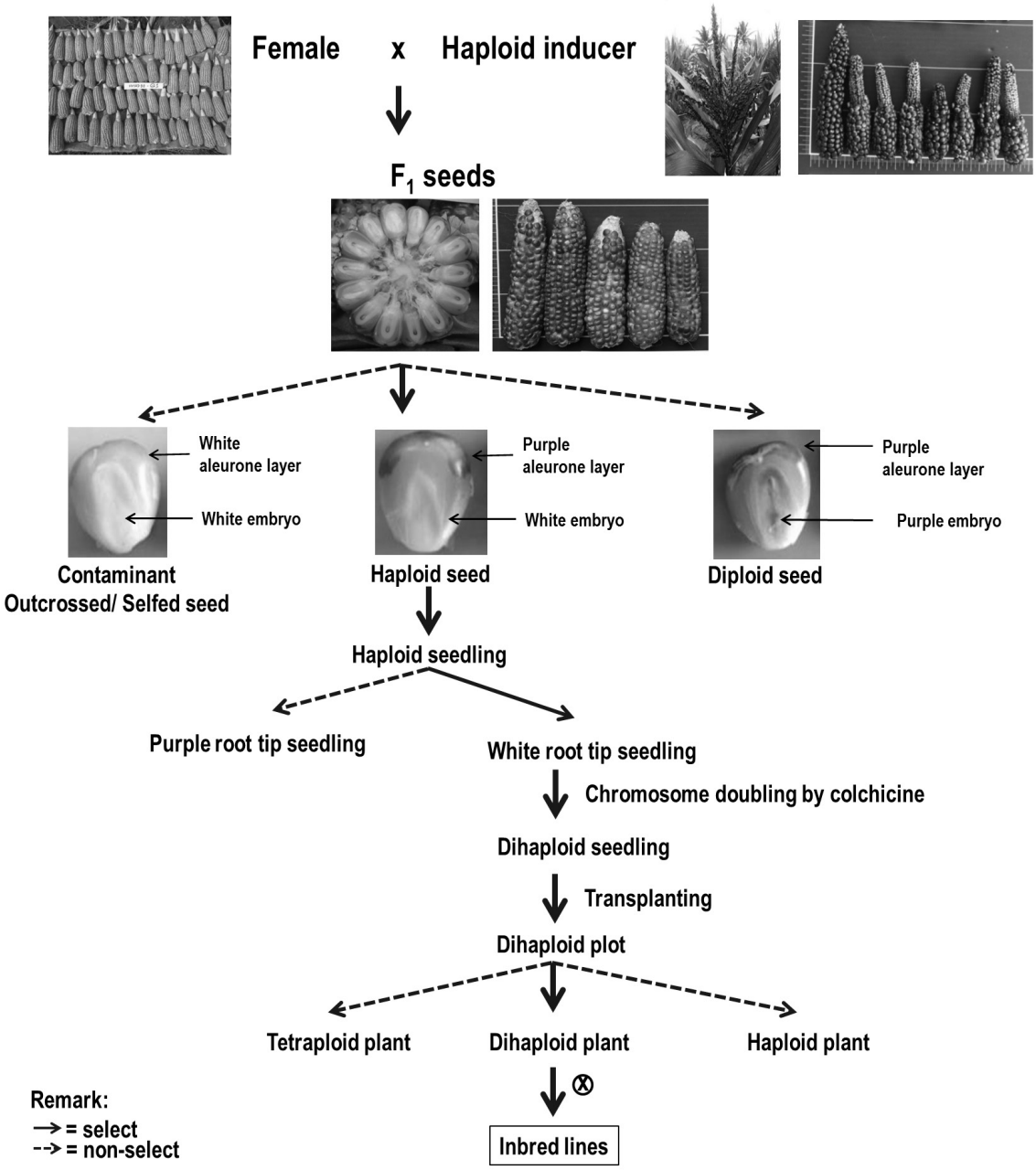

Figure 1 Development of maize inbred lines, doubled haploid lines, by doubled haploid method using haploid inducer

