การปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งโดยวิธีผสมกลับและการเพาะเลี้ยงอับเรณูร่วมกับการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

Improvement of Rice KDML105 for Bacterial Blight Resistance by Backcross Method, Anther Culture and Marker Assisted Selection

คำนำ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของโลก ประชากรกว่าครึ่งโลกบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญ พื้นที่ทางการเกษตรของประเทศไทยเกือบครึ่งถูกใช้ในการทำนาและกว่าร้อยละ 60 ของครัวเรือนปลูกข้าวไว้เพื่อบริโภคและ/หรือเพื่อการค้า ทำให้ในแต่ละปีประเทศไทยมีรายได้จากการส่งออกข้าวและผลิตภัณฑ์เกือบแสนล้านบาท และส่งออกเป็นอันดับต้น ๆ ของโลกอย่างต่อเนื่องมากว่า 20 ปี (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2547)

ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่เกษตรกรในประเทศไทยนิยมปลูก ทั้งเพื่อบริโภคภายในประเทศและส่งออกไปยังต่างประเทศ เป็นที่รู้จักในชื่อ Jasmine Rice, Fragrant Rice และ Thai Hom Mali Rice เนื่องจากเป็นข้าวหอมที่มีคุณภาพการหุงต้มที่ดีหลายประการ ตามแนวยุทศาสตร์ที่ 1 ในยุทศาสตร์ข้าวของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ปี 2547-2551 ได้กำหนดพื้นที่ปลูกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ไว้ทั้งในเขตภาคเหนือตอนบน ภาคเหนือตอนล่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนและตอนล่าง และในภาคกลางเขตนาลุ่มปานกลาง โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อเพิ่มผลผลิตโดยรวมของข้าวขาวดอกมะลิ105 (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2547) อย่างไรก็ตามข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 เป็นพันธุ์ข้าวที่ไม่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง (bacterial blight) ซึ่งจัดเป็นโรคข้าวที่มีความสำคัญเนื่องจากมีการแพร่ระบาดในหลายพื้นที่ มีรายงานว่าการเข้าทำลายของโรคขอบใบแห้งสามารถทำให้ผลผลิตของข้าวเสียหายอย่างมาก โดยจะทำให้ผลผลิตลดลงตั้งแต่ 10-50 เปอร์เซ็นต์ตามระดับความรุนแรงของโรค ในประเทศไทยมีพันธุ์ข้าวต้านทานที่แนะนำให้เกษตรกรปลูกในพื้นที่ที่มีการแพร่ระบาดของโรค เช่นพันธุ์ กข5, กข7 และกข23 (กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, 2543) แต่คุณภาพเมล็ดของพันธุ์ข้าวเหล่านี้ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากคุณภาพข้าวสุกไม่นุ่มหอมเท่ากับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ได้พันธุ์ที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งและยังคงมีลักษณะคุณภาพเมล็ดที่ดีบางประการของพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ไว้จะทำให้เกษตรกรมีทางเลือกที่จะปลูกข้าวพันธุ์ใหม่ๆ ได้มากขึ้น

วิธีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวมีหลายวิธีได้แก่ การนำพันธุ์ข้าวจากท้องถิ่นต่างๆ เข้ามาปลูก การคัดเลือกพันธุ์และการผสมพันธุ์ข้าว(ประพาส, 2531) รวมทั้งการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมโดยการชักนำให้เกิดการกลาย(mutation)โดยรังสี และสารเคมีและการใช้เทคโนโลยีชีวภาพและพันธุวิศวกรรม (วาสนา, 2538) การเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมร่วมการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมแบบทวีคูณด้วยสารโคลชิซินสามารถนำมาใช้ในการพัฒนาพันธุ์ข้าวได้เป็นอย่างดี เนื่องจากจะทำให้ต้นข้าวที่ได้เข้าสู่สภาพพันธุ์แท้ (pure line) ได้เร็วกว่าวิธีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวแบบดั้งเดิม (conventional breeding) ซึ่งจะต้องปล่อยให้ต้นข้าวลูกผสมเกิดการผสมตัวเองอย่างน้อย 6-7 ชั่วอายุจึงจะเข้าสู่สภาพพันธุ์แท้ นอกจากนี้ยังอาจนำเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่างๆ มาใช้ในการคัดเลือกต้นพืชที่มีลักษณะที่ต้องการ ทำให้นักปรับปรุงพันธุ์สามารถคัดเลือกต้นพืชที่มีลักษณะที่ต้องการได้ในระดับดีเอ็นเอโดยไม่ต้องรอให้ต้นข้าวแสดงฟีโนไทป์ที่ต้องการออกมาก่อน การคัดเลือกด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอจึงช่วยลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้เป็นอย่างดี

