



โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

ภาควิชา

เรื่อง การช่วยชีวิตเอ็มบริโอที่ได้จากการผสมข้ามชนิดระหว่างถั่วเขียวฝีม้วน (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) ถั่วเขียวฝีม้วนดำ (*V. mungo* (L.) Hepper) และ ถั่วขึ้นฉางแดง (*V. umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi) ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงอวุล

Embryo Rescue of Interspecific Hybrids among Mungbean (*V. radiata* (L.) Wilczek), Black Gram (*V. mungo* (L.) Hepper), and Rice Bean (*V. umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi) by Ovule Culture

นามผู้วิจัย นายธนพล ไชยแสน

๒ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สรพจน์ ดำรงกิตติกุล, Dr. Agr.)

กิจกรรมการ

(ศาสตราจารย์พิเศษศักดิ์ ศรีนิเวศน์, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์รังสฤษดิ์ กาวิต๊ะ, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อัจจงหาญ, M.A.)

คุณสมบัติบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 24 เดือน มกราคม พ.ศ. 2549

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การช่วยชีวิตเอ็มบริโอที่ได้จากการผสมข้ามชนิดระหว่างถั่วเขียวพิวมัน (*Vigna radiata* (L.)
Wilczek) ถั่วเขียวพิวดำ (*V. mungo* (L.) Hepper) และถั่วขึ้นฉางแดง (*V. umbellata*
(Thunb.) Ohwi & Ohashi) ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงอวุล

Embryo Rescue of Interspecific Hybrids among Mungbean (*V. radiata* (L.)
Wilczek), Black Gram (*V. mungo* (L.) Hepper), and Rice Bean
(*V. umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi) by Ovule Culture

โดย

นายธนพล ไชยแสน

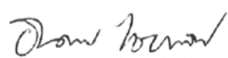
เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
พ.ศ. 2549

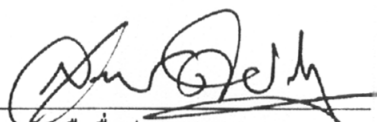
ISBN 974-16-1059-9

ธนพล ไชยแสน 2549: การช่วยชีวิตเอ็มบริโอที่ได้จากการผสมข้ามชนิดระหว่าง
ถั่วเขียวผิวมัน (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) ถั่วเขียวผิวดำ (*V. mungo* (L.) Hepper) และ
ถั่วเนาวนางแดง (*V. umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi) ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงอวูล
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
เกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ปรธานกรรมการที่ปรึกษา:
ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุรพงษ์ คำรงกิตติกุล, Dr.Agr. 91 หน้า
ISBN 974-16-1059-9

ทำการผสมข้ามชนิดระหว่าง *Vigna radiata* “กำแพงแสน 2” กับ *V. mungo* “พินธุโลก 2”
และ *V. umbellata* “Miyazaki” และผสมกลับเพื่อสร้างลูกผสมข้ามชนิดชั่วที่ 1 โดยการช่วยชีวิต
เอ็มบริโอด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงอวูล พบว่า กลุ่มผสม *V. radiata* x *V. mungo* มีการผสมติดฝัก 48% ส่วน
การผสมกลับมีการผสมติดฝัก 7.5% ส่วนกลุ่มผสม *V. radiata* x *V. umbellata* และ *V. mungo* x
V. umbellata มีการผสมติดฝัก 28.2% และ 16.04% ตามลำดับ แต่กลุ่มผสมกลับของทั้ง 2 กลุ่มผสมนี้ไม่เกิด
การติดฝัก เมล็ดที่ได้จากการผสมข้ามชนิดจากทุกกลุ่มผสมที่ติดฝักไม่สามารถงอกเมื่อนำไปเพาะใน
แปลงทดลอง การเพาะเลี้ยงอวูลเพื่อช่วยชีวิตเอ็มบริโอที่เกิดจากการผสมข้ามชนิด สามารถทำให้
เอ็มบริโออายุ 12 วันหลังการผสมเกสรของ *V. radiata* x *V. mungo* และ *V. radiata* x *V. umbellata* เกิด
การงอกและพัฒนาเป็นต้นบนอาหารสังเคราะห์ได้เท่ากับ 92.5 และ 5% ตามลำดับ ส่วน *V. mungo* x
V. umbellata อวูลที่มีอายุ 14 วันหลังการผสมเกสร สามารถงอกและพัฒนาเป็นต้นได้ 50% ส่วน
เอ็มบริโอของ *V. mungo* x *V. radiata* ไม่สามารถงอกได้ เมื่อตรวจสอบความเป็นลูกผสมกับต้นที่ได้
จากการช่วยชีวิตด้วยเทคนิค RAPD พบว่า ทุกต้นที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอเป็นลูกผสมข้ามชนิด
จากการนำต้นลูกผสมที่ได้มาเพิ่มจำนวนในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า ต้นลูกผสมชั่วที่ 1 ของ *V. radiata* x
V. umbellata เท่านั้นที่ประสบความสำเร็จในการเพิ่มจำนวน และเมื่อย้ายปลูกลงดินสามารถออกดอก
ได้แต่ไม่ติดฝัก ซึ่งจากการตรวจสอบความมีชีวิตของละอองเกสรบนอาหารสังเคราะห์ พบว่า ละออง
เกสรไม่มีชีวิตโดยไม่พบการงอกเลย และจากการทดลองเพิ่มจำนวนโครโมโซมของต้นถั่วลูกผสมข้าม
ชนิดที่ได้โดยการหยดสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.2% (w/v) ให้กับยอดของต้นถั่วลูกผสมใน
สภาพปลอดเชื้อพบว่า สามารถเพิ่มจำนวนโครโมโซม จาก 2x เป็น 4x ได้ในอัตราที่สูงถึง 15% เมื่อ
ตรวจสอบด้วยวิธี Flow cytometry



ลายมือชื่อนิติ



ลายมือชื่อประธานกรรมการ

9 / ๑๐๐ / 2549

Tanapon Chaisan 2006: Embryo Rescue of Interspecific Hybrids among Mungbean (*V. radiata* (L.) Wilczek), Black Gram (*V. mungo* (L.) Hepper), and Rice Bean (*V. umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi) by Ovule Culture. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Surapong Dumrongkittikule, Dr.Agr. 91 pages.
ISBN 974-16-1059-9

The interspecific crossing among *Vigna radiata* “Kamphaeng Saen 2”, *V. mungo* “Pitsanulok 2” and *V. umbellata* “Miyazaki” and their reciprocal crossings were carried out to obtain F₁ hybrid plants through ovule culture. The results showed that pod setting from *V. radiata* x *V. mungo* cross was 43%, whereas that from the reciprocal cross was only 7.5%. The *V. radiata* x *V. umbellata* and *V. mungo* x *V. umbellata* crosses gave 28.2 and 16.04% pod setting, respectively. However, their reciprocal crosses were not successful. All F₁ hybrid seeds could not germinate in a field. The ovule culture could rescue and raise the plantlets from 12 days old embryos of *V. radiata* x *V. mungo* and *V. radiata* x *V. umbellata*, with the plantlet germination of 92.5 and 5%, respectively. For *V. mungo* x *V. umbellata*, the culture of 14 days old ovule gave the plantlet germination at 50%. Whereas, the interspecific embryo of *V. mungo* x *V. radiata* could not be rescued. The result of hybridity checking by RAPD showed that all of the rescued plantlets were interspecific hybrids. In an attempt to increase the number of hybrid plantlets *in vitro*, only the F₁ of *V. radiata* x *V. umbellata* was successfully obtained. When the hybrids were transferred into the field the plants flowered without pod setting. The pollen of the hybrid plants was cultured on a synthetic medium and showed no viability. The hybrid plants were induced to become polyploid by dropping 0.2% (w/v) colchicine solution on the apical shoots *in vitro*. The rate of polyploidy induction from 2x to 4x was 15% a tested by flow cytometry method.

T. Chaisan

Student's signature



Thesis Advisor's signature

9 / 210 / 2549

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. สุรพงษ์ ดำรงกิตติกุล ประธานกรรมการที่ปริญญานิพนธ์ ศ.ดร. พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ กรรมการที่ปริญญานิพนธ์เอก และ รศ.ดร. รังสฤษฎ์ กาวิด๊ะ กรรมการที่ปริญญานิพนธ์รอง ที่ให้คำปรึกษาแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนการตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณ ดร. ทิพย์วัลย์ ศรีจันทร์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สนธิชัย จันทร์เปรม และ ดร. เสริมศิริ จันทร์เปรม ที่ให้คำแนะนำในการทำงานวิจัยและให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติการในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและงานด้านโมเลกุลเครื่องหมาย และขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. จุลภาภักดิ์ กุณวงศ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดโครโมโซม

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ

ขอขอบพระคุณ โครงการพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืชตระกูลถั่วสำหรับประเทศไทย สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนสนับสนุนในการวิจัย

ขอขอบคุณ คุณวราณี โสมนัส นักวิจัยห้องปฏิบัติการ Plant Tissue Culture and Transformation ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านเทคนิคต่าง ๆ ในห้องทดลอง ขอขอบคุณ คุณณัฏฐา ศรีสวัสดิ์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดโครโมโซมด้วยเครื่อง Flow cytometer และขอขอบคุณ พี่ ๆ น้อง ๆ และ เพื่อนทุกคนที่ช่วยเหลือให้คำแนะนำต่าง ๆ แก่ข้าพเจ้า อีกทั้งยังเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงสำหรับคุณพ่อและคุณแม่ ที่ให้กำลังใจที่ยิ่งใหญ่แก่ข้าพเจ้าและให้การสนับสนุนในการศึกษาของข้าพเจ้าตลอดมา

ธนพล ไชยแสน

มกราคม 2549

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	22
ผลการทดลอง	33
วิจารณ์	58
สรุป	74
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	75
ภาคผนวก	84

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดถั่วเขียวผิวมัน	5
2	ปริมาณของกรดอะมิโนแต่ละชนิดในเมล็ดถั่วเขียวผิวมัน	6
3	ปริมาณเกลือแร่และวิตามินในเมล็ดแห้งของถั่วเขียวผิวมัน	6
4	การติดฝักที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ <i>V. radiata</i> <i>V. mungo</i> และ <i>V. umbellata</i>	34
5	การงอกเป็นต้นของออวูลที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ <i>V. radiata</i> x <i>V. mungo</i> ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เป็นเวลา 30 วัน	37
6	การงอกเป็นต้นของออวูลที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ <i>V. radiata</i> x <i>V. umbellata</i> ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เป็นเวลา 30 วัน	38
7	การงอกเป็นต้นของออวูลที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ <i>V. mungo</i> x <i>V. umbellata</i> ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เป็นเวลา 30 วัน	40
8	ไพรเมอร์ RAPD ที่สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่าง <i>V. radiata</i> <i>V. mungo</i> และ <i>V. umbellata</i>	42
9	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันเมื่อตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ A02 A03 A07 A13 และ Ax17 เปรียบเทียบระหว่าง <i>V. radiata</i> กับ <i>V. mungo</i> <i>V. radiata</i> กับ <i>V. umbellata</i> และ <i>V. mungo</i> กับ <i>V. umbellata</i>	43
10	การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิด (จำนวน 40 ชิ้นจากต้นที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอต่อ 1 คู่ผสม) บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS + vitamin B5 ที่มีความเข้มข้นของ BA 3 ระดับ คือ 0.1 0.2 และ 0.3 mg/l	52
11	การเปลี่ยนแปลงของจำนวนชุดโครโมโซมของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิด <i>V. radiata</i> x <i>V. umbellata</i> ที่หยดด้วยสารละลายโคลชิซิน	55

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
1 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารสังเคราะห์สูตร MS basal medium (Murashige and Skoog, 1962)	85
2 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารสังเคราะห์สูตร Gamborg B-5 media (B5) (Gamborg <i>et al.</i> , 1968)	86
3 ไพรมเมอร์ RAPD ที่นำมาคัดเลือกเพื่อใช้แยกความแตกต่างระหว่าง <i>V. radiata</i> <i>V. mungo</i> และ <i>V. umbellata</i>	87
4 สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากพืช	88
5 การเตรียมส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR ของ RAPD	89

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ฝักถั่วที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ <i>V. radiata</i> x <i>V. mungo</i>	34
2	เมล็ดถั่ว <i>V. radiata</i> “กำแพงแสน 2” (ก) <i>V. mungo</i> “พิษณุโลก 2” (ค) และ เมล็ด F_1 ที่ได้จากการผสมข้ามชนิด (ข)	34
3	เมล็ดถั่ว <i>V. radiata</i> “กำแพงแสน 2” (ก) <i>V. umbellata</i> “Miyazaki” (ค) และเมล็ด F_1 ที่ได้จากการผสมข้ามชนิด (ข)	35
4	เมล็ดถั่ว <i>V. mungo</i> “พิษณุโลก 2” (ก) <i>V. umbellata</i> “Miyazaki” (ค) และ เมล็ด F_1 ที่ได้จากการผสมข้ามชนิด (ข)	35
5	การงอกเป็นต้นจากการเพาะเลี้ยงอวูลที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ <i>V. radiata</i> x <i>V. mungo</i> ที่มีอายุต่าง ๆ กัน	36
6	ต้นถั่วที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอวูลของคู่ผสม <i>V. radiata</i> x <i>V. mungo</i>	37
7	การงอกเป็นต้นจากการเพาะเลี้ยงอวูลที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ <i>V. radiata</i> x <i>V. umbellata</i> ที่มีอายุต่าง ๆ กัน	38
8	ต้นถั่วที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอวูลของคู่ผสม <i>V. radiata</i> x <i>V. umbellata</i>	39
9	การงอกเป็นต้นจากการเพาะเลี้ยงอวูลที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ <i>V. mungo</i> x <i>V. umbellata</i> ที่มีอายุต่าง ๆ กัน	40
10	ต้นถั่วที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอวูลของคู่ผสม <i>V. mungo</i> x <i>V. umbellata</i>	41
11	แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเมื่อใช้ไพรเมอร์ A02 ตรวจสอบความเป็นลูกผสม ของต้นตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอจากการผสมข้ามชนิดของ <i>V. radiata</i> x <i>V. mungo</i> (แถวที่ 1-6) เทียบกับแถบดีเอ็นเอของ <i>V. radiata</i> (R) และ <i>V. mungo</i> (M)	44
12	แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเมื่อใช้ไพรเมอร์ Ax17 ตรวจสอบความเป็นลูกผสม ของต้นตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอจากการผสมข้ามชนิดของ <i>V. radiata</i> x <i>V. mungo</i> (แถวที่ 1-6) เทียบกับแถบดีเอ็นเอของ <i>V. radiata</i> (R) และ <i>V. mungo</i> (M)	45
13	แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเมื่อใช้ไพรเมอร์ A13 ตรวจสอบความเป็นลูกผสม ของต้นตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอจากการผสมข้ามชนิดของ <i>V. radiata</i> x <i>V. umbellata</i> (แถวที่ 1-8) เทียบกับแถบดีเอ็นเอของ <i>V. radiata</i> (R) และ <i>V. umbellata</i> (U)	46

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเมื่อใช้ไพรเมอร์ Ax17 ตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอจากการผสมข้ามชนิดของ <i>V. radiata</i> x <i>V. umbellata</i> (แถวที่ 1-9) เทียบกับแถบดีเอ็นเอของ <i>V. radiata</i> (R) และ <i>V. umbellata</i> (U)	46
15	แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเมื่อใช้ไพรเมอร์ A03 ตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอของ <i>V. mungo</i> x <i>V. umbellata</i> (แถวที่ 1-6) เทียบกับแถบดีเอ็นเอของ <i>V. mungo</i> (M) และ <i>V. umbellata</i> (U)	47
16	แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเมื่อใช้ไพรเมอร์ A07 ตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอของ <i>V. mungo</i> x <i>V. umbellata</i> (แถวที่ 1-6) เทียบกับแถบดีเอ็นเอของ <i>V. mungo</i> (M) และ <i>V. umbellata</i> (U)	48
17	ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ <i>V. radiata</i> x <i>V. mungo</i> ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS basal medium + B5 vitamins ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 mg/l	49
18	รากของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ <i>V. radiata</i> x <i>V. umbellata</i> ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร B5 + IBA 2 mg/l (ก) และอาหารสังเคราะห์สูตร B5 (ข)	50
19	ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ <i>V. mungo</i> x <i>V. umbellata</i> ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS basal medium + B5 vitamins ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 mg/l	50
20	ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ <i>V. radiata</i> x <i>V. umbellata</i> ที่ย้ายปลูกลงในกระถางและเพาะเลี้ยงในสภาพธรรมชาติ	53
21	ละอองเกสรของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ <i>V. radiata</i> x <i>V. umbellata</i> ที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Brewbaker and Kwack (1963) ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 15% (w/v)	54

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	ปริมาณดีเอ็นเอของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดจากต้นที่ไม่ได้หยดสารละลายโคลชิซิน (ก) หยดด้วยสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.1% (w/v) (ข) และหยดด้วยสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.2% (w/v) (ค)	56
ภาพผนวกที่		
1	แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่าง <i>V. radiata</i> (R) <i>V. mungo</i> (M) และ <i>V. umbellata</i> (U) เมื่อตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ A02 และ A03	89
2	แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่าง <i>V. radiata</i> (R) <i>V. mungo</i> (M) และ <i>V. umbellata</i> (U) เมื่อตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ A07 และ A13	90
3	แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่าง <i>V. radiata</i> (R) <i>V. mungo</i> (M) และ <i>V. umbellata</i> (U) เมื่อตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ Ax17	90
4	ละอองเกสรของ <i>V. radiata</i> (ก) และ <i>V. umbellata</i> (ข) ที่งอกในอาหารสังเคราะห์สูตร Brewbaker and Kwack (1963) ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 15% (w/v)	91

การช่วยชีวิตเอ็มบริโอที่ได้จากการผสมข้ามชนิดระหว่างถั่วเขียวผิวมัน (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) ถั่วเขียวผิวดำ (*V. mungo* (L.) Hepper) และถั่วขึ้นฉางแดง (*V. umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi) ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงอวูล

Embryo Rescue of Interspecific Hybrids among Mungbean (*V. radiata* (L.) Wilczek), Black Gram (*V. mungo* (L.) Hepper), and Rice Bean (*V. umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi) by Ovule Culture

คำนำ

ถั่วเขียวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญและนิยมปลูกกันแพร่หลายในประเทศไทย เนื่องจากเป็นพืชที่ปลูกง่าย ต้องการการดูแลรักษาน้อยเมื่อเทียบกับพืชเศรษฐกิจชนิดอื่น และเป็นพืชอายุสั้น สามารถใช้ประโยชน์ได้ทั้งต้นและเมล็ด นิยมใช้ปลูกก่อนหรือหลังการทำนาหรือทำไร่เพื่อตัดวงจรการระบาดของศัตรูพืช และใช้ไถกลบช่วยบำรุงรักษาความอุดมสมบูรณ์ของดิน (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2545) นอกจากนี้เมล็ดถั่วเขียวยังสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตแป้ง วุ้นเส้น ถั่วงอก และประกอบอาหารอื่น ๆ เนื่องจากมีคุณค่าทางอาหารสูง สามารถใช้เป็นอาหารเสริมพวกธัญพืช และอาหารแบ่งอื่น ๆ ได้ (Akpapunam, 1996) ซึ่งปริมาณความต้องการในการใช้ผลิตภัณฑ์จากถั่วเขียวในประเทศและส่งออกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี โดยในช่วงปี พ.ศ. 2542 - 2544 มีความต้องการในประเทศเพิ่มขึ้น 6% และในปี พ.ศ. 2544 มีความต้องการถั่วเขียวผิวมันรวม 230,000 ตัน โดยนำไปเพาะเป็นถั่วงอก 70,000 ตัน แป้ง 20,000 ตัน ขน 30,000 ตัน วุ้นเส้น 50,000 ตัน และใช้บริโภคเมล็ดโดยตรง 10,000 ตัน โดยมีมูลค่าการส่งออกในรูปวุ้นเส้นเป็นมูลค่าประมาณ 190 ล้านบาท ต่อปี และใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ 15,000 ตัน (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2545) ในปี พ.ศ. 2546 ประเทศไทยส่งออกถั่วเขียวเป็นมูลค่า 325,110,000 บาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2547)

ถั่วเขียวผิวดำเป็นพืชที่มีการปลูกมานานแล้วในประเทศไทย ในแต่ละปีประเทศไทยสามารถผลิตถั่วเขียวผิวดำได้ประมาณ 70,000-100,000 ตัน (สมชาย และ มนตรี, 2540) โดยผลผลิตประมาณ 90% ผลิตเพื่อส่งออกไปยังต่างประเทศ ส่วนที่เหลือใช้ในการบริโภคภายในประเทศ การส่งออกถั่วเขียวผิวดำส่วนใหญ่เป็นการส่งออกเมล็ดพันธุ์ โดยตลาดส่งออกถั่วเขียวผิวดำสำคัญได้แก่

ประเทศญี่ปุ่น ปากีสถาน และประเทศอินเดีย โดยในปี พ.ศ. 2548 ประเทศไทยส่งออกถั่วเขียวผิวดำ เป็นมูลค่า 51,100,000 บาท (ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร, 2548)

ถั่วเขียวเป็นถั่วที่ค่อนข้างรู้จักกันมาก ในปัจจุบันประเทศไทยมีการส่งออกเมล็ดถั่วเขียวประมาณ 20,000-30,000 ตันต่อปี ตลาดในการส่งออกถั่วเขียวที่สำคัญได้แก่ ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา เยอรมันต์ จอร์แดน และไต้หวัน การใช้ประโยชน์จากถั่วเขียวแดงภายในประเทศมีน้อย ส่วนใหญ่จะเป็นการผลิตเพื่อการส่งออก (นาค, 2548) โดยในปี 2548 ประเทศไทยส่งออกถั่วเขียวแดงเป็นมูลค่า 150,400,000 บาท (ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร, 2548)

ถั่วเขียวเป็นพืชผสมตัวเอง (Shanmugasundaram, 1996) ทำให้มีฐานพันธุกรรมที่แคบ ซึ่งการมีฐานพันธุกรรมที่แคบจัดเป็นข้อจำกัดในการปรับปรุงพันธุ์ (Rashid *et al.*, 1987) ดังนั้น การขยายฐานพันธุกรรมหรือการสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้กับพืชจึงเป็นหนทางหนึ่งในการนำไปสู่ความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดจากสาเหตุสำคัญหลัก 2 สาเหตุ คือ การกลายพันธุ์ของยีน (gene mutation) และการรวมตัวกันใหม่ของยีน (gene recombination) (รังสฤษฎ์, 2539) ซึ่งการผสมพันธุ์ข้ามชนิด (interspecific crossing) เป็นหนึ่งในวิธีที่สามารถสร้างความผันแปรทางพันธุกรรมจากกระบวนการรวมตัวกันใหม่ของยีน ทำให้เกิดการกระจายตัวในลักษณะต่าง ๆ ของลูกผสม ทำให้สามารถคัดเลือกลักษณะที่พึงประสงค์มาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้ (กฤษฎา, 2546) โดยการผสมพันธุ์พืชข้ามชนิดสามารถถ่ายทอดลักษณะที่ดีจากพืชชนิดหนึ่งไปสู่อีกชนิดหนึ่งและสามารถทำให้เกิดลักษณะใหม่ ๆ ที่ไม่เคยปรากฏในรุ่นพ่อแม่มาก่อนได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างยิ่ง (Rattan, 1998)

จากการศึกษาการผสมข้ามชนิดระหว่างถั่วเขียวกับถั่วอื่น ๆ ในสกุล *Vigna* พบว่าส่วนใหญ่มีการร่วงของดอกและฝักอ่อน เนื่องจากไม่เกิดการพัฒนาหรือเกิดความผิดปกติในการพัฒนาของเอ็มบริโอทำให้ไม่สามารถเก็บเมล็ดลูกผสมได้ (F_1 hybrid seed) หรืออาจเกิดการพัฒนาของเอ็มบริโอจนได้เป็นเมล็ด แต่เมล็ดที่ได้มีลักษณะเล็กและลีบ เปลือกหุ้มเมล็ดมีลักษณะหยาบ เมื่อนำไปเพาะโดยวิธีการเพาะเมล็ดปกติมักจะไม่งอกหรือออกเป็นต้นที่ไม่สมบูรณ์ (Chen *et al.*, 1982; Rashid *et al.*, 1987) ทำให้การสร้างพันธุ์พืชใหม่ ๆ ที่มีลักษณะดังที่ต้องการไม่ประสบความสำเร็จ

จากปัญหาการไม่พัฒนาหรือเกิดความผิดปกติในการพัฒนาของเอ็มบริโอที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดนั้นสามารถแก้ไขได้โดยการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงอวูล (ovule culture)

(Fujime *et al.*, 2000; Kumlehn *et al.*, 1997; Mallikarjuna, 1999; Sharma *et al.*, 1996) อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงอวูลต้องประกอบด้วยปัจจัยที่เหมาะสมหลายประการ โดยเฉพาะอายุของอวูลที่นำมาเพาะเลี้ยง (Mallikarjuna, 1999; Pellegrineschi *et al.*, 1997; Pierik, 1987) ดังนั้น การสร้างประชากรต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดระหว่างถั่ว *V. radiata* *V. mungo* และ *V. umbellata* เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาพันธุ์จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาอายุของอวูลที่มีผลต่อการช่วยชีวิตเอ็มบริโอ ลูกผสมโดยวิธีการเพาะเลี้ยงอวูลในสภาพปลอดเชื้อ และศึกษาวิธีการตรวจสอบความเป็นลูกผสมข้างต้นที่ได้จากการช่วยชีวิตโดยใช้เทคนิค RAPD เพื่อยืนยันความเป็นลูกผสมก่อนที่จะนำไปคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ต่อไป และศึกษาวิธีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดโดยใช้สารโคลชิซินเพื่อให้ต้นถั่วลูกผสมที่ได้นั้นสามารถผลิตเมล็ดพันธุ์รุ่นต่อไปได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการช่วยชีวิตเอ็มบริโอที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดระหว่าง *V. radiata* *V. mungo* และ *V. umbellata* ด้วยการวิธีการเพาะเลี้ยงอวูล
2. เพื่อศึกษาวิธีการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นที่ได้จากการช่วยชีวิตด้วยเทคนิค RAPD
3. เพื่อศึกษาการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิด

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของ *V. radiata* *V. mungo* และ *V. umbellata*

ถั่วเขียวพืชม้วน (mungbean) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vigna radiata* (L.) Wilczek จัดอยู่ใน Family Fabaceae (Leguminosae), Subfamily Papilionoideae, Genus *Vigna* และจัดอยู่ใน Subgenus *Ceratotropis* (Shanmugasundaram, 1996) มีกำเนิดอยู่ในประเทศอินเดีย และมีโครโมโซมเป็น diploid มีจำนวนโครโมโซม $2n = 22$ ถั่วเขียวเป็นถั่วที่มีคุณค่าทางอาหารสูง โดยมีคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนเป็นองค์ประกอบต่อเมล็ดในปริมาณ 58.2% (w/w) และ 23.6% (w/w) ตามลำดับ (ตารางที่ 1) มีกรดอะมิโนหลายชนิด (ตารางที่ 2) รวมทั้งยังมีเกลือแร่และวิตามินอีกหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ (ตารางที่ 3) อย่างไรก็ตามถั่วเขียวมีความอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของศัตรูพืชหลายชนิด เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไวรัส (Shanmugasundaram, 1996) โรครากเน่าและโคนเน่า โรคใบจุด นอกจากนั้นยังมีแมลงศัตรูพืชที่สำคัญ เช่น หนอนแมลงวันเจาะลำต้น หนอนฝัก หนอนกระทู้ผัก เพลี้ยไฟและไรขาว ทำให้เกิดความเสียหายต่อการผลิตเป็นอย่างมาก (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2545)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดถั่วเขียวพืชม้วน

องค์ประกอบทางเคมี	เปอร์เซ็นต์
Total carbohydrate	58.2
Protein	23.6
Moisture	9.7
Ash	4
Crude fiber	3.3
Ether extract	1.2

ที่มา: Akpapunam (1996)

ตารางที่ 2 ปริมาณของกรดอะมิโนแต่ละชนิดในเมล็ดถั่วเขียวฝัมน

กรดอะมิโน	ปริมาณ (g/16 g N)
Alanine	3.9
Arginine	5.5
Aspartic acid	11.5
Cystine	0.7
Glutamic acid	13.8
Glycine	3.4
Histidine	2.9
Isoleucine	3.7
Lysine	8.1
Methionine	0.5
Phenylalanine	4.9
Proline	3.7
Serine	4.7
Threonine	3.3
Tyrosine	2.5
Valine	4.1

ที่มา: Akpapunam (1996)

ตารางที่ 3 ปริมาณเกลือแร่และวิตามินในเมล็ดแห้งของถั่วเขียวฝัมน

องค์ประกอบ	ปริมาณ (mg/100 g of dry seed)
Calcium	105
Iron	7.1
Niacin	2.5
Phosphorus	330
Potassium	1132
Riboflavin	0.3
Sodium	6
Thiamine	0.5

ที่มา: Akpapunam (1996)

ถั่วเขียวผิวดำ (black gram) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vigna mungo* (L.) Hepper จัดอยู่ใน Genus *Vigna* และอยู่ใน Subgenus *Ceratotropis* เช่นเดียวกับถั่วเขียวผิวมัน มีโครโมโซมเป็น diploid $2n = 22$ มีแหล่งกำเนิดในประเทศอินเดีย มีลักษณะลำต้นเป็นพุ่ม แตกกิ่งก้าน และทอดเลื้อย มีใบหนา มีขนขึ้นปกคลุมลำต้น ส่วนประกอบทางเคมีต่อหนึ่งเมล็ด พบว่า มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต 59.9% และ โปรตีน 24.8% (สถาบันวิจัยพืชไร่, 2539) นอกจากนี้ ถั่วเขียวผิวดำยังมีความสามารถในการต้านทานต่อโรคและแมลงได้ดี (Shanmugasundaram, 1996) และยังมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Tomooka *et al.*, 1991)