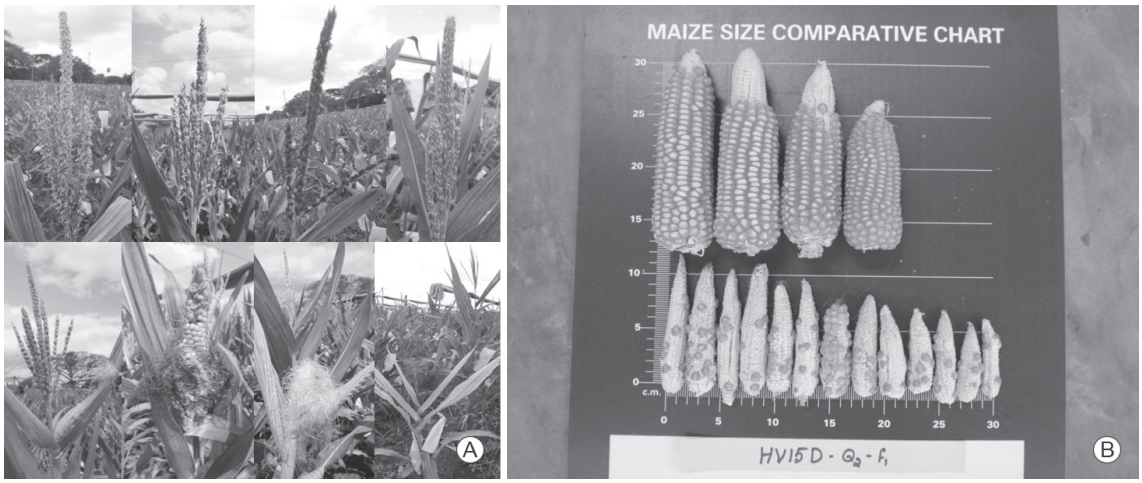

Figure 2 Double haploids shown variation in agronomic traits. For reproductive organ: (a) variation of tassels in flowering period from normal and fertile tassel to abnormal and sterile tassel such as tassel seed, (b) variation of ears and selfed seed set of doubled haploids from non–seed set to good seed set

ผลการทดลอง และวิจารณ์

การพัฒนาสายพันธุ์แท้ด้วยวิธีดับเบิ้ลแฮพลอยด์ โดยการผสมระหว่างประชากร S_0 และประชากร S_1 กับแฮพลอยด์อินดิวเซอร์ พบว่าการผสมระหว่างประชากร S_0 ของ Q1, Q2, K3 และ K4 กับแฮพลอยด์อินดิวเซอร์ ได้จำนวนฝัก 229, 186, 133 และ 132 ฝัก ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนฝักของทั้ง 4 ประชากรเท่ากับ 170 ฝัก ในขณะที่การผสมระหว่างประชากร S_1 ของ Q1, Q2, K3 และ K4 กับแฮพลอยด์อินดิวเซอร์ ได้จำนวนฝัก 456, 468, 331 และ 348 ฝัก ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนฝักของทั้ง 4 ประชากรเท่ากับ 401 ฝัก จากการที่ประชากร S_1 สร้างมาจากการผสมตัวเองของสายพันธุ์ S_0 ในแต่ละประชากร ซึ่งง่ายกว่าการผสมข้ามจึงทำให้ได้ต้นจำนวนมากและสามารถคัดเลือกต้นที่มีลักษณะที่ต้องการสำหรับการผสมกับแฮพลอยด์อินดิวเซอร์ต่อไปได้ สำหรับประชากร S_0 ซึ่งก็คือลูก F_1 ระหว่างสายพันธุ์ดีในแต่และกลุ่มเชื้อพันธุกรรม ได้จำนวนต้นที่ใช้เริ่มต้นน้อยกว่าทำให้ไม่สามารถเลือกต้นได้ การผสมระหว่างสายพันธุ์ S_0 ของแต่ละประชากรกับแฮพลอยด์อินดิวเซอร์จึงเป็นการสุ่มเลือก ซึ่งสายพันธุ์แท้ที่ได้จะมีลักษณะที่แตกต่างกันหลากหลาย ในขณะที่สายพันธุ์ดับเบิ้ลแฮพลอยด์จากประชากร S_1 ที่ได้ผ่านการคัดเลือกมาแล้ว 1 ชั่ว จะทำให้ได้สายพันธุ์แท้ที่มีลักษณะการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้แล้วในระดับหนึ่ง (Dwivedi *et al*., 2015) (Table 1)

