การปรับปรุงพันธุ์งาโดยวิธีการเพาะเลี้ยงคัพภะ

ประสิทธิ์ ใจศิล และ สุภลักษณ์ นพคุณางกูล
ภาควิชาพืชไร่ และ ศูนย์ศึกษาค้นคว้าและพัฒนาเกษตรกรรมภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

บทคัดย่อ

การปรับปรุงพันธุ์งา โดยวิธีการเพาะเลี้ยงคัพภะ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคในการเพาะเลี้ยงคัพภะและขั้นตอนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์งาต่อไป แผนการดำเนินงานประกอบด้วย การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมาบนฝักงา การสร้างลูกผสมข้ามชนิด การเพาะเลี้ยงคัพภะของลูกผสมข้ามชนิด การเพิ่มชุดของจำนวนโครโมโซมโดยใช้สารคอลชิซีนและการตรวจสอบจำนวนโครโมโซม

ผลการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมาบนฝักงา พบว่าการแช่ฝักงาในแอลกอฮอล์ 70% นาน 1 นาที ตามด้วย คลอร็อกซ์ 10% นาน 15 นาที จะช่วยให้มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนต่ำที่สุด สำหรับการสร้างลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *Sesamum indicum* (2n = 26) × *S. radiatum* (2n = 64) นั้น ไม่ประสบความสำเร็จเพราะจำนวนโครโมโซมพื้นฐานมีความแตกต่างกันมาก ส่วน *S. indicum* × *S. malabaricum* (2n = 26)นั้น สามารถผลิตลูกผสมได้ตามปกติ และลักษณะต่าง ๆของ *S. malabaricum* จะข่ม *S. indicum* ทุกลักษณะ ลูกผสมข้ามชนิดที่ได้นี้ พบว่าสามารถเพาะเลี้ยงได้ดีในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA 22μM โดยอาจจะเติม kinetin 2.3μM หรือไม่ก็ได้

การศึกษาผลของสารคอลชิซีนต่องา 3 พันธุ์คือ งาขาวพันธุ์ มข. 1 งาดำพันธุ์ มข 2 และงาแดงพันธุ์ มข 3 โดยการแช่เมล็ดงาทั้ง 3 พันธุ์นาน 12 ชั่วโมงในสารละลายคอลชิซีนที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 , และ 0.5% เปรียบเทียบกับการแช่เมล็ดงาในน้ำกลั่นพบว่า งาขาวพันธุ์ มข 1 มีความทนทานต่อสารคอลชิซีนสูงที่สุด คือต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึง 0.2- 0.3% จึงจะเริ่มตอบสนองต่อคอลชิซีน ในขณะที่งาดำพันธุ์ มข 2 และ งาแดงพันธุ์ มข 3 จะตอบสนองที่ระดับความเข้มข้นเพียง 0.1% เท่านั้น โดยความผิดปกติของลักษณะทางสัณฐานของต้นกล้าที่สังเกตเห็นได้ชัดเจนคือ hypocotyl และ epicotyle จะสั้นลง ใบเลี้ยงหนาขึ้น โค้งงอและมีสีเขียวเข้ม โคนลำต้นใหญ่อวบ การตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากปลายรากงาของลูกผสมข้ามชนิดพบว่า มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น แต่ไม่สามารถนับให้ได้ครบทั้ง 52 แท่ง เนื่องจากมีขนาดเล็กและจำนวนมาก จึงตรวจสอบได้ยากเพราะบางแท่งมีการซ้อนทับกัน

Keywords : งา , ลูกผสมข้ามชนิด , การเพาะเลี้ยงคัพภะ , คอลชิซีน , โครโมโซม , *Sesamum indicum* , *S. radiatum* , *S. malabaricum*

Sesame Breeding Through Embryo Culture

Prasit Jaisil and Supalak Nopkunangkul

Department of Agromomy and Agricultural Development Research Center in Northeast Thailand , Faculty of Agriculture , Khon Kaen University

Khon Kaen 40002 , Thailand

ABSTRACT

Sesame breeding through embryo culture was conducted to evaluated the potential of embryo culture in sesame. The process of this study comprised of the experiment on surface sterilization of sesame capsule , interspecific hybrids formation , ovule culture of interspecific hybrids, colchicine treatment and chromosome investigation.

The results revealed that the most efficient sterilization was surface sterilized with 70% alcohol for 1 min fallowed by 10% chlorox for 15 min. Interspecific hybrid between *Sesamum indicum* and *S. radiatum* was failed to get the seed according to the difference of basic chromosome number between these two species. While the interspecific hybrid between *S. indicum* × *S. malabaricum* was succeeded. It was noticed that all agronomic characters of *S. malabaricum* dominated to *S. indicum*. The young ovule of interspecific hybrid was used for ovule culture on MS media supplemented with different concentration of IAA and kinetin combinations. The result showed that the combination of IAA 22 μM with or without kinetin 2.3 μM was the most efficient for young ovule regeneration.

Effects of colchicine on 3 sesame cultivars i.e. KKU 1 , KKU 2 and KKU 3 were also studied. Various concentration of colchicine i.e. 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 and 0.5% compared to water were investigated by soaking the sesame seed for 12 hr. The results revealed that KKU1 is the most tolerant to colchicine whereas KKU 2 and KKU 3 are very sensitive. The most efficient concentration for KKU 1 is 0.2-0.3% whereas KKU 2 and KKU 3 is 0.1%. The colchicine is effect to all observed agronomic characters such as shorter in hypocotyl and epicotyl , thick cotyledon with dark green color and larger collar. The chromosome number was investigated from the root tip of colchicine-treated seedling. More number of chromosome was observed. However, the size of chromosome is too small, we cannot count the real number of chromosome from the colchicine-treated seedling.