ถั่วเขียวนางแดง (rice bean) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi จัดอยู่ใน Genus *Vigna*, Subgenus *Ceratotropis* และอยู่ใน Section *Angularis* มีโครโมโซมเป็น diploid $2n = 22$ องค์ประกอบทางเคมีในเมล็ดต่อ 100 กรัมของน้ำหนักเมล็ดแห้ง พบว่า มีคาร์โบไฮเดรต 60.7 g โปรตีน 20.9 g แคลเซียม 200 mg ฟอสฟอรัส 390 mg และเหล็ก 10.9 mg นอกจากนั้นพบว่า มีปริมาณวิตามินบางชนิดที่สูง ได้แก่ niacin thiamine และ riboflavin ที่มีปริมาณต่อ 100 กรัมของน้ำหนักเมล็ดแห้งเป็น 2.4 0.49 และ 0.21 mg ตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบว่า ถั่วเขียวนางแดงมีปริมาณกรดอะมิโนที่สูงมาก ได้แก่ arginine histidine leucine isoleucine lysine methionine cystine phenylalanine tyrosine threonine และ valine ซึ่งปริมาณกรดอะมิโนเหล่านี้ในเมล็ดถั่วเขียวนางแดงมีปริมาณที่สูงกว่าถั่วเขียวผิวมัน (Carvalho and Vieira, 1996) ถั่วเขียวนางแดงนั้น เป็นถั่วที่นิยมบริโภคกันมากในประเทศญี่ปุ่น มีลักษณะทางพันธุกรรมที่สามารถปรับตัวได้ดีในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งได้ดี มีความต้านทานต่อโรคและแมลงสูง นอกจากนั้นยังต้านทานต่อการเข้าทำลายของโรคราน้ำค้าง โรคเหี่ยว และโรคใบจุด ส่วนถั่วเขียวนางแดงที่มีการคัดเลือกที่อินเดียพบลักษณะที่ต้านทานต่อ yellow mosaic และ bacterial blight อีกด้วย (Carvalho and Vieira, 1996)

2. การผสมพันธุ์พืชข้ามชนิด (interspecific crossing)

ในการปรับปรุงพันธุ์พืช การสร้างพันธุ์พืชที่ดีมักมาจากการผสมพันธุ์ระหว่างพ่อแม่ที่อยู่ในพืชชนิด (species) เดียวกัน แต่หลายกรณีพบว่า ลักษณะบางอย่างที่ต้องการไม่สามารถหาได้ในพืชชนิดเดียวกัน เช่น ลักษณะที่ต้านทานโรคบางชนิด ลักษณะคุณภาพของผลผลิตบางอย่าง และความแปลกใหม่ของลักษณะที่ต้องการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชชนิดที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ อย่างไรก็ตามถึงแม้จะเป็นพืชที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ก็อาจขาด

ลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจบางอย่าง ซึ่งหาไม่ได้ในพืชชนิดเดียวกัน ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงมีความจำเป็นต้องหาลักษณะที่ต้องการจากพืชในเครือญาติที่ต่างชนิด (species) กัน (กฤษฎา, 2546)

การผสมพันธุ์พืชข้ามชนิด (interspecific crossing) เป็นวิธีการที่สร้างความผันแปรทางพันธุกรรมและทำให้เกิดการกระจายตัวของลักษณะต่าง ๆ ในลูกผสม ทำให้สามารถคัดเลือกต้นที่มีลักษณะที่พึงประสงค์มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้ (นิศย์ศรี, 2541) นอกจากนี้การผสมพันธุ์พืชข้ามชนิดยังมีจุดมุ่งหมายที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือ การถ่ายทอดลักษณะบางอย่างที่สำคัญที่มีในพืชชนิด (species) หนึ่งไปสู่พืชอีกชนิดหนึ่ง เช่น ลักษณะทนแล้ง ทนต่อโรค ทนต่อการเข้าทำลายของแมลงต่าง ๆ เป็นต้น (Rattan, 1998) อย่างไรก็ตามการผสมพันธุ์พืชข้ามชนิดมักไม่ค่อยประสบความสำเร็จเนื่องจากมีอุปสรรคบางประการที่ทำให้ไม่สามารถเก็บเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ได้ ซึ่งสามารถแบ่งอุปสรรคดังกล่าว ได้เป็น 2 ประเภทดังนี้

1. อุปสรรคก่อนการปฏิสนธิ (pre-fertilization barrier) เป็นอุปสรรคที่ป้องกันไม่ให้เกิดการปฏิสนธิ โดยอาจเกิดเพียงหนึ่งสาเหตุหรือหลายสาเหตุร่วมกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและกลุ่มผสม ซึ่งสาเหตุดังกล่าวได้แก่ ละอองเกสรไม่สามารถเกาะและงอกบนยอดเกสรตัวเมียได้ เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของละอองเกสรและยอดเกสรตัวเมียนั้นไม่ส่งเสริมให้เกิดการจับกัน หรือละอองเกสรสามารถงอกหลุดละอองเกสรบนยอดเกสรตัวเมียได้แต่ไม่สามารถงอกผ่านยอดเกสรเพศเมีย (stigma) และ ก้านเกสรเพศเมีย (style) ลงไปยังรังไข่ได้ หรือหลอดละอองเกสรสามารถงอกไปถึงอวุลได้แต่ไม่เกิดการปฏิสนธิ ทำให้ไม่มีการสร้างไซโกต (zygote) (Pickersgill, 1993; Shivanna, 2003)

2. อุปสรรคหลังการปฏิสนธิ (post-fertilization barrier) เป็นอุปสรรคที่เกิดขึ้นหลังจากเกิดการปฏิสนธิ ทำให้เกิดการแท้งของเอ็มบริโอที่เกิดจากการผสมข้าม โดยสามารถเกิดได้ในหลายระยะของการพัฒนาของเอ็มบริโอ ซึ่งขึ้นอยู่กับกลไกของการพัฒนาของเอ็มบริโอหรือเอนโดสเปิร์มจะเกิดขึ้นเมื่อใด ทำให้ไม่สามารถสร้างเมล็ดหรือต้นลูกผสมข้ามชนิดขึ้นมาได้ (Rattan, 1998; Shivanna, 2003)

การล้มเหลวในการพัฒนาของเอ็มบริโอนั้น เกิดจากไซโกตที่เกิดขึ้นจากการผสมข้ามชนิดไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอดหรือไม่สามารถแบ่งเซลล์และพัฒนาไปจนถึงระยะเอ็มบริโอที่แก่สมบูรณ์ โดยอาจเกิดจากความไม่เข้ากันระหว่างจีโนมของพ่อกับแม่ โดยเกิดจากการที่ยีนบางยีนเข้าคู่กัน

แล้วส่งผลให้เกิดการแสดงออกในการยับยั้งการพัฒนของเอ็มบริโอหรือส่งผลทำให้เอ็มบริโอนั้นตาย (Hadley and Openshaw, 1980)

การล้มเหลวในการพัฒนาของเอนโดสเปิร์มนั้นพบว่า เกิดจากการพัฒนาที่ผิดปกติของเอนโดสเปิร์ม เนื่องจากความไม่เข้ากันระหว่างจีโนมของพ่อและแม่ที่อยู่ในเอนโดสเปิร์ม ซึ่งส่งผลให้เกิดการยับยั้งการพัฒนาและสลายตัว เป็นผลทำให้ขาดเนื้อเยื่อที่ช่วยสนับสนุนการพัฒนาของเอ็มบริโอในระยะแรก เอ็มบริโอจึงไม่สามารถพัฒนาจนแก่สมบูรณ์ และบางครั้งพบว่าเอนโดสเปิร์มที่เกิดจากการผสมข้ามนั้นยังส่งผลก่อให้เกิดการขัดขวางการพัฒนาของเอ็มบริโออีกด้วย (Hadley and Openshaw, 1980)

จากสาเหตุหลักทั้ง 2 ประการนี้ทำให้เกิดการแท้งและร่วงของฝักอ่อนหรือส่งผลให้เมล็ดที่ได้นั้นไม่สามารถงอกได้ (Pickersgill, 1993; Shivanna, 2003) หรือบางครั้งพบว่า ลูกผสมข้ามชนิดนั้นสามารถงอกและเจริญเป็นต้นได้แต่เป็นหมัน (sterile) ที่ชั่วแรก (F_1) หรือชั่วที่ 2 (F_2) อย่างไรก็ตาม รายละเอียดของการเกิดอุปสรรคหลังการปฏิสนธินั้นยังไม่ทราบรายละเอียดที่แน่ชัด (Chen *et al.*, 1982; Shivanna, 2003)

3. การผสมพันธุ์พืชข้ามชนิดระหว่างถั่วเขียวผิวมัน (*V. radiata*) ถั่วเขียวผิวดำ (*V. mungo*) และถั่วเนืองแดง (*V. umbellata*)

การผสมข้ามชนิดระหว่างถั่วเขียวผิวมัน (*V. radiata*) ถั่วเขียวผิวดำ (*V. mungo*) และถั่วเนืองแดง (*V. umbellata*) นั้น เป็นการสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรมให้กับต้นถั่วลูกผสม เพื่อทำให้เกิดการกระจายตัวของลักษณะต่าง ๆ และสามารถคัดเลือกต้นลูกผสมที่มีลักษณะที่ต้องการได้ (Chen *et al.*, 1982) โดยการผสมข้ามชนิดในถั่วทั้งสามชนิดมีรายงานว่า มักเกิดการแท้งและร่วงของฝักอ่อนเกิดขึ้น (Chen *et al.*, 1982; Rashid *et al.*, 1987) ซึ่งเกิดจากสาเหตุการล้มเหลวในการพัฒนาของเอนโดสเปิร์ม โดยอาจจะมีการพัฒนาที่ช้าหรือไม่มีการพัฒนาเลย ทำให้เอ็มบริโอมีอาหารหรือสารประกอบอื่น ๆ ไม่เพียงพอจึงส่งผลให้เกิดการแท้งเกิดขึ้น (Pickersgill, 1993)

การศึกษาการผสมข้ามชนิดระหว่างถั่วเขียวผิวมัน (*V. radiata*) กับถั่วเขียวผิวดำ (*V. mungo*) ที่ผ่านมา พบว่า การผสมติดฝักจะมีระดับที่สูงเมื่อใช้ถั่วเขียวผิวมัน (*V. radiata*) เป็นต้นแม่ (Chen *et al.*, 1982; Edgawa *et al.*, 1987; Ngampongsai *et al.*, 1996; Rashid *et al.*, 1987; Sree *et al.*, 1987; Verma and Yadava, 1986) ซึ่งสามารถใช้สารผสมระหว่าง GA₃, NAA และ Kinetin จีดพ่นบริเวณช่อดอกเพื่อช่วยในการป้องกันการร่วงของฝักอ่อนและส่งเสริมการพัฒนาของเมล็ดของลูกผสมนี้ได้ (Manirul, 1991) Rashid *et al.* (1987) รายงานว่า การผสมข้ามชนิดของกลุ่มผสมรุ่นนี้มีอัตราการผสมติดฝัก 27.62% โดยลูกผสม F₁ มีอัตราการงอก 10.4% ในแปลงทดลอง และมีความงอก 71% เมื่อนำมาทำการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (embryo culture) (สุมนา, 2540; Ngampongsai *et al.*, 1996) ส่วนการผสมแบบสลับพ่อและแม่นั้นไม่ประสบความสำเร็จ (Ngampongsai *et al.*, 1996; Verma and Yadava, 1986) ลักษณะที่ปรากฏในต้นลูกผสม ได้แก่ สีดอก ขนที่ฝัก และความยาวต่อความกว้างของใบแรก (L/W) จะมีลักษณะที่เหมือนแม่ แต่บางลักษณะจะอยู่กึ่งกลางระหว่างพ่อและแม่ เช่น สีเมล็ด สีของฝักแก่ และความยาวของ hypocotyl ซึ่งลักษณะที่แสดงออกนี้สามารถนำไปตรวจสอบความเป็นลูกผสม (hybridity) ได้ (Rashid *et al.*, 1987; Sree *et al.*, 1987; Verma and Yadava, 1986) และต้นลูกผสม F₁ ที่ได้นั้นพบว่า มีความมีชีวิตของละอองเกสรตัวผู้ โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 3.3 ถึง 31.5% จากการตรวจสอบโดยวิธีการย้อมสีของละอองเกสร และจากการตรวจสอบการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของละอองเกสร พบว่า มีการแบ่งตัวที่ไม่สม่ำเสมอ โดยในต้นลูกผสม F₁ พบ 4 ถึง 6 univalents (univalent หมายถึง โครโมโซมที่ไม่มีการแนบชิดกัน (synapsis) ของ homologous chromosome ในระยะ zygotene ของการแบ่งตัวแบบไมโอซิส I) (Geoffrey, 2000) ซึ่งมีความผิดปกติเนื่องจากชุดของโครโมโซมที่ได้จากพ่อและแม่นั้นต่างชุดกัน ส่งผลทำให้ต้นลูกผสมที่ได้นั้นเป็นหมัน (Edgawa *et al.*, 1987)

การผสมข้ามชนิดระหว่างถั่วเขียวผิวมัน (*V. radiata*) กับถั่วเขียวผิวแดง (*V. umbellata*) มีรายงานความสำเร็จเมื่อใช้ถั่วเขียวผิวมันเป็นต้นแม่ โดยมีการผสมติดฝัก 27.62% และสามารถพัฒนาจนเป็นฝักแก่ได้ 10.86% โดยเมล็ดลูกผสมที่ได้เมื่อนำไปปลูกพบว่า ได้ต้นที่เป็นหมัน (Rashid *et al.*, 1987; Verma and Yadava, 1986) ส่วนการใช้ถั่วเขียวผิวแดงเป็นต้นแม่นั้น มีการผสมติดฝัก 23.67% แต่เมล็ดทั้งหมดที่ได้มีลักษณะเหี่ยวแห้ง (Rashid *et al.*, 1987) และเมล็ดลูกผสมที่ได้มีความงอกต่ำเพียง 12% (Ngampongsai *et al.*, 1996) ลักษณะของต้นลูกผสมที่แสดงออก พบว่า มีความยาวของก้านใบและความสูงของ cotyledon อยู่ระหว่างพ่อและแม่ และมีสีของฝักแก่เหมือนกับถั่วเขียวผิวแดง (Chen *et al.*, 1982; Rashid *et al.*, 1987) จากการทดลองการช่วยชีวิตของเอ็มบริโอลูกผสมโดยการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในสภาพปลอดเชื้อทั้งหมด 4 เอ็มบริโอ พบว่า ไม่มีเอ็มบริโอที่รอดชีวิต (Rashid *et al.*, 1987)

การผสมข้ามชนิดระหว่างถั่วเขียวผิวดำ (*V. mungo*) กับถั่วเขียวนางแดง (*V. umbellata*) พบว่า ประสบความสำเร็จในการผสมเมื่อใช้ถั่วเขียวผิวดำเป็นต้นแม่ โดยมีการติดฝัก 35.4% และสามารถพัฒนาจนถึงระยะฝักแก่ได้ 43 ถึง 71% แต่ฝักที่ได้นั้นพบว่า เป็นฝักกลม เมล็ดที่ได้ทั้งหมดเหี่ยวแห้งและไม่สามารถนำไปปลูกได้ ส่วนการใช้ถั่วเขียวนางแดงเป็นต้นแม่มีการผสมติดฝักต่ำและมีการร่วงของฝักอ่อนที่สูงมาก เมล็ดที่ได้มีลักษณะเหี่ยวแห้งและมีความสมบูรณ์ต่ำมาก (Ahn and Hartmann, 1978; Chen *et al.*, 1982; Rashid *et al.*, 1987)

4. การช่วยชีวิตเอ็มบริโอ (embryo rescue)

เทคนิคการช่วยชีวิตเอ็มบริโอ เป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการช่วยทำให้การผสมพันธุ์พืชข้ามชนิดประสบความสำเร็จ เนื่องจากเอ็มบริโอของลูกผสมข้ามชนิดมักจะเกิดการแท้งหลังจากการผสมเกสร โดยส่วนใหญ่สามารถแก้ปัญหาการแท้งของลูกผสมข้ามชนิดได้โดยการนำเอ็มบริโอของลูกผสมในระยะก่อนที่จะเกิดการแท้งมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพที่ปลอดเชื้อ ซึ่งจะทำให้เอ็มบริโอสามารถเกิดการพัฒนาและเจริญเป็นต้นบนอาหารสังเคราะห์ได้ นอกจากนี้ เทคนิคการช่วยชีวิตเอ็มบริโอยังสามารถใช้ในการเพาะเมล็ดที่เอ็มบริโอมีความอ่อนแอตั้งแต่กำเนิดให้งอกเป็นต้นได้ และยังสามารถย่นระยะเวลาในการทำการปรับปรุงพันธุ์ได้โดยใช้แก้ปัญหาการพักตัวของเมล็ดในพืชบางชนิด (Pierik, 1987; Sharma *et al.*, 1996)

โดยปกติการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ นั้น ต้องมีการแยกเอาส่วนของเอ็มบริโอที่งอกออกมาจากเมล็ด ซึ่งในกรณีที่เอ็มบริโอมีขนาดเล็กจะทำให้เกิดปัญหาในการแยกเอาส่วนเอ็มบริโอออกมาเพาะเลี้ยง เช่น ทำให้เอ็มบริโอเกิดความบอบช้ำจนไม่สามารถพัฒนาบนอาหารเพาะเลี้ยงได้หรืออาจทำให้เกิดบาดแผลจนทำให้เอ็มบริโอเสียหายและตายไป หรือมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้มากขึ้นทำให้ไม่ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ อย่างไรก็ตาม การช่วยชีวิตเอ็มบริโอของลูกผสมข้ามชนิดโดยหลีกเลี่ยงการทำให้เกิดความเสียหายหรืออันตรายต่อเอ็มบริโอ สามารถทำได้โดยการเพาะเลี้ยงอวูล (ovule culture) หรือการเพาะเลี้ยงรังไข่ (ovary culture) ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและมีโอกาสในการสร้างความเสียหายแก่เอ็มบริโอน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอโดยตรง

การเพาะเลี้ยงอวูลนั้น เป็นการแยกเอาอวูลออกมาจากฝักอ่อนที่มีการพัฒนาไปแล้วระยะหนึ่งมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ โดยวิธีนี้จะไม่มีการแยกเอาส่วนของผนังอวูลและเอนโดสเปิร์มออก ซึ่งเอนโดสเปิร์มที่มีอยู่นั้นจะมีส่วนช่วยในการพัฒนาของเอ็มบริโอและป้องกัน

อันตรายให้แก่เอ็มบริโอ (Pierik, 1987) การช่วยชีวิตเอ็มบริโอโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงอูตนั้น มีรายงานความสำเร็จในพืชหลายชนิด ได้แก่ การช่วยชีวิตเอ็มบริโอลูกผสมจากการผสมข้ามชนิด ในพืชตระกูลกะหล่ำ (Siemens, 2002) ลิลลี่ (Chi, 2000) ข้าวสาลี (Kumlehn *et al.*, 1997) และ ถั่ว ลูกไก่ (Mallikarjuna, 1999)

ส่วนการเพาะเลี้ยงรังไข่ เป็นการนำรังไข่จากดอกที่ผ่านการผสมเกสรเพียงไม่กี่วันมา เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เนื่องจากถ้าหากปล่อยให้รังไข่มีอายุหลังผสมเกสรนานขึ้น จะเกิดการหลุดร่วงของดอกภายในเวลาอันรวดเร็วเนื่องจากการแท้งของเอ็มบริโอ (Buitendijk *et al.*, 1995) ซึ่งเป็นผลมาจากความต้านทานทางพันธุกรรม (Pierik, 1987; Sharma *et al.*, 1996) ซึ่งถ้าการเพาะเลี้ยงรังไข่ประสบความสำเร็จ ออวูลที่อยู่ภายในจะเกิดการพัฒนานั้นจะต้องทำการแยกเอา ออวูลที่พัฒนาออกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์อีกทีเพื่อให้เกิดการงอกขึ้นมา แต่ในบางพืชอาจเกิดการงอกเป็นต้นขึ้นมาภายในรังไข่เลย ซึ่งต้องทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารอีกทีเช่นกัน (Pierik, 1987; Sharma *et al.*, 1996)

5. ปัจจัยที่มีผลต่อการประสบความสำเร็จในการช่วยชีวิตเอ็มบริโอ

การช่วยชีวิตเอ็มบริโอมีปัจจัยที่ส่งผลต่อการประสบความสำเร็จดังนี้

1. ระยะการพัฒนของเอ็มบริโอหรืออายุของออวูลหลังการผสมเกสร โดยมีรายงานว่า เอ็มบริโอที่มีการพัฒนาไม่ถึงระยะ heart stage เมื่อถูกนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ จะทำให้โอกาสที่เอ็มบริโอสามารถพัฒนาเป็นต้นได้นั้นลดลงมากเมื่อเทียบกับเอ็มบริโอ ที่มีการพัฒนาถึงหรือเลยระยะ heart stage ไปแล้ว (Pellegrineschi *et al.*, 1997; Pierik, 1987; Sharma *et al.*, 1996)

2. ส่วนประกอบของอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ โดยมีส่วนประกอบที่ จำเป็นคือ ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง น้ำตาล และสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช โดยส่วนใหญ่ในการช่วยชีวิตเอ็มบริโอ นิยมใช้อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS) และ Gamberg's B5 (Bridgen, 1994; Pellegrineschi *et al.*, 1997; Pierik, 1987)

น้ำตาลและเคซีนไฮโดรไลเซตในอาหารสังเคราะห์ Sharma *et al.* (1996) รายงานว่า ใน การช่วยชีวิตเอ็มบริโอนั้น น้ำตาลและเคซีนไฮโดรไลเซต (casein hydrolysate) ในอาหารสังเคราะห์

มีความสำคัญมาก ซึ่งทำให้เกิดการคั่งอาหารต่าง ๆ จากอาหารสังเคราะห์เข้าไปสู่เอ็มบริโอได้ดีขึ้น และเป็นการป้องกันไม่ให้เอ็มบริโอเกิดการเจริญเป็นต้นโดยที่ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ เนื่องจากคั่งที่ได้จากการพัฒนาของเอ็มบริโอที่ไม่สมบูรณ์นั้นจะมีความอ่อนแอมาก (Sharma *et al.*, 1996) นอกจากนั้นน้ำตาลยังเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญให้กับพืช โดยเป็นแหล่งของคาร์บอน (carbon source) ส่วนเคซีนไฮโดรไลเซทมีกรดอะมิโน 18 ชนิดเป็นองค์ประกอบ ซึ่งเป็นแหล่งของไนโตรเจนและใช้กันอย่างกว้างขวางในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอและพบว่า กรดอะมิโนในเคซีนไฮโดรไลเซทโดยเฉพาะกลูตามีน มีประสิทธิภาพสูงมากสำหรับการพัฒนาของเอ็มบริโออ่อน (Pierik, 1987)

สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช ในการช่วยชีวิตเอ็มบริโอนั้น สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชมีส่วนช่วยทำให้การช่วยชีวิตเอ็มบริโอมีโอกาสประสบความสำเร็จมากขึ้น โดยออกซินที่ความเข้มข้นต่ำช่วยทำให้เอ็มบริโอมีการพัฒนาที่เป็นปกติและช่วยป้องกันไม่ให้เกิดการสร้างแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ เช่น IAA ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอได้ แต่ออกซินที่ระดับความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการพัฒนาของเอ็มบริโอและส่งเสริมให้เกิดการสร้างแคลลัสขึ้น (Sharma *et al.*, 1996) ส่วนไซโตไคนินช่วยให้เกิดการพัฒนาของใบเลี้ยงและยังกระตุ้นให้เกิดยอดและรากจากเอ็มบริโอ (Pierik, 1987) และเมื่อใช้ออกซินร่วมกับไซโตไคนินจะส่งผลให้มีการกระตุ้นการเจริญของเอ็มบริโอด้วย (Bridgen, 1994)

สารสกัดจากธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าวถูกนำมาใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างแพร่หลายซึ่งในน้ำมะพร้าวจะประกอบด้วย myo-inositol sorbitol auxin cytokinin และ สารประกอบพวกไนโตรเจน ซึ่งส่งผลทำให้การช่วยชีวิตเอ็มบริโอในพืชต่าง ๆ นั้นแตกต่างกัน (Bridgen, 1994; Sharma *et al.*, 1996)

3. สภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง โดยมีปัจจัยสภาพแวดล้อมที่สำคัญคือ แสง และ อุณหภูมิ (Mallikarjuna, 1999) รายงานถึงการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอที่ได้จากการผสมข้ามในสภาพปลอดเชื้อว่า ควรเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ และควรได้รับช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ในบางกรณีควรนำไปเพาะเลี้ยงไว้ในที่มีดินช่วง 1-2 สัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยง เพื่อเลียนแบบสภาพมืดเหมือนที่อยู่ในรังไข่หรือในฝัก หลังจากนั้นจึงนำไปเพาะเลี้ยงในที่ที่มีแสงเพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างคลอโรฟิลล์ (Badami *et al.*, 1997) และการสังเคราะห์แสงเพื่อสร้างอาหารต่อไป

4. ลักษณะจีโนไทป์ (genotype) ของพืชแต่ละชนิด (species) จะมีผลต่อความยากง่ายในการเจริญของเอ็มบริโอในแต่ละสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน (Pierik, 1987)

5. สภาพแวดล้อมที่ต้นแม่เจริญเติบโต พบว่า เอ็มบริโอที่นำมาจากต้นแม่ที่ทำการเพาะเลี้ยงเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่ควบคุมจะเกิดการการพัฒนาที่ดีกว่าเอ็มบริโอที่นำมาจากต้นแม่ที่เจริญเติบโตในแปลงปลูกธรรมชาติ (Pierik, 1987)

6. การช่วยชีวิตเอ็มบริโอลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามชนิด

ผลที่เกิดขึ้นหลังจากการผสมข้ามชนิด (interspecific crossing) และไม่มีอุปสรรคในด้าน pre-fertilization เกิดขึ้นคือ เอ็มบริโอที่เกิดจากการผสมข้ามนี้มักจะมีปัญหาทางพันธุกรรม (genetic barriers) เกิดขึ้นตามมา ซึ่งทำให้ไม่สามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอและเมล็ดที่สมบูรณ์ได้ (Shivanna, 2003) เอ็มบริโอที่เกิดจากการผสมข้ามดังกล่าวสามารถพัฒนาต่อไปจนออกเป็นต้นได้โดยใช้เทคนิคการช่วยชีวิตเอ็มบริโอเข้ามาช่วยดังที่กล่าวข้างต้น โดยเทคนิคนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับกรณีที่เกิดเอ็มบริโอขึ้นมาแล้วแต่เอนโดสเปิร์มมีการพัฒนาที่ผิดปกติ (รังสฤษฎ์, 2539) เทคนิคดังกล่าวทำได้โดยนำเอ็มบริโอในระยะที่เหมาะสมมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพเหลวหรือกึ่งแข็งที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของเอ็มบริโอก่อนที่เอ็มบริโอจะหยุดการพัฒนาหรือตายไป ซึ่งแสดงให้เห็นโดยเกิดการร่วงของฝักอ่อน (Pickersgill, 1993) หรือเกิดการเหี่ยวลีบและฝ่อตายไปของเอ็มบริโอ (Sharma *et al.*, 1996)

อาหารสังเคราะห์ที่นำมาใช้ในการช่วยชีวิตเอ็มบริโอต้องมีส่วนประกอบของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช เกลือแร่ และวิตามินที่จำเป็นและเหมาะสมต่อการเจริญของเอ็มบริโอ เพื่อให้เอ็มบริโอเกิดการพัฒนาต่อไปเป็นต้นและรากที่สมบูรณ์ และบางครั้งต้องเติมสารประกอบอินทรีย์ที่ให้ธาตุไนโตรเจนหรือสารสกัดจากธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าว หรือมอลต์สกัด (malt extract) เพื่อส่งเสริมให้เอ็มบริโอที่ทำการเพาะเลี้ยงมีการพัฒนาเป็นต้นที่ดีขึ้น (Sharma *et al.*, 1996)

Pellegrineschi *et al.* (1997) ได้รายงานผลการศึกษองค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงเอ็มบริโออ่อนที่ยังไม่สมบูรณ์ของ cowpea จากการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนระหว่าง ซูโครส ฟรุคโตส และ กลูโคส พบว่า ฟรุคโตส และ กลูโคส ทำให้จำนวนของเอ็มบริโอที่รอดชีวิตน้อยลง และ ซูโครส ที่ความเข้มข้น 2 และ 3% (w/v) ทำให้จำนวนเอ็มบริโอที่พัฒนาต่อได้มีจำนวนสูงขึ้น และพบว่า การเติมสารเคซีนไฮโดรไลเซต ปริมาณ 0.5 mg/l ในอาหารสังเคราะห์จะ

ช่วยกระตุ้นให้เอ็มบริโอเกิดการพัฒนามาเป็นต้นเพิ่มขึ้น 30-32% โดยการพัฒนาของเอ็มบริโอที่ได้รับ น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 2 และ 3% (w/v) พร้อมกับการเติมเคซินไฮโดรไลเซทมีการรอดชีวิต เป็น 32 และ 35.2% ตามลำดับ

Rashid *et al.* (1987) ได้รายงานผลการศึกษากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอที่ได้จากการผสมข้าม ชนิดระหว่าง *V. radiata* *V. mungo* และ *V. umbellata* โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีส่วนผสมของซูโครส 30 g/l วุ้น 8 g/l IAA 1 mg/l kinetin 0.2 mg/l และ เคซินไฮโดรไลเซท 500 mg/l พบว่า คู่ผสมของ *V. radiata* x *V. mungo* *V. radiata* x *V. umbellata* และ *V. mungo* x *V. umbellata* สามารถเกิดการพัฒนามาเป็นต้นอ่อนลูกผสมจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเท่ากับ 83.3 0 และ 22.7% ตามลำดับ