การเกิดเมล็ดแฮพลอยด์บางส่วนในฝักข้าวโพดจากการผสมระหว่างประชากรหรือเชื้อพันธุกรรมที่ต้องการพัฒนาสายพันธุ์แท้กับแฮพลอยด์อินดิวเซอร์ โดยให้แฮพลอยด์อินดิวเซอร์เป็นพันธุ์พ่อนั้น เกิดจากความผิดปกติในการปฏิสนธิระหว่างเซลล์ไข่ (egg cell) กับสเปิร์มนิวเคลียส (sperm nucleus) ทำให้ไม่เกิดการปฏิสนธิ และเมล็ดที่ได้จะมีชุดโครโมโซมเพียงครึ่งหนึ่งของชุดโครโมโซมปกติ (Swapna and Sarkar, 2011; Prasana *et al*., 2012) ดังนั้นการคัดเลือก

เมล็ดแฮพลอยด์ให้สังเกตจากการแสดงออกของยีนเครื่องหมาย *R1–Navajo* (*R1–nj*) ของแฮพลอยด์อินดิวเซอร์ ที่ให้สีม่วงของแอนโทไซยานินซึ่งเป็นลักษณะเด่น โดยเมล็ด F_1 ที่ได้หากเป็นเมล็ดแฮพลอยด์จะปรากฏสีม่วงบนเปลือกหุ้มเมล็ด (aleurone layer) ในขณะที่ส่วนของเอ็มบริโอ (embryo) จะไม่ปรากฏสีม่วง ส่วนเมล็ดดิพลอยด์จะปรากฏสีม่วงทั้งบนเปลือกหุ้มเมล็ดและเอ็มบริโอ นอกจากนี้อาจมีเมล็ดที่เกิดจากการผสมตัวเองหรือผสมข้ามจากข้าวโพดอื่นซึ่งจะไม่ปรากฏสีม่วงบนเมล็ด โดยเมล็ดที่เป็นดิพลอยด์ เมล็ดที่เกิดจากการผสมตัวเอง และเมล็ดที่เกิดจากการผสมข้ามจากข้าวโพดอื่นจะถูกคัดทิ้ง (Prigge and Melchinger, 2012; Rotarenco and Dicu, 2012) (Figure 1) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบและยืนยันการเป็นเมล็ดแฮพลอยด์ได้ที่ระยะกล้าอีกครั้ง โดยดูจากปลายรากที่ไม่มีสีม่วง ทำให้สามารถคัดกรองต้นแฮพลอยด์ได้อีกชั้นหนึ่ง ส่วนต้นกล้าที่มีปลายรากสีม่วง หรือปลายรากขาวแต่ต้นใหญ่แตกต่างจากต้นแฮพลอยด์จะเป็นต้นดิพลอยด์ต้องคัดทิ้งไป