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้มีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง ด้วยวิธีผสมกลับและเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (KDML 105//IRBB5/KDML 105) ร่วมกับการคัดเลือกต้นที่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ และมีวัตถุประสงค์รองดังนี้

1. เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของต้นข้าวลูกผสมกลับชั่วที่1 (KDML105//IRBB5/KDML105)

2. เพื่อคัดเลือกต้นข้าว BC_1 BC_1F_1 และต้นข้าวแฮพลอยด์ที่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

3. เพื่อศึกษาลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของต้นข้าว BC_1F_1 และต้นข้าวแฮพลอยด์ที่มียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง เพื่อคัดเลือกต้นที่มีพันธุกรรมเหมือนกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 มากที่สุด

4. เพื่อศึกษาจำนวนวันที่เหมาะสมในการได้รับสารโคลชิซินของหน่อข้าวแฮพลอยด์ที่สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมแบบทวีคูณ

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของข้าว

ข้าวเป็นพืชผสมตัวเองจัดอยู่ในวงศ์ (family) Gramineae สกุล (genus) *Oryza* ซึ่งประกอบด้วยข้าวป่า 20 ชนิด (species) และข้าวปลูก 2 ชนิดได้แก่ *O. sativa* และ *O. glaberrima* ข้าวปลูกชนิด *O. sativa* แบ่งเป็น 3 กลุ่มตามความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของต้น เมล็ด การแพร่กระจายและสภาพภูมิประเทศของแหล่งปลูก (ecospecies) ได้แก่ ข้าวจาปอนิกา (japonica) ซึ่งเป็นข้าวที่มีลำต้นเตี้ย ใบตั้งและสั้น เมล็ดป้อม นิยมปลูกในประเทศจีน เกาหลี และญี่ปุ่น ข้าวอินดิกา (indica) เป็นข้าวต้นสูง เมล็ดยาว ใบมากและโค้งงอ ปลูกมากในไทย จีน ลาว เวียดนาม กัมพูชา และฟิลิปปินส์ และข้าวจาวานิกา (javanica) มีลักษณะต้นสูง รวงยาว เมล็ดป้อมใหญ่ ให้ผลผลิตต่ำ ปลูกเฉพาะในฟิลิปปินส์และอินโดนิเซียเท่านั้น (ประพาส, 2531; Chang, 1976)