7. การตรวจสอบความเป็นลูกผสม

ในการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการผสมเกสรนั้น ถึงแม้ว่าจะมีการป้องกันการผสมตัวเองของ พืช โดยการตอนเกสรเพศผู้ขณะที่ดอกยังไม่บานและการคลุมดอกหลังจากการตอนเกสรเพศผู้แล้ว ก็ตาม แต่ยังไม่สามารถยืนยันได้ว่า ต้นที่ได้นั้นเป็นลูกผสมที่ต้องการหรือไม่ เนื่องจากอาจเกิดการ ผสมตัวเองเกิดขึ้นในดอกก่อนหรือขณะที่ทำการตอนเกสรเพศผู้ หรืออาจเกิดการปนเปื้อนของ ละอองเกสรอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการเกิดขึ้น ดังนั้น การตรวจสอบลูกผสมที่ได้มาว่าเป็นลูกผสมที่ ต้องการจริงหรือไม่จึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการปรับปรุงพันธุ์พืช เพื่อป้องกันการนำต้นที่ไม่ใช่ ลูกผสมมาทำการปรับปรุงพันธุ์ในขั้นตอนต่อไป การตรวจสอบหรือคัดเลือกลูกผสมนั้นสามารถทำ ได้หลายวิธี เช่น การปลูกต้นพืชในแปลงเพื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปรากฏของ ลูกผสม (go out test) ลักษณะของโครโมโซมในขณะที่มีการแบ่งเซลล์ เอ็นไซม์หรือโปรตีนที่พืช สร้างขึ้น หรือลักษณะลายพิมพ์ของดีเอ็นเอ ซึ่งการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปรากฏ โปรตีน หรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ในการคัดเลือกลูกผสมเรียกรวมว่าเป็นการคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมาย (marker) (อรรรัตน์, 2548)

เครื่องหมาย (marker) คือ ตัวบ่งชี้ที่มีความจำเพาะเจาะจงในลักษณะต่าง ๆ ของพืชที่เรา ต้องการศึกษ (สุรินทร์, 2545) ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชได้นำเอาเครื่องหมายที่เป็นเครื่อง บ่งชี้ลักษณะทางด้านการเกษตรมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกให้สูงขึ้น โดยเครื่อง หมายที่ใช้สามารถแบ่งได้ 3 ประเภทดังนี้

1. Morphological markers โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นตัวบ่งชี้ คือ ลักษณะโดยทั่วไปที่สามารถสังเกตได้ เช่น ลักษณะความสูงของต้นพืช ลักษณะสีของดอก หรือลักษณะความแตกต่างของใบ เป็นต้น (Rashid *et al.*, 1987)

2. Biochemical markers โดยใช้สารประกอบทางชีวเคมีเป็นตัวระบุความแตกต่าง เช่น การใช้ isozyme หรือ โปรตีนในการจำแนกความแตกต่าง (Lu, 1996)

3. Molecular markers เป็นการใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบความแตกต่างในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ ซึ่งมีความถูกต้องและแม่นยำกว่าเครื่องหมายชนิดอื่น molecular markers ถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชในหลาย ๆ ด้าน เช่น นำมาใช้แยกสายพันธุ์พืช สร้างแผนที่ทางพันธุกรรม เพิ่มประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม และสามารถย่นระยะเวลาในการคัดเลือกได้ (Morell *et al.*, 1995; Tomooka *et al.*, 1996)

นอกจากนี้ การตรวจสอบในระดับของดีเอ็นเอ มีข้อได้เปรียบกว่าการตรวจสอบแบบอื่น ๆ คือ สามารถวิเคราะห์จากชิ้นส่วนของพืชก็ได้ ไม่ขึ้นกับชนิดของเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต สภาพแวดล้อม และสามารถทำการตรวจสอบได้ทุกระยะของการเจริญเติบโต (สุรินทร์, 2543)

8. การตรวจสอบความเป็นลูกผสมในระดับดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RAPD

เทคนิค RAPD เป็นการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA finger print) ซึ่งจัดเป็น molecular marker แบบหนึ่ง (อรรถรัตน์, 2548) โดยการใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) สามารถเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอได้โดยไม่ต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายดังกล่าว และไพรเมอร์ที่ใช้ไม่เจาะจงกับลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณใดบริเวณหนึ่ง (arbitrary primer) ซึ่งอาจเรียกวิธีดังกล่าวนี้ว่า AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction) (Welsh and McClelland, 1990) เทคนิค RAPD สามารถนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของจีโนม (genome) ได้ เพื่อนำไปหาความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ ซึ่งจากความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มจำนวนได้นี้ สามารถนำมาวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการในสิ่งมีชีวิตได้โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มโดยที่ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมที่ตรวจสอบ ไพรเมอร์ที่ใช้มีขนาดสั้นประมาณ 8-10 นิวคลีโอไทด์ ดังนั้นในจีโนมที่ตรวจสอบจึงมีหลายบริเวณที่ไพรเมอร์สามารถเข้าเกาะกับดีเอ็นเอได้ เพื่อให้เอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสใช้เริ่มต้นในการจำลองตัว ผลที่ได้ก็คือ เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะบางส่วนของจีโนมเท่านั้น จากนั้น

นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณไปแยกขนาดบนเจลด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสและย้อมแถบดีเอ็นเอที่แยกแล้วด้วยเอซีเดียมโบรไมด์ เมื่อนำไปส่องภายใต้แสง UV จะปรากฏแถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้นบนแผ่นเจล ดังนั้นจึงสามารถตรวจสอบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอจากตำแหน่งที่ปรากฏว่ามีตำแหน่งที่เหมือนกันหรือต่างกัน ซึ่งในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันหรือสายพันธุ์เดียวกันย่อมต้องมีแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเป็นรูปแบบเดียวกัน เทคนิคนี้สามารถใช้ตรวจสอบความแตกต่างได้ในแบคทีเรีย โปรโตซัว เห็ดรา แมลง พืช สัตว์ รวมทั้งมนุษย์ ต่อมาจึงได้มีการนำมาใช้ตรวจสอบพันธุ์พืชกันอย่างกว้างขวาง (Caetano *et al.*, 1991)

โดยทั่วไปโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของ RAPD มักเกิดขึ้นในลักษณะของการเกิดหรือไม่เกิดแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ ซึ่งความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้จาก RAPD ที่เกิดขึ้นในแต่ละตัวอย่างเกิดได้จากหลายสาเหตุ ส่วนการไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอหรือการที่มีแถบดีเอ็นเอที่เปลี่ยนแปลงไป อาจเกิดจากการที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดใหญ่มาสอดแทรกอยู่ระหว่างตำแหน่ง 2 ตำแหน่งที่ไพรเมอร์เกาะ (duplication) ทำให้ไพรเมอร์ทั้งสองโมเลกุลอยู่ห่างกันเกินกว่าที่จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จึงไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ หรืออาจเกิดจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็นที่เกาะกับไพรเมอร์หายไปหนึ่งตำแหน่งหรือทั้งสองตำแหน่งหรือเกิดการแทนที่หรือเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบริเวณที่เป็นที่เกาะของไพรเมอร์หรืออาจมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กสอดแทรกเข้ามาหรือหายไป ทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้นได้ ดังนั้นเมื่อทำปฏิกิริยา PCR จึงไม่เกิดการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าว และเมื่อนำ PCR product มาแยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสจึงไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอแถบเดิมปรากฏให้เห็น (สุรินทร์, 2545)

แม้ว่าเทคนิค RAPD จะทำได้ง่าย รวดเร็ว และให้ข้อมูลได้มาก แต่ก็มีข้อเสียในเรื่องการทดลองซ้ำ ซึ่งบางครั้งให้ผลที่ต่างจากเดิม เนื่องจากเทคนิค RAPD มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะต่าง ๆ จึงต้องควบคุมวิธีการและสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ให้คงที่ อย่างไรก็ตาม แถบดีเอ็นเอที่เกิดจาก RAPD จะแสดงการข่ม (dominance) คือ แสดงผลเฉพาะการปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แต่ไม่สามารถบอกได้ว่า แถบที่ปรากฏนั้นเป็น homozygous หรือ heterozygous ทำให้ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์แบบ homozygous และ heterozygous ได้ (สุรินทร์, 2543) เทคนิค RAPD ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพืชจากแหล่งรวบรวมพันธุ์ โดยความแตกต่างที่เกิดขึ้นนี้สามารถนำมาบอกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในพืชชนิดเดียวกันที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยได้และเป็นวิธีที่ง่ายต่อการตรวจสอบจีโนมพืชทั้งจีโนม (Tomooka *et al.*, 1996)

9. การเพิ่มจำนวนต้นถั่วเขียวในสภาพปลอดเชื้อ

ความสำเร็จในการเพิ่มจำนวนต้นถั่วเขียวในสภาพปลอดเชื้อขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ อาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช พันธุกรรมของพืช (genotype) ขนาดและอายุของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง (Anju and Jaiwal, 1994; Renato and Kazumi, 1999) นอกจากนั้น สภาพการเพาะเลี้ยงเช่น แสง และ อุณหภูมิ ก็เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการประสบความสำเร็จในการเพิ่มจำนวนในสภาพปลอดเชื้อ

สูตรอาหารสังเคราะห์ที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตระกูลถั่ว ได้แก่ อาหารสังเคราะห์สูตร MS MS basal medium + B5 vitamin และอาหารสังเคราะห์สูตร B5 (สุมนา, 2540; Anju and Jaiwal, 1992; Anju and Jaiwal, 1994; Renato and Kazumi, 1999)

สุมนา (2540) ชักนำชิ้นส่วนปลายยอดของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิด ระหว่าง *V. radiata* *V. mungo* และ *V. umbellata* ให้เกิดรากที่สมบูรณ์ก่อนนำไปย้ายปลูกโดยใช้อาหารสังเคราะห์สูตร B5 + IBA 2 mg/l พบว่า สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดี

Anju and Jaiwal (1992) เพาะเลี้ยงปลายยอดของถั่วเขียวบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS basal medium + B5 vitamin สามารถชักนำส่วนของปลายยอดให้พัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ โดยอัตราการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยงมีความสัมพันธ์กับพันธุกรรม (genotype) ของพืช ขนาดของชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง และสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช ส่วนการชักนำให้เกิดยอดหลายยอดจากชิ้นส่วนปลายยอดประสบความสำเร็จเมื่อใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS basal medium + B5 vitamin + BA 1.125 mg/l โดยสามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุด 9 ยอดต่อ 1 ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง และยอดใหม่ที่ได้สามารถกระตุ้นให้เกิดรากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS และ MS + IBA 0.2 mg/l

Anju and Jaiwal (1994) ชักนำชิ้นส่วนถั่วเขียวให้มียอดหลายยอดจาก cotyledonary node บนอาหารสังเคราะห์สูตร B5 + BA 0.1125 mg/l โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน cotyledonary node ที่มีอายุ 4 วัน พบว่า เกิดยอดใหม่จาก cotyledonary node จำนวน 5-6 ยอดต่อ 1 ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง ภายใน 2 สัปดาห์หลังการเพาะเลี้ยง

10. การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม

ในการผสมพันธุ์พืชข้ามชนิดนั้น ต้นลูกผสม F_1 ที่ได้มักจะเป็นหมัน ไม่สามารถผสมเกสร เพื่อผลิตเมล็ดรุ่นถัดไปได้ เพราะโครโมโซมที่ได้จากต้นพ่อและต้นแม่นั้นต่างชุดกัน ทำให้การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของลูกผสม F_1 มีความผิดปกติ เนื่องจากโครโมโซมไม่สามารถเข้าคู่กันได้ (กฤษฎา, 2546; Chen *et al.*, 1982; Rashid *et al.*, 1987) ซึ่งโครโมโซมจากพืชแต่ละชนิดที่มาอยู่รวมกันในกลุ่มผสมนั้นมีความแตกต่างกัน ทั้งขนาด รูปร่าง และชนิดของยีนที่แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อเซลล์แบ่งตัวแบบไมโอซิสเพื่อสร้างหน่วยสืบพันธุ์ โครโมโซมเหล่านี้จะไม่เข้าคู่กัน และการเคลื่อนที่เข้าสู่ขั้วเซลล์เป็นแบบสุ่ม ทำให้เซลล์สืบพันธุ์มีจำนวนโครโมโซมที่ผิดปกติซึ่งจะส่งผลทำให้ไม่สามารถทำงานได้ แต่ถ้ามีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของต้น F_1 จาก diploid เป็น tetraploid จะทำให้แต่ละโครโมโซมมีโอกาสมีคู่ของมันเอง เมื่อมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส จึงมีโอกาสจับคู่อย่างปกติได้ (ไพศาล, 2539)

การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมนั้นสามารถทำได้โดยการให้สารละลายโคลชิซิน (colchicine) กับบริเวณเนื้อเยื่อเจริญ เช่น เมล็ดที่กำลังงอก ต้นอ่อน และตา (bud) เป็นต้น เมื่อใช้สารละลายนี้ที่ความเข้มข้นประมาณ 0.1 ถึง 0.5% (w/v) จะทำให้โครโมโซมในชิ้นส่วนเหล่านั้นมีโอกาสเพิ่มขึ้นเป็นเท่าตัวทั้งชุดโครโมโซม เพราะสารนี้ไปยับยั้งการสร้างสาย spindle fiber ที่เป็นส่วนสำคัญในการแยกโครโมโซมที่เข้าคู่กันออกจากกันในช่วงตอนของกระบวนการแบ่งเซลล์ (สุทัศน์, 2539) โดยสารโคลชิซินจะไปรวมตัวกับองค์ประกอบที่เป็นโปรตีนของไมโครทิวบูล (microtubule) ภายในเซลล์ ทำให้ไมโครทิวบูลไม่สามารถต่อกันเป็นเส้นใยสปินเดิลเพื่อที่จะดึงโครโมโซมให้ออกจากกันในช่วงระยะ metaphase ถึง anaphase ดังนั้นการแบ่งเซลล์ในช่วงตอนต่อไปของวงจรเซลล์ (cell cycle) คือ การแบ่งไซโทพลาสซึมและการสร้างผนังเซลล์เพื่อแบ่งเซลล์ออกเป็นสองเซลล์จึงไม่เกิดขึ้น ทำให้ได้เซลล์ที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นอีกเท่าตัวและเมื่อเซลล์นั้นเข้าสู่เซลล์ไซเคิลในรอบต่อไปและสารโคลชิซินที่เหลือมีปริมาณน้อยจนไม่สามารถขัดขวางการสร้างไมโครทิวบูลได้ จะทำให้เซลล์สามารถกลับมาแบ่งเซลล์ได้ตามปกติ (Geoffrey, 2000) แต่ถ้าสารโคลชิซินยังเหลืออยู่ในเซลล์เป็นจำนวนมากจะทำให้เกิดการยับยั้งการแบ่งเซลล์นั้นต่อไป ถ้าการยับยั้งการแบ่งเซลล์นั้นเกิดขึ้นนานเกินไปจนเซลล์และเนื้อเยื่อนั้นไม่สามารถทนต่อความผิดปกตินี้ได้จะทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อนั้นตาย (Ghaemi *et al.*, 1994)

การใช้สารโคลชิซินเพื่อเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมในพืชนั้น นิยมใช้อยู่ 2 วิธี คือ การให้สารโคลชิซินโดยตรง โดยหยดสารละลายโคลชิซินลงบนเนื้อเยื่อเจริญของพืช เช่น บริเวณตา

หรือยอดอ่อนของพืช (ปาริชาติ, 2540) หรือการใช้สารโคลชิซินร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการผสมสารละลายโคลชิซินในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมลงบนอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สารละลายโคลชิซินนั้นสามารถผสมลงในอาหารสังเคราะห์ก่อนการฆ่าเชื้อโดยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ หรืออาจใช้วิธีการกรองเชื้อออกจากสารละลายโคลชิซินแล้วจึงเติมลงไปในการอาหารสังเคราะห์ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วในสภาพปลอดเชื้อ (Gmitter *et al.*, 1991) ซึ่งการใช้สารโคลชิซินในการเพิ่มจำนวนโครโมโซมมีรายงานดังนี้

Chen and Kallemeyn (1979) ได้ทำการศึกษาการกระตุ้นการเกิด polyploid ของแคลลัสของลิ้นจี่ โดยเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี 2,4-D 1 mg/l และ kinetin 1 mg/l และใส่สารละลายโคลชิซินลงในอาหารสังเคราะห์ โดยมีความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0 0.1 0.2 และ 0.4% (w/v) และนำแคลลัสที่ผ่านการ sub culture มาแล้ว 7 วัน มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ดังกล่าว โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกลับด้านของก้อนแคลลัสแล้วเพาะเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 7 วัน แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องบนอาหารที่ไม่มีสารละลายโคลชิซิน จากการทดลองเลี้ยงทั้งหมด 57 ดัน ได้ดันที่เป็น tetraploid ทั้งหมด 29 ดัน โดยใน 29 ดันนี้มี 16 ดันที่เกิดจากการใช้สารละลายโคลชิซินที่เข้มข้น 0.2% (w/v) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทำให้เกิด tetraploid มากที่สุด

Gmitter *et al.* (1991) ศึกษาผลของสารละลายโคลชิซินในการชักนำให้เกิด polyploid ในส้มพันธุ์ Hamlin และ Ridge Pineapple โดยนำเอ็มบริโอจากเมล็ดที่สมบูรณ์มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมมอลต์สกัด 500 mg/l เป็นเวลา 4-6 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรที่เติมมอลต์สกัด 500 mg/l ร่วมกับสารละลายโคลชิซิน 0.01 และ 0.1% (w/v) เป็นเวลา 4 ถึง 12 สัปดาห์ พบว่า ส้มพันธุ์ Hamlin ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีสารละลายโคลชิซิน 0.1% (w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เกิดดัน tetraploid สูงสุด 51.8%

Kadota and Niimi (2002) รายงานการใช้สารละลายโคลชิซินกับแพร์ญี่ปุ่น (*Pyrus pyrifolia*) โดยใช้สารโคลชิซินผสมลงในอาหารสังเคราะห์ที่ชักนำให้เกิดยอด (shoot proliferation medium) โดยใช้ความเข้มข้น 0.01 และ 0.1% (w/v) โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีสารละลายโคลชิซินเป็นองค์ประกอบ เป็นเวลา 1 2 4 และ 8 วัน ตามลำดับ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่ 0.01% (w/v) ที่ผสมลงในอาหารสังเคราะห์เพาะเลี้ยงและทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ทำให้เกิดดันที่เป็น tetraploid 5 ดัน จากทั้งหมด 26 ดัน

Rey *et al.* (2001) รายงานการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของ *Ilex paraguariensis* ร่วมกับการใช้สารละลายโคลชิซินเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม โดยทำการแยกเอ็มบริโอออกจากเมล็ดอ่อนและทำการเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีชูโครส 3% (w/v) วุ้น 0.65% (w/v) และ zeatin 0.46 μ M และมีสารละลายโคลชิซินเป็นองค์ประกอบ 0.1 0.2 และ 0.5% (w/v) โดยทำการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอบนอาหารสังเคราะห์ที่มีส่วนผสมของสารละลายโคลชิซินเป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ในที่มืดที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เมื่อเอ็มบริโอพัฒนาเป็นต้นแล้วย้ายมาเลี้ยงที่มีแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ผลการทดลองได้ต้นทั้งหมด 152 ต้น ซึ่งเกิดต้นที่เป็น tetraploid ทั้งหมด 2 ต้น

ปาริชาติ (2540) ได้ทำการศึกษาการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของถั่วเขียว เพื่อแก้ปัญหาการผสมข้ามชนิดไม่ติดระหว่างถั่วเขียวที่มีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน โดยทดลองใช้สารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0 0.1 0.2 และ 0.3% (w/v) กับต้นกล้าถั่วเขียวที่มีอายุประมาณ 4 วัน โดยใช้สารละลายโคลชิซินหยดลงบนลำต้นที่หุ้มยอดอ่อนไว้ โดยหยด 4 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 2 วัน และป้องกันการระเหยของสารละลายโคลชิซินโดยใช้ร่มกระดาษกางคลุมต้นกล้า พบว่า การให้สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.2 และ 0.3% (w/v) ทำให้ต้นถั่วเขียวมีโครโมโซมเป็น tetraploid และต้นถั่วเขียวที่เป็น tetraploid มีลักษณะภายนอกแตกต่างจากถั่วปกติ คือ ใบมีลักษณะหึงงอ มีสีเขียวเข้ม หนาและอวบมากกว่าต้น diploid

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัสดุและอุปกรณ์ในการปลูกพืช

- 1.1 เมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวผิวมัน (*Vigna radiata*) พันธุ์ “กำแพงแสน 2”
- 1.2 เมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวผิวดำ (*Vigna mungo*) พันธุ์ “พิษณุโลก 2”
- 1.3 เมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงนางแดง (*Vigna umbellata*) พันธุ์ “Miyazaki”
- 1.4 สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยเคมี

2. วัสดุและอุปกรณ์ในการผสมเกสร

- 2.1 ปากคีบ
- 2.2 ป้ายชื่อ
- 2.3 แอลกอฮอล์ 70%
- 2.4 ถุงกระดาษ ใช้คลุมดอกหลังการ emasculation

3. วัสดุและอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- 3.1 ตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- 3.2 ปากคีบ
- 3.3 มีดผ่าตัด
- 3.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.5 จานแก้วและกระดาษชำระ

4. สารเคมี

- 4.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับการเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS) และสูตร Gamborg B-5 media (B5) (ตารางผนวกที่ 1 และ 2)

4.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับการเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร Breebaker and Kwack (1963) (100 mg/l H_3BO_3 , 300 mg/l $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 200 mg/l $MgSO_4$ และ 100 mg/l KNO_3)

4.3 สารเคมีที่ใช้ในการปรับค่า กรด-เบส ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 และ 1 N และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 และ 1 N

4.4 สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช ได้แก่ BA IBA IAA (indole-3-acetic acid) และ kinetin

4.5 สารเคมีสำหรับฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ Haiter® (สารออกฤทธิ์ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ ความเข้มข้น 6.6% w/w) ที่ความเข้มข้น 20% (v/v)

4.6 สารเคมีสำหรับการสกัด DNA (ตารางผนวกที่ 4)

4.7 สารเคมีสำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR (ตารางผนวกที่ 5)

4.8 สารโคลชิซินสำหรับการเพิ่มจำนวนโครโมโซมต้นถั่วลูกผสม F_1

4.9 สารเคมีสำหรับการตรวจสอบดีเอ็นเอ (kit solution) ด้วยเครื่อง Flow Cytometer (บริษัท Partec, Munster, Germany)

5. เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหารสังเคราะห์

5.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 2 3 และ 4 ตำแหน่ง

5.2 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง

5.3 ขวดแก้วพร้อมฝา ปีกเกอร์ กระบอกตวง และ บีเปด

5.4 หม้อนึ่งความดันไอ

6. เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสม

6.1 เครื่อง PCR (Perkin Elmer รุ่น Gene Amp PCR system 2400)

6.2 เครื่อง Gel document (บริษัท Vilber lour Mat รุ่น TCX. 20.M)

6.3 เครื่อง Electrophoresis (บริษัท Gelmate 2000)

6.4 เครื่อง Centrifuge (บริษัท Hettich zentrifugen รุ่น EBR 12 R)

7. เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมโดยวิธี Flow cytometry

7.1 เครื่อง flow cytometer (บริษัท Partec รุ่น CyStain UV Precise P)

7.2 จานแก้วและกระดวยชำระ

7.3 หลอดแก้วสำหรับเครื่อง flow cytometer (บริษัท Partec รุ่น CyStain UV Precise P)

7.4 ไขมีดโกน

7.5 หลอดหยดสาร

7.6 ปีเปต ขนาด 1000 ไมโครลิตร

8. สถานที่ทำการทดลอง

8.1 ห้องปฏิบัติการ Plant Tissue Culture and Transformation ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม

8.2 แปลงทดลองศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาการผสมพันธุ์พืชข้ามชนิดระหว่างถั่วเขียวผิวมัน (*V. radiata*) ถั่วเขียวผิวดำ (*V. mungo*) และ ถั่วเขียวนางแดง (*V. umbellata*)

ทำการผสมข้ามชนิดระหว่าง *V. radiata* x *V. mungo* *V. radiata* x *V. umbellata* และ *V. mungo* x *V. umbellata* และทำการผสมกลับ (reciprocals) ทุกคู่ผสมเพื่อศึกษาการผสมติดฝัก (pod set) และการติดเมล็ด (seed set) ทำการเตรียมต้นพ่อพันธุ์และต้นแม่พันธุ์ โดยปลูกถั่วเขียวผิวมัน (*V. radiata*) “กำแพงแสน 2” ถั่วเขียวผิวดำ (*V. mungo*) “พิษณุโลก 2” และ ถั่วเขียวนางแดง (*V. umbellata*) “Miyazaki” ในแปลงปลูกขนาด 1 x 5 เมตร โดยปลูก 2 แถวต่อ 1 แปลง และปลูกเป็นรุ่น แต่ละรุ่นห่างกัน 1 สัปดาห์ เพื่อเว้นช่วงให้สามารถผสมเกสรได้พอดี ก่อนการผสมข้ามต้องมีการตอนเกสรเพศผู้ (emasculation) เพื่อป้องกันการผสมตัวเอง โดยเลือกดอกที่คาดว่าจะบานในเช้าวันรุ่งขึ้น มีลักษณะกลีบดอกเต่งตึงและอับละอองเกสร (anther) ยังไม่แตก เมื่อเลือกดอกได้แล้ว จับบริเวณของฐานดอกเบา ๆ ใช้ปากคีบค่อย ๆ กรีดตามแนวยาวของกลีบดอกจากด้านล่างขึ้นไปยังปลายดอก จากนั้นใช้ปากคีบค่อย ๆ คัดกลีบดอกจนถึงชั้นในสุดจะพบอับละอองเกสร 10 อัน และยอดเกสรเพศเมีย (stigma) ใช้ปากคีบดึงก้านชูเกสรเพศผู้ (filament) ทั้ง 10 ก้านพร้อมอับละอองเกสรออกให้หมด ระวังไม่ให้อับละอองเกสรแตก และอย่าให้ยอดเกสรเพศเมียและก้านชูเกสรเพศเมียถูกกระทบกระเทือนหรือหัก เพราะจะทำให้ผสมเกสรไม่สำเร็จและทำให้ดอกร่วงได้ง่าย เวลาที่เหมาะสมในการตอนเกสรเพศผู้อยู่ในช่วง 16:00-18:00 น. จากนั้นใช้ปากคีบดึงดอกที่ไม่ต้องการทิ้ง และหลังจากการตอนเกสรเพศผู้เสร็จแต่ละดอก ควรจุ่มปากคีบในแอลกอฮอล์ 70% ก่อนที่จะทำการตอนดอกอื่นต่อไป และทำการคลุมดอกที่ผ่านการตอนเกสรเพศผู้แล้วด้วยถุงกระดาษเพื่อป้องกันการผสมข้าม จากนั้นทำการผสมข้ามในช่วง 7:00-10:00 น. ของวันรุ่งขึ้น โดยนำละอองเกสรเพศผู้ (pollen grain) ของต้นที่ต้องการใช้เป็นต้นพ่อมาแตะลงบนยอดเกสรเพศเมีย (stigma) บนดอกของต้นแม่ที่ทำการตอนเกสรเพศผู้ไว้แล้ว บันทึกจำนวนดอกที่ทำการผสม จำนวนดอกที่ผสมติดฝัก และลักษณะของฝักและเมล็ดที่ได้จากการผสมข้ามชนิด

2. การช่วยชีวิตเอ็มบริโอลูกผสมข้ามชนิดระหว่างถั่วเขียวผิวมัน (*V. radiata*) ถั่วเขียวผิวดำ (*V. mungo*) และถั่วเขียวนางแดง (*V. umbellata*)

ศึกษาการช่วยชีวิตเอ็มบริโอที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของกลุ่มผสม ถั่วเขียวผิวมัน (*V. radiata*) “กำแพงแสน 2” x ถั่วเขียวผิวดำ (*V. mungo*) “พิษณุโลก 2” ถั่วเขียวผิวมัน (*V. radiata*) “กำแพงแสน 2” x ถั่วเขียวนางแดง (*V. umbellata*) “Miyazaki” และ ถั่วเขียวผิวดำ (*V. mungo*) “พิษณุโลก 2” x ถั่วเขียวนางแดง (*V. umbellata*) “Miyazaki” และการผสมสลับ (reciprocals) ทุกคู่ ผสม ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงอวูล (ovule culture) โดยศึกษาผลของอายุของอวูลหลังการผสมเกสรที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 6 8 10 12 และ 14 วันหลังผสมเกสร ที่มีผลต่อการชักนำให้เอ็มบริโอเกิดการงอกและพัฒนาเป็นต้นบนอาหารสังเคราะห์ เมื่ออวูลที่เกิดจากการผสมข้ามมีอายุครบตามที่กำหนด นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม kinetin 0.2 mg/l IAA 0.1 mg/l และ casein hydrolysate 500 mg/l (Rashid *et al.*, 1987) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ทำซ้ำทั้งหมด 4 ซ้ำ ซ้ำละ 20 อวูล บันทึกจำนวนของอวูลที่มีการงอกและพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ที่มีทั้งใบและราก

วิธีการเพาะเลี้ยงอวูล เริ่มจากเก็บฝักที่มีอายุตามที่กำหนด นำมาล้างด้วยน้ำสบู่ 1 ครั้ง และฟอกฆ่าเชื้อในสารละลาย Haiter® ความเข้มข้น 20% (v/v) (สารออกฤทธิ์ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ ความเข้มข้น 6.6% w/w) ที่เตรียมด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำการฟอกฆ่าเชื้อเป็นเวลา 10 นาที ในสภาพปลอดเชื้อ และล้างด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที จากนั้นแยกเอาส่วนของอวูลออกจากฝัก โดยใช้มีดตัดบริเวณโคน funiculus ด้านที่ติดกับอวูล พยายามไม่ให้เกิดความเสียหายกับอวูลโดยเด็ดขาด จากนั้นย้ายอวูลมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรข้างต้นในสภาพปลอดเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 7 วัน และย้ายออกมาเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 55 $\mu\text{mole/m}^2/\text{s}$ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน และมี 8 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3. การศึกษาวิธีการตรวจสอบต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *V. radiata* *V. mungo* และ *V. umbellata* โดยใช้เทคนิค RAPD