Keywords : Sesame , *Sesamum indicum* , *S. radiatum* , *S. malabaricum*, interspecific hybrid , embryo culture , ovule culture , colchicine , chromosome

(cultivated species) ดังนั้น การผสมพันธุ์ (hybridization) จึงอาจจะทำได้ทั้งการผสมพันธุ์ภายในชนิดเดียวกัน (intraspecific hybridization) หรือการผสมพันธุ์ข้ามชนิด (interspecific hybridization) ซึ่งในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์งาเหล่านี้ การสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมนับว่าเป็นสิ่งจำเป็นขั้นพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์พืชทุกชนิด

งานวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาข้อมูลขั้นพื้นฐานในการเพาะเลี้ยงคัพภะของงา เพื่อสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมสำหรับนำมาใช้ประโยชน์ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์งาต่อไป นอกจากนี้แล้วทักษะและประสบการณ์ที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้จะนำไปใช้เป็นแนวทางสำหรับปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดอื่น ๆ ได้อีกด้วย

การตรวจเอกสาร

งา (*Sesamum indicum* L.) เป็นพืชน้ำมันเก่าแก่ที่สุดพืชหนึ่งที่มนุษย์ปลูก สันนิษฐานว่าอาจจะมีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศเอธิโอเปีย (Yermanos, 1980) หลังจากนั้นก็แพร่เข้าไปปลูกในประเทศต่าง ๆ ทั้งในทวีปอัฟริกา ยุโรป อเมริกา เอเชีย และออสเตรเลีย สำหรับประเทศไทยนั้นสันนิษฐานว่าถูกนำเข้ามาปลูกครั้งแรกในภาคเหนือก่อนโดยผ่านเข้ามาทางประเทศพม่า

จากข้อมูลของศูนย์สถิติการเกษตร (2537) พบว่าระหว่างปี 2527-2537 มีการขยายพื้นที่ปลูกจากปีละ 230,000 ไร่ เป็น 377,000 ไร่ ผลผลิตเพิ่มขึ้นจากปีละ 22,100 ตัน เป็น 32,800 ตัน โดยผลผลิตที่เพิ่มขึ้นนี้เป็นผลมาจากการขยายพื้นที่ปลูก เพราะผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ของงาไม่ได้เพิ่มขึ้น แต่กลับมีแนวโน้มลดต่ำลง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะดินที่ใช้ปลูกขาดการอนุรักษ์ทำให้เสื่อมโทรมลงมาก และงาพันธุ์ดีที่หน่วยงานราชการต่าง ๆ ปรับปรุงขึ้นมาไม่ได้รับการส่งเสริมเผยแพร่อย่างทั่วถึง นอกจากนี้แล้วเกษตรกรส่วนใหญ่ปลูกงาเป็นพืชเสริมรายได้และผลิตอยู่ในเขตเกษตรล้าหลังที่อาศัยน้ำฝนแต่เพียงอย่างเดียว แนวทางในการเพิ่มผลผลิต จึงต้องปรับปรุงทั้งด้านการเขตกรรมและพันธุกรรมของงาโดยเฉพาะการปรับปรุงพันธุ์ใหม่ ๆ ให้มีฐานทางพันธุกรรมกว้างและสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมทั่ว ๆ ไปได้ดี

ในการปรับปรุงพันธุ์พืชนั้น ขั้นตอนที่สำคัญประการหนึ่งคือ การสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้เกิดขึ้นในประชากรก่อน หลังจากนั้นจึงทำการคัดเลือกพันธุ์ต่อไป ซึ่งในการสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมนี้ ในอดีตจะใช้วิธีผสมพันธุ์ระหว่างพืชที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ซึ่งเป็นวิธีที่ปฏิบัติกันมาตั้งแต่อดีต (conventional plant breeding) แต่ในปัจจุบันวิทยาการด้านต่าง ๆ มีความเจริญก้าวหน้าอย่างมากมาย ทำให้มีการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์ใช้ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งนับว่าเป็นวิธีการสมัยใหม่ (non-conventional plant breeding) และช่วยให้การปรับปรุงพันธุ์พืชประสบผลสำเร็จได้รวดเร็วยิ่งขึ้น

วิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnology) ที่อาจจะนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชนั้นมีมากมาย เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture) การเพาะเลี้ยงคัพภะ (embryo culture) การเพาะเลี้ยงไข่อ่อน (ovule culture) การเพาะเลี้ยงเรณูหรืออับเรณู (pollen or anther culture) การหลอมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) และพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เป็นต้น

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นการนำชิ้นส่วนของพืช เช่น ชิ้นส่วนจากใบ ลำต้น ราก เป็นต้น มาเลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์ที่ประกอบด้วย แร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ ที่มีการควบคุมแสง อุณหภูมิและความชื้น ซึ่งชิ้นส่วนเหล่านี้จะพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ต่อไป ต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้จะมีพันธุกรรมเหมือนกับต้นเดิมทุกประการ ยกเว้นในกรณีที่อาจจะเกิดความแปรปรวนของเซลล์ร่างกาย (somaclonal variation) ซึ่งจะช่วยให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) ได้ โดยลักษณะใหม่ ๆ ที่เกิดขึ้นนี้สามารถดำรงพันธุ์และขยายพันธุ์เพิ่มเติมต่อไปได้

นั่นคือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นอกจากจะช่วยขยายพันธุ์พืชให้ได้ปริมาณมาก ๆ ในเวลาอันจำกัดแล้ว ยังอาจจะสร้างพืชพันธุ์ใหม่ได้โดยตรงหรือใช้ช่วยในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงอับเรณู การเพาะเลี้ยงคัพภะ การหลอมเซลล์หรือการทำพันธุวิศวกรรมได้อีกด้วย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสบความสำเร็จในพืชทั่ว ๆ ไปอย่างมากมาย สำหรับในงานั้น Lee et. al. (1986 a) พบว่าสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้ยอดอ่อนของงากลายเป็นต้นอ่อนได้มากที่สุด คือ สูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม NAA 0.1 มก./ลิตร, IAA 0.5 มก./ลิตร และ kinetin 2 มก./ลิตร และ BA 1 มก./ลิตร ซึ่งช่วยชักนำให้เป็นต้นงาที่สมบูรณ์ได้ถึง 93 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Lee et. al. (1986 b) ยังได้ทดลองเพาะเลี้ยงอับเรณูของงาในอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D 25 มก./ลิตร และ BA 1 มก./ลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 55 เปอร์เซ็นต์ แต่ยังไม่สามารถกระตุ้นให้พัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้

อุปสรรคประการหนึ่งในการผสมพันธุ์พืชข้ามชนิด (interspecific hybridization) คือความอ่อนแอของลูกผสม ซึ่งอาจจะเป็นผลอันเนื่องมาจากการเข้ากันไม่ได้ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของไซโกต (zygote) และลักษณะทางพันธุกรรมของการสะสมอาหาร ทำให้คัพภะแห้งหรือตาย (Halward and Stalker, 1987) ดังเช่นปรากฏการณ์ในการผสมข้ามชนิดของถั่วลิสง (Nalini and Sastri, 1985) ซึ่งพบว่าการเจริญเติบโตของคัพภะลูกผสมและอาหารสะสมถูกทำให้ช้าลงและหยุดการเจริญเติบโต โดย hypertophy ของเยื่อหุ้มเมล็ด และในที่สุดคัพภะก็จะตายไปโดยไม่มีการพัฒนาเป็นต้นอ่อน