เมื่อพิจารณาอัตราการชักนำให้เกิดแฮพลอยด์ (haploid induction rate; HIR) ในประชากร S_0 และประชากร S_1 ของแต่ละประชากรพบว่า ประชากร S_0 ของประชากร Q1, Q2, K3 และ K4 มีค่า HIR เท่ากับ 2.1, 5.8, 5.2 และ 8.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 1) เมื่อเฉลี่ยจากทั้ง 4 ประชากร S_0 พบว่ามีค่า HIR เฉลี่ย 5.4 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ประชากร S_1 ของประชากร Q1, Q2, K3 และ K4 มีค่า HIR เท่ากับ 5.0, 7.8, 5.4 และ 7.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ย HIR จากทั้ง 4 ประชากร S_1 เท่ากับ 6.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าพื้นฐานพันธุกรรมที่แตกต่างกันของประชากรจะส่งผลต่อการชักนำให้เกิดเมล็ดแฮพลอยด์ โดยเมื่อเปรียบเทียบค่า HIR ของประชากร S_0 กับประชากร S_1 พบว่า ค่า HIR ของประชากร S_0 ต่ำกว่าประชากร S_1 ซึ่งการที่ประชากร S_0 ให้จำนวนเมล็ดแฮพลอยด์น้อยกว่าประชากร S_1 เนื่องจากประชากร S_0 ไม่มีการคัดเลือกการปรับตัวของสายพันธุ์ ส่วนประชากร S_1 ที่เกิดจากการผสมตัวเองของต้น S_0 นั้น มีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีทรงต้นดี แข็งแรง และมีการปรับตัวได้ดี ทำให้สามารถคัดเลือกพันธุกรรมที่ไม่ดีทิ้งไปได้ก่อนการผสมกับแฮพลอยด์อินดิวเซอร์

อย่างไรก็ตาม ต้นกล้าแฮพลอยด์ที่ผ่านการเพิ่มชุดโครโมโซมเป็นต้นไดแฮพลอยด์แล้ว เมื่อย้ายปลูกลงแปลงจะพบการกระจายตัวของลักษณะการเพิ่มชุดโครโมโซมมากเกินไปเป็นต้นที่มีโครโมโซม 4 ชุด (tetraploid) ซึ่งจะมีขนาดต้นใหญ่ชัดเจน โดยต้นที่ได้นี้อาจจะเกิดขึ้นจากการเพิ่มชุดโครโมโซมของต้นดิพลอยด์ที่คัดทิ้งไม่หมดหรือเพิ่มจากต้นแฮพลอยด์ที่ได้ ซึ่งจะคัดต้นที่มีลักษณะนี้ทิ้งไป และยังพบต้นที่การเพิ่มชุดโครโมโซมไม่ประสบผลสำเร็จซึ่งจะมีลักษณะต้นเล็กแคระแกร็นและเป็นหมัน ซึ่งไม่สามารถเก็บเมล็ดได้ ส่วนต้นที่สามารถเพิ่มชุดโครโมโซมได้สำเร็จและได้เป็นต้นไดแฮพลอยด์จะผสมตัวเองเพื่อเก็บเมล็ดเป็นสายพันธุ์แท้ต่อไป เปอร์เซ็นต์ของต้นดับเบิ้ลแฮพลอยด์ที่ได้ในแต่ละประชากรมีความแตกต่างกันได้ตั้งแต่ 18.05–52.60 เปอร์เซ็นต์ (Gayen *et al.*, 1994; Geiger, 2011) โดยประชากร DHS_0 ของ Q1, Q2, K3 และ K4 มีเปอร์เซ็นต์ของสายพันธุ์แท้ดับเบิ้ลแฮพลอยด์ที่สามารถผสมตัวเองและติดเมล็ดได้ 70.6, 45.7, 5.8 และ 21.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยคิดเป็นค่าเฉลี่ยของทั้ง 4 ประชากรเท่ากับ 35.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนประชากร DHS_1 มีเปอร์เซ็นต์ของสายพันธุ์แท้ดับเบิ้ลแฮพลอยด์เท่ากับ 73.3, 65.3, 16.5 และ 45.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยคิดเป็นค่าเฉลี่ยของทั้ง 4 ประชากรเท่ากับ 50.1 เปอร์เซ็นต์ (Table 1)

Table 1 Population type and name, number of ears and seeds obtained from crosses between population and haploid inducer, seed type identified from each cross, number of dihaploid plants, number of DH inbred lines and percentage of success DH inbred line