3.1 การคัดเลือกโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD ที่สามารถแยกความแตกต่างของถั่วที่ใช้เป็นต้นพ่อและต้นแม่

ศึกษาวิธีการตรวจสอบความแตกต่างระหว่าง *V. radiata* *V. mungo* และ *V. umbellata* โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD โดยคัดเลือกไพรเมอร์ RAPD ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างถั่วทั้ง 3 ชนิด และทำการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Ida *et al.* (2004) เริ่มจากตัดใบจริงคู่แรกที่มีอายุ 1 สัปดาห์ของต้นถั่วที่ใช้เป็นพ่อและแม่จำนวน 1 ใบ นำมาใส่ในไนโตรเจนเหลวบดให้ละเอียดและตัดใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml เติม extraction buffer (2% (w/v) CTAB, 20 mM EDTA, 2% (v/v) 2- mercaptoethanol, 1.4 mM NaCl₂, 2% (w/v) PVP และ 100 mM Tris-HCl ค่า pH 8.0) ปริมาตร 600 μ l และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 5 M KAC ปริมาตร 300 μ l และแช่ไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ระดับความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ย้ายสารละลายส่วนใสใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ และเติมสารละลาย chloroform : isoamyl (อัตราส่วน 24 : 1) ปริมาตร 500 μ l เขย่าเบา ๆ บนโรเตอร์ เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ย้ายสารละลายส่วนใสลงในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ และเติม ethanol ความเข้มข้น 95% (v/v) ปริมาตร 700 μ l เขย่าเบา ๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้งและล้างตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย ethanol ความเข้มข้น 70% (v/v) ปริมาตร 700 μ l โดยวิธีการทำเหมือนขั้นตอนของการเติม ethanol ความเข้มข้น 95% (v/v) ทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นผึ่งดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 20 μ l จากนั้นตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้ 1 μ l ผสมกับ dye (0.25% bromophenol blue, 30% glycerol) ปริมาตร 9 μ l หยอดลงในหลุมของ agarose gel ความเข้มข้น 0.8% เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 20 50 100 และ 200 ng/ μ l ผ่านสนามไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ ใน 0.5x TBE buffer เป็นเวลา 20 นาที แล้วย้อม agarose gel ด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วยน้ำสะอาดอีก 10 นาที จากนั้นตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel Document (บริษัท Vilber lour Mat รุ่น TCX. 20.M) ประมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดโดยเทียบกับความเข้มข้นของ

แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จนกระทั่งมีความเข้มข้นประมาณ 20 ng/μl แล้วจึงนำไปทำปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) ทั้งในการทดลองหาไพรเมอร์ RAPD และการตรวจสอบความเป็นลูกผสม

ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ RAPD จำนวน 40 ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียว (ตารางผนวกที่ 3) เพื่อตรวจสอบหาไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นพ่อและต้นแม่ได้ โดยใช้ปฏิกิริยา PCR โดยมีปริมาตรของ reaction mixed (1x buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 μM dNTP, 0.2 μM ไพรเมอร์, 1.25 unit *Taq* DNA polymerase และ 1.2x BSA) เท่ากับ 25 μl ต่อ 1 ปฏิกิริยา นำ reaction mixed เข้าเครื่อง PCR ของ Perkin Elmer รุ่น Gene Amp PCR system 2400 โดยใช้อุณหภูมิในการ denature รอบแรกที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย 35 รอบของการ denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นใช้อุณหภูมิในการทำไพรเมอร์ annealing ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และไพรเมอร์ elongation ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยการทำ extend elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ทำการแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสใน agarose gel ความเข้มข้น 1.5% (w/v) ที่เตรียมด้วย 1x TBE buffer ด้วยเครื่อง electrophoresis (Gelmate 2000) ผ่านกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 V นาน 50 นาที และย้อม agarose gel ด้วย ethidium bromide (ETBR) แล้วถ่ายภาพแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel Document (บริษัท Vilber Lour Mat รุ่น TCX. 20.M) ทำการบันทึกผล คัดเลือกไพรเมอร์ที่แสดงความแตกต่าง (morphism) ของแถบดีเอ็นเอระหว่างต้นพ่อและต้นแม่ที่ชัดเจน (ถั่วเขียวผิวมัน ถั่วเขียวผิวดำ และถั่วเขียวนางแดง) และบันทึกจำนวนแถบดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ของแต่ละไพรเมอร์ เพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกต้นลูกผสมข้ามชนิดที่ได้จากการช่วยชีวิตต่อไป

3.2 การศึกษาการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอโดยวิธีการเพาะเลี้ยงอวูล์ที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. mungo* *V. radiata* x *V. umbellata* *V. mungo* x *V. umbellata* ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD

ศึกษาวิธีการตรวจสอบความเป็นลูกผสมโดยใช้เทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ (จากการทดลองที่ 3.1) โดยตัดใบจริงคู่แรกที่มีอายุ 1 สัปดาห์จากต้นถั่วที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอทุกต้นมาต้นละ 1 ใบ นำไปสกัดดีเอ็นเอ และปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้นประมาณ 20 ng/μl จากนั้นนำไปตรวจสอบความเป็นลูกผสมโดยนำไปทำปฏิกิริยา PCR กับไพรเมอร์ RAPD ที่ได้จากการคัดเลือกตามวิธีการในการทดลอง

ที่ 3.1 โดยใช้ ladder 100 bp plus เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐานบอกขนาดชิ้นดีเอ็นเอ ทำการบันทึกผล เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏระหว่างต้นที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอกับแถบดีเอ็นเอของ *V. radiata* *V. mungo* และ *V. umbellata* เพื่อตรวจสอบความเป็นลูกผสม

4. การศึกษาวิธีการเพิ่มจำนวนต้นอ้วกลูกผสมข้ามชนิดในสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นอ้วที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอวูลที่ตรวจสอบแล้วว่าเป็นลูกผสมจากทุกคู่ผสมที่สามารถช่วยชีวิตได้ มาศึกษาวิธีการเพิ่มจำนวนให้ได้มากขึ้น โดยวิธีการ sub culture โดยตัดชิ้นส่วนของลำต้นให้มีขนาดยาว 1 เซนติเมตร ให้มีส่วนของตายอดหรือตาข้างอยู่ในชิ้นส่วนที่ตัดด้วย จากนั้นนำชิ้นส่วนของพืชไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS basal medium + vitamin B5 ที่เติม BA 0.1 0.2 และ 0.3 mg/l วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ทำซ้ำทั้งหมด 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ชิ้นส่วน บันทึกจำนวนต้นอ้วที่สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ (adventitious shoot) จากนั้นย้ายต้นอ้วลูกผสมที่เกิดยอดใหม่ไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร B5 + IBA 2 mg/l (สุมนา, 2540) เพื่อชักนำให้เกิดราก ทำการเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง $55 \mu\text{mole/m}^2/\text{s}$ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน และมี 8 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บันทึกจำนวนต้นอ้วที่สามารถชักนำให้เกิดราก เมื่อส่วนยอด (adventitious shoot) ของต้นอ้วลูกผสมเกิดรากจนสมบูรณ์แล้ว จึงนำไปย้ายปลูกต่อไป

5. การศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสรของอ้วลูกผสมข้ามชนิด

เตรียมต้นอ้วลูกผสมข้ามชนิดเพื่อย้ายปลูกสำหรับการทดสอบความมีชีวิตของละอองเกสร โดยคลายฟางวดเพาะเลี้ยงต้นอ้วที่พร้อมสำหรับการย้ายปลูกเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนย้ายปลูก ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และแสง $55 \mu\text{mole/m}^2/\text{s}$ เมื่อครบ 1 สัปดาห์ นำต้นอ้วออกจากขวดเพาะเลี้ยงและล้างวุ้นที่ติดอยู่บริเวณรากให้สะอาด นำไปแช่น้ำยากันรา (ซีเบนดาซิม 35 ความเข้มข้น 10% w/w) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นย้ายปลูกต้นอ้วลูกผสมลงในกระถางขนาด 3 นิ้ว โดยใช้ทรายและขุยมะพร้าวที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วผสมกันในอัตราส่วน 1 : 1 เป็นวัสดุปลูก เมื่อย้ายปลูกต้นอ้วลูกผสมแล้วคลุมกระถางและต้นอ้วด้วยถุงพลาสติกใสขนาด 8x15 นิ้ว นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มแสง $55 \mu\text{mole/m}^2/\text{s}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นเปิดถุงพลาสติกออกครึ่งหนึ่งของที่ปิดไว้เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นเปิดถุงพลาสติกและเพาะเลี้ยงต่อในสภาพเดิมจนครบ 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำต้นอ้วลูกผสมมาเพาะเลี้ยงในดินผสม (สูตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) ภายใต้ที่ร่มเงาเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นย้ายปลูกต้นอ้วลูกผสมข้ามชนิดในกระถางทดลองและเพาะเลี้ยงในสภาพธรรมชาติ

ทดสอบความมีชีวิตของละอองเกสรของต้นถั่วลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* โดยวิธีการทดสอบความงอกของละอองเกสร (pollen germination test) โดยใช้ hanging drop technique โดยเฉพาะเลี้ยงละอองเกสรของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดบนอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ทดสอบความงอกของละอองเกสรสูตร Brewbaker and Kwack (1963) ($100 \text{ mg/l H}_3\text{BO}_3$, $300 \text{ mg/l Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 200 mg/l MgSO_4 และ 100 mg/l KNO_3) ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 15% (w/v) ทำการเพาะเลี้ยงโดยเก็บละอองเกสรที่เวลา 8:00 9:00 10:00 11:00 และ 12:00 น. วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำ 3 ซ้ำ ซึ่งดำเนินการดังนี้ หยดอาหารสังเคราะห์สูตร Brewbaker and Kwack (1963) ลงบน cover slip จากนั้นเขียนละอองเกสรที่ต้องการทดสอบปริมาณเล็กน้อยลงบนอาหาร เกลี่ยให้กระจายโดยไม่ทำให้หยดอาหารแตกและหยดน้ำสะอาดลงบริเวณมุมทั้ง 4 ของ cover slip แล้วจึงวางสไลด์คลุมปิดลงบน cover slip ให้ตำแหน่งของหยดอาหารตรงกับบริเวณตรงกลางหลุมและหยดอาหารไม่แตะโดนแผ่นสไลด์ จากนั้นพลิกสไลด์กลับและเก็บสไลด์ไว้ในกล่องที่มีกระดาษทิชชูที่อ้อมตัวด้วยน้ำรองอยู่ที่ก้นกล่อง ตรวจสอบการงอกของละอองเกสรภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก ๆ 2 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง หลังเริ่มทดสอบ โดยละอองเกสรที่ถือว่ามีชีวิต (viable pollen grain) คือ ละอองเกสรที่สามารถงอกหลอดละอองเกสรยาวเกินหรือน้อยกว่าเท่ากับเส้นผ่านศูนย์กลางของละอองเกสรนั้น ๆ และต้องไม่เป็นละอองเกสรที่เหี่ยวแห้งหรือแตก สุ่มนับ 5 microscopic fields ต่อ 1 slide ทำ 1 slide ต่อซ้ำ บันทึกจำนวนละอองเกสรที่มีชีวิตที่เกิดการงอกบนอาหารสังเคราะห์

6. การศึกษาการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของถั่วลูกผสมข้ามชนิด

6.1 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่เหมาะสมเมื่อหยดลงบนยอดต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดในสภาพปลอดเชื้อ

ศึกษาความเข้มข้นของสาร โคลชิซินที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นในต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดที่ได้จากการช่วยชีวิตของ *V. radiata* x *V. umbellata* โดยใช้วิธีหยดสารละลายโคลชิซินลงบนยอดอ่อนของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร B5 โดยตรงในสภาพปลอดเชื้อ ทำการหยดสารละลายโคลชิซินที่ผ่านการกรองเชื้อแล้วที่บริเวณเนื้อเยื่อเจริญของปลายยอดของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดที่ความเข้มข้น 0 0.1 0.2 และ 0.3% (w/v) โดยหยดสารละลายโคลชิซินแต่ละความเข้มข้นจำนวน 5 ครั้งต่อวัน ครั้งละ 1 หยด ตั้งแต่วันที่ 8:00-12:00 น. เป็นเวลา 2 วัน ใช้ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิด จำนวน 20 ต้นต่อ 1 ความเข้มข้น สารละลายโคลชิซินที่ใช้ทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองสารละลาย ด้วย sterilized filter ขนาด $0.2 \mu\text{m}$

ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ และต้นลูกผสมข้ามชนิดที่ใช้หอยศรละลายโคลชิซินเป็นต้นที่ผ่านการ sub culture เป็นเวลา 2 อาทิตย์ หลังจากหอยศรละลายโคลชิซินครบตามกำหนดแล้ว นำต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ สูตร B5 ให้ได้รับแสง $55\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บันทึกลักษณะของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดที่ปรากฏหลังจากหอยศรละลายโคลชิซิน ได้แก่ ลักษณะของใบและลำต้น จากนั้นนำต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดที่ได้รับการหอยศรละลายโคลชิซินไปตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนโครโมโซมด้วยเครื่อง Flow Cytometer บริษัท Partec รุ่น CyStain UV preciseP (Gu *et al.*, 2005)

การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมหลังจากหอยศรละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยเครื่อง Flow Cytometer ของบริษัท Partec รุ่น Partec CyStain UV precise P โดยใช้ตัวอย่างใบที่แตกออกมาจากยอดที่ถูกหอยศรละลายโคลชิซิน โดยใช้ใบที่มีอายุ 1 สัปดาห์ โดยตัดใบให้มีขนาด 1 cm^2 วางบนจานพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 55 mm จากนั้นเติม extraction buffer (kit solution) 500 μl และใช้ใบมีดโกนตัดใบตัวอย่างให้มีขนาดประมาณ 1 mm^2 แช่ชิ้นส่วนของใบให้อยู่ใน extraction buffer เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นกรองผ่าน filter ขนาด 50 μm ลงในหลอดแก้วสำหรับเครื่อง Flow Cytometer และเติม staining buffer (kit solution) 1 ml ลงในหลอดแก้ว ตั้งหลอดแก้วทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นติดตั้งหลอดแก้วที่มีตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบเข้ากับ blue fluorescence channel ของเครื่อง Flow Cytometer แล้วตรวจสอบผลด้วยเครื่อง Flow Cytometer บันทึกการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดโครโมโซมและจำนวนต้นถั่วที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นจาก 2x เป็น 4x

6.2 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่เหมาะสมเมื่อเติมลงในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการ sub culture ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิด

ทำการ sub culture ส่วนลำต้นที่มีตาข้างของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* ลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร B5 ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช แต่เติมสารละลายโคลชิซินที่มีความเข้มข้น 0 0.01 0.05 และ 0.1% (w/v) เพื่อชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิด โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในสภาพปลอดเชื้อ จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร B5 ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในสภาพปลอดเชื้อ ทำการเพาะเลี้ยง 20 ชิ้นตัวอย่างต่อหนึ่งความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน หลังจากขึ้นส่วนของพืชมีการแตกยอดใหม่เป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำใบที่ได้ขึ้นไปทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมโดยเครื่อง Flow Cytometer ตามวิธีการในข้อ 6.1

การเตรียมอาหารสังเคราะห์ที่เติมสารละลายโคลชิซินที่ใช้ในการทดลอง เตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร B5 ใส่ในขวดขนาด 1000 ml แต่ละขวดใส่อาหารปริมาตร 500 ml สำหรับผสมกับสารละลายโคลชิซินแต่ละความเข้มข้น จากนั้นกรองสารละลายโคลชิซินด้วย sterilized filter ขนาด 0.2 μm ภายใต้อากาศปลอดเชื้อ จากนั้นเติมสารละลายโคลชิซินแต่ละความเข้มข้นลงในอาหารสังเคราะห์สูตร B5 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและยังเป็นของเหลวอยู่ ผสมอาหารและสารละลายโคลชิซินให้เข้ากันก่อนเทลงในขวดที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ผลการทดลอง

1. การศึกษาการผสมพันธุ์พืชข้ามชนิดระหว่างถั่วเขียวผิวมัน (*V. radiata*) ถั่วเขียวผิวดำ (*V. mungo*) และ ถั่วนี้้วนางแดง (*V. umbellata*)

การผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* กับ *V. mungo* พบว่า เมื่อทำการผสมเกสรโดยใช้ *V. radiata* เป็นต้นแม่ให้เปอร์เซ็นต์การผสมติดฝัก 43% (ตารางที่ 4) โดยมีการพัฒนาของฝักอ่อนในช่วงหลังการผสมเกสรจนถึงวันที่ 10 หลังการผสมเกสร เป็นปกติเหมือนกับฝักที่เกิดจากการผสมตัวเอง แต่หลังจากวันที่ 10 เป็นต้นไป พบว่า บางฝักมีการแตกของฝักเกิดขึ้นและเมื่อฝักที่ได้จากการผสมข้ามพัฒนาจนกระทั่งแก่ขึ้น มีขนาดเล็ก ล้วนและมีลักษณะหงิกงอ (ภาพที่ 1) ส่วนเมล็ดจากฝักที่ได้รับการผสมข้ามมีการพัฒนาที่ปกติจนกระทั่งวันที่ 12 หลังการผสมเกสร จึงพบว่า เมล็ดบางส่วนเกิดการบิดงอของเปลือกหุ้มเมล็ดและเมล็ดเริ่มมีลักษณะนิ่มและยุบ ส่วนเมล็ดที่ได้จากฝักแก่ พบว่า เปลือกหุ้มเมล็ดมีสีเขียว ลักษณะ ย่น ลีบ และเมล็ดมีขนาดเล็ก (ภาพที่ 2) เมื่อนำเมล็ดมาเพาะในแปลงทดลอง พบว่า เมล็ดที่ได้จากการผสมข้ามไม่สามารถงอกได้ ส่วนการใช้ *V. mungo* เป็นต้นแม่นั้น พบว่า มีอัตราการผสมติดฝัก 7.5% ฝักที่เกิดจากการผสมมีขนาดเล็ก เมล็ดมีสีเขียว ขนาดเล็กและลีบ และไม่สามารถงอกได้ในสภาพแปลง

การผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* กับ *V. umbellata* พบว่า เมื่อใช้ *V. radiata* เป็นต้นแม่ มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดฝัก 26.2% (ตารางที่ 4) การพัฒนาของฝักที่ได้รับการผสมข้าม ในช่วงแรกจะพัฒนาอย่างปกติ แต่จะเริ่มเกิดการเหี่ยวยุบของฝักหลังจากวันที่ 10 หลังการผสมเกสร เมื่อฝักแก่ที่ได้จากการผสมข้ามแก่ พบว่า ทุกฝักมีลักษณะหงิกงอและมีขนาดเล็ก ส่วนเมล็ดที่ได้นั้นมีสีเขียวเข้ม ขนาดเล็กมาก และลีบ (ภาพที่ 3) เมื่อนำเมล็ดที่ได้ไปเพาะในแปลงทดลองพบว่า เมล็ดดังกล่าวไม่สามารถงอกได้ ส่วนการผสมโดยใช้ *V. umbellata* เป็นต้นแม่นั้น ไม่สามารถผสมติดฝักได้ โดยดอกที่ได้รับการผสมจะเกิดการร่วงภายใน 1-2 วันหลังการผสมเกสร

การผสมข้ามชนิดของ *V. mungo* กับ *V. umbellata* พบว่า เมื่อผสมเกสรโดยใช้ *V. mungo* เป็นต้นแม่ ให้เปอร์เซ็นต์การผสมติดฝัก 19.04% (ตารางที่ 4) โดยฝักแก่ที่ได้จากการผสมมีขนาดเล็ก ส่วนเมล็ดถูกผสมมีสีดำ บางเมล็ดมีขนาดเล็กและลีบ (ภาพที่ 4) และพบฝักลมเกิดขึ้นด้วย เมื่อนำเมล็ดไปเพาะในสภาพแปลง พบว่า ไม่สามารถงอกได้ ส่วนการใช้ *V. umbellata* เป็นต้นแม่ ไม่สามารถผสมติดฝักได้ โดยดอกที่ทำการผสมจะร่วงภายใน 1-2 วันหลังการผสมเกสร

ตารางที่ 4 การติดฝักที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* *V. mungo* และ *V. umbellata*

คู่ผสม	จำนวนดอกที่ผสม	จำนวนฝักที่ผสมติด
<i>V. radiata</i> x <i>V. mungo</i>	552	248 (43%)
<i>V. mungo</i> x <i>V. radiata</i>	40	3 (7.5%)
<i>V. radiata</i> x <i>V. umbellata</i>	574	162 (26.2%)
<i>V. umbellata</i> x <i>V. radiata</i>	74	0
<i>V. mungo</i> x <i>V. umbellata</i>	1,234	235 (19.04%)
<i>V. umbellata</i> x <i>V. mungo</i>	30	0



ภาพที่ 1 ฝักถั่วที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. mungo*



ภาพที่ 2 เมล็ดถั่ว *V. radiata* “กำแพงแสน 2” (ก) *V. mungo* “พิจนุโลก 2” (ค) และเมล็ด F_1 ที่ได้จากการผสมข้ามชนิด (ข)



ภาพที่ 3 เมล็ดถั่ว *V. radiata* “กำแพงแสน 2” (ก) *V. umbellata* “Miyazaki” (ค) และเมล็ด F_1 ที่ได้จากการผสมข้ามชนิด (ข)



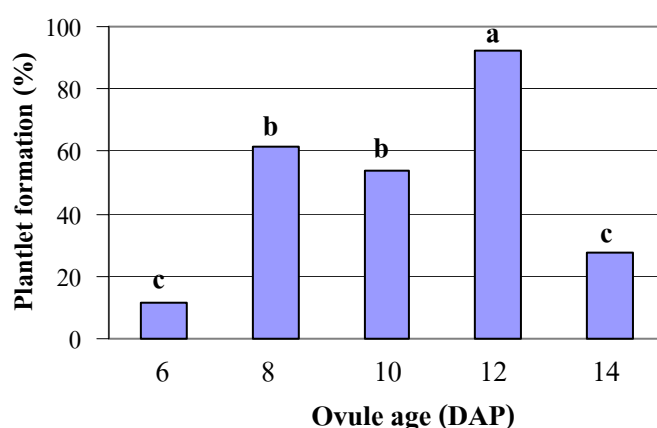
ภาพที่ 4 เมล็ดถั่ว *V. mungo* “พิษณุโลก 2” (ก) *V. umbellata* “Miyazaki” (ค) และเมล็ด F_1 ที่ได้จากการผสมข้ามชนิด (ข)

2. การช่วยชีวิตเอ็มบริโอลูกผสมข้ามชนิดระหว่างถั่วเขียวผิวมัน (*V. radiata*) ถั่วเขียวผิวดำ (*V. mungo*) และถั่วเขียวนางแดง (*V. umbellata*)

หลังจากการผสมข้ามชนิดระหว่างถั่วทั้ง 3 ชนิดนี้แล้ว จึงเก็บฝักอ่อนของถั่วแต่ละคู่ผสม ที่อายุ 6 8 10 12 และ 14 วันหลังผสมเกสร มาช่วยชีวิตเอ็มบริโอด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงออรูในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า

การช่วยชีวิตเอ็มบริโอที่เกิดจากการผสมข้ามของ *V. radiata* กับ *V. mungo* โดยใช้ *V. radiata* เป็นต้นแม่ พบว่า อายุของออรูลหลังการผสมเกสรข้ามชนิดที่ต่างกัน มีผลทำให้ออรูลที่เกิดจากการผสมข้ามมีอัตราการงอกและพัฒนาไปเป็นต้นในระดับที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ภาพที่ 5) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการงอกและการพัฒนาเป็นต้นของ

ออวูล์ที่ได้จากการผสมข้าม พบว่า ค่าเฉลี่ยของการงอกเป็นต้นสามารถแบ่งออกได้ 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 เป็นออวูล์ที่เก็บจากฝักที่มีอายุ 12 วันหลังการผสม ซึ่งมีการงอกเป็นต้นได้ 18.5 ต้น (92.5%) กลุ่มที่ 2 เป็นออวูล์ที่เก็บจากฝักที่มีอายุ 8 และ 10 วันหลังการผสม มีการงอกเป็นต้นรองลงมา เท่ากับ 12.2 ต้น (61.0%) และ 10.75 ต้น (53.75%) ตามลำดับ และกลุ่มที่ 3 เป็นออวูล์ที่เก็บจากฝักที่มีอายุ 14 และ 6 วันหลังการผสม ซึ่งมีการงอกเป็นต้นเพียง 5.5 ต้น (27.5%) และ 2.25 ต้น (11.25%) ตามลำดับ (ตารางที่ 5)



ภาพที่ 5 การงอกเป็นต้นจากการเพาะเลี้ยงออวูล์ที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. mungo* ที่มีอายุต่าง ๆ กัน

ต้นอ่อนที่งอกจากออวูล์ที่ได้จากการผสมข้ามของ *V. radiata* x *V. mungo* ในสภาพปลอดเชื้อ (ภาพที่ 6) มีสีของส่วน hypocotyl เป็นสีม่วงเหมือนกับ *V. mungo* ซึ่งการแสดงออกของสีม่วงของ hypocotyl นั้น พบว่า บางต้นมีสีม่วงปรากฏตั้งแต่แรก แต่บางต้นสีของ hypocotyl เป็นสีเขียวในตอนเริ่มต้น แล้วจึงเปลี่ยนเป็นสีม่วงในภายหลัง และพบว่า ต้นอ่อนที่ได้นั้นมีการพัฒนาของระบบรากเพียงเล็กน้อยบนอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เพาะเลี้ยง โดยรากที่ได้นั้นมีส่วนของแคลลัสเกิดขึ้นด้วย ส่วนการใช้ *V. mungo* เป็นต้นแม่ พบว่า ออวูล์ที่ได้ไม่สามารถงอกเป็นต้นอ่อนได้เลยบนอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

ตารางที่ 5 การงอกเป็นต้นของอวูลที่เกิดจากการผสมข้ามของ *V. radiata* x *V. mungo* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เป็นเวลา 30 วัน

อายุของอวูล (วันหลังผสมเกสร)	จำนวนอวูลที่งอกเป็นต้น	เปอร์เซ็นต์การงอกเป็นต้น (%)
6	2.25 c	11.25
8	12.25 b	61.25
10	10.75 b	53.75
12	18.5 a	92.5
14	5.5 c	27.5
F-test	**	

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ตามการวิเคราะห์แบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%



ภาพที่ 6 ต้นอวูลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอวูลของกลุ่มผสม *V. radiata* x *V. mungo*

ส่วนอวูลที่ได้จากการผสมข้ามชนิดของ *V. mungo* x *V. radiata* มีอัตราการผสมติดฝักต่ำมาก จึงไม่สามารถทำการทดลองได้ครบตามแผนการทดลองที่วางไว้ อย่างไรก็ตามจากการเพาะเลี้ยงอวูลที่ได้จากการผสมข้ามชนิดคู่นี้ ที่เก็บจากฝักที่มีอายุ 6 8 10 12 และ 14 วันหลังการผสมพบว่า อวูลจากทุกอายุไม่สามารถงอกเป็นต้นได้เลย

การเพาะเลี้ยงอวูลที่เกิดจากการผสมข้ามชนิด *V. radiata* x *V. umbellata* ที่มีอายุแตกต่างกัน ให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 6) โดยพบว่า อวูลที่มีอายุ 12 วันหลัง

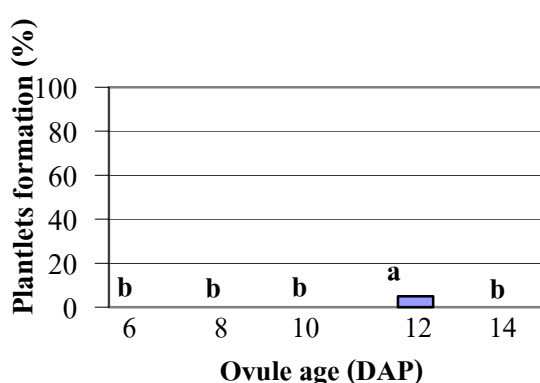
การผสม สามารถออกเป็นต้นได้ 4 ต้น จาก 80 ออวูล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์คิดเป็น 5% (ภาพที่ 7) ส่วนออวูล์ที่มีอายุ 6 8 10 และ 14 วันหลังการผสม พบว่า ไม่สามารถออกเป็นต้นได้เลย

ต้นอ่อนที่งอกจากออวูล์ที่ได้จากการผสมข้าม *V. radiata* x *V. umbellata* มีลักษณะเหมือน ชีดทั้งต้นและมีอัตราการเจริญเติบโตช้าบนอาหารสังเคราะห์ (ภาพที่ 8)

ตารางที่ 6 การงอกเป็นต้นของออวูล์ที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* ที่ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เป็นเวลา 30 วัน

อายุของออวูล์ (วันหลังผสมเกสร)	จำนวนออวูล์ที่งอกเป็นต้น	เปอร์เซ็นต์การงอกเป็นต้น (%)
6	0 b	0
8	0 b	0
10	0 b	0
12	4 a	5
14	0 b	0
F-test	**	

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ตาม การวิเคราะห์แบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%



ภาพที่ 7 การงอกเป็นต้นจากการเพาะเลี้ยงออวูล์ที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* ที่มีอายุต่าง ๆ กัน



ภาพที่ 8 ต้นถั่วที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอวูลของคู่ผสม *V. radiata* x *V. umbellata*