จากปัญหาและอุปสรรคในการผสมพันธุ์พืชข้ามชนิดดังกล่าว เทคนิคการเพาะเลี้ยงคัพภะ (embryo culture) จึงถูกนำมาใช้เพื่อแก้ไขอุปสรรคเหล่านี้ การเพาะเลี้ยงคัพภะเป็นเทคนิคในการนำเอาคัพภะอ่อน (immature embryo) หรืออาจจะนำเอาคัพภะที่เจริญเต็มที่แล้วมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* culture) เพื่อช่วยให้คัพภะลูกผสมสามารถพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ได้ คัพภะ (embryo) เกิดจากการปฏิสนธิของไข่ (egg) และอสุจิ (sperm) ได้เป็นไซโกต (zygote) จากนั้นไซโกตจึงเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นคัพภะอยู่ภายในเมล็ด คัพภะมีส่วนประกอบที่สำคัญคือยอดอ่อน (plumule) เอปิคอทิล (epicotyl) ใบเลี้ยง (cotyledon) ไฮโปคอทิล (hypocotyl) และเรดิเคิล (radicle) ซึ่งคัพภะของพืชชั้นสูงนี้ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมในสภาพที่ปลอดเชื้อ ก็สามารถเจริญเติบโตจนเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ เรียกวิธีการดังกล่าวว่า การเพาะเลี้ยงคัพภะ (embryo culture)

ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์เรียกว่า explant การเพาะเลี้ยงคัพภะต้องกระทำในสภาพที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นคัพภะที่จะนำมาเพาะเลี้ยงต้องนำมาฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับผิวก่อน พืชแต่ละชนิดจะมีวิธีฟอกที่แตกต่างกันไป เช่น เมล็ด Hex และเมล็ด *Sassafras* (Hu อ้างโดย Hu and Wang , 1984) ฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้คลอร็อกซ์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที Dunwell (อ้างโดย Hu and Wang , 1984) พบว่าการใช้คลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ตามผิวเมล็ดข้าวบาร์เลย์ได้ดี ในเมล็ดถั่วเขียว Monner (อ้างโดย Hu and Wang ,1984)แนะนำให้แช่ในสารละลายที่มีคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 60 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 10 นาที ส่วนในเมล็ดลูกผสม *Lilium* (Asano อ้างโดย Hu and

Wang, 1984) และเมล็ด *Iris* (Stoltz อ้างโดย Hu and Wang , 1984) ฟอกฆ่าเชื้อโดยจุ่มชิ้นส่วนลงใน เอธานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เป็นวิธีฟอกฆ่าเชื้อที่ดีที่สุด จะเห็นได้ว่าการฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับคัพภะโดยทั่วไปใช้แอลกอฮอล์และสารละลายคลอร็อกซ์ แต่ความเข้มข้นและเวลาที่ใช้จะแตกต่างไปตามชนิดของพืช

การแยกคัพภะที่อยู่ภายในเมล็ดมาเพาะเลี้ยงต้องอาศัยเทคนิคและวิธีการที่แตกต่างกันตามชนิดและขนาดของเมล็ด ในกรณีที่เมล็ดมีขนาดเล็กมาก เช่นเมล็ดกล้วยไม้ เมล็ดยูคาลิปตัส ฯลฯ อาจทำการแยกคัพภะภายใต้กล้องจุลทรรน์ ถ้าเมล็ดมีขนาดใหญ่ เช่น ถั่วลิสง การแยกคัพภะสามารถทำได้ง่าย แต่ควรจะศึกษาลักษณะ และตำแหน่งของคัพภะที่อยู่ภายในเมล็ด การแยกเอาคัพภะควรกระทำด้วยความระมัดระวัง เพื่อให้ได้คัพภะที่มีส่วนประกอบที่สมบูรณ์

ความต้องการอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของคัพภะนั้นขึ้นอยู่กับระยะการเจริญของคัพภะ คัพภะที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นส่วนต่าง ๆ มีความต้องการอาหารที่ค่อนข้างซับซ้อนมากกว่าคัพภะที่เจริญเต็มที่แล้ว นอกจากนี้ความต้องการอาหารยังแตกต่างกันตามชนิดของพืช เช่น ทานตะวันสามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารสังเคราะห์ B5, B5S, MS และ NN คัพภะของถั่วเหลืองสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารสูตร HS ที่เพิ่ม BAP (เพิ่มศักดิ์ และคณะ, 2534) ส่วนคัพภะของถั่วลิสง Bajaj (อ้างโดย Bajaj, 1983) พบว่าสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ผสม IAA กับ kinetin

การปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ได้ลักษณะที่ดี อาจใช้วิธีการผสมพันธุ์เพื่อให้เกิดพันธุ์ตามที่ต้องการ แต่การผสมพันธุ์พืชบางชนิดคัพภะไม่สามารถเจริญได้สมบูรณ์ หรืออาจตายก่อนที่จะเจริญเติบโตเต็มที่ Bajaj (อ้างโดย Bajaj, 1983) สามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้โดยนำเอาคัพภะของถั่วลิสงมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีสารเร่งการเจริญเติบโตคือ IAA กับ kinetin ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Bajaj และคณะ (อ้างโดย Bajaj, 1983) ที่สามารถเพาะเลี้ยงคัพภะของถั่วลิสงในอาหารสังเคราะห์ MS ที่ผสม 2, 4-D กับ kinetin ได้สำเร็จ คัพภะของพืชบางชนิดไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในธรรมชาติ โดยเฉพาะลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดหรือข้ามสกุล แต่การเพาะเลี้ยงคัพภะสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ Cherry (อ้างโดย Bajaj, 1983) สามารถเพาะเลี้ยงคัพภะของถั่วลิสงลูกผสมระหว่าง *Arachis hypogaea* กับ *A. villosa* เพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้มีความต้านทานโรค แมลง ทนแล้ง และมีเปอร์เซ็นต์น้ำมันในเมล็ดสูงได้ Strokes and Hull (อ้างโดย Bajaj, 1983) Srinivasmurthy and Iyengar (อ้างโดย Bajaj, 1983) พบว่าคัพภะที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างถั่วลิสงพันธุ์ป่ากับพันธุ์เพาะปลูก หรือระหว่างดิพพลอยด์เหมือนกัน (*A. duranensis* × *A. villosa*) หรือระหว่างเตตตราพลอยด์ด้วยกัน (*A. nanbyquarae or A. rasteiro* × *A. hypogaea*) สามารถเจริญได้ดีเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารสังเคราะห์ และพบว่าคัพภะซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างถั่วลิสงที่เป็นดิพพลอยด์กับเตตราพลอยด์สปีชีส์ก็สามารถนำมาเพาะเลี้ยงโดยเทคนิคดังกล่าวได้ดี (Ramans อ้างโดย Bajaj, 1983) นอกจากนั้นการเพาะเลี้ยงคัพภะยังช่วยย่นระยะเวลาในการขยายพันธุ์ได้ Knudson (อ้างโดย Dixon , 1985) สามารถเพาะเลี้ยงคัพภะของเมล็ดกล้วยไม้ได้หลังการปฏิสนธิแล้วเพียง 1 สัปดาห์ เมล็ดของพืชบางชนิดมีเปลือกแข็งการเพาะโดยวิธีธรรมชาติ ต้องรอจนกระทั่งเปลือก