Population type	Population name	No. of ears from population x haploid inducer	No. of seeds from population x haploid inducer	Seed type identified from each cross (%)			No. of dihaploid plants	No. of DH inbred lines	Success DH inbred lines (%)
				Selfed seed	Diploid seed	Haploid seed			
S_0	Q1	229	37,491	6.6	91.3	2.1	17	12	70.6
	Q2	186	45,125	2.1	92.1	5.8	105	48	45.7
	K3	133	23,334	1.5	93.3	5.2	52	3	5.8
	K4	132	28,359	5.3	86.2	8.5	170	36	21.2
	Mean	**170**	**33,577**	**3.9**	**90.7**	**5.4**	**86**	**25**	**35.8**
S_1	Q1	456	98,776	4.7	90.3	5.0	135	99	73.3
	Q2	468	90,474	3.2	89.0	7.8	308	201	65.3
	K3	331	62,603	2.6	92.0	5.4	218	36	16.5
	K4	348	67,876	6.5	86.0	7.5	388	176	45.4
	Mean	**401**	**79,932**	**4.3**	**89.3**	**6.4**	**262**	**128**	**50.1**

การเพิ่มชุดโครโมโซมของต้นแฮพลอยด์ที่ได้โดยการใช้สารโคลชิซินในระยะต้นกล้านั้น ความเข้มข้น ระยะเวลา และเทคนิค เป็นปัจจัยหลักที่จะส่งเสริมให้การเพิ่มชุดโครโมโซมของต้นแฮพลอยด์ประสบผลสำเร็จและได้เป็นต้นไดแฮพลอยด์ โดยการพัฒนาเทคนิคการเพิ่มชุดโครโมโซมที่มีประสิทธิภาพเป็นอีกสิ่งหนึ่งที่จะทำให้ได้จำนวนสายพันธุ์แท้ที่มากพอ และการพัฒนาสายพันธุ์อินดิวเซอร์ให้มีอัตราการชักนำให้เกิดแฮพลอยด์มากขึ้นเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะทำให้วิธีการพัฒนาสายพันธุ์แท้วิธีนี้เป็นที่นิยมมากยิ่งขึ้น หากแต่การพัฒนาสายพันธุ์อินดิวเซอร์ต้องคำนึงถึงลิขสิทธิ์ของสายพันธุ์อินดิวเซอร์ ซึ่งจะต้องได้รับการอนุญาตจากเจ้าของสายพันธุ์ก่อนจึงจะสามารถดำเนินการได้

การพัฒนาสายพันธุ์แท้ด้วยวิธี DHS_0 และ DHS_1 ใช้จำนวนฤดูปลูก 2 และ 3 ฤดู ตามลำดับ เริ่มจากการสร้างประชากรจนถึงได้ต้นและเมล็ดสายพันธุ์แท้ที่มีพันธุกรรมเป็นโฮโมไซกัส 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานที่ต้องใช้เวลาอย่างน้อย 11 ฤดูปลูก (ผสมตัวเอง 10 ครั้ง) จึงจะได้สายพันธุ์แท้ที่มีระดับโฮโมไซกัส 99.99 เปอร์เซ็นต์ (Prasana *et al.*, 2012) ซึ่งวิธี DHS_0 และ DHS_1 นี้สามารถย่นระยะเวลาในการพัฒนาสายพันธุ์แท้ได้อย่างน้อย 7 ฤดู นอกจากนี้การใช้ประชากร S_1 สำหรับผสมกับแฮพลอยด์อินดิวเซอร์จะให้ทั้งจำนวนเมล็ดแฮพลอยด์และจำนวนสายพันธุ์แท้ที่พัฒนาขึ้นมากกว่าการใช้ประชากร S_0 ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของ Dwivedi *et al.* (2015)