ส่วนการผสมข้ามชนิดของ *V. umbellata* x *V. radiata* พบว่า การผสมข้ามชนิดของคู่ผสมนี้ไม่เกิดการติดฝัก โดยฝักเกิดการหลุดร่วงหลังจากผสมภายใน 1-2 วัน จึงไม่สามารถทำการทดลองการเพาะเลี้ยงอวูล และการทดลองในขั้นต่อไปได้

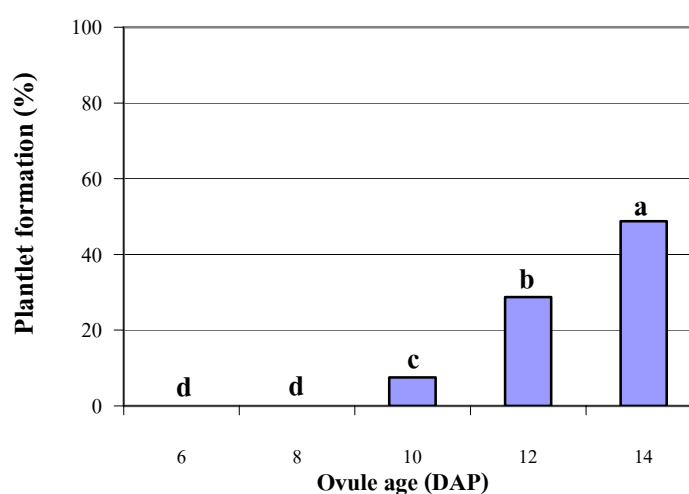
จากนั้นได้ทำการทดลองเพิ่มเติมโดยเปรียบเทียบสูตรอาหารสังเคราะห์ในการเพาะเลี้ยงอวูลของลูกผสมนี้ โดยใช้อาหารสังเคราะห์ 3 สูตรคือ MS MS + vitamin B5 และ MS + vitamin B5 + BA 1 mg/l โดยใช้อวูลที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่าง *V. radiata* x *V. umbellata* จำนวน 40 อวูล ต่อ 1 สูตรอาหาร พบว่า ไม่เกิดการงอกบนอาหารสูตรเหล่านี้เช่นกัน

ส่วนการเพาะเลี้ยงอวูลที่เกิดจากการผสมข้ามของ *V. mungo* x *V. umbellata* ที่มีอายุต่าง ๆ กัน พบว่า อวูลที่ได้จากการผสมข้ามที่มีอายุแตกต่างกัน มีการงอกเป็นต้นอ่อนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 7) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการงอกเป็นต้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้ กลุ่มที่ 1 คือ อวูลที่เก็บจากฝักที่มีอายุ 14 วันหลังการผสม มีการงอกและพัฒนาเป็นต้นบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อสูงสุด เท่ากับ 9.75 ต้น (48.75%) กลุ่มที่ 2 คือ อวูลที่เก็บจากฝักที่มีอายุ 12 วันหลังการผสม มีการงอกและพัฒนาเป็นต้นรองลงมาเท่ากับ 5.75 ต้น (28.75%) และกลุ่มที่ 3 คือ อวูลที่เก็บจากฝักที่มีอายุ 10 วันหลังการผสม มีการงอกและพัฒนาเป็นต้น เท่ากับ 1.5 ต้น (7.5%) ส่วนอวูลที่อายุ 8 และ 6 วันหลังการผสมเกสร ไม่สามารถงอกเป็นต้นได้เลย (ภาพที่ 9) ต้นอ่อนที่งอกบนอาหารสังเคราะห์มีรูปแบบการงอกแบบ epigeal ลำต้นมีสีม่วงและมีขนาดเล็ก ส่วนใบเลี้ยงมีขนาดเล็ก และ ระบบรากมีการพัฒนาเพียงเล็กน้อยบนอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เพาะเลี้ยง (ภาพที่ 10)

ตารางที่ 7 การงอกเป็นต้นของอวูล์ที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ *V. mungo* x *V. umbellata* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เป็นเวลา 30 วัน

อายุของอวูล์ (วันหลังผสมเกสร)	จำนวนอวูล์ที่งอกเป็นต้น	เปอร์เซ็นต์การงอกเป็นต้น (%)
6	0 d	0
8	0 d	0
10	1.5 c	7.5
12	5.75 b	28.75
14	9.75 a	48.75
F-test	**	

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ตามการวิเคราะห์แบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%



ภาพที่ 9 การงอกเป็นต้นจากการเพาะเลี้ยงอวูล์ที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ *V. mungo* x *V. umbellata* ที่มีอายุต่าง ๆ กัน



ภาพที่ 10 ต้นถั่วที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอวูลของคู่ผสม *V. mungo* x *V. umbellata*

ส่วนการเพาะเลี้ยงอวูลที่ได้จากการผสมข้ามชนิดของ *V. umbellata* x *V. mungo* นั้นไม่สามารถทำได้ เนื่องจากคู่ผสมนี้ไม่สามารถผสมติดฝัก ดังนั้น คู่ผสมนี้จึงไม่สามารถทำการทดลองการเพาะเลี้ยงอวูลและการทดลองในขั้นต่อไปได้

จากการทดลองนี้สามารถบอกได้ว่ามีเพียงอวูลที่ได้จากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. mungo* *V. radiata* x *V. umbellata* และ *V. mungo* x *V. umbellata* เท่านั้นที่ประสบความสำเร็จในการช่วยชีวิตเอ็มบริโอด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงอวูล ส่วนคู่ผสม *V. umbellata* x *V. radiata* และ *V. umbellata* x *V. mungo* ไม่สามารถทำการทดลองช่วยชีวิตเอ็มบริโอได้ เนื่องจากการผสมข้ามของถั่วทั้งสองคู่ผสมนี้ไม่สามารถผสมติดฝักได้

3. การศึกษาวิธีการตรวจสอบต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *V. radiata* *V. mungo* และ *V. umbellata* โดยใช้เทคนิค RAPD

3.1 การคัดเลือกโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD ที่สามารถแยกความแตกต่างของถั่วที่ใช้เป็นต้นพ่อและต้นแม่

จากการคัดเลือกไพรมเมอร์ RAPD จำนวน 40 ไพรมเมอร์ (ตารางผนวกที่ 3) ที่ใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์ถั่ว พบว่า มี 9 ไพรมเมอร์ ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *V. radiata* *V. mungo* และ *V. umbellata* ได้ คือ ไพรมเมอร์ A02 A03 A04 A07 A10 A13 A15 A18 และ Ax17 (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ไพรมเมอร์ RAPD ที่สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่าง *V. radiata*
V. mungo และ *V. umbellata*

ไพรมเมอร์	ลำดับเบส	จำนวนแถบดีเอ็นเอ ที่ปรากฏทั้งหมดจาก ถั่วทั้ง 3 ชนิด	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ แสดงความแตกต่าง
A02	TGCCGAGCTG	12	10 (83.3%)
A03	AGTCAGCCAC	19	11 (57.8%)
A04	AATCGGGCTG	10	6 (60%)
A07	GAAACGGGTG	8	6 (75%)
A10	GTGATCGCAG	7	5 (71.4%)
A13	CAGCACCCAC	13	8 (61.5%)
A15	TTCCGAACCC	6	5 (83.3%)
A18	AGGTGACCGT	10	9 (90%)
Ax17	TGGGCTCTGG	10	10 (100%)

โดยไพรมเมอร์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในทุกทั้งสามชนิดได้ดีที่สุดคือ Ax17 เนื่องจากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการตรวจสอบในทุกทั้ง 3 ชนิด มีจำนวน 10 แถบดีเอ็นเอ และทั้ง 10 แถบดีเอ็นเอนั้นเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันทั้งหมด คิดเป็น 100% ถัดมา คือ A18 (90.0%) A15 (83.3%) A02 (83.3%) A07 (75%) A10 (71.4%) A13 (61.5%) A04 (60.0%) และ A03 (57.8%) ตามลำดับ แต่เมื่อทำการทดสอบซ้ำ พบว่า มีเพียงไพรมเมอร์ A02 A03 A07 A13 และ Ax17 ที่ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนเดิม (ตารางที่ 9) ส่วนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรมเมอร์อื่น ๆ มีลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เปลี่ยนไปและส่วนใหญ่เป็นแถบดีเอ็นเอจาง ๆ ไม่ชัดเจน และบางไพรมเมอร์ พบว่า ไม่สามารถแสดงแถบของดีเอ็นเอได้ ดังนั้นจึงเลือกไพรมเมอร์ A02 A03 A07 A13 และ Ax17 มาใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสม โดยไพรมเมอร์ ทั้ง 5 ตัวดังกล่าวนี้ ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (polymorphic) เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง *V. radiata* กับ *V. mungo* *V. radiata* กับ *V. umbellata* และ *V. mungo* กับ *V. umbellata* ได้ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันเมื่อตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ A02 A03 A07 A13 และ Ax17 เปรียบเทียบระหว่าง *V. radiata* กับ *V. mungo* *V. radiata* กับ *V. umbellata* และ *V. mungo* กับ *V. umbellata*

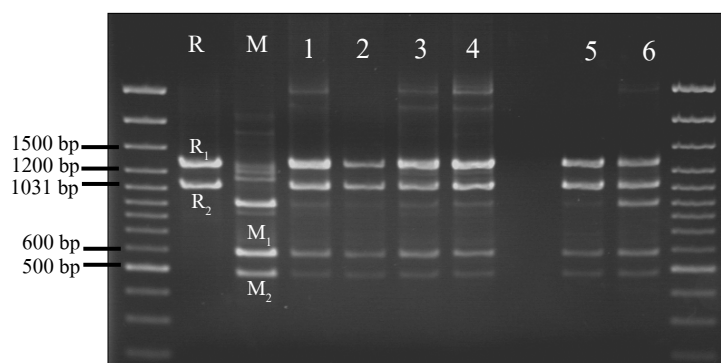
ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างคู่ผสมต่าง ๆ		
	<i>V. radiata</i> กับ <i>V. mungo</i>	<i>V. radiata</i> กับ <i>V. umbellata</i>	<i>V. mungo</i> กับ <i>V. umbellata</i>
A02	7	3	5
A03	7	5	5
A07	3	4	6
A13	4	5	7
Ax17	5	5	6

3.2 การศึกษาการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอโดยวิธีการเพาะเลี้ยงอวูลที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. mungo* *V. radiata* x *V. umbellata* *V. mungo* x *V. umbellata* ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD

จากตารางที่ 9 นำไพรเมอร์ RAPD ที่ได้ไปตรวจสอบความเป็นลูกผสมกับต้นที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอโดยวิธีการเพาะเลี้ยงอวูลที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดระหว่าง *V. radiata* x *V. mungo* *V. radiata* x *V. umbellata* และ *V. mungo* x *V. umbellata* โดยเลือกไพรเมอร์ ที่แยกความแตกต่างได้ชัดเจนที่สุดของแต่ละคู่ผสมไปใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมต่อไป โดยใช้ 2 ไพรเมอร์ ต่อ 1 คู่ผสม

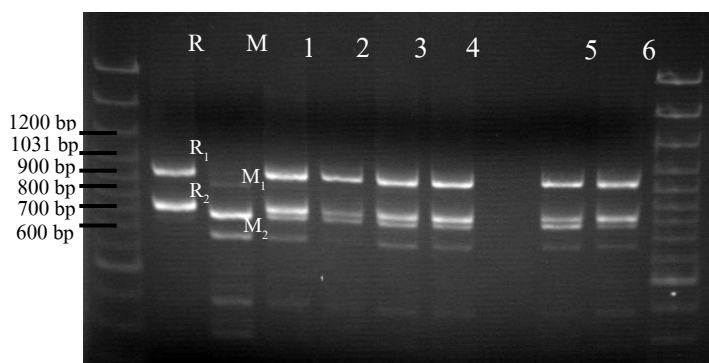
การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอโดยวิธีการเพาะเลี้ยงอวูลที่เกิดจากการผสมข้ามของ *V. radiata* x *V. mungo* เลือกใช้ไพรเมอร์ A02 และ Ax17 เนื่องจากเป็นไพรเมอร์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่าง *V. radiata* กับ *V. mungo* ได้อย่างชัดเจนที่สุด จากการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ดังกล่าวทั้งคู่ พบว่า มีแถบดีเอ็นเอบางส่วนในต้นตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอ (แถวที่ 1-6) ตรงกับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใน *V. radiata* (R) และแถบดีเอ็นเอบางส่วนตรงกับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใน *V. mungo* (M)

ผลการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอของ คู่ผสม *V. radiata* x *V. mungo* โดยการเพาะเลี้ยงอวูล (แถวที่ 1-6) ด้วยไพรเมอร์ A02 (ภาพที่ 11) พบว่า ต้นตัวอย่างปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 1300 bp และ 1120 bp ที่ตรงกับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใน *V. radiata* คือ แถบดีเอ็นเอ R₁ และ R₂ และปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 560 bp และ 470 bp ที่ตรงกับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใน *V. mungo* คือ แถบดีเอ็นเอ M₁ และ M₂



ภาพที่ 11 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเมื่อใช้ไพรเมอร์ A02 ตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอจากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. mungo* (แถวที่ 1-6) เทียบกับแถบดีเอ็นเอของ *V. radiata* (R) และ *V. mungo* (M)

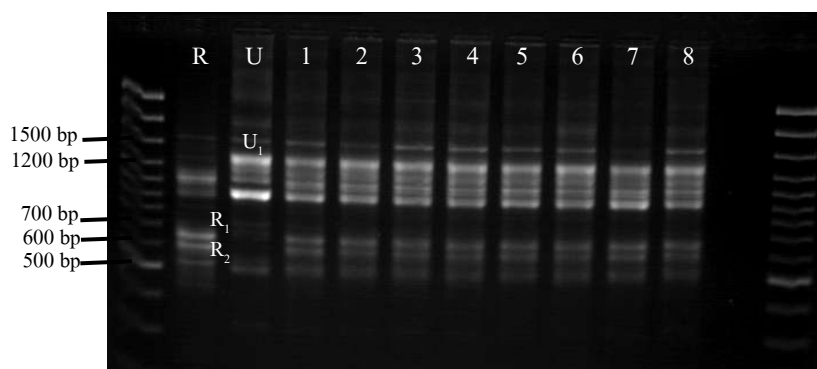
ผลการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอของ คู่ผสม *V. radiata* x *V. mungo* โดยการเพาะเลี้ยงอวูล (แถวที่ 1-6) ด้วยไพรเมอร์ Ax17 (ภาพที่ 12) พบว่า ต้นตัวอย่างปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 1120 bp และ 810 bp ที่ตรงกับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใน *V. radiata* คือ R₁ และ R₂ และปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 760 bp และ 650 bp ที่ตรงกับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใน *V. mungo* คือ M₁ และ M₂



ภาพที่ 12 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเมื่อใช้ไพรเมอร์ Ax17 ตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอจากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. mungo* (แถวที่ 1-6) เทียบกับแถบดีเอ็นเอของ *V. radiata* (R) และ *V. mungo* (M)

การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอโดยวิธีการเพาะเลี้ยงอวูลที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* เลือกใช้ไพรเมอร์ A13 และ Ax17 เนื่องจากเป็นไพรเมอร์ที่แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่าง *V. radiata* กับ *V. umbellata* ได้ชัดเจนที่สุด จากการตรวจสอบ พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในต้นตัวอย่าง (แถวที่ 1-6) นั้นบางแถบดีเอ็นเอตรงกับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใน *V. radiata* และบางแถบดีเอ็นเอตรงกับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใน *V. umbellata*

ผลการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* ด้วยไพรเมอร์ A13 (ภาพที่ 13) พบว่า ต้นตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอวูล (แถวที่ 1-8) ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับ *V. radiata* คือ R₁ และ R₂ ที่มีขนาด 650 bp และ 590 bp และพบแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับแถบดีเอ็นเอของ *V. umbellata* คือ U₁ ที่มีขนาด 1300 bp



ภาพที่ 13 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเมื่อใช้ไพรเมอร์ A13 ตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอจากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* (แถวที่ 1-8) เทียบกับแถบดีเอ็นเอของ *V. radiata* (R) และ *V. umbellata* (U)

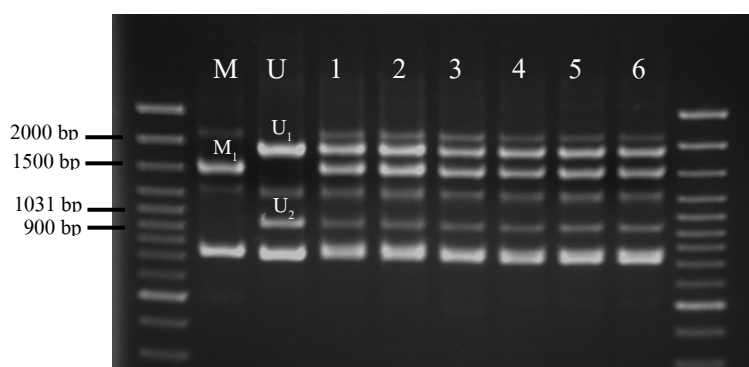
ผลการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอที่เกิดจากผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* ด้วยไพรเมอร์ Ax17 (ภาพที่ 14) พบว่า ต้นตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอโดยการเพาะเลี้ยงอวูล (แถวที่ 1-9) ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดตรงกับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใน *V. radiata* คือ R₁ และ R₂ ซึ่งมีขนาด 1120 bp และ 850 bp และปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดตรงกับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใน *V. umbellata* คือ U₁ U₂ และ U₃ ซึ่งมีขนาด 1110 bp 950 bp และ 450 bp ตามลำดับ



ภาพที่ 14 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเมื่อใช้ไพรเมอร์ Ax17 ตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอจากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* (แถวที่ 1-9) เทียบกับแถบดีเอ็นเอของ *V. radiata* (R) และ *V. umbellata* (U)

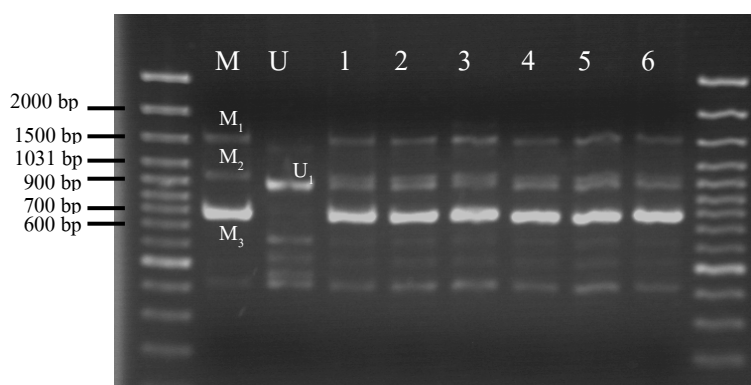
ส่วนการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอโดยการเพาะเลี้ยงอวูลที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ *V. mungo* กับ *V. umbellata* เลือกใช้ไพรเมอร์ A03 และ A07 เนื่องจากเป็นไพรเมอร์ที่แสดงความแตกต่างระหว่าง *V. mungo* กับ *V. umbellata* ได้ชัดเจนที่สุด จากการตรวจสอบพบว่า แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในต้นตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตนั้นมีแถบดีเอ็นเอบางส่วนตรงกับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใน *V. mungo* และบางส่วนตรงกับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใน *V. umbellata*

ผลการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอของ *V. mungo* x *V. umbellata* ด้วยไพรเมอร์ A03 (ภาพที่ 15) พบว่า ต้นตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอโดยการเพาะเลี้ยงอวูล (แถวที่ 1-6) ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดตรงกับ M_1 ที่ปรากฏใน *V. mungo* ที่มีขนาด 1580 bp และปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดตรงกับ U_1 และ U_2 ที่ปรากฏใน *V. umbellata* ซึ่งมีขนาด 1800 bp และ 944 bp ตามลำดับ



ภาพที่ 15 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเมื่อใช้ไพรเมอร์ A03 ตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอของ *V. mungo* x *V. umbellata* (แถวที่ 1-6) เทียบกับแถบดีเอ็นเอของ *V. mungo* (M) และ *V. umbellata* (U)

ผลการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอของ *V. mungo* x *V. umbellata* ด้วยไพรเมอร์ A07 (ภาพที่ 16) พบว่า ต้นตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอโดยการเพาะเลี้ยงอวูล (แถวที่ 1-6) ปรากฏแถบดีเอ็นเอบางส่วนที่มีขนาดตรงกับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใน *V. mungo* คือ M_1 , M_2 และ M_3 ซึ่งมีขนาด 1510 bp, 950 bp และ 680 bp ตามลำดับ และปรากฏแถบดีเอ็นเอบางส่วนจากต้นตัวอย่างที่มีขนาดตรงกับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใน *V. umbellata* คือ U_1 ซึ่งมีขนาด 900 bp



ภาพที่ 16 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเมื่อใช้ไพรเมอร์ A07 ตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอของ *V. mungo* x *V. umbellata* (แถวที่ 1-6) เทียบกับแถบดีเอ็นเอของ *V. mungo* (M) และ *V. umbellata* (U)

4. การศึกษาวิธีการเพิ่มจำนวนต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดในสภาพปลอดเชื้อ

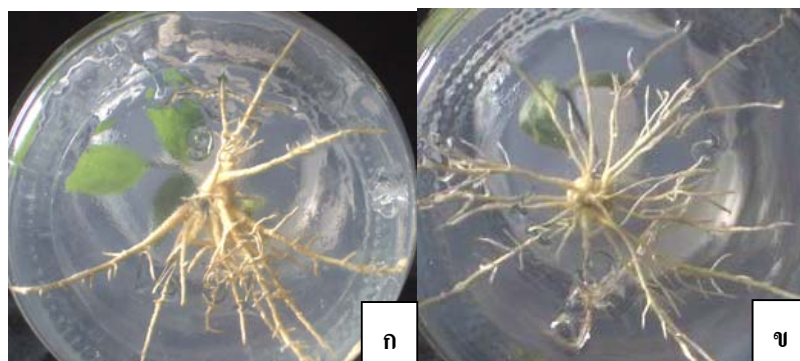
การศึกษการขยายเพิ่มจำนวนต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดที่ได้จากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. mungo* โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนที่ตัดจากต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดที่มีส่วนยอดและชิ้นส่วนที่มีตาข้างบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS basal medium + B5 vitamins ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 1 2 และ 3 mg/l พบว่า ชิ้นส่วนที่ตัดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรดังกล่าวที่เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้เลย โดยชิ้นส่วนที่มียอดของต้นถั่วลูกผสมที่นำไปเพาะเลี้ยงมีการเปลี่ยนแปลงดังนี้ บริเวณรอยตัดของเนื้อเยื่อเกิดการพัฒนาก่อนของ compact callus เกิดขึ้น (ภาพที่ 17) ส่วนบริเวณยอดมีการขยายขนาดของใบอ่อนในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นจะหยุดการขยายขนาดของใบ ส่วนการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่มีตาข้าง พบว่า บริเวณฐานของเนื้อเยื่อมีการพัฒนาเป็น compact callus เกิดขึ้นเช่นกันและแตกยอดใหม่จากส่วนของตา แต่หลังจากนั้นไม่พบว่าการเจริญและพัฒนาของยอดเกิดขึ้น



ภาพที่ 17 ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. mungo* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS basal medium + B5 vitamins ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 mg/l

เนื่องจากการ sub culture ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิด *V. radiata* x *V. mungo* บนอาหารสังเคราะห์สูตรชักนำให้เกิดยอดไม่ประสบความสำเร็จ ดังนั้นจึงนำชิ้นส่วนที่มีตายอดของต้นถั่วลูกผสมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอวูลมาชักนำให้เกิดรากบนอาหารสังเคราะห์สูตร B5 + IBA 2 mg/l ทำการเพาะเลี้ยงทั้งหมด 40 ชิ้น พบว่า อาหารสูตรดังกล่าวไม่สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนของต้นถั่วลูกผสมนี้ให้เกิดรากได้เลยเช่นกัน

การเพิ่มจำนวนของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของกลุ่ม *V. radiata* x *V. umbellata* ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนที่มีตายอดเฉพาะบนอาหารสังเคราะห์สูตร B5 + IBA 2 mg/l ส่วนอาหารสังเคราะห์สูตร MS Basal medium + B5 vitamins ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 1 2 และ 3 mg/l ไม่ได้ทำการทดลอง เนื่องจากจำนวนต้นถั่วลูกผสมมีจำนวนเพียง 4 ต้น จากการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของชิ้นส่วนที่มียอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร B5 + IBA 2 mg/l สามารถเพิ่มจำนวนต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดนี้ได้ ทำให้เกิดการพัฒนายอดและรากเกิดขึ้นและสามารถกระตุ้นให้เนื้อเยื่อบริเวณรอยตัดที่สัมผัสกับอาหารสังเคราะห์เกิดรากได้ในปริมาณที่มาก แต่วางที่ที่เกิดขึ้น พบว่ามีแคลลัสเกิดขึ้นด้วย(ภาพที่ 18) ดังนั้นในการ sub culture รอบที่ 2 จึงได้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนที่มีตายอดบนอาหารสังเคราะห์ สูตร B5 + IBA 2 mg/l จำนวน 4 ชิ้น และทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 จำนวน 4 ชิ้น พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร B5 สามารถกระตุ้นให้ชิ้นส่วนของต้นถั่วลูกผสมเกิดการพัฒนาของยอดและรากเช่นเดียวกับอาหารสังเคราะห์สูตร B5 + IBA 2 mg/l แต่ลักษณะของรากที่เกิดในอาหารสังเคราะห์สูตร B5 มีลักษณะเรียวเล็กและไม่พบการเกิดแคลลัสบริเวณรอยตัดที่สัมผัสกับอาหารสังเคราะห์ (ภาพที่ 18) ดังนั้นในการ sub culture ครั้งต่อไป จึงเปลี่ยนมาใช้อาหารสูตร B5 แทนอาหารสูตร B5 + IBA 2 mg/l



ภาพที่ 18 รากของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร B5 + IBA 2 mg/l (ก) และอาหารสังเคราะห์สูตร B5 (ข)

การเพิ่มจำนวนต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของกลุ่มผสม *V. mungo* x *V. umbellata* โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนที่มีส่วนยอดและชิ้นส่วนที่มีตาข้างบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS basal medium + B5 vitamins ที่มี BA ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 1 2 และ 3 mg/l พบว่า ทุกสูตรอาหารสังเคราะห์ที่มี BA ทั้ง 3 ความเข้มข้นทำให้เกิด compact callus เกิดขึ้นบริเวณเนื้อเยื่อส่วนที่สัมผัสกับอาหารสังเคราะห์และไม่ทำให้เกิดการพัฒนาของยอด (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ *V. mungo* x *V. umbellata* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS basal medium + B5 vitamins ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 mg/l

เนื่องจากการ sub culture ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ *V. mungo* x *V. umbellata* บนอาหารสังเคราะห์สูตรชักนำให้เกิดยอดไม่ประสบความสำเร็จ ดังนั้นจึงนำชิ้นส่วนที่มีตาของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดคู่นี้ได้จากการเพาะเลี้ยงอวูลมาชักนำให้เกิดรากบนอาหารสังเคราะห์สูตร

B5 + IBA 2 mg/l ทำการเพาะเลี้ยงทั้งหมด 40 ชิ้น พบว่า อาหารสูตรดังกล่าวไม่สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนของต้นถั่วลูกผสมนี้ให้เกิดรากได้เลย

จากการศึกษาการเพิ่มจำนวนต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอของกลุ่มผสมต่าง ๆ ด้วยการ sub culture นั้น พบว่า กลุ่มผสม *V. radiata* x *V. mungo* และ *V. mungo* x *V. umbellata* ไม่ประสบความสำเร็จในการเพิ่มจำนวนในสภาพปลอดเชื้อ (ตารางที่ 10) ดังนั้นจึงทำการย้ายต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดออกปลูกโดยตรง จากการย้ายปลูกพบว่า ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดทั้งสองกลุ่มนี้ไม่สามารถเจริญเติบโตและพัฒนาในสภาพธรรมชาติและเกิดการตายในระหว่างการย้ายปลูกภายใน 1 สัปดาห์

ตารางที่ 10 การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิด (จำนวน 40 ชิ้นจากต้นที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอต่อ 1 คู่ผสม) บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS + vitamin B5 ที่มีความเข้มข้นของ BA 3 ระดับ คือ 0.1 0.2 และ 0.3 mg/l

เนื้อเยื่อ	อาหารสังเคราะห์สูตร MS + vitamin ที่เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ (mg/l)					
	0.1		0.2		0.3	
	จำนวนชิ้นที่ เกิดยอด	จำนวนชิ้นที่ เกิดแคลลัส	จำนวนชิ้นที่ เกิดยอด	จำนวนชิ้นที่ เกิดแคลลัส	จำนวนชิ้นที่ เกิดยอด	จำนวนชิ้นที่ เกิดแคลลัส
<i>V. radiata</i> x <i>V. mungo</i>						
ชิ้นส่วนที่มีตาข้าง	0	40	0	40	0	40
ชิ้นส่วนที่มีตายอด	0	40	0	40	0	40
<i>V. radiata</i> x <i>V. umbellata</i>						
ชิ้นส่วนที่มีตาข้าง	-	-	-	-	-	-
ชิ้นส่วนที่มีตายอด	-	-	-	-	-	-
<i>V. mungo</i> x <i>V. umbellata</i>						
ชิ้นส่วนที่มีตาข้าง	0	40	0	40	0	40
ชิ้นส่วนที่มีตายอด	0	40	0	40	0	40