เมล็ดแตก คัพภะจึงจะสามารถงอกได้ ซึ่งต้องใช้เวลานาน แต่การแยกเอาเฉพาะคัพภะมาเพาะเลี้ยงก็จะช่วยย่นระยะเวลาได้เช่นในเมล็ด *Iris* (Randolph et. al. อ้างโดย Dixon , 1985)

สำหรับการเพาะเลี้ยงคัพภะในงานั้นยังไม่พบรายงาน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเป็นพืชที่มีขนาดเมล็ดเล็กมาก การนำเอาเฉพาะส่วนของคัพภะมาเพาะเลี้ยงจึงทำได้ค่อนข้างยาก ดังนั้นจึงต้องดัดแปลงวิธีการโดยนำเอาไข่อ่อน (ovule) มาเพาะเลี้ยงแทนที่จะแคะเอามาเฉพาะส่วนคัพภะเพียงอย่างเดียว การเพาะเลี้ยงคัพภะของลูกผสมข้ามชนิดนี้ ประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิดแล้ว เช่น ถั่วลิสง (Nalini and Sastri , 1985) white clover (Yamada and Fukuoka, 1986) red clover (Phillips et al., 1992) และ ยาสูบ (Chung et al., 1988) เป็นต้น การเพาะเลี้ยงคัพภะของงาในครั้งนี้ จึงเป็นการศึกษาครั้งแรกที่จะใช้เป็นข้อมูลขั้นพื้นฐานในการประยุกต์ใช้ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์งาต่อไป

เนื่องจากงาพันธุ์เพาะปลูก (*Sesamum indicum*) มีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 ในขณะที่งาพันธุ์ป่า (*Sesamum* spp.) อีกหลายชนิดมีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกันไป ดังนั้นการผสมข้ามชนิด (interspecific hybridization) เพื่อถ่ายทอดลักษณะต้านทานโรคและแมลงศัตรูที่สำคัญของงา อาจจะประสบปัญหาผสมไม่ติด หรือลูกผสมที่ได้เป็นหมัน การใช้วิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วย เช่น การเพาะเลี้ยงไข่อ่อน (ovule culture) นั้น อาจจะมีความจำเป็นต้องเพิ่มจำนวนโครโมโซมของงาเพื่อแก้ปัญหาการเป็นหมันของรุ่นลูก

คอลชิซีน (colchicine) เป็นสารอัลคาลอยด์ ที่สกัดมาจากต้นพืชชนิดหนึ่งคือ *Colchicum autumnale* สารชนิดนี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้าง spindle fibre ในการแบ่งเซลล์ทั้งแบบ mitosis และ meiosis (Scott and Eagleson, 1988) สารชนิดนี้ใช้กันมานานแล้วในทางการแพทย์ โดยถ้าใช้ในระดับความเข้มข้นสูง ๆ ก็จะเป็นพิษถึงตายได้

การใช้สารคอลชิซีนนี้ จะให้ผลแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น อุณหภูมิขณะที่ใช้สาร ช่วงเวลาในการใช้ (duration of treatment) ความเข้มข้น ชนิดของพืช และส่วนของพืชที่ใช้ คอลชิซีนมีคุณสมบัติพิเศษในการใช้เพิ่มจำนวนโครโมโซม ซึ่งโดยทั่ว ๆ ไปแล้วการใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ (เช่น 0.05%) ในระยะเวลานาน ๆ (เช่น ไม่ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิห้องจะช่วยเพิ่มจำนวนโครโมโซมได้ดีกว่าการใช้สารที่มีเข้มข้นสูง ๆ และในระยะเวลาสั้น ๆ (Sybenga, 1972) คอลชิซีนช่วยให้มองเห็นโครโมโซมในระยะแบ่งเซลล์แบบ mitosis ได้อย่างชัดเจนที่ระยะ metaphase โดยช่วยให้โครโมโซมมีขนาดสั้น ตรงและแยกเป็น 2 chromatid อย่างชัดเจน โดยมีจุดสัมผัสตรง centromere

นอกจากคอลชิซีนแล้ว ยังมีสารชนิดอื่น ๆ อีกที่อาจจะใช้ได้ผลดีเหมือน ๆ กัน เช่น colcemid, α - bromonaphtalene, paradichlorobenzene, 8 - oxyquinoline และอนุพันธ์ของมัน สารกำจัดแมลงบางชนิดเช่น lindane ก็อาจจะใช้ได้ผลดี แต่มักจะมีความรุนแรงมากเกินไป สารเหล่านี้มีข้อดีเหนือกว่า คอลชิซีน คือ มีราคาถูก และเป็นพิษน้อยกว่า

คอลชิซีนถูกนำมาใช้เพิ่มจำนวนโครโมโซมให้กับพืชชนิดต่าง ๆ เช่น ในเชอรี่ (Theiler-Hedtrich, 1990) เมื่อใช้คอลชิซีนความเข้มข้น 0.1% กับตายอดและตาข้าง ทำให้เกิดพวก polyploid ประมาณ 10% ซึ่งสังเกตได้จากลำต้นเตี้ยลง รากสั้น ใบสีเขียวเข้ม ขนาดใหญ่