สรุป

อัตราการชักนำให้เกิดแฮพลอยด์เป็นศักยภาพหลักของพันธุกรรมของแฮพลอยด์อินดิวเซอร์ และปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างพันธุกรรมของแฮพลอยด์อินดิวเซอร์กับพันธุ์แม่ที่ใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์แท้ โดยปกติควรมีค่า HIR ไม่ต่ำกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ การพัฒนาสายพันธุ์แท้โดยวิธี DHS_0 และ DHS_1 สามารถย่นระยะเวลาในการพัฒนาสายพันธุ์แท้ได้ 7–8 ฤดูเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน และควรใช้ประชากร S_1 ในการผสมกับแฮพลอยด์อินดิวเซอร์ เพื่อให้ได้สายพันธุ์แท้ที่ต้องการจำนวนมาก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บริษัท เจริญโภคภัณฑ์เมล็ดพันธุ์ (อินเดีย) จำกัด สังกัดกลุ่มธุรกิจพืชครบวงจร (ข้าวโพด) เครือเจริญโภคภัณฑ์ที่สนับสนุนงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

Charoen Pokphand Seeds (India) Pvt. Ltd. 2012. Annual Report of Line / Inbred Line Testing for Hybrid Development 2011/2012. Bengaluru, Karnataka, India.

Curran, B. 2008. Future trends in corn genetics and biotechnology. *In* Proceedings, 2008 California Alfalfa & Forage Symposium and Western Seed Conference. San Diego, CA 2–4 December, 2008. UC Cooperative Extension, Plant Sciences Department, University of California, Davis, USA.

Dwivedi, S.L., A.B. Britt, L. Tripathi, S. Sharma, H.D. Upadhyaya and R. Ortiz. 2015. Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding. Biotechnol. Adv. 33: 812–829.

Gayen, P., J.K. Madan, R. Kumar and K.R. Sarkar. 1994. Chromosome doubling in haploids through colchicine. Maize Genetics Cooperation Newsletter 68: 65.

Geiger, H.H. and M. Schonleben. 2011. Incidence of Male Fertility in Haploid Elite Dent Maize Germplasm. Maize Genetics Cooperation Newsletter. Volume 85. Available Source: http://www.agron.missouri.edumnl/85/PDF/22geiger.pdf, August 13, 2016.

Jumbo, M.D., T. Weldekidan, J.B. Holland and J.A. Hawk. 2011. Comparison of conventional, modified single seed descent, and doubled haploid breeding methods for maize inbred line development using germplasm enhancement of maize breeding crosses. Crop Sci. 51(4): 1534–1543.

Lee, E. and W.F. Tracy. 2009. Modern maize breeding, pp. 141–160, *In* J.L. Bennetzen and S. Hake, eds. Handbook of Maize: Genetics and Genomics. Springer Science + Business Media LLC, New York, USA.

Mladenovic, D.S., V. Andelkovic, M. Babic and K. Konstantinov. 2013. New technologies for improving maize breeding, pp. 27–36. *In* Proceedings of the Fourth International Scientific Symposium "Agrosym 2013", Jahorina, Bosnia and Herzegovina.

Office of Agricultural Economics. 2016. Situation and Trends of the Important Agricultural Products Year 2016, Bangkok, 241. (in Thai)

Prasana, B.M., V. Chaikam and G. Mahuku. 2012. Double Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practice, Mexico, D.F., CIMMYT.

Prigge, V. and A.E. Melchinger. 2012. Production of haploids and doubled haploids in maize, pp. 161–172. *In* V.M. Loyola–Vargas and N. Ochoa–Alejo, eds. Plant Cell Culture Protocols, 3rd ed. Humana Press, New York, USA.

Rotarenco, V. and G. Dicu. 2012. Improvements of *in vivo* haploid induction in maize, Maize Genetics Cooperation Newsletter 86: 1–8.

Samphantharak, K. 2008. Plant Breeding: Fundamental, Methodology and Concept. Kasetsart University Press, Bangkok. 465. (in Thai)

Shull, G.H. 1908. The composition of a field of maize. J. Hered. 4: 296–301.

Shull, G.H. 1909. A Pure line method of corn breeding. J. Hered. 5: 51–58.

Swapna, M. and K.R. Sarkar. 2011. Anomalous fertilization in haploidy inducer lines in maize (*Zea mays* L). Maydica. 56(3): 221–225.