หมายเหตุ - ไม่ได้ทำการทดลองเนื่องจากจำนวนต้นที่ได้จากการช่วยชีวิตมีไม่เพียงพอ

สำหรับต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของกลุ่มผสม *V. radiata* x *V. umbellata* สามารถเพิ่มจำนวนได้ในสภาพปลอดเชื้อโดยการ sub culture บนอาหารสังเคราะห์สูตร B5 และไม่ทำให้เกิดแคลลัสบริเวณราก จึงทำการ sub culture ถั่วลูกผสมคู่นี้บนอาหารสังเคราะห์สูตร B5 เพื่อเพิ่มจำนวนต้นในการย้ายปลูกต่อไป จากการย้ายปลูกต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิด พบว่า ทุกต้นที่ทำการย้ายปลูกสามารถเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์ได้ในสภาพธรรมชาติ สามารถออกดอกและติดฝักอ่อนได้ แต่ฝักอ่อนดังกล่าวจะเกิดการร่วงภายใน 1-2 วันหลังดอกบาน และไม่พบการติดฝักที่สามารถพัฒนาถึงระยะฝักแก่ได้เลย (ภาพที่ 20)

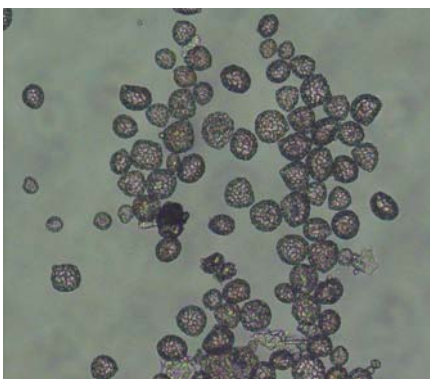


ภาพที่ 20 ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* ที่ย้ายปลูกลงในกระถางและเพาะเลี้ยงในสภาพธรรมชาติ

5. การศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสรของถั่วลูกผสมข้ามชนิด

เนื่องจากการเพิ่มจำนวนต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดและการย้ายปลูกประสบความสำเร็จเฉพาะกลุ่มผสม *V. radiata* x *V. umbellata* ดังนั้น จากการทดลองนี้เป็นต้นไปจึงทำการศึกษาได้เฉพาะต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* เท่านั้น

ย้ายปลูกต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* ลงในแปลงเมื่อต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดออกดอก สุ่มเก็บละอองเกสรที่เวลา 7:00 8:00 9:00 10:00 11:00 และ 12:00 น. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Brewbaker and Kwack (1963) ที่มีน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 15% (w/v) พบว่า ละอองเกสรของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดที่เก็บจากเวลาต่าง ๆ กันไม่สามารถเกิดการงอกในอาหารสังเคราะห์ได้เลย นอกจากนั้นยังพบว่า ละอองเกสรของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* มีขนาดและรูปร่างที่แตกต่างกันด้วย (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 ละอองเกสรของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* ที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Brewbaker and Kwack (1963) ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 15% (w/v)

6. การศึกษาการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของถั่วลูกผสมข้ามชนิด

6.1 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่เหมาะสมเมื่อหยดลงบนยอดต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดในสภาพปลอดเชื้อ

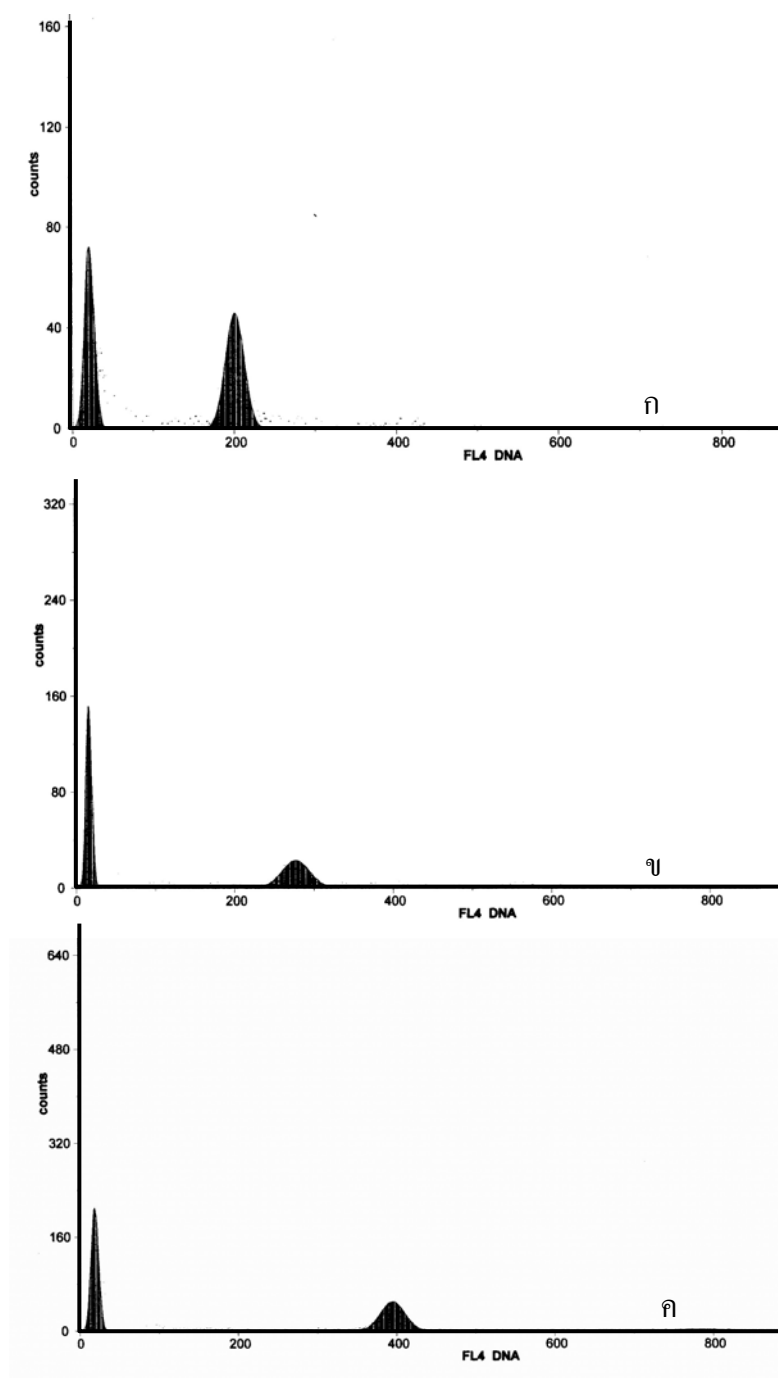
จากการศึกษาการใช้สารละลายโคลชิซินที่มีความเข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.3% (w/v) หยดลงบนยอดของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธีการ sub culture เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม โดยใช้ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดจำนวน 20 ต้น ต่อ 1 ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน พบว่า หลังการให้สารละลายโคลชิซินเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดเกิดการร่วงของใบเกิดขึ้น โดยต้นที่ถูกหยดด้วยสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.3% (w/v) เกิดการร่วงของใบสูงที่สุด รองลงมาคือ 0.2 และ 0.1% (w/v) ตามลำดับ หลังจากนั้นอีก 2 สัปดาห์ ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดเกิดการแตกยอดใหม่จากยอดที่มีการให้สารละลายโคลชิซินทุกความเข้มข้น

เมื่อนำใบที่แตกจากยอดที่ถูกหยดด้วยสารละลายโคลชิซินไปตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนโครโมโซมด้วยเครื่อง Flow Cytometer พบว่า การหยดด้วยสารละลายโคลชิซินที่มีความเข้มข้น 0.2% (w/v) ทำให้มีจำนวนต้นที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นจาก 2x เป็น 4x อยู่ 3 ต้นจาก 20 ต้น (15%) (ตารางที่ 11) โดยพบว่า ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น 4x มีปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดที่มีโครโมโซมเป็น 2x (control) (ภาพที่ 22) ส่วนความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่ 0.1% (w/v) พบว่า บางตัวอย่างเกิดการ

เปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมโดยมีจำนวนเพิ่มขึ้นแต่เพิ่มไม่ถึง 3x ซึ่งพบทั้งหมด 3 ต้นจาก 20 ต้น (15%) ส่วนความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่ 0.3% (w/v) พบว่า ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของจำนวนโครโมโซม

ตารางที่ 11 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนชุดโครโมโซมของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิด *V. radiata* x *V. umbellata* ที่หยดด้วยสารละลายโคลชิซิน

ความเข้มข้นของสาร ละลายโคลชิซิน (w/v)	จำนวนต้นที่ใช้ ทดลอง	จำนวนชุดโครโมโซม		
		diploid	incomplete tetraploid	tetraploid
0	20	20	0	0
0.1	20	17	3	0
0.2	20	17	0	3
0.3	20	20	0	0



ภาพที่ 22 ปริมาณดีเอ็นเอของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดจากต้นที่ไม่ได้หยดสารละลายโคลชิซิน (ก) หยดด้วยสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.1% (w/v) (ข) และหยดด้วยสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.2% (w/v) (ค)

6.2 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่เหมาะสมเมื่อเติมลงในอาหาร สังเคราะห์ที่ใช้ในการ sub culture ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิด

การศึกษาผลของวิธีการให้สารละลายโคลชิซินเพื่อเพิ่มจำนวนโครโมโซมของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* โดยการผสมสารละลายโคลชิซินลงในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการ sub culture โดยตรง โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0.1 0.2 และ 0.3% (w/v) เพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของลูกผสมข้ามชนิด พบว่า ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* ไม่สามารถแตกยอดและรากเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มีสารโคลชิซินในทุกความเข้มข้นและเมื่อย้ายกลับมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร B5 ที่ไม่มีสารละลายโคลชิซินพบว่า ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดเกิดการตายภายใน 2 สัปดาห์

วิจารณ์

1. การศึกษาการผสมพันธุ์พืชข้ามชนิดระหว่างถั่วเขียวผิวมัน (*V. radiata*) ถั่วเขียวผิวดำ (*V. mungo*) และ ถั่วขึ้นฉางแดง (*V. umbellata*)

การผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* กับ *V. mungo* เมื่อใช้ *V. radiata* เป็นต้นแม่ พบว่า มีอัตราการผสมติดฝักถึง 43% ซึ่ง Chen *et al.* (1982) และ Rashid *et al.* (1987) รายงานว่า ในการผสมข้ามชนิดระหว่างคู่ผสมคู่นี้ไม่มีอุปสรรคก่อนการปฏิสนธิ ทำให้ละอองเกสรสามารถออกผ่านยอดเกสรเพศเมียและก้านชูยอดเกสรเพศเมียเข้าไปให้ไข่กับสเปิร์มนิวเคลียสผสมกันได้ รวมทั้งการผสมระหว่างสเปิร์มผสมกับโพลาร์นิวคลีโอ (polar nuclei) ที่สามารถเกิดขึ้นได้ จึงทำให้เปอร์เซ็นต์การผสมติดฝักมีอัตราสูง แต่เมื่อเก็บเมล็ดจากฝักถั่วที่ได้จากการผสมข้ามชนิดที่มีอายุ 16 วันหลังการผสมเกสร ซึ่งเป็นระยะที่เอ็มบริโอของถั่วเขียวมีการพัฒนาเต็มที่ (Rashid *et al.*, 1987) พบว่า เมล็ดที่ได้นั้นมีลักษณะลีบและย่น โดยเมล็ดเริ่มมีการลีบและย่นหลังจากวันที่ 12 หลังการผสมเกสร และเมื่อนำเมล็ดไปเพาะ เมล็ดเหล่านั้นไม่สามารถงอกได้ สาเหตุการลีบย่นของเมล็ดนั้นอาจเกิดจากอุปสรรคหลังการปฏิสนธิ อาจเป็นความผิดปกติของเอนโดสเปิร์ม (Ahn and Hartmann, 1978; Chen *et al.*, 1982; Rashid *et al.*, 1987) และอาจเป็นไปได้ว่าเอนโดสเปิร์มที่เกิดขึ้นอาจมีการพัฒนาที่เป็นปกติจนกระทั่งวันที่ 13 หลังการผสมเกสร เนื่องจากก่อนวันที่ 13 หลังการผสมเกสร ฝักและเมล็ดที่ได้จากการผสมข้ามชนิดมีการพัฒนาที่เป็นปกติ แต่หลังจากนั้น เอนโดสเปิร์มเริ่มเกิดการพัฒนาที่ผิดปกติและเกิดการการสลายตัวขึ้น ทำให้กระบวนการสะสมอาหารภายในเมล็ดที่ส่งไปยังใบเลี้ยง หดชะงักลง เป็นผลทำให้เมล็ดที่เก็บในวันที่ 16 หลังการผสม มีลักษณะลีบและย่น เมื่อนำเมล็ดดังกล่าวไปปลูกในแปลงทดลองจึงพบว่า ไม่เกิดการงอกของเมล็ดเนื่องจากเอ็มบริโอในเมล็ดได้เกิดการตายไปก่อนแล้วจากการที่เอ็มบริโอในเมล็ดไม่มีสารอาหารไปเลี้ยง (Buitendijk *et al.*, 1995)

ส่วนการผสมแบบสลับของคู่ผสม *V. mungo* x *V. radiata* พบว่า มีการผสมติดเพียง 7.5% ซึ่งสาเหตุที่มีการผสมติดน้อยอาจเกิดอุปสรรคก่อนการปฏิสนธิทำให้โอกาสที่สเปิร์มนิวเคลียสจะปฏิสนธิกับไข่เกิดขึ้นได้น้อยลง (Barone *et al.* 1992) ดังนั้นจะมีดอกบางดอกเท่านั้นที่ทำการผสมเกสรแล้วเกิดการปฏิสนธิ โดยดอกที่ไม่เกิดการปฏิสนธินั้นจะเกิดการร่วงอย่างรวดเร็ว ส่วนดอกที่เกิดการปฏิสนธิจะเกิดการพัฒนาดอกต่อไป ซึ่งในระยะหลังการผสมเกสรนี้อาจเกิดการร่วงของฝักอ่อนขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากความไม่เข้ากันระหว่างเอ็มบริโอกับเอนโดสเปิร์ม โดยเอนโดสเปิร์มที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดไม่สามารถส่งสารอาหารไปยังเอ็มบริโอได้ ทำให้เอ็มบริโอเกิดการตายไป

ในที่สุด ทำให้เกิดการร่วงของฝักอ่อน (Hadley and Openshaw, 1980; Pickersgill, 1993) อย่างไรก็ตาม ผลของการผสมข้ามชนิดระหว่างถั่วทั้งสองชนิดนี้อาจจะแตกต่างกันได้ โดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่เลือกใช้ในการผสมข้ามด้วย (Rashid *et al.*, 1987) ดังนั้นการผสมข้ามชนิดของ *V. mungo* x *V. radiata* อาจจะประสบความสำเร็จถ้าหากเลือกใช้สายพันธุ์อื่น ๆ ในพืชชนิดดังกล่าวมาใช้เป็นพ่อและแม่พันธุ์ในการผสมข้ามชนิด

การผสมข้ามชนิดระหว่าง *V. radiata* กับ *V. umbellata* ประสบความสำเร็จเมื่อใช้ *V. radiata* เป็นต้นแม่เท่านั้น โดยพบว่า มีการผสมติดฝัก 26.2% ซึ่งสาเหตุที่ทำให้มีอัตราการผสมติดฝักต่ำอาจเกิดจากอุปสรรคก่อนการปฏิสนธิ ซึ่งการเกิดอุปสรรคการปฏิสนธินั้นทำให้โอกาสที่สเปิร์มนิวเคลียสจะเข้าไปผสมกับไข่่นั้นลดลง (Barone *et al.*, 1992) รวมทั้งการผสมระหว่างสเปิร์มนิวเคลียสกับเอนโดสเปิร์มที่ลดลงด้วย ส่วน Chen *et al.* (1982) และ Rashid *et al.* (1987) รายงานว่า ในการผสมข้ามระหว่างถั่วทั้งสองชนิดนี้จะเกิดอุปสรรคในระยะหลังการปฏิสนธิ และ Ahn and Hartmann. (1978) ได้รายงานว่าถั่วทั้งสองชนิดนี้มีความแตกต่างทางด้านพันธุกรรมสูง ซึ่งอาจทำให้เกิดความผิดปกติในการพัฒนาของเอนโดสเปิร์มทำให้เกิดการร่วงของฝักอ่อนภายหลังการปฏิสนธิที่สูง นอกจากนั้นการพัฒนาที่ผิดปกติของเอนโดสเปิร์มอาจเกิดจากยีนของฝ่ายพ่อและฝ่ายแม่ที่เข้ามาเข้าคู่กันและเกิดการแสดงออกในการยับยั้งการพัฒนาของเอนโดสเปิร์ม หรืออาจเกิดจากการไม่เข้ากันของจีโนม ในเอนโดสเปิร์ม ทำให้เกิดการสลายตัวหรือการพัฒนาที่ผิดปกติของเอนโดสเปิร์ม (Hadley and Openshaw, 1980) ซึ่งการล้มเหลวของการพัฒนาของเอนโดสเปิร์มส่งผลให้เมล็ดลูกผสมมีลักษณะลีบและย่น (Chen *et al.*, 1982; Rashid *et al.*, 1987) และเมื่อนำเมล็ดที่ได้จากการผสมข้ามชนิดคู่นี้ไปปลูกในแปลงทดลอง พบว่า เมล็ดเหล่านั้นไม่สามารถงอกได้เลย อาจเป็นเพราะเอ็มบริโอที่อยู่ภายในเมล็ดได้แท้งตายไปก่อนแล้วเนื่องจากขาดอาหารสะสมภายในเมล็ดและสารต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อกระบวนการงอกของเมล็ด (Buitendijk *et al.*, 1995)

การผสมกลับของกลุ่มผสมข้ามชนิดของ *V. umbellata* x *V. radiata* พบว่า ไม่สามารถผสมติดฝักได้เลย อาจเป็นเพราะสาเหตุจากละอองเกสรไม่สามารถงอกหลอดละอองเกสรบนยอดเกสรเพศเมียหรืออาจจะเกิดการงอกได้แต่ไม่สามารถงอกและเจริญผ่านก้านชูเกสรเพศเมียลงไปยังเกิดการปฏิสนธิได้ (Shivanna, 2003) ทำให้ดอกที่ได้รับการผสมเกสรเกิดการร่วงอย่างรวดเร็วภายหลังการผสม

การผสมข้ามชนิดระหว่าง *V. mungo* กับ *V. umbellata* ประสบความสำเร็จเมื่อใช้ *V. mungo* เป็นต้นแม่เท่านั้น โดยพบว่า มีอัตราการผสมติด 19.04% สาเหตุที่กลุ่มผสมนี้มีอัตราการผสม

ติดฝักนี้อาจมีสาเหตุมาจากมีเกิดอุปสรรคก่อนการปฏิสนธิเกิดขึ้น ดังเช่นที่อาจพบในการผสมข้ามชนิดระหว่าง *V. radiata* กับ *V. umbellata* ทำให้มีอัตราการการผสมติดฝักที่ต่ำ เนื่องจากอุปสรรคก่อนการผสมนั้นสามารถทำให้อัตราการปฏิสนธิระหว่างเสปิร์มนิวเคลียสกับไข่ในการผสมข้ามชนิดลดลงได้ (Barone *et al.*, 1992) ทำให้ดอกบางส่วนที่ทำการผสมข้ามชนิดนั้นไม่เกิดการปฏิสนธิและเกิดการร่วงภายหลังการผสมอย่างรวดเร็ว และดอกบางส่วนที่ได้รับการปฏิสนธิจะเกิดการพัฒนามาเป็นฝักต่อไป นอกจากนั้นการผสมข้ามชนิดในกลุ่มผสมนี้เกิดการร่วงของฝักอ่อนที่สูงมาก ซึ่งอาจเกิดจากพันธุกรรมของ *V. mungo* และ *V. umbellata* มีความแตกต่างกันมากจึงส่งผลให้การพัฒนาของเอนโดสเปิร์มผิดปกติและทำให้เกิดการร่วงของฝักอ่อนที่สูง ส่วนเมล็ดที่ได้จากการผสมข้ามชนิดนี้มีลักษณะลีบและย่น เมื่อนำเมล็ดที่ได้จากการผสมข้ามของคู่ผสมนี้ไปปลูก พบว่า เมล็ดที่ได้นั้นไม่สามารถงอกได้เลย ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากอุปสรรคของหลังการปฏิสนธิ โดยการผสมข้ามระหว่างถั่ว 2 ชนิดนี้อาจจะเกิดการขัดขวางการพัฒนาของเอนโดสเปิร์ม (Ahn and Hartmann, 1978; Chen *et al.*, 1982; Rashid *et al.*, 1987) ซึ่งเอนโดสเปิร์มที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดมักจะเกิดการพัฒาที่ผิดปกติและเกิดการสลายตัวในภายหลัง ทำให้เอ็มบริโอเกิดการแท้งตายเนื่องจากขาดแหล่งอาหาร (Buitendijk *et al.*, 1995)

สำหรับการผสมสลับของกลุ่มผสมข้ามชนิดของ *V. umbellata* x *V. mungo* พบว่า ไม่สามารถผสมติดฝักได้เลย ซึ่ง Chen *et al.* (1982) รายงานว่า เมื่อใช้ *V. umbellata* เป็นต้นแม่นั้น ละอองเกสรจาก *V. mungo* ไม่สามารถงอกผ่านยอดเกสรเพศเมียเข้าไปในก้านชูเกสรเพศเมีย ทำให้เป็นอุปสรรคในการผสมข้ามชนิดที่เกิดขึ้นก่อนการปฏิสนธิ

ในการแก้ปัญหาอุปสรรคในการผสมข้ามชนิด ในกรณีที่เมล็ดที่ผสมติดไม่สามารถงอกและพัฒนาเป็นต้นได้นั้น อาจแก้ปัญหาก็ได้โดยการเปลี่ยนสายพันธุ์ที่ใช้ในการผสมข้ามชนิด เนื่องจากพบว่า การผสมข้ามชนิดโดยใช้สายพันธุ์ในการผสมที่ต่างกันจะส่งผลให้เกิดอัตราการผสมติดฝักที่แตกต่างกัน (สุนนา, 2540; Ahn and Hartmann, 1978; Chen *et al.*, 1982; Rashid *et al.*, 1987) ส่วนปัญหาการร่วงของฝักอ่อนอาจช่วยลดการหลุดร่วงได้โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช เช่น GA (gibberellic acid) NAA (naphthaleneacetic acid) หรือ kinetin ฉีดพ่นบริเวณข้อฝักหรือทาบบริเวณข้อฝักที่ทำการผสมข้ามโดยตรงซึ่งสารดังกล่าวนี้ช่วยในการติดฝักและชะลอการร่วงของฝักได้ (Rattan, 1998) นอกจากนี้ในกลุ่มผสมที่เกิดอุปสรรคก่อนการปฏิสนธิ เนื่องจากละอองเกสรไม่สามารถงอกทะลุผ่านยอดเกสรเพศเมียเข้าไปได้นั้น อาจแก้ไขได้โดยใช้วิธีการผสมโดยตรงในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* pollination) (Deverna *et al.*, 1987) ซึ่งอาจจะช่วยทำให้เกิดการปฏิสนธิและการพัฒนาของเอ็มบริโอต่อไปได้ ดังนั้นเพื่อให้ได้ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของการ

ผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* *V. mungo* และ *V. umbellata* จึงทำการทดลองเพื่อช่วยชีวิตเอ็มบริโอ เพื่อชักนำให้เกิดต้นบนอาหารสังเคราะห์ต่อไป

2. การช่วยชีวิตเอ็มบริโอลูกผสมข้ามชนิดระหว่างถั่วเขียวผิวมัน (*V. radiata*) ถั่วเขียวผิวดำ (*V. mungo*) และถั่วเนาวางแดง (*V. umbellata*)

การช่วยชีวิตเอ็มบริโอที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. mungo* โดยวิธีการเพาะเลี้ยงอวูล พบว่า อวูลที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดทุกอายุที่นำมาเพาะเลี้ยงสามารถเกิดการพัฒนาและงอกเป็นต้นบนอาหารสังเคราะห์ได้ (ภาพที่ 5) การที่เอ็มบริโอสามารถพัฒนาจนงอกเป็นต้นได้ อาจเป็นได้ว่าเอ็มบริโอที่อยู่ในอวูลที่นำมาเพาะเลี้ยงนั้นมีการพัฒนาและแบ่งเซลล์จนถึงหรือผ่านระยะ heart shape แล้ว ซึ่งการนำเอ็มบริโออ่อนที่มีการพัฒนาจนถึงหรือผ่านระยะ heart shape ไปแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ จะทำให้เอ็มบริโอนั้นสามารถแบ่งเซลล์และพัฒนาต่อไปจนสามารถงอกและเจริญเป็นต้นในอัตราที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับการนำเอ็มบริโอที่ยังพัฒนาไม่ถึงระยะ heart shape มาเพาะเลี้ยง ซึ่งการนำเอ็มบริโอที่ยังอ่อนอยู่หรือพัฒนายังไม่ถึงระยะ heart shape มาเพาะเลี้ยงจะไม่สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นได้ (Pellegrineschi *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 1996)

จากการเพาะเลี้ยงอวูลที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. mungo* ที่มีอายุตั้งแต่ 6 วันจนถึง 12 วันหลังการผสมเกสร มีแนวโน้มว่าอวูลที่มีอายุเพิ่มขึ้นจะมีการพัฒนาเป็นต้นบนอาหารสังเคราะห์สูงขึ้นตามไปด้วย ซึ่งตรงกับรายงานของ Pellegrineschi *et al.* (1997) ซึ่งทำการทดลองใน cowpea โดยนำเอ็มบริโอที่ยังพัฒนาไม่ถึงระยะ heart shape มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เปรียบเทียบกับเอ็มบริโอที่มีการพัฒนาอยู่ในระยะ heart shape พบว่า เอ็มบริโอที่ยังพัฒนาไม่ถึงระยะ heart shape มีอัตราการพัฒนาเป็นต้นน้อยมาก ขณะที่เอ็มบริโอที่มีการพัฒนาถึงระยะ heart shape แล้วสามารถเกิดการพัฒนาและงอกเป็นต้นได้ในอัตราที่สูงขึ้นอย่างชัดเจน แต่เมื่ออวูลมีอายุเพิ่มขึ้นเป็น 14 วันหลังผสมเกสร พบว่า การงอกเป็นต้นเกิดขึ้นน้อยลงอาจเป็นเพราะสาเหตุจากการที่เอนโดสเปิร์มเกิดการสลายตัวหรือเกิดการแท้งตายของเอ็มบริโอเกิดขึ้นหลังจากวันที่ 12 หลังการผสมเกสร (Hadley and Openshaw, 1980) ซึ่งส่งผลทำให้การงอกเป็นต้นมีอัตราลดลง

จากการศึกษาการช่วยชีวิตเอ็มบริโอโดยการเพาะเลี้ยงอวูลของกลุ่มผสมของ *V. radiata* x *V. mungo* พบว่า อายุของเอ็มบริโอหลังการผสมเกสรเป็นปัจจัยสำคัญที่สำคัญที่มีผลต่อการประสบ

ความสำเร็จในการช่วยชีวิตของเอ็มบริโอเป็นอย่างยิ่ง เช่นเดียวกับที่ Fujime *et al.* (2000) รายงานในการผสมข้ามในพืชตระกูลกะหล่ำ โดยอายุที่ทำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นได้สูงสุดคือ 12 วัน หลังการผสมเกสร แต่หลังจากนั้นการงอกเป็นต้นจะลดลง ดังนั้นการเก็บฝักแก้วที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของกลุ่มผสมนี้เพื่อนำไปทำการช่วยชีวิตเอ็มบริโอจึงควรปล่อยให้ฝักมีการพัฒนานบนต้นแมจนถึงวันที่ 12 หลังจากการผสมเกสร แล้วจึงเก็บเพื่อนำออรูที่ได้จากการผสมข้ามมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งออรูที่อยู่ในระยะนี้น่าจะมีเอ็มบริโอที่พัฒนาเกินระยะ heart shape และเอนโดสเปิร์มอาจจะยังไม่เกิดการสลายตัว จึงน่าจะเป็นช่วงอายุของออรูที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการช่วยชีวิตเอ็มบริโอของกลุ่มผสมนี้ ส่วนฝักที่มีการหลุดร่วงในช่วง 8 และ 10 วันหลังการผสมเกสรสามารถนำออรูมาเพาะเลี้ยงเพื่อช่วยชีวิตเอ็มบริโอด้วย เนื่องจากเอ็มบริโอที่มีอายุดังกล่าวสามารถพัฒนาเป็นต้นได้บางส่วนโดยการงอกยังคงอยู่ในระดับสูงเกิน 50%

การช่วยชีวิตเอ็มบริโอที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* พบว่าออรูที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดสามารถงอกและพัฒนาเป็นต้นได้เฉพาะออรูที่มีอายุ 12 วันหลังการผสม ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าอายุของออรูที่ 12 วันหลังการผสมเกสรที่นำมาเพาะเลี้ยงนั้นเป็นระยะที่เอ็มบริโอสามารถพัฒนาเป็นต้นได้แต่พบว่า เกิดการงอกเป็นต้นได้เพียง 5% สาเหตุที่ออรูมีการงอกได้น้อยอาจเนื่องมาจากหลายสาเหตุ เช่น เกิดจากอุปสรรคจากตัวลูกผสมเอง ซึ่งอาจเกิดจากความไม่เข้ากันระหว่างเอ็มบริโอกับเอนโดสเปิร์มที่อยู่ในออรู หรือเอนโดสเปิร์มเกิดการพัฒนาที่ผิดปกติและสลายตัวไป เนื่องจากพ่อและแม่ที่ใช้ในการผสมเกสรมีความแตกต่างของพื้นฐานทางพันธุกรรมสูง (Ahn and Hartmann, 1978) หรืออาจเป็นเพราะองค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยังไม่เหมาะสมต่อกลุ่มผสมนี้ ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่ใส่ลงในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอจะส่งผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (Fujime *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 1996; Sudripta *et al.*, 1999) ดังนั้นในการศึกษาการช่วยชีวิตเอ็มบริโอของกลุ่มผสมข้ามชนิดจากกลุ่มผสมนี้ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการคัดเลือกสายพันธุ์ของพ่อและแม่ที่นำมาใช้ในการผสมเกสรที่เหมาะสม สูตรอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการช่วยชีวิตเอ็มบริโอต่อไป