และมีขนาดปากใบใหญ่ขึ้นด้วย ในส้ม (Gmitter et al, 1991) เมื่อใช้สารคอลชิซีนความเข้มข้น 0.1% กับ embryo culture ช่วยให้ได้ส้มที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 3x,4x,6x และ 8x ในชูการ์บีท (Dobosh, 1989) เมื่อใช้สารละลายคอลชิซีน ความเข้มข้น 1% หยอดยอดต้นกล้าระยะ cotyledon stage ในเวลาเช้า โดยใช้ต้นตัวผู้เป็นหมัน (diploid male-sterile) พบว่า ได้ต้น tretraploid (4x) ซึ่งมีขนาดใบกว้างขึ้น และพบทั้งต้นที่เป็นหมันและไม่เป็นหมัน ในกระเทียม (Mar'yakhina et al, 1990) ได้มีการทดลองคอลชิซีน ความเข้มข้น 0.05% ผสมกับวุ้น เพาะกลีบกระเทียมนาน 72 ชั่วโมง แล้วจึงย้ายลงสูตรอาหาร MS ที่มีส่วนผสมของน้ำตาล, วิตามิน และฮอร์โมน เมื่อต้นกระเทียมงอกแล้วก็ผ่าหัวออกตามยาวเพื่อเร่งให้แตกยอดมาก ๆ ในข้าวบาร์เลย์ (Kim et al., 1988) ได้มีการทดลองใช้สารคอลชิซีนความเข้มข้น 0.1% เพื่อผลิตต้น 2x จากต้นกล้า haploid ของ *Hordeum vulgare x H. bulbasum* ในคาเมลเลีย (Kato, 1989) เมื่อใช้สารคอลชิซีนความเข้มข้น 0.1% ผสมในสูตรอาหาร MS สามารถผลิตต้นกล้า autopolyploid จาก somatic embryo ของ hypocotyl explant ได้ ใน *Rubus* spp (Gupton, 1989) ได้มีการทดลองใช้สารคอลชิซีนความเข้มข้น 0.02-0.8% ผสมในสูตรอาหารสำหรับผลิตต้นกล้าจากปลายยอด ซึ่งสามารถผลิตต้นกล้า 4x ที่มีขนาดปากใบใหญ่ ขนาดละอองเกสรตัวผู้ใหญ่ แต่การสังเคราะห์แสงลดลง ในมินต์ (Bugaenko et al, 1988) เมื่อใช้สารคอลชิซีนความเข้มข้น 0.01% กับ *Mentha canadensis* × *M. aquatica* โดย treat ตาข้าง นาน 1-4 วัน และตายอดนาน 7-10 วัน สามารถผลิตต้น Polyploid ได้ 16.7% ซึ่งสังเกตได้จากลักษณะทางสัณฐานที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น ลักษณะดอก, ขนที่ใบ, ต่อมน้ำมัน และสีของใบ ในกุหลาบ (Andrew et al, 1990) ได้มีการทดลองใช้สารคอลชิซีนความเข้มข้น 0.05% ผสมในสูตรอาหารเร่งราก นาน 16-24 ชม. แล้วจึงย้ายลงปลูกในสูตรอาหารธรรมดา อีก 7 วัน พบว่าให้ผลดีกว่าคอลชิซีน ที่ระดับความเข้มข้น 0.1% ในโคลเวอร์ (Anderson et al.,1991) ได้มีการทดลองใช้สารคอลชิซีนช่วยเพิ่มจำนวนโครโมโซมกับ interspecific hybrid ของ *Trifolium* spp. โดยนำตาข้างมาเลี้ยง ในสูตรอาหารที่มี 0.1% คอลชิซีน นาน 48-72 ชม. หลังจากนั้นจึงย้ายต้นกล้าระยะ trifoliolate ไปเพาะในสูตรอาหารเร่งราก ซึ่งจากการตรวจสอบจำนวนโครโมโซมที่ปลายรากอ่อน พบว่า 81% สามารถเพิ่มจำนวนโครโมโซม โดยอาจสามารถตรวจสอบได้ง่าย ๆ คือ ละอองเกสรตัวผู้ของพวก polyploid จะติดสีย้อมได้มากกว่า ในผักตระกูลกระหล่ำ (Kumar and Shivanna, 1991) เมื่อนำลูกผสมระหว่าง *Brassica fruticulosa* × *B. campestris* ซึ่งเป็นหมันมาเลี้ยง ในสูตร MS แล้วใช้สำลีชุบ 0.1% คอลชิซีนไป treat ตาข้าง สามารถผลิต amphidiploid ได้ภายใน 25-30 วัน สังเกตได้จากมีใบหนาสีเขียวเข้ม

จากการตรวจเอกสารยังไม่พบรายงานการทดลองใช้สารคอลชิซีนในงา การทดลองในครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาข้อมูลขั้นพื้นฐาน สำหรับหาวิธีเพิ่มชุดของโครโมโซมเพื่อช่วยให้ลูกผสมข้ามชนิดไม่เป็นหมัน เพื่อใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์งาต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อ

นำฝักงาพันธุ์ มข. 2 ที่มีอายุได้ 20 วัน หลังดอกบานมาฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวนอกโดยแช่ในแอลกอฮอล์ 70% นาน 1 นาที แล้วนำไปแช่ฆ่าเชื้อในคลอร็อกซ์ที่มีความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ กัน ดังนี้

1. แช่คลร็อกซ์ ความเข้มข้น 5% นาน 10 นาที
2. แช่คลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 5% นาน 15 นาที
3. แช่คลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 10% นาน 10 นาที
4. แช่คลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 10% นาน 15 นาที
5. แช่คลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 10% นาน 10 นาที แล้ว แช่ซ้ำอีกครั้งที่ความเข้มข้น 5% นาน 5 นาที (control)

2. การสร้างลูกผสมข้ามชนิด (interspecific hybridization)

ใช้งาพันธุ์เพาะปลูก (cultivated species , *Sesamum indicum*, 2n = 26) คือ งาดำพันธุ์ มข. 2 เป็นพันธุ์แม่ นำไปผสมข้ามกับงาพันธุ์ป่า (wild species) 2 พันธุ์คือ *S. malabaricum* (2n=26) และ *S. radiatum* (2n=64) โดยงาดำพันธุ์ มข. 2 เป็นงาพันธุ์ดีของมหาวิทยาลัยขอนแก่น แต่งาพันธุ์นี้ยังไม่ต้านทานต่อโรคและแมลง ดังนั้น จึงต้องการสร้างลูกผสมขึ้นมาใหม่โดยใช้ *S. malabaricum* เป็นสายพันธุ์พ่อเพื่อถ่ายทอดยีนต้านทานหนอนห่อยอด และลักษณะทนทานต่อน้ำท่วมขัง เช่นเดียวกับงาพันธุ์ *S. radiatum* ซึ่งทนทานต่อความแห้งแล้ง ทนน้ำท่วมและต้านทานต่อโรคและแมลงดีกว่าพันธุ์เพาะปลูกทั่ว ๆ ไป

3. การเพาะเลี้ยงคัพภะของงา

ทำการผสมพันธุ์ระหว่าง *S.indicum x S.malabaricum* เมื่อได้ฝักอ่อนอายุ 20 วันหลังผสมเกสร ตัดฝักอ่อนมาฟอกฆ่าเชื้อโดยแช่ในแอลกอฮอล์ 70% นาน 1 นาที แล้วนำไปแช่ในคลอร็อกซ์ 10% นาน 15 นาที หลังจากนั้นนำไปล้างน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำฝักงาไปผ่าเอาเมล็ด (ทำภายใต้สภาพปลอดเชื้อ) ที่อยู่ภายในไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS. ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ IAA (indole acetic acid) และ kinetin ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 6 ระดับ คือ

IAA 11 µM

IAA 11 µM + kinetin 2.3 µM

IAA 22 µM

IAA 22 µM + kinetin 2.3 µM

IAA 33 µM

IAA 33 µM + kinetin 2.3 µM

โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) ทำ 10 ซ้ำ แล้วบันทึกความยาวรากและลำต้น เมื่ออายุ 4 สัปดาห์

4. การศึกษาผลของคอลชิซีน

นำเมล็ดงาขาวพันธุ์ มข. 1 งาดำพันธุ์ มข. 2 และงาแดงพันธุ์ มข. 3 มาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อสังเกตการตอบสนองของงาแต่ละพันธุ์ ต่อสารคอลชิซีน โดยนำงาทั้ง 3 พันธุ์นี้มาแช่ในสารละลายคอลชิซีนที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5% โดยมีทรีตเมนต์ที่เป็น control คือ แช่น้ำกลั่นอย่างเดียว เมล็ดงาทั้ง 3พันธุ์นี้จะแช่นาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำไปเพาะใน petri dish ที่มีกระดาษเพาะความงอกรอง เติมน้ำให้กระดาษชื้นแล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เพาะความงอกที่อุณหภูมิ 25° ซ นาน 5 วัน แล้วทำการบันทึกผลการทดลอง โดยใช้ Digital vernier caliper วัดความยาวของ epicotyl , hypocotyl , ความหนาของ cotyledon, เส้นผ่าศูนย์กลางของโคนต้นกล้า และพื้นที่ใบของ cotyledon

5. การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายรากงาที่ผ่านการทรีตสารคอลชิซีน

ตัดปลายรากงาระดับต่ำกว่า hypocotyl เล็กน้อย นำไปแช่ในสารละลาย 0.002M ของ 8-hydroxyquinoline (oxine) นำตัวอย่างไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15° ซ นานไม่น้อยกว่า 18 ชม. หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างไป fix chromosome โดยแช่ในสารละลาย 99% ethalnol : 99% acetic acid = 3:1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ° ซ นาน 3 ชม. หลังจากนั้นนำปลายรากงาไปล้างน้ำกลั่น แล้วนำไปแช่ในหลอดพลาสติกเล็ก ๆที่มี 1 N HCl แล้วนำหลอดนี้ไปใส่ใน incubator waterbath ที่อุณหภูมิ 60 ° ซ (maceration) นาน 8 นาที เสร็จแล้วนำไปย้อมสี (staining) โดยใช้สารละลาย basic fuchsin ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะสังเกตเห็นปลายรากงามีสีม่วง จึงนำตัวอย่างไปศึกษาและนับจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ต่อไป

หอสมุดกลาง
สถาบันวิทยบริการ

ผลการทดลอง

1. การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อ

จากการทดสอบวิธีฟอกฆ่าเชื้อหลังจากแช่ฝักอ่อนของงาในแอลกอฮอล์ 70% นาน 1 นาที แล้วนำไปแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่ต่างกัน 5 วิธีการ แล้วนำฝักมาแกะเอาเมล็ดออกในตู้ปลอดเชื้อเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) แล้วเก็บไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิ 25° ซ นาน 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นจึงตรวจนับต้นกล้าที่มีลักษณะปกติ พบว่าการแช่คลอร็อกซ์ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกันจะมีผลต่อการงอก เปอร์เซ็นต์ต้นปกติและการปลอดเชื้อของเมล็ดอ่อนงาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1) โดยทรีตเมนต์ที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที จะให้เปอร์เซ็นต์ต้นปกติและปลอดเชื้อสูงที่สุด แต่ไม่แตกต่างกับการใช้คลอร็อกซ์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที ดังนั้น การฟอกฆ่าเชื้อฝักงาอาจใช้คลอร็อกซ์เข้มข้นเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที ก็ให้ผลดีเท่า ๆ กับคลอร็อกซ์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที

Table 1 Normal seedlings from various concentration and duration of treatment of chlorox cultured on MS for 4 weeks.

Treatment	No. of normal seedlings (%)
5% chlorox 10 min.	80
5% chlorox 15 min.	50
10% chlorox 10 min.	40
10% chlorox 15 min.	90
10% chlorox 10 min. + 5% chlorox 5 min.	30
Average	58
LSD .05	19.9
C.V. (%)	22.4

2. การสร้างลูกผสมข้ามชนิด

จากการสร้างลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *S. indicum* × *S. radiatum* นั้นไม่ประสบความสำเร็จในการผสมข้าม ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะความแตกต่างของจำนวนโครโมโซมของงาทั้ง 2 ชนิด โดย *S.indicum* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 ในขณะที่ *S. radiatum* มีจำนวน

โครโมโซมสูงถึง 2n = 64 ซึ่งงาทั้ง 2 ชนิดนี้มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (basic chromosome number) แตกต่างกันมาก ทำให้โครโมโซมไม่สามารถจับคู่กันได้

สำหรับลูกผสมระหว่าง *S.indicum* × *S. malabaricum* นั้น สามารถผสมข้ามกันได้ตามปกติ เพราะมีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือ 2n = 26 ทำให้การจับคู่ของโครโมโซมเป็นไปอย่างปกติ ลูกผสมข้ามชนิดของคู่ผสมนี้ มีลักษณะเหมือนงาพันธุ์ป่า (*S.malabaricum*) มากกว่างาพันธุ์เพาะปลูก (Table 2) แสดงว่าพฤติกรรมของยีนน่าจะเป็นแบบข่มสมบูรณ์ (complete dominant) โดยลักษณะจากงาพันธุ์ป่าจะข่มงาพันธุ์เพาะปลูก

Table 2 Morphological characteristics of parents and F_1 hybrids of the cross *S.indicum* × *S.malabaricum*.