การช่วยชีวิตเอ็มบริโอที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ *V. mungo* x *V. umbellata* พบว่าออรูที่มีอายุ 6 และ 8 วันหลังการผสมเกสร ไม่สามารถงอกและพัฒนาเป็นต้นได้เลย ซึ่งอาจเกิดมาจากเอ็มบริโอที่อยู่ภายในออรูนั้นยังมีการพัฒนาไม่ถึงระยะ heart shape จึงยังมีการพัฒนาน้อยเกินไปที่จะช่วยให้สามารถงอกเป็นต้นได้ (Pellegrineschi *et al.*, 1997) เนื่องจากออรูที่มีอายุ 10-12

และ 14 วันหลังผสมเกสร สามารถงอกและพัฒนาเป็นต้นได้แสดงว่า ออวูลที่มีอายุ 10-14 วันหลังการผสมเกสรนั้น เอ็มบริโออาจจะอยู่ในระยะที่สามารถหรือพร้อมที่จะงอกเป็นต้นได้และมีแนวโน้มว่า อายุของเอ็มบริโอที่มากขึ้นนั้นส่งผลให้การงอกเป็นต้นสูงขึ้นตามลำดับ (Pellegrineschi *et al.*, 1997; Pierk, 1987; Sharma *et al.*, 1996) จากการทดลองพบว่า การงอกเป็นต้นสูงสุดของกลุ่มสมนี้เท่ากับ 48.7% เมื่อออวูลมีอายุได้ 14 วันหลังการผสม ซึ่ง Rashid *et al.* (1987) รายงานว่า อายุที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของกลุ่มสมนี้อยู่ในช่วง 15-19 วันหลังการผสมเกสร ซึ่งผู้ทดลองไม่ได้ทำการทดลองในช่วงอายุที่เกิน 14 วันหลังการผสมเกสร เนื่องจากว่ากลุ่มสมนี้มีอัตราการร่วงของฝักอ่อนสูงมาก อาจเป็นผลมาจากการใช้สายพันธุ์พ่อและแม่ในการผสมที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมสูงจึงส่งผลทำให้เกิดการร่วงของฝักอ่อนหลังการผสมในอัตราที่สูง (Chen *et al.*, 1982; Rashid *et al.*, 1987)

จากผลการทดลองการเพาะเลี้ยงออวูลที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* ซึ่งเป็นกลุ่มสมที่พ่อและแม่มีความแตกต่างระหว่างพันธุกรรมสูง จึงพบลักษณะอาการใบเหลืองซีดเกิดขึ้นกับทุกต้นที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอ สาเหตุที่ใบเกิดอาการเหลืองซีดนั้นอาจเกิดจากคลอโรพลาสต์ในใบของต้นที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอมีการพัฒนาที่ผิดปกติ หรืออาจเป็นเพราะว่า ไทลาคอยด์ที่อยู่ในคลอโรพลาสต์มีการวางตัวแบบไม่เป็นระเบียบ (Badami *et al.*, 1997) ซึ่งปัญหานี้อาจแก้ไขได้โดยทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชที่มีอาการเหลืองซีดในสภาพที่มีแสงเต็มที่ควบคู่กับอาหารสังเคราะห์ที่มีการเติมไซโตไคนิน โดยวิธีดังกล่าวจะทำให้โอริโอพลาสต์ (ethioplast) สามารถเปลี่ยนเป็นคลอโรพลาสต์ได้ ซึ่งจะส่งผลทำให้ใบสามารถเปลี่ยนกลับมาเป็นสีเขียวได้ (Badami *et al.*, 1997) ซึ่งจากการทดลองนำต้นลูกผสมข้ามชนิดไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสงเต็มที่พบว่า ใบที่เหลืองซีดของต้นที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอสามารถเปลี่ยนกลับเป็นสีเขียวได้ ส่วนต้นที่ได้จากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. mungo* และ *V. mungo* x *V. umbellata* พบว่า ไม่เกิดอาการเหลืองซีดของใบแต่อย่างใด ซึ่งอาจเป็นเพราะกลุ่มสมดังกล่าวมีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกัน

3. การศึกษาวิธีการตรวจสอบต้นอ้วลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *V. radiata* *V. mungo* และ *V. umbellata* โดยใช้เทคนิค RAPD

3.1 การคัดเลือกโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD ที่สามารถแยกความแตกต่างของอ้วที่ใช้เป็นต้นพ่อและต้นแม่

จากการคัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 40 ไพรเมอร์ พบ ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัว *V. radiata* *V. mungo* และ *V. umbellata* ได้จำนวน 9 ไพรเมอร์ คือไพรเมอร์ A02 A03 A04 A07 A10 A13 A15 A18 และ Ax17 แต่เมื่อทำการทดลองซ้ำพบเพียงไพรเมอร์ A02 A03 A07 A13 และ Ax17 ที่ยังแสดงแถบดีเอ็นเอที่เหมือนเดิม ส่วนไพรเมอร์อื่นนั้นให้แถบดีเอ็นเอบางส่วนแตกต่างไปจากเดิมและโดยส่วนใหญ่เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะจาง ๆ โดยปกติแล้วการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ RAPD มักจะเกิดลักษณะแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะจาง ๆ ขึ้นมาเนื่องจากเป็นไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นเพียง 10 เบส ดังนั้นการจับกับสายดีเอ็นเอแบบไม่เฉพาะเจาะจง (non-specific) จึงสามารถเกิดขึ้นได้ (Arnold *et al.*, 1991) ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะจาง ๆ นั้นมักจะไม่สามารถทำซ้ำได้ จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาแยกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตหรือใช้ในการแยกพ่อและแม่พันธุ์ โดยในการคัดเลือกไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมในแต่ละกลุ่มผสมนั้นจะต้องเลือกใช้ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้อย่างชัดเจนที่สุด จากการวิเคราะห์ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัวที่ใช้เป็นพ่อและแม่ในการผสมข้ามได้ไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการตรวจสอบดังนี้

การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. mungo* สามารถใช้ไพรเมอร์ A02 และ Ax17 ซึ่งแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง 7 และ 5 แถบดีเอ็นเอ ตามลำดับ มาใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมข้ามชนิดของกลุ่มผสมนี้ได้ เนื่องจากทั้งสองไพรเมอร์นี้แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างตัวทั้งสองชนิดได้อย่างชัดเจน ส่วนไพรเมอร์ A03 ที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างตัวทั้งสองชนิดนี้ได้ 7 แถบดีเอ็นเอเช่นกันนั้น ไม่สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมได้เนื่องจากไพรเมอร์ A03 แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันระหว่าง *V. radiata* กับ *V. mungo* ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ทำให้การแยกความแตกต่างทำได้ยากหรือมีโอกาสผิดพลาดได้สูง (ภาพผนวกที่ 1) จึงไม่นำไพรเมอร์ A03 ไปใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมในกลุ่มผสมนี้

การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* สามารถใช้ไพรเมอร์ A13 และ Ax17 ซึ่งแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง 5 แถบดีเอ็นเอทั้งสองไพรเมอร์มาใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของกลุ่มผสมนี้ได้ เนื่องจากทั้งสองไพรเมอร์นี้แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างตัวทั้งสองชนิดนี้ได้ อย่างชัดเจน ส่วนไพรเมอร์ A03 และ A07 ซึ่งแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 5 และ 4 แถบดีเอ็นเอตามลำดับ แต่ไม่สามารถนำไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดนี้ไปใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของกลุ่มผสมนี้ เนื่องจากไพรเมอร์ A03 แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่าง *V. radiata*

กับ *V. umbellata* ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ทำให้ยากต่อการแยกความแตกต่างและมีโอกาสผิดพลาดสูง (ภาพผนวกที่ 1) ส่วนไพรเมอร์ A07 แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่าง *V. radiata* กับ *V. umbellata* เป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใน *V. umbellata* เป็นส่วนใหญ่ (ภาพผนวกที่ 2) ซึ่งอาจทำให้เกิดความผิดพลาดได้ง่ายในการนำไปแยกความแตกต่างระหว่างต้นที่เกิดจากการผสมตัวเองกับต้นที่เกิดจากการผสมข้ามชนิด (Prabakaran and Sujatha, 2004) ดังนั้นจึงไม่เลือกใช้ไพรเมอร์ A03 และ A07 มาใช้ในการตรวจสอบลูกผสมครั้งนี้

การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ *V. mungo* x *V. umbellata* สามารถใช้ไพรเมอร์ A03 และ A07 ซึ่งแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง 5 และ 6 แถบดีเอ็นเอ ตามลำดับ มาใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของกลุ่มผสมครั้งนี้ได้ เนื่องจากทั้งสองไพรเมอร์นี้แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างตัวทั้งสองชนิดได้อย่างชัดเจน ส่วนไพรเมอร์ A02 A13 และ Ax17 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง 5 7 และ 6 แถบดีเอ็นเอตามลำดับ แต่ไม่สามารถนำไพรเมอร์เหล่านี้มาใช้ในการตรวจสอบลูกผสมของครั้งนี้ได้ เนื่องจากไพรเมอร์ A02 และ A13 แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่าง *V. mungo* กับ *V. umbellata* ที่มีขนาดที่ใกล้เคียงกันทำให้ยากในการแยกความแตกต่าง (ภาพผนวกที่ 1 และ 2) ส่วนไพรเมอร์ Ax17 แสดงแถบดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *V. mungo* กับ *V. umbellata* ได้อย่างชัดเจน แต่เมื่อนำไพรเมอร์นี้ไปตรวจสอบความเป็นลูกผสม พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในลูกผสมเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะจาง ๆ ซึ่งไม่เหมาะสำหรับใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสม (Crockett *et al.*, 2002)

3.2 การศึกษาการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอโดยวิธีการเพาะเลี้ยงอวูล์ที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. mungo* *V. radiata* x *V. umbellata* *V. mungo* x *V. umbellata* ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD

จากการสอบความเป็นลูกผสมของต้นอวูล์ที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอโดยวิธีการเพาะเลี้ยงอวูล์ที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดของกลุ่มผสม *V. radiata* x *V. mungo* *V. radiata* x *V. umbellata* และ *V. mungo* x *V. umbellata* พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในต้นตัวอย่างมีบางส่วนที่เหมือนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในฝ่ายพ่อและบางส่วนเหมือนกับที่ปรากฏในฝ่ายแม่ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจีโนมของต้นอวูล์ตัวอย่างที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอนั้นได้รับโครโมโซมบางส่วนมาจากฝ่ายพ่อและได้รับบางส่วนมาจากฝ่ายแม่มารวมกัน (Prabakaran and Sujatha, 2004) โดยแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในผลการทดลองนั้นพบว่า มีแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันอยู่หลายแถบดีเอ็นเอ ซึ่ง

สามารถเลือกแถบดีเอ็นเอเหล่านั้นมาใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมข้ามชนิดได้ และแถบดีเอ็นเอที่นำมาตรวจสอบความเป็นลูกผสมข้ามชนิดในการทดลองที่ 3.2 คือ แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดอยู่ในช่วง 500 -1500 bp หรือชิ้นส่วนที่มีขนาดใกล้เคียงกันกับในช่วงนี้เป็นตัวตัดสินความเป็นลูกผสมข้ามชนิด เนื่องจากแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดมากกว่าหรือน้อยกว่านี้มักจะเกิดการทำให้เข้าไม่ได้ ทั้งนี้รวมถึงแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะจาง ๆ (minor band) ด้วย (Crockett *et al.*, 2002)

การตรวจสอบความเป็นลูกผสมข้ามชนิดในการทดลองนี้พิจารณาจากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในต้นตัวอย่างที่ทดสอบ ซึ่งต้นที่เป็นลูกผสมข้ามชนิดจะต้องมีแถบดีเอ็นเอบางส่วนที่มีขนาดตรงกับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในแถบดีเอ็นเอของต้นพ่อแม่และมีแถบดีเอ็นเอบางส่วนที่มีขนาดตรงกับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในต้นแม่ (Huang and Sheu, 2000) ซึ่งการใช้ลักษณะการปรากฏแถบดีเอ็นเอจากพ่อแม่ที่ปรากฏร่วมกันในลูกเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือต้นที่เป็นลูกผสมข้ามชนิดจัดว่าเป็นวิธีการตรวจสอบความเป็นลูกผสมที่มีประสิทธิภาพ (Arnold *et al.*, 1991; Huang and Sheu, 2000) และถ้าต้นตัวอย่างที่ทดสอบต้นใดปรากฏเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในต้นแม่ แสดงว่าต้นนั้นเกิดจากการผสมตัวเอง (Arnold *et al.*, 1991) ซึ่งจากผลการทดลองที่ 3.2 พบว่า การตรวจสอบความเป็นลูกผสมกับต้นถั่วทุกต้นที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงอวุลเป็นต้นถั่วลูกผสมที่เกิดจากการข้ามชนิดจริงทุกต้น

4. การศึกษาวิธีการเพิ่มจำนวนต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดในสภาพปลอดเชื้อ

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนที่มีตาจากส่วนที่มีตายอด (apical shoot) และตาข้าง (axillary bud) ของต้นลูกผสมข้ามชนิด ทั้งในลูกผสมระหว่าง *V. radiata* กับ *V. mungo* และในคู่ผสมระหว่าง *V. mungo* กับ *V. umbellata* บนอาหารสังเคราะห์สูตรชักนำให้เกิดยอดและชักนำให้เกิดราก พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS basal + vitamin B5 + BA ที่ความเข้มข้น 1 2 และ 3 mg/l ไม่สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงเกิดยอดใหม่เกิดขึ้นเลยและอาหารสังเคราะห์สูตร B5+ IBA 2 mg/l ไม่สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงเกิดรากได้เลยเช่นเดียวกัน สาเหตุที่ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดและราก (adventitious shoot and root) กับชิ้นส่วนของต้นลูกผสมข้ามชนิดที่นำมาเพาะเลี้ยงอาจเป็นผลเนื่องมาจากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในอาหารสังเคราะห์ที่อาจยังไม่เหมาะสม ซึ่ง Anju and Jaiwal (1994) ได้รายงานว่า การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนที่มีตาข้างของต้นถั่วเขียวในสภาพปลอดเชื้อจะประสบผลสำเร็จนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ชนิดหรือสูตรอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ชนิดและปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่ใช้ อายุของชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง และชนิดของเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยง ใน

การทดลองนี้คาดว่าสาเหตุที่ทำให้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดได้ในสภาพปลอดเชื้อ อาจเกิดจากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่ยังไม่เหมาะสม เนื่องจากอาหารสังเคราะห์สูตร MS salts + B5 vitamins นั้นมีรายงานว่า สามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของถั่วสกุล *Vigna* ได้ (Anju and Jaiwal, 1992; Anju and Jaiwal, 1994; Renato and Kazumi, 1999) และอายุของเนื้อเยื่อถั่วสกุล *Vigna* ที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงนั้นอย่างน้อยควรมีอายุเกิน 4 วันหลังจากออก (Renato and Kazumi, 1999) ซึ่งการทดลองครั้งนี้ใช้เนื้อเยื่อของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดที่มีอายุ 2 สัปดาห์ และใช้ส่วนเนื้อเยื่อที่มีตายอดกับตาข้างมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อซึ่งน่าจะเกิดการพัฒนายอดและรากใหม่ขึ้นได้ (Anju and Jaiwal, 1992; Anju and Jaiwal, 1994; Goel *et al.*, 1983; Kartha *et al.*, 1981; Renato and Kazumi, 1999) แต่ในส่วนของการควบคุมการเจริญเติบโตพืชนั้น พบว่า ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่ระดับหนึ่งจะส่งผลอย่างมากต่อการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาที่แตกต่างกันกับเนื้อเยื่อพืชที่มีพันธุกรรม (genotype) ที่ต่างกัน (Anju and Jaiwal, 1992; Anju and Jaiwal, 1994; Renato and Kazumi, 1999) ดังนั้นต้นถั่วที่ได้จากการผสมข้ามชนิดในแต่ละคู่ผสมนั้น อาจต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่มีชนิดและปริมาณที่แตกต่างกันเพื่อกระตุ้นให้เกิดการเจริญของยอดหรือราก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไปเพื่อหาคำตอบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่เหมาะสมควรเป็นสารชนิดใดและใช้ในปริมาณเท่าใด และสาเหตุที่ทำให้เกิดแคลลัสบริเวณส่วนของเนื้อเยื่อที่สัมผัสกับอาหารนั้น อาจเกิดจากความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชประเภทไซโตไคนินที่ใช้ซึ่งมีความเข้มข้นสูงเกินไป โดยปกติแล้วไซโตไคนินจะช่วยชักนำให้เกิดยอดใหม่ แต่ถ้าปริมาณความเข้มข้นของไซโตไคนินที่ใช้มีปริมาณที่สูงเกินไปจะทำให้ชิ้นส่วนที่ทำการเพาะเลี้ยงนั้นเกิดแคลลัสได้ (Sagare *et al.*, 2000)

การย้ายปลูกลงในสภาพธรรมชาติของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดที่ได้จากการช่วยชีวิตเอ็มบริโอโดยการเพาะเลี้ยงอวูลของ *V. radiata* x *V. mungo* *V. mungo* x *V. umbellata* และ *V. radiata* x *V. umbellata* พบว่า ต้นที่ได้จากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. mungo* และ *V. mungo* x *V. umbellata* ไม่ประสบความสำเร็จในการย้ายปลูก เนื่องจากต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดทั้งสองคู่ผสมนี้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้บนอาหารสังเคราะห์สูตรชักนำให้เกิดต้นและเกิดราก ดังนั้นจึงต้องนำต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดทั้ง 2 คู่ผสมนี้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอวูลโดยตรงมาทำการย้ายปลูก ซึ่งต้นถั่วลูกผสมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอวูลนั้นมีการพัฒนาของระบบรากที่ไม่สมบูรณ์และมีแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณราก อาจเป็นเพราะอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงอวูลมี IAA และ kinetin เป็นองค์ประกอบ ซึ่งอาจมีความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชทั้งสองตัวนี้ที่เหมาะสมทำให้เกิดการงอกของอวูลได้ดี แต่อาจไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาของราก จึงส่งผลทำให้

ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดทั้งสองกลุ่มนี้เกิดการพัฒนาของระบบรากได้น้อยและยังพบแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณรากต้นถั่วลูกผสมด้วย โดยปกติแล้วการแบ่งเซลล์ของพืชจะเกี่ยวข้องกับสมดุลของฮอร์โมนระหว่างออกซินกับไซโตไคนิน ซึ่งการเพิ่มออกซินลงในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นถั่วลูกผสมในปริมาณที่สูงเกินไปอาจทำให้ความสมดุลระหว่างออกซินกับไซโตไคนินในชั้นส่วนของถั่วลูกผสมที่นำมาเพาะเลี้ยงนั้นเปลี่ยนไป เมื่อเนื้อเยื่อต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดที่ทำการเพาะเลี้ยงนั้นมีอัตราส่วนของออกซินในปริมาณที่สูงและมีไซโตไคนินที่ต่ำกว่าอาจจะส่งผลให้เนื้อเยื่อของต้นถั่วลูกผสมที่ทำการเพาะเลี้ยงนั้นเกิดการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างแคลลัส (Zin *et al.*, 1997) ดังนั้นเมื่อทำการย้ายปลูกต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดทั้งสองกลุ่มนี้ลงในวัสดุปลูก รากของต้นถั่วลูกผสมอาจจะไม่สามารถดูดธาตุอาหารและน้ำได้อย่างเต็มที่ จึงส่งผลให้ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดนั้นตายในระหว่างการย้ายปลูก

อย่างไรก็ตามการย้ายปลูกต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของกลุ่มผสม *V. radiata* x *V. umbellata* สามารถประสบความสำเร็จได้เป็นอย่างดี โดยสามารถย้ายปลูกและรอดชีวิตได้หมดทุกต้น เนื่องจากต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดนี้สามารถเพิ่มจำนวนต้นได้บนอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสูตร B5 + IBA 2 mg/l และ B5 โดยอาหารสังเคราะห์สูตร B5 ที่มีการเติม IBA 2 mg/l นั้นสามารถกระตุ้นให้ชิ้นส่วนยอดของกลุ่มผสมนี้เกิดรากได้เร็วกว่าอาหารสังเคราะห์สูตร B5 แต่รากที่เกิดขึ้นนั้นมีแคลลัสเกิดขึ้นด้วย ซึ่งแคลลัสที่เกิดขึ้นอาจมีผลในการขัดขวางการดูดซึมอาหารและน้ำของรากหลังการย้ายปลูก ขณะที่อาหารสังเคราะห์สูตร B5 ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจะทำให้ชิ้นส่วนเกิดรากได้ช้ากว่าอาหารสังเคราะห์ที่เติม IBA 2 mg/l แต่ปรากฏว่ารากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร B5 มีลักษณะเรียวยาว เล็ก และไม่เกิดแคลลัส ดังนั้นอาหารสูตร B5 จึงเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต้นถั่วลูกผสมเพื่อกระตุ้นให้เกิดรากก่อนการย้ายปลูกได้ดีกว่าอาหารสูตร B5 + IBA 2 mg/l นอกจากนี้อาจต้องศึกษาหาความเข้มข้นของ IBA ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการชักนำให้เกิดรากในต้นถั่วลูกผสมต่อไป

หลังการย้ายปลูก พบว่า ต้นถั่วลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* สามารถออกดอกได้ตามปกติและดอกที่ได้สามารถเกิดการผสมตัวเองและติดฝักอ่อน แต่ฝักอ่อนดังกล่าวจะเกิดการร่วงภายใน 1-2 วันหลังการผสมเกสร ซึ่งตรงกับรายงานของ Ahn and Hartmann (1978) และ Rashid *et al.* (1987) ที่รายงานว่า ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* สามารถติดฝักได้ แต่ฝักที่ได้นั้นจะเกิดการร่วงภายใน 1-2 วันหลังการผสมเกสร และไม่พบฝักที่สามารถพัฒนาจนถึงระยะฝักแก่เลย

5. การศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสรของถั่วลูกผสมข้ามชนิด

ก่อนทำการทดลองศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสรจากต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิด *V. radiata* x *V. umbellata* ได้ทำการเพาะเลี้ยงละอองเกสรของถั่ว *V. radiata* กับ *V. umbellata* ที่ใช้เป็นพ่อแม่ในการผสมเกสรบนอาหารเพาะเลี้ยงละอองเกสรสูตร Brewbaker and Kwack (1963) เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการงอกของละอองเกสรเพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการตรวจสอบความมีชีวิตของละอองเกสรของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิด โดยการทดสอบความงอกของละอองเกสรของต้นพ่อและต้นแม่ พบว่า เฉพาะอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 15% (w/v) ทำให้ละอองเกสรของ *V. radiata* และ *V. umbellata* งอกได้ดี อาจเป็นเพราะน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 15% (w/v) เป็นความเข้มข้นที่ทำให้พลังงานกัมกับตัวละลาย (osmotic potential) ในอาหารสังเคราะห์มีค่าที่พอเหมาะที่ส่งเสริมให้น้ำและองค์ประกอบต่าง ๆ ที่อยู่ในอาหารสังเคราะห์เกิดการเคลื่อนที่เข้าสู่ภายในละอองเกสรในระดับที่พอเหมาะแก่ความต้องการในการงอกของหลอดละอองเกสร ซึ่ง Shivanna (2003) ได้รายงานไว้ว่า อัตราการดูดน้ำเข้าสู่ละอองเกสรที่เหมาะสมเป็นปัจจัยแรกที่ทำให้กระตุ้นให้เกิดการงอกของละอองเกสร นอกจากนี้ น้ำตาล ซูโครสยังเป็นแหล่งของคาร์บอนที่เป็นสารตั้งต้น (substrate) สำหรับกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ของละอองเกสรด้วย และยังพบว่า น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 15% (w/v) ไม่ทำให้เกิดความเสียหายต่อละอองเกสร โดยความเข้มข้นของน้ำตาลที่ต่ำเกินไปในอาหารสังเคราะห์จะส่งผลทำให้เกิดการแตกของละอองเกสรเกิดขึ้นเนื่องจากน้ำจากอาหารสังเคราะห์เคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์ของละอองเกสรมากเกินไปตามค่าพลังงานศักย์ของน้ำ หากความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสมีความเข้มข้นมากเกินไปจะส่งผลทำให้ละอองเกสรเกิดการเหี่ยวเหี่ยว เนื่องจากน้ำภายในละอองเกสรเคลื่อนที่ออกสู่อาหารสังเคราะห์ตามค่าพลังงานศักย์ของน้ำภายในเซลล์ของเกสรที่มีค่าสูงกว่าภายในอาหารสังเคราะห์ (Jayaprakash and Sarla, 2001; Shivanna, 2003) ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 15% (w/v) ไปใช้ในอาหารสังเคราะห์สูตร Brewbaker and Kwack (1963) ในการตรวจสอบความมีชีวิตของละอองเกสรของถั่วลูกผสมข้ามชนิดต่อไป

จากการทดลองการเพาะเลี้ยงละอองเกสรของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* บนอาหารสังเคราะห์สูตร Brewbaker and Kwack (1963) ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 15% (w/v) พบว่า ละอองเกสรของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดที่เก็บจากเวลาต่าง ๆ กันไม่สามารถเกิดการงอกได้เลย และยังพบว่า ละอองเกสรของถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* มีลักษณะที่ผิดปกติคือ มีขนาดไม่สม่ำเสมอ กัน บางเซลล์มีขนาดใหญ่ บางเซลล์มีขนาดเล็ก ซึ่งอาจเกิดจากในช่วงการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในระยะ zygotene ของ

prophase I ของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสซึ่งในต้นพืชปกติทั่วไปเป็นระยะที่ต้องมีการเข้าสู่ของ homologous chromosome (Geoffrey, 2000) แต่ในต้นลูกผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* มีชุดของโครโมโซมจาก *V. radiata* ครึ่งหนึ่ง และของ *V. umbellata* อีกครึ่งหนึ่ง ทำให้โครโมโซมในต้นลูกผสมข้ามชนิดส่วนใหญ่ไม่สามารถเกิดการเข้าคู่กันได้ตามปกติ (Edgawa et al., 1987) ดังนั้นเมื่อเซลล์ของเกสรเข้าสู่ระยะ anaphase I ของการแบ่งเซลล์ ซึ่งโครโมโซมจะมีการเคลื่อนที่เข้าสู่ขั้วของเซลล์แบบสุ่ม จึงทำให้บางเซลล์มีจำนวนโครโมโซมมากกว่าปกติและบางเซลล์มีโครโมโซมน้อยกว่าปกติ ส่งผลให้ละอองเกสรที่ได้จากการแบ่งเซลล์นั้นมีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน ซึ่งอาจจะส่งผลต่อเนื่องทำให้โปรตีนและสารประกอบต่าง ๆ ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาภายในเซลล์มีปริมาณที่แตกต่างกันด้วย ทำให้ละอองเกสรที่ได้นั้นมีลักษณะไม่สม่ำเสมอและไม่สามารถทำหน้าที่ตามปกติได้ (Ahn and Hartmann, 1978) จึงไม่เกิดการงอกของละอองเกสร ซึ่งหมายความว่าละอองเกสรของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดคู่นี้ไม่มีชีวิตและไม่สามารถทำหน้าที่ในการผสมเกสรได้ตามปกติ

จากการทดสอบความมีชีวิตของละอองเกสร พบว่า ละอองเกสรของลูกผสมข้ามชนิดคู่นี้ไม่สามารถงอกหลอดละอองเกสรได้ ดังนั้นฝักอ่อนที่ติดในระยะแรกที่ปรากฏนั้นอาจเป็นฝักที่ไม่ได้เกิดจากการผสมเกสร เพื่อยืนยันความคิดนี้ ผู้ทดลองจึงได้ทำการเปรียบเทียบการติดฝักอ่อนระหว่างดอกที่มีการตอนเกสรเพศผู้กับดอกที่ไม่มีการตอนเกสรเพศผู้บนต้นลูกผสมต้นเดียวกัน พบว่า ดอกที่มีการตอนเกสรเพศผู้สามารถติดฝักอ่อนได้เช่นเดียวกับดอกที่ไม่มีการตอนเกสรเพศผู้ และมีการร่วงของฝักอ่อนภายใน 1-2 วันเหมือนกัน จึงสามารถบอกได้ว่าฝักอ่อนที่ติดบนต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดคู่นี้เป็นฝักที่ไม่ได้เกิดจากการผสมเกสร แต่อาจเป็นฝักอ่อนที่เกิดการพัฒนาของรังไข่ในขณะที่รอการเกิดกระบวนการปฏิสนธิภายในรังไข่

6. การศึกษาการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของถั่วลูกผสมข้ามชนิด

จากการทดลองการเพิ่มจำนวนต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดด้วยวิธีการ sub culture พบว่า ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* เท่านั้นที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในสภาพปลอดเชื้อ ดังนั้นในการทดสอบการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมจึงสามารถทำการทดลองได้เฉพาะต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata*

6.1 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่เหมาะสมเมื่อหยดลงบนยอดต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดในสภาพปลอดเชื้อ

การศึกษาผลของการหดยาสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันบนยอดของต้นถั่ว ลูกผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* โดยตรงในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า ทุกความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินมีผลทำให้ใบเกิดการเหลืองซีดและเกิดการร่วงในระยะต่อมา ซึ่งสาเหตุของอาการเหลืองซีดและการหลุดร่วงของใบอาจเกิดจากความเป็นพิษของสารละลายโคลชิซินที่มีผลต่อเนื้อเยื่อพืช โดยสารละลายโคลชิซินที่พืชดูดเข้าไปมากเกินไปจะยับยั้งการแบ่งเซลล์ ถ้าเซลล์ใดถูกขัดขวางการแบ่งเซลล์อย่างต่อเนื่องจนทำให้เซลล์นั้นไม่สามารถทนต่อความเสียหายที่เกิดขึ้นได้เซลล์นั้นจะเกิดการตาย (Ghaemi *et al.*, 1994)