Character	*S.indicum*	*S.malabaricum*	F_1
Habit	Annual , erect	Annual , erect	Annual , erect
Branching	Moderately branching	Profusely branching	Profusely branching
Leaves	Simple , medium, basal leaves ovate and wavy, upper leaves linear and entire, pale green color	Heteromorphic, lerger, basal leaves deeply threelobed with dentate margin, upper leaves linear and entire, green color	Heteromorphic, larger, basal leaves shallowly threelobed, upper leaves linear and entire, dark green color
Corolla	Purple	Purple	Purple
Seeds	Black,rough	Black,rough	Black,rough

3. การเพาะเลี้ยงคัพภะของงา

ผลการทดลองใน Table 3 แสดงให้เห็นว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง IAA ที่ระดับ 11 µM อย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับ kinetin 2.3 µM ไม่ได้ช่วยให้ความยาวของรากและลำต้นแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงบน MS อย่างเดียวแต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ IAA เป็น 22 µM หรือ 33 µM ทั้งที่เติม kinetin 2.3µM หรือไม่ก็ตาม จะช่วยให้การเจริญเติบโตของรากงาดีขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และมีความแตกต่างทางสถิติกับ control อย่างไรก็ตามความยาวของลำต้นในทุกทรีตเมนต์นั้น ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเลย

Table 3 Effects of plant growth regulators on growth of seedlings regenerated from young seed (ovule culture) of sesame cultured on MS medium for 4 weeks.

Treatment	Length of (cm.)	
	Root	Stem
Ms (control)	4.25^{c}	4.71
MS + IAA 11 µM	4.54^{bc}	4.66
MS + IAA 11 µM + kin. 2.3 µM	4.52^{bc}	4.52
MS + IAA 22 µM	5.69^{a}	5.54
MS + IAA 22 µM + kin. 2.3 µM	5.39^{a}	5.00
MS + IAA 33 µM	5.13^{ab}	4.86
MS + IAA 33 µM + kin. 2.3 µM	5.00^{abc}	5.12
F-test	*	ns
C.V. (%)	18.0	21.1

* indicated 95% level of probability

ns = non significant

4. การศึกษาผลของคอลชิซีน

การศึกษาผลของคอลชิซีนในงาทั้ง 3 พันธุ์นี้ เป็นที่น่าสังเกตว่า งาขาวพันธุ์ มข. 1 มีความทนทานต่อสารคอลชิซีนมากกว่างาพันธุ์อื่น (Table 4) ซึ่งจะเห็นได้จาก ความยาวของ epicotyl, hypocotyl, ความหนาของ cotyledon, ขนาดของโคนต้นกล้า (collar) และพื้นที่ใบเลี้ยง (cotyledon) โดยงาดำพันธุ์ มข. 2 และงาแดงพันธุ์ มข. 3 นั้น เริ่มเห็นความเปลี่ยนแปลงของขนาดตั้งแต่ความเข้มข้นที่ระดับ 0.1% ในขณะที่งาขาวพันธุ์ มข. 1 ต้องใช้ความเข้มข้นที่ระดับ 0.2 หรือ 0.3% จึงจะเริ่มสังเกตเห็นความเปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่ามีปฏิสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์งากับความเข้มข้นของสารละลายคอลชิซีน ซึ่งจากการทดลองในครั้งนี้สรุปได้ว่าความเข้มข้นของสารละลายคอลชิซีนที่เหมาะสมสำหรับงาขาวพันธุ์ มข. 1 จะอยู่ที่ระดับ 0.2-0.3% ในขณะที่งาดำพันธุ์ มข. 2 และงาแดงพันธุ์ มข. 3 จะอยู่ที่ระดับ 0.1% ต้นกล้าที่ผ่านการทรีตด้วยสารคอลชิซีนนี้จะมีใบเลี้ยงหนา โค้งงอลง สีเขียวเข้ม hypocotyl และ epicotyl มีขนาดใหญ่สั้น โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้นสูง ๆ เช่น 0.5% จะเห็นต้นกล้ามีขนาดใหญ่มากและสั้นอย่างเห็นได้ชัด

Table 4 Effects of colchicine concentration on seedlings of 3 sesame varieties.

1. Epicotyl length. (mm.)

Variety	Colchicine concentration (%)					
	Control	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
KKU 1	30.67	26.01	18.18	13.00	9.66	7.93
KKU 2	29.90	5.73	5.72	4.70	4.25	4.16
KKU 3	29.68	8.07	4.34	4.16	3.74	3.24

2. Hypocotyl length (mm.)

KKU 1	49.77	57.57	45.49	37.71	37.86	44.90
KKU 2	41.34	28.78	32.32	19.10	5.75	0.42
KKU 3	59.83	27.85	4.19	3.77	2.56	2.18

3. Cotyledon area ($mm.^2$)

Variety	Colchicine concentration (%)					
	Control	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
KKU 1	15.63	15.87	18.37	18.72	18.75	18.70
KKU 2	10.89	14.52	15.15	15.18	13.29	13.87
KKU 3	12.77	14.88	17.61	18.00	15.23	16.40

4. Cotyledon thickness (mm.)

KKU 1	0.36	0.39	0.43	0.47	0.48	0.49
KKU 2	0.36	0.49	0.51	0.53	0.51	0.56
KKU 3	0.36	0.47	0.52	0.51	0.49	0.48

5. Collar diameter (mm.)

KKU 1	1.10	0.68	1.13	1.19	1.25	1.33
KKU 2	1.30	0.95	1.43	1.32	1.47	1.59
KKU 3	1.19	1.15	1.51	1.41	1.47	1.63

5. การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายรากงาที่ผ่านการทรีตสารคอลชิซีน

งา *(Sesamum indicum)* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 จากการศึกษาโครโมโซมจากปลายรากพบว่าเป็นพืชที่มีขนาดโครโมโซมเล็กมากมองไม่เห็นความแตกต่างระหว่างโครโมโซมคู่ต่าง ๆ การนับจำนวนให้ครบทำได้ค่อนข้างยาก เพราะมักจะมีการซ้อนทับกันอยู่บ้าง อย่างไรก็ตามหลังจาก ทรีต ด้วยคอลชิซีนแล้วพบว่า มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น ซึ่งถึงแม้จะนับได้ไม่ครบทั้ง 52 แท่ง แต่เนื่องจากคอลชิซีนมีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้าง spindle fibre ในระยะการแบ่งเซลล์แบบ mitosis ที่ระยะ metaphase ดังนั้น ถ้ามีจำนวนโครโมโซม มากกว่า 26 แท่ง ก็อาจจะสันนิษฐานได้ว่า น่าจะเกิดการเพิ่มชุดของโครโมโซมมากขึ้นเท่าตัวแล้ว

สรุปและวิจารณ์

ในการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อบนฝักงานั้น พบว่าการฆ่าเชื้อโดยใช้แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที ตามด้วยคลอร็อซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ 15 นาที จะช่วยให้มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนน้อยที่สุด ต้นกล้าเจริญเติบโตได้ดี สอดคล้องกับ Bajaj (1983) ซึ่งรายงานวิธีการฟอกฆ่าเชื้อบนฝักถั่วเหลืองด้วยวิธีการเดียวกัน แต่ระยะเวลาของการแช่คลอร็อกซ์นั้น อาจแตกต่างกันไปบ้างตามชนิดของพืช

การสร้างลูกผสมข้ามชนิดของงานั้น พบว่าลูกผสมระหว่าง *Sesamum indicum* × *S. radiatum* ไม่สามารถผสมกันได้ ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากความแตกต่างของจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน ซึ่ง *S.indicum* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 ในขณะที่ *S. radiatum* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 64 ทำให้โครโมโซมไม่สามารถจับคู่กันได้ตามปกติ ส่วนลูกผสมระหว่าง *S.indicum* × *S.malabaricum* นั้นสามารถผลิตลูกผสม (F_1) ได้ตามปกติ ซึ่งอาจจะเป็นเพราะต่างก็มีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน (2n = 26) ลูกผสมที่ได้มีลักษณะทางสัณฐานเหมือนกับ *S.malabaricum* แสดงว่ายีนที่ควบคุมลักษณะต่าง ๆ ของ *S. malabaricum* จะข่มลักษณะต่าง ๆ ของ *S.indicum*

ลูกผสมระหว่าง *S.indicum* × *S. malabaricum* นี้ ได้ทดลองนำคัพภะไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ แต่เนื่องจากคัพภะของงามีขนาดเล็กมาก จึงได้ดัดแปลงโดยนำเอาเมล็ดอ่อน (ovule) ไปเพาะเลี้ยงแทน ซึ่งเมื่อนำฝักงาอายุ 20 วัน ไปฟอกฆ่าเชื้อตามวิธีการดังกล่าวแล้ว และนำเมล็ดอ่อนไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม IAA 22 μM โดยอาจจะเติม kinetin 2.3 μM หรือไม่ก็ได้ จะช่วยให้การเจริญเติบโตในส่วนของรากดีกว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับอื่น ๆ อย่างไรก็ตามสูตรอาหารดังกล่าวนั้นหรือสูตรอื่น ๆ ไม่ได้ทำให้การเจริญเติบโตในส่วนของลำต้นแตกต่างกัน

เพื่อเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาการเป็นหมันของลูกผสมข้ามชนิดจึงได้ศึกษาข้อมูลพื้นฐานในการใช้สารคอลชิซีน โดยนำเมล็ดงาขาว มข 1 งาดำ มข 2 และงาแดง มข 3 ไปแช่ในสารคอลชิซีนความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำเมล็ดงาไปเพาะ พบว่างาขาวพันธุ์ มข. 1 มีความทนทานต่อสารคอลชิซีนมากที่สุด โดยเริ่มตอบสนองต่อสารนี้ที่ระดับความเข้มข้น 0.2-0.3 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่งาดำพันธุ์ มข. 2 และงาแดงพันธุ์ มข. 3 จะตอบสนองต่อสารนี้ที่ระดับความเข้มข้นเพียง 0.1 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ลักษณะทางสัณฐานของต้นกล้าที่ผ่านการทรีตสารคอลชิซีนจะเห็นความเปลี่ยนแปลงชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับต้นกล้าปกติ กล่าวคือ ส่วนของ hypocotyl และ epicotyl จะสั้นลง ใบเลี้ยงหนาขึ้น โค้งงอและมีสีเขียวเข้ม โคนลำต้นจะใหญ่อวบ ยิ่งเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสูงมาก ๆ ลำต้นจะยิ่งสั้น แต่มีขนาดใหญ่และอวบมากขึ้นตามลำดับ

สารคอลชิซีนมีคุณสมบัติในการเพิ่มชุดของจำนวนโครโมโซม จึงมีความจำเป็นต้องตรวจสอบจำนวนโครโมโซม เพื่อยืนยันผลของสารชนิดนี้ งาพันธุ์เพาะปลูกโดยทั่วไปนั้นจะมีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 อย่างไรก็ตามโครโมโซมของงามีขนาดเล็กมาก การเตรียมตัวอย่าง

จากปลายรากงาเพื่อตรวจสอบจำนวนโครโมโซมให้ได้เท่ากับ 26 แท่งพอดีนั้นค่อนข้างยากมาก สำหรับปลายรากงาที่ผ่านการทรีตด้วยสารคอลชิซีนนั้น พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น แต่ไม่สามารถนับให้ได้ครบทั้ง 52 แท่ง เนื่องจากมีขนาดเล็ก มีจำนวนมาก มีการซ้อนทับกันบ้างทำให้ตรวจสอบได้ลำบาก จึงใช้วิธีสันนิษฐาน เช่น เมื่อพบว่ามีจำนวนโครโมโซมมากกว่า 26 แท่ง ก็จะสันนิษฐานว่า น่าจะมีจำนวนโครโมโซมเป็น 52 แท่ง ทั้งนี้เนื่องจากอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษามีข้อจำกัดมาก

ผลการศึกษาครั้งนี้นับว่ามีประโยชน์มาก โดยเฉพาะโครงการปรับปรุงพันธุ์งาของมหาวิทยาลัยขอนแก่น เพราะการนำความรู้ทางเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์ใช้ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชนี้ จะเป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้มาก โดยเฉพาะการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานโรคและแมลงนั้น การนำเชื้อพันธุกรรมจากพืชพันธุ์ป่ามาใช้ประโยชน์ จะช่วยให้พืชพันธุ์ใหม่ที่ได้มีความต้านทานต่อโรคและแมลงอย่างสมบูรณ์ได้ ซึ่งการที่จะประสบผลสำเร็จในการสร้างลูกผสมข้ามชนิดนั้น เทคโนโลยีชีวภาพนับว่ามีส่วนช่วยเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงคัพภะของพืชลูกผสมและการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมเพื่อแก้ความเป็นหมันของลูกผสมนี้ก็เป็นแนวทางหนึ่งที่นักปรับปรุงพันธุ์พืชจะนำมาใช้ประโยชน์ได้มากที่สุด