อย่างไรก็ตามหลังการเพาะเลี้ยงต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดที่หดยาสารละลายโคลชิซินแล้ว รอดชีวิตจนกระทั่งมีอายุเป็นเวลา 3 สัปดาห์ จะเกิดการแตกยอดและใบใหม่ออกมาจากยอดที่เคยหดยาด้วยสารละลายโคลชิซิน เมื่อนำใบที่แตกจากยอดที่ถูกหดยาด้วยสารละลายโคลชิซินทั้ง 3 ความเข้มข้นไปวัดการเปลี่ยนชุดโครโมโซมด้วยเครื่อง Flow Cytometer พบว่า เฉพาะสารละลายโคลชิซินที่มีความเข้มข้น 0.2% (w/v) เท่านั้นที่สามารถทำให้จำนวนชุดโครโมโซมของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดเพิ่มขึ้น 2 เท่า ซึ่งต่างจากที่ ปาริชาติ (2540) รายงานว่า ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่ 0.3% (w/v) สามารถเพิ่มจำนวนโครโมโซมในถั่วเขียวฝีม้วนได้เป็น 2 เท่า โดยทำการทดลองในสภาพแปลงทดลอง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อมีผนังเซลล์ที่บางกว่าเนื้อเยื่อปกติที่มีการเจริญในสภาพธรรมชาติ หรือ อาจเป็นไปได้ว่า จีโนมของถั่วเขียวฝีม้วนกับถั่วลูกผสมข้ามชนิดมีความแตกต่างกันจึงส่งผลให้ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนโครโมโซมนั้นต่างกัน (Redha *et al.*, 1998) ดังนั้น ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนโครโมโซมในพืชชนิดหนึ่งหรือเนื้อเยื่อหนึ่งอาจแตกต่างกันได้ ส่วนความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่ 0.1% (w/v) พบว่า สามารถทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของจำนวนโครโมโซมได้แต่เพิ่มขึ้นไม่ถึง 2 เท่า ซึ่งอาจเป็นเพราะเกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมได้เพียงบางส่วนเท่านั้น เนื่องจากการทำงานของสารละลายโคลชิซินจะไปจับกับทูบูลินที่เป็นหน่วยย่อย ๆ ในการรวมกันเป็นเส้นใยสปินเดิล โดยในการจับนั้นโคลชิซิน 1 หน่วย จะจับกับทูบูลิน 1 หน่วย (Geoffrey, 2000) ดังนั้นถ้าปริมาณของสารละลายโคลชิซินน้อยเกินไปอาจทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างสายใยสปินเดิลเพียงบางส่วน ซึ่งส่วนที่เหลือก็สามารถที่จะเกิดการแบ่งเซลล์ต่อไปได้ ซึ่งส่งผลให้เซลล์มีโครโมโซมเพิ่มขึ้นแต่ไม่ครบทั้งชุดโครโมโซม ดังนั้นเมื่อตรวจสอบด้วยเครื่อง Flow Cytometer จึงพบว่า จำนวนโครโมโซมมีการเพิ่มขึ้นแต่ไม่ได้เพิ่มเป็น 2 เท่า ส่วนความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่ 0.3% (w/v) พบว่า ไม่สามารถเพิ่ม

จำนวนโครโมโซมได้เลย อาจเนื่องมาจากเป็นความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่สูงเกินไป ทำให้เนื้อเยื่อเจริญที่ได้รับสารละลายโคลชิซินนั้นเกิดอาการเป็นพิษหรือผิดปกติ ทำให้ไม่สามารถแตกยอดออกมาได้ แต่ยอดที่แตกออกมาใหม่ภายหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์อาจเป็นยอดที่พัฒนาจากส่วนที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ดังนั้น เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเครื่อง Flow Cytrometer จึงพบว่า ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของชุดโครโมโซม

6.2 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่เหมาะสมเมื่อเติมลงในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการ sub culture ดันถั่วลูกผสมข้ามชนิด

การเพาะเลี้ยงดันถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* บนอาหารสังเคราะห์ที่เติมสารละลายโคลชิซินลงในอาหารให้มีความเข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.3% (w/v) พบว่า ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่เติมสารละลายโคลชิซินนั้นไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในทุก ๆ ความเข้มข้น และเนื้อเยื่อทุกชิ้นที่ทำการเพาะเลี้ยงนั้นเกิดการตายหลังจากย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร B5 ที่ไม่เติมสารโคลชิซินเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ซึ่ง Ghaemi *et al.* (1994) ได้รายงานว่าเป็นพิษของสารโคลชิซินที่มีต่อเนื้อเยื่อพืชนั้นจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่ใช้และระยะเวลาที่เนื้อเยื่อได้รับสารละลายโคลชิซิน ซึ่งในการทดลองนี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของลูกผสมข้ามชนิดบนอาหารสังเคราะห์ที่มีสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็นเวลา 6 วัน จากนั้นย้ายชิ้นส่วนของลูกผสมข้ามชนิดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 เป็นระยะเวลาหนึ่งแล้วเนื้อเยื่อจึงเกิดการตาย ซึ่งอาจเป็นเพราะระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารละลายโคลชิซินนั้นนานเกินไปจึงทำให้เซลล์ถูกยับยั้งการแบ่งเซลล์เป็นเวลานานเกินไปด้วย จนทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อนั้นไม่สามารถทนต่อความผิดปกตินี้ได้จึงทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อนั้นตาย ดังนั้นในวิธีการทดลองนี้อาจแก้ไขโดยทำการทดลองหาระดับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่เหมาะสมที่ใช้เติมลงในอาหารสังเคราะห์และระยะเวลาการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มีสารโคลชิซินที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มจำนวนโครโมโซมของดันถั่วลูกผสมข้ามชนิดต่อไป

จากการทดลอง พบว่า การใช้สารละลายโคลชิซินที่มีความเข้มข้น 0.2% (w/v) หยดลงบนยอดของชิ้นส่วนดันถั่วลูกผสมข้ามชนิดในสภาพปลอดเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนโครโมโซมของดันถั่วลูกผสมข้ามชนิดจาก 2x เป็น 4x ได้ 15% (3 ต้นจาก 20 ต้น) ส่วนการใช้สารละลายโคลชิซินผสมลงในอาหารสังเคราะห์เพื่อใช้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของดันถั่วลูกผสมข้ามชนิดนั้นไม่สามารถเพาะเลี้ยงให้ดันถั่วลูกผสมมีชีวิตรอดได้ และยังเป็นวิธีการที่ใช้สารโคลชิซินเป็นจำนวนมาก ดังนั้นในการเพิ่ม

จำนวนโครโมโซมของต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *V. radiata* x *V. umbellata* ควรปฏิบัติตาม
วิธีการในการทดลองที่ 6.1

สรุป

1. อายุของอวูลภายหลังการผสมเกสรข้ามชนิดระหว่าง *V. radiata* *V. mungo* และ *V. umbellata* มีผลต่อการประสบความสำเร็จในการช่วยชีวิตเอ็มบริโอด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงอวูล
2. ชนิดของต้นแม่ที่ใช้ในการผสมข้ามระหว่าง *V. radiata* *V. mungo* และ *V. umbellata* มีผลต่อการประสบความสำเร็จในการช่วยชีวิตเอ็มบริโอด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงอวูล
3. เทคนิค RAPD สามารถใช้ตรวจสอบความเป็นลูกผสมในการผสมข้ามชนิดระหว่าง *V. radiata* *V. mungo* และ *V. umbellata* ได้
4. เฉพาะต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* เท่านั้นที่สามารถเพิ่มจำนวนได้บนอาหารสูตร B5 ในสภาพปลอดเชื้อ
5. ต้นถั่วลูกผสมข้ามชนิดของ *V. radiata* x *V. umbellata* สามารถเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมจาก diploid เป็น tetraploid ได้โดยการหยดสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.2% (w/v) ลงบนยอดของต้นถั่วลูกผสมที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กฤษฎา สัมพันธ์รักษ์. 2546. การปรับปรุงพันธุ์พืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2545. ถั่วเขียว. พืชเศรษฐกิจที่สำคัญ. แหล่งที่มา: <http://www.doae.go.th/plant/mungbn.htm>, 11 มีนาคม 2547.

ปาริชาติ ไผ่ผักแว่น. 2540. เทคนิคการชักนำให้เกิดรากจากใบพืชเพื่อใช้ในการตรวจโครโมโซม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2539. พันธุศาสตร์. โรงพิมพ์ไทยชัยวัฒนาพานิช จำกัด, กรุงเทพฯ.

นิศย์ศรี แสงเดือน. 2541. พันธุศาสตร์พืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นาค โพธิ์แท่น. 2548 การปลูกถั่วแดงหรือถั่วเขียวแดง. แหล่งที่มา: http://web.oae.go.th/e_book/plant/peanut.pdf, 6 มกราคม 2549.

รังสฤษฎ์ กาวิต๊ะ. 2539. การปรับปรุงพันธุ์พืชขั้นสูง. ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร. 2548. ตลาดการส่งออกของไทยรายสินค้า. แหล่งที่มา: <http://ops2.moc.go.th/tradeth/cgi/Excomm2.asp>, 6 มกราคม 2549.

สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์. 2539. การปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมชาย บุญประดับ และ มนต์รี ชาตะศิริ. 2540. การปรับปรุงคุณภาพและผลผลิตถั่วเขียวผิวดำเพื่อการส่งออก. สถานีทดลองพืชไร่พิษณุโลก, สถาบันวิจัยพืชไร่, กรมวิชาการเกษตร.

สุนานางามพ่องไส. 2540. การผสมข้ามชนิดระหว่างถั่วเขียวกับถั่วในสกุล *Vigna* ร่วมกับการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สถาบันวิจัยพืชไร่. 2539. **พันธุ์พืชไร่**. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สุรินทร์ ปิยะโชครากุล. 2543. **พันธุ์วิศวกรรมเบื้องต้น**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชครากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2547. นำเข้า/ส่งออก. พืชไร่. ถั่วเขียว. แหล่งที่มา :<http://oae.go.th/Import.php>. 11 มีนาคม 2547.

อรรถัน มงคลพร. 2548. เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. จรัสสินทวงศ์การพิมพ์. กรุงเทพฯ.

Ahn, C.S. and R.W. Hartmann. 1978. Interspecific hybridization among four species of the genus *Vigna* Savi. pp. 240-246. **The 1st International Mungbean Symposium**, Office of the Information Services at AVRDC.

Akpapunam, M. 1996. Mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek), pp. 209-215. In E. Nwokolo and J. Smartt, eds. **Legumes and Oilseeds in Nutrition**. Chapman & Hall., London.

Anju G. and P.K. Jaiwal. 1992. *In vitro* induction of multiple shoots and plant regeneration from shoot tips of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). **Plant Cell Rept.** 29: 199-205.

Anju G. and P.K. Jaiwal. 1994. Plant regeneration from cotyledonary node explants of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). **Plant Cell Rept.** 3: 523-527.

- Arnold, M.L., C.M. Buckner and J.J. Robinson. 1991. Pollen mediated introgression and hybrid speciation in *Louisiana irises*. **Proc. Natl. Zcad. Sci.** 88: 1398-1402.
- Badami, P.S., N. Mallikarjuna and J.P. Moss. 1997. Interspecific hybridization between *Cicer arietinum* and *Cicer pinnatifidum*. **Plant Breed.** 116: 393-395.
- Barone A., A.D. Giudice and N.Q. Ng. 1992. Barriers to interspecific hybridization between *Vigna unguiculata* and *Vigna vexillata*. **Sexual Plant Rep.** 5(3): 195-200.
- Brewbaker, J.L. and B.H. Kwack. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **Am. J. Bot.** 50: 859-865.
- Bridgen, M.P. 1994. A review of plant embryo culture. **Hort Sci.** 29(11): 1243-1245.
- Buitendijk, J.H., N. Pinsonneaux, A.C.V. Donk, M.S. Ramanna and A.A.M.V. Lammeren. 1995. Embryo rescue by half-ovule culture for the production of interspecific hybrids in *Alstroemeria*. **Sci. Hort.** 64: 65-75.
- Caetano, A., G.B.J. Bassam and P.M. Gresshoff. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Bio-Technology.** 9: 553-557.
- Carvalho, N.M. and R.D. Vieira. 1996. Rice bean (*Vigna umbellata* (Thunb) Ohwi et Ohashi). pp. 222-227. In E. Nwokolo and J. Smartt, eds. **Food and Feed Legumes and Oilseeds.** Chapman & Hall., London.
- Chen, N.E., L.R. Baker and S. Honma. 1982. Interspecific crossability among four species of *Vigna* food legumes. **Euphytica** 32: 925-937.
- Chen, C.H. and V.C.C. Kallemeyn. 1979. *In vitro* induction of tetraploid plant from colchicine - treated diploid daylily callus. **Euphytica** 28: 705-709.

- Chi, H.S. 2000. Interspecific cross of lily by *in vitro* pollinated ovules. **Bot. Bull. Acall. Sin.** 41: 143-149.
- Crockett, P.C., M.B. Singh, C.K. Lee and P.L. Bhalla. 2002. Genetic purity analysis of hybrid broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) seeds using RAPD PCR. **Aust. J. Agric. Res.** 53: 51-54.
- Deverna, J.W., J.R. Myers and G.B. Collins. 1987. Bypassing prefertilization barriers to hybridization in nicotina using *in vitro* pollination and fertilization. **Theo. App. Gen.** 73: 665-671.
- Edgawa, Y., M. Nakagahra and G.C.J. Fernandez. 1987. Cytogenetical analysis of tetraploid *Vigna glabrescens* by interspecific hybridization involving diploid asian *Vigna* species. pp. 200-204. In **Mung bean: proceeding of the second international sym.** AVRDC, Shunhun, Tainan.
- Fujima, Y., S. Dumrongkittikule, G. Meng, N. Okuda and T. Matsui. 2000. Effects of the species of female parent and the age ovule on interspecific hybrid formation in several brassicas by ovule culture. **J. SHITA.** 12(1): 10 – 17.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. **Exp. Cell. Res.** 50: 152-158.
- Geoffrey, M.C. 2000. **The Cell a Molecular Approach.** 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Ghaemi, M., A. Sarrafi and G. Alibert. 1994. The effect of silver nitrate, colchicines, copper sulphate and genotype on the production of embryoids from anthers of tetraploid Wheat (*Triticum turgidum*). **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 36: 355-359.

- Gmitter, F.G., J.R.X. Ling, C. Cai and J.W. Grosser. 1991. Colchicine induce polyploid in citrus embryogenic culture, somatic embryo and regenerate plantlets. **Plant Sci.** 74: 135-141.
- Goel, S., A.K. Mudgal and S.C. Gupta. 1983. Development of plants from *in vitro* cultured shoot tips of *Vigna mungo* and *V. radiata*. **Trop. Plant. Sci. Res.** 1: 31-33.
- Gu, X.F., A.F. Yang, H. Meng and J.R. Zhang. 2005. *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. Cv. Zhanhua. **Plant Cell Rep.** 24: 617-676
- Hadley, H.H. and S.J. Openshaw. 1980. Interspecific and Intergeneric Hybridization, pp. 133-159. In Walter, E. and H.H. Hadley, eds. **Hybridization of Crop Plant**. American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, Publishers, USA.
- Huang, S.C. and C.S. Sheu. 2000. Genetic analysis of *Chrysanthemum* hybrids based on RAPD moleculars. **Bot. Bull. Acad. Sin.** 41: 257-262.
- Ida, A.A., J.A. Plummer, R.A. Lancaster and G. Yan. 2004. Fingerprinting of cauliflower cultivars using RAPD markers. **Aust. J. Res.** 55: 117-124.
- Jayaprakash, P. and N. Sarla. 2001. Development of an improved medium for germination of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. pollen *in vitro*. **J. Exp. Bot.** 53: 851-855.
- Kadota, M. and Y. Niimi. 2002. *In vitro* induction of tetraploid from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. CV. Hosu). **Plant Cell Rep.** 21: 282-286.
- Kartha, K.K., K. Pahl, N.L. Leung and L.A. Mroginski. 1981. Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpea, peanut, checkpea and bean. **Can. J. Bot.** 59: 1671-1679.

- Kumlehn, J., O. Schieder and H. Lorz. 1997. *In vitro* development of wheat (*Triticum aestivum* L.) from zygote to plant via ovule culture. **Plant Cell Rep.** 16: 663-667.
- Lu, P. 1996. Varietal verification of *Ceratotropis* species using isozyme. **ARC Training**. Available source: <http://www.arc-avrdc.org/pdf-files/Luping>, November 24, 2003.
- Mallikarjuna, N. 1999. Ovule and embryo culture to obtain hybrids from interspecific incompatible pollinations in chickpea. **Euphytica** 110: 1-6.
- Manirul, M.I. 1991. Interspecific hybridization between *Vigna radiata* (L) Wilczek and *V. mungo* (L.) Hepper. **Acta Hort.** 289: 241-242.
- Morell, M.K., R. Peakall, R. Appels, L.R. Preston and H.L. Loyd. 1995. DNA profiling techniques for plant variety identification. **Aust. J. Exp. Agric.** 35: 807-819.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue culture. **Plant Physiol.** 15: 473-497.
- Ngampongsai, S., S. Pichitporn, W. Promkum, Y. Egawa and P. Srinives. 1996. Interspecific hybridization of mung bean and related species using embryo rescue techniques, pp. 41-46. *In* **Proceeding of the workshop on mung bean germplasm**. JIRCA, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries.
- Pellegrineschi, C., A. Fatukun, G. Thottappilly and A.A. Adepoju. 1997. Cowpea embryo rescue. 1. Influence of culture media composition on plant recovery from isolated immature embryos. **Plant Cell Rep.** 17: 133-138.
- Pickersgill, B. 1993. Interspecific hybridization by sexual means. pp. 63-78. *In* Hayward, M.D., N.O. Bosemark and I. Romagosa, eds. **Plant Breeding : Principles and Prospects**. Chapman & Hall, London.

- Pierik, R.L.M. 1987. ***In vitro* culture of higher plants**. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands. 344 pp.
- Prabakaran, A.J. and M. Sujatha. 2004. Interspecific hybrid of *Helianthus annuus* x *H. simulans*: characterization and utilization in improvement of cultivated sunflower (*H. annuus* L.). **Euphytica** 135: 275-282.
- Rashid, K.A., J. Smartt and N. Hag. 1987. Hybridization in the genus *Vigna*. pp. 205-221. In **Mung bean: proceeding of the second international sym.** AVRDC, Shunhun, Tainan.
- Rattan, L.A. 1998. **Fundamentals of plant breeding & hybrid seed production**. Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire.
- Redha, A., T. Attia, B. Buter, S. Saisingtong, P. Stamp and J.E. Schmid. 1998. Improved production of doubled haploids by colchicines application to wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. **Plant Cell Rep.** 17: 974-979.
- Renato, A.A. and H. Kazumi. 1999. Differences in shoot regeneration response from cotyledonary node explants in Asiatic *Vigna* species support genomic grouping within subgenus *Ceratotropis* (piper) Verdc. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 58: 99-110.
- Rey, H.Y., P.A. Sansberro, M.M. Collavino, J.R. Davina, A.M. Gonzalez and L.A. Mroginski. 2001. Colchicine, trifluralin, and oryzalin promote development of somatic embryos in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **Euphytica** 123: 49-56.
- Sagare, A.P., Y.L. Lee, T.C. Chen and H.S. Tsay. 2000. Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusou* (Fumariaceae) a medicinal plant. **Plant Sci.** 160 (200): 139-147.
- Sharma, D.R., R. Kaur and K. Kumar. 1996. Embryo rescue in plants – a review. **Euphytica** 89: 325-337.

- Shanmugasundaram, S. 1996. Mungbean. pp. 137-172. *In* P.N. Bahl and P.M. Salimath, eds. **Genetic Cytogenetics & Breeding of Crop Plant**. Volume 1, Pulses & Oilseed. Lebanon.
- Shivanna, K.R. 2003. **Pollen biology and biotechnology**. Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire.
- Siemens, J. 2002. Interspecific hybridisation between wild relatives and *Brassica napus* to introduce new resistance traits into the oilseed rape gene pool. **Czech J. Genet. Plant Breed.** 38: 155–157.
- Sree, R., V. Muralidharan and R. Rathnasamy. 1987. Breeding behavior of *Vigna radiata* – *Vigna mungo*. pp. 187-198. *In* **Mung bean: proceeding of the second international sym.** AVRDC, Shunhun, Tainan..
- Sudripta, D., T.B. Jha and S. Jha. 1999. Factors affecting *in vitro* development of embryonic axes of cashewnut. **Sci. Hort.** 82: 135-144.
- Tomooka, N., C. Lairungreang and Y. Egawa. 1996. Taxonomic position of wild *Vigna* species collected in Thailand based on RAPD analysis. pp. *In* **Proceeding of the workshop on mung bean germplasm**. JIRCA, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries.
- Tomooka, N., C. Lairungreang, P. Nakeeraks, Y. Egawa and C. Thavarasook. 1991. pp. 1-24. *In* **Mungbean and the genetic resources of the sub genus *ceratotropis***. JIRCA, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries.
- Verma, S.N.P. and H.S. Yadava. 1986. Improvement of greengram through interspecific hybridization. **Ind. J. Agric. Sci.** 56: 296-297.

Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary Primer. **Nucl. Acids Res.** 18: 7213-7218.

Zin, H.L., W.C. Wang and S.Y. Yan. 1997. Effect of hormone treatment on callus formation and endogenous indole-acetic acid and polyamine contents of soybean hypocotyls cultivated *in vitro*. **Bot. Bull. Acad. Sin.** 38: 171-176.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารสังเคราะห์สูตร MS basal medium (Murashige and Skoog, 1962)

องค์ประกอบ	ปริมาณ (mg/l)
<u>Stock 1 Macronutrients (10X)</u>	
NH_4NO_3	16,500
KNO_3	19,000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,400
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,700
KH_2PO_4	1,700
<u>Stock 2 Micronutrients (200X)</u>	
KI	166
H_3BO_3	1,240
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	4,460
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,720
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5
<u>Stock 3 Fe-EDTA solution (100X)</u>	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,785
Na_2EDTA	3,725
<u>Stock 4 Organic compounds (100X)</u>	
Myo-inositol	10,000
Glycine	200
Nicotinic acid	50
Pyridoxine-HCl	50
Thiamine-HCl	10
<u>Others</u>	
Sucrose	30,000
pH	5.7-5.8

ตารางผนวกที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารสังเคราะห์สูตร Gamborg B-5 media (B5)
(Gamborg et al., 1968)

องค์ประกอบ	ปริมาณ (mg/l)
<u>Stock 1 Macronutrients (20X)</u>	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,680
KNO_3	50,000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,000
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3,000
<u>Stock 2 Vitamins (200X)</u>	
Myo-inositol	4,000
Nicotinic acid	40
Pyridoxine-HCl	40
Thiamine-HCl	200
<u>Stock 3 Fe-EDTA solution (100X)</u>	
FeSO_4	1,390
Na_2EDTA	1,865
<u>Stock 4 Micronutrients (200X)</u>	
KI	75
H_3BO_3	300
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,000
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2.5
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.5
<u>Others</u>	
Sucrose	30,000
pH	5.7-5.8

ตารางผนวกที่ 3 ไพรมเมอร์ RAPD ที่นำมาคัดเลือกเพื่อใช้แยกความแตกต่างระหว่าง *V. radiata*
V. mungo และ *V. umbellata*

ไพรมเมอร์	ลำดับเบส
A01	CAGGCCCTTC
A02	TGCCGAGCTG
A03	AGTCAGCCAC
A04	AATCGGGCTG
A05	AGGGGTCTTG
A06	GGTCCCTGAC
A07	GAAACGGGTG
A08	GTGACGTAGG
A09	GGGTAACGCC
A10	GTGATCGCAG
A11	CAATCGCCGT
A12	TCGGCGATAG
A13	CAGCACCCAC
A14	TCTGTGCTGG
A15	TTCCGAACCC
A16	AGCCAGCGAA
A18	AGGTGACCGT
A20	GTTGCGATCC
AE19	GACAGTCCCT
AG16	CCTGCGACAG
AI01	GGCATCGGCT
AI02	AGCCGTTCAG
AK04	AGGGTCGGTC
AK10	CAAGCGTCAC
AN19	ACCACGCCTT
AO18	GGGAGCGCTT

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

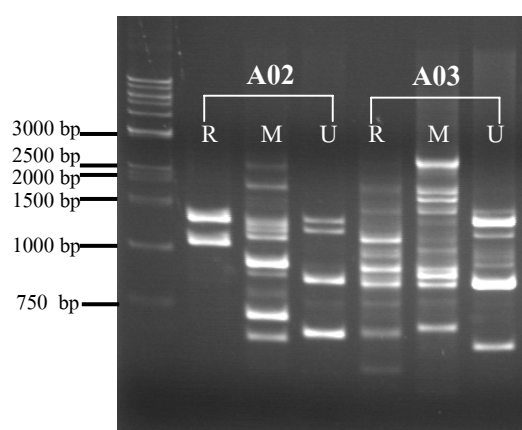
ไพรเมอร์	ลำดับเบส
AT07	ACTGCGACCA
AU03	ACGAAACGGG
AX17	TGGGCTCTGG
C02	GTGAGGCGTC
C03	GGGGGTCTTT
C04	CCGCATCTAC
C06	GAACGGACTC
C08	TGGACCGGTG
C11	AAAGCTGCGG
C14	TGCGTGCTTG
C16	CACACTCCAG
C17	TTCCCCCAG
C18	TGAGTGGGTG
D20	ACCCGGTCAC

ตารางผนวกที่ 4 สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากพืช

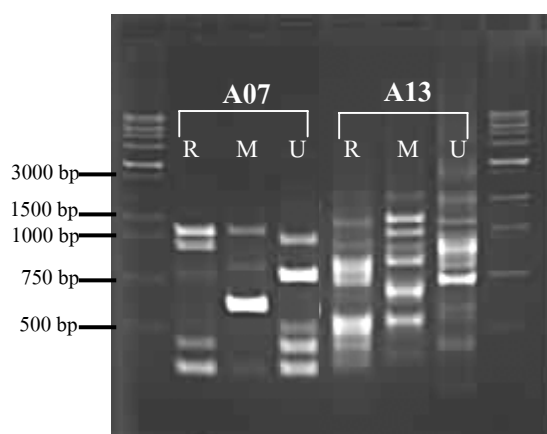
องค์ประกอบ	ปริมาณ
<u>Extraction buffer</u>	
Tris-HCL (pH8)	100 mM
EDTA (pH8)	20 mM
NaCl	1.4 M
CTAB	2% (w/v)
<u>TE buffer</u>	
Tris-HCL	10 mM
EDTA	1 mM

ตารางผนวกที่ 5 การเตรียมส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR ของ RAPD

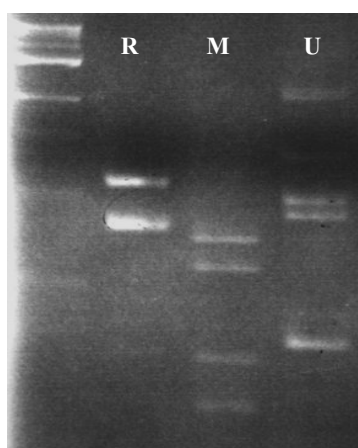
สารองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR	ปริมาณที่ใช้ต่อ 1 ปฏิกิริยา
10X PCR buffer	2.5 μ l
25 mM MgCl ₂	2.5 μ l
1 mM dNTP	5 μ l
10 μ M RAPD primer	1 μ l
5U/ μ l <i>Taq</i> polymerase	0.2 μ l
100 X BSA	0.3 μ l
20 ng DNA template	1 μ l
dH ₂ O	<u>12.5 μl</u>
Total volume	<u>25 μl</u>



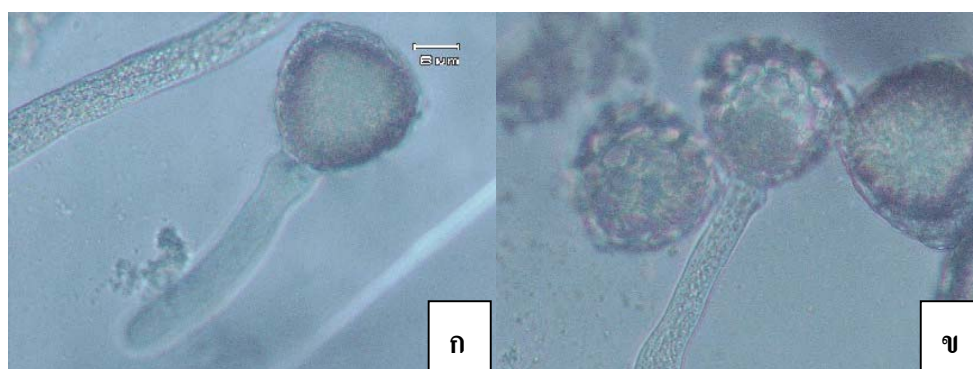
ภาพผนวกที่ 1 แอปดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่าง *V. radiata* (R) *V. mungo* (M) และ *V. umbellata* (U) เมื่อตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ A02 และ A03



ภาพผนวกที่ 2 แอบริเอ็นเอทีแสดงแตกต่างระหว่าง *V. radiata* (R) *V. mungo* (M) และ *V. umbellata* (U) เมื่อตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ A07 และ A13



ภาพผนวกที่ 3 แอบริเอ็นเอทีแสดงแตกต่างระหว่าง *V. radiata* (R) *V. mungo* (M) และ *V. umbellata* (U) เมื่อตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ Ax17



ภาพผนวกที่ 4 ละอองเกสรของ *V. radiata* (ก) และ *V. umbellata* (ข) ที่งอกในอาหารสังเคราะห์
สูตร Brewbaker and Kwack (1963) ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 15% (w/v)