1.1 ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวปลูกชนิด *O. sativa* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มอินดิกา มีชื่อที่แท้จริงว่า ขาวดอกมะลิ 4-2-105 เป็นข้าวเจ้าพันธุ์พื้นเมือง ที่นายสุนทร สีหะเนิน พนักงานเกษตรรวบรวมจากอำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา เมื่อ พ.ศ. 2493-2494 จำนวน 199 รวง แล้วนำไปคัดเลือกแบบคัดพันธุ์บริสุทธิ์ จากนั้นจึงมีการพิจารณาให้ใช้ปลูกขยายพันธุ์ในปี พ.ศ. 2502 ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีลำต้นสีเขียวจาง ความสูงของต้นเฉลี่ยประมาณ 1.4-1.5 เมตร การแตกกอดีและมีใบค่อนข้างเล็ก ทนต่อสภาพแห้งแล้ง ขนาดเมล็ดข้าวกล้อง หนา 1.07 มิลลิเมตร กว้าง 2.1 มิลลิเมตร และยาว 7.6 มิลลิเมตร มีคุณภาพหุงต้มดี เมล็ดข้าวสุกเหนียวนุ่มและมีกลิ่นหอม มีวิตามินบี 1 และ บี 2 เท่ากับ 21.2 และ 6.4 ไมโครกรัม มีกรดอะมิโนไลซีน 1.3 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีน 9.5 เปอร์เซ็นต์ ข้อด้อยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ได้แก่ ผลผลิตค่อนข้างต่ำ ไม่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง โรคไหม้ และโรคใบหงิก ไม่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเพลี้ยจักจั่นสีเขียวและหนอนกอ (วาสนา, 2538)

1.2 ข้าวสายพันธุ์ IRBB5

ข้าวสายพันธุ์ IRBB5 เป็นพันธุ์ข้าวที่พัฒนาขึ้นในโครงการความร่วมมือระหว่าง Tropical Agriculture Research Center (TARC) ของญี่ปุ่นและสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (International Rice Research Institute, IRRI) ของประเทศฟิลิปปินส์ในช่วงปีค.ศ. 1981-1990 เป็นสายพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะเป็น near isogenic line (NIL) ที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์ข้าว IR24 ซึ่งใช้เป็นพันธุ์รับ (recurrent parent) กับพันธุ์ IR1545-339 ที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งเป็นพันธุ์ให้ (donor parent) โดยการผสมกลับไปยังพันธุ์ผู้รับจำนวน 4 ครั้ง วัตถุประสงค์ของการพัฒนาสายพันธุ์ NIL ก็เพื่อใช้ในการตรวจหาสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค ตรวจหายีนต้านทานใหม่ๆ ตลอดจนใช้เป็นแหล่งของยีนต้านทานในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยวิธีการผสมกลับ (Ogawa *et al.*, 1991) สาเหตุที่ใช้พันธุ์ IR 24 เป็นพันธุ์รับก็เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่มีลักษณะไม่ต้านทานต่อเชื้อ 7 สายพันธุ์ของญี่ปุ่นและเชื้อ 4 สายพันธุ์ของฟิลิปปินส์ซึ่งเป็นลักษณะที่เหมาะสมในการนำมาสร้างเป็นสายพันธุ์ NIL (Ogawa and Yamamoto, 1987) ถึงแม้ว่าข้าวพันธุ์ IR24 จะมีลักษณะไม่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งดังกล่าวแต่ก็มีข้อดีคือ ผลผลิตค่อนข้างสูงและทนต่อสภาพดินเค็ม (FAO, 2005)

จากการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคขอบใบแห้งของข้าวในประเทศไทยโดยกาญจนา (2544) พบว่าข้าวสายพันธุ์ IRBB5 ซึ่งมียีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *xa5* สามารถแสดงความต้านทานต่อเชื้อที่มีในประเทศไทย 5 สายพันธุ์ (8702, 9502, 9601, 9602 และ 9603)ในระดับค่อนข้างสูงถึงสูงมาก ส่วนการทดสอบกับเชื้อ 5 สายพันธุ์ในประเทศฟิลิปปินส์พบว่าสามารถแสดงลักษณะต้านทานโรคได้สูง (Kihupi *et al.,* 2001)

2. โรคขอบใบแห้งของข้าว

2.1 สาเหตุและอาการของโรค

โรคขอบใบแห้ง (bacterial blight) ของข้าวเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae (Xoo)* ที่สามารถเข้าทำลายต้นข้าวได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงระยะออกรวง อาการที่แสดงออกมี 2 แบบ คือ แบบ leaf blight โดยจะเริ่มเป็นจุดช้ำบนขอบใบและจะขยายเป็นทางยาวไปตามใบข้าว เมื่อนานไปแผลนี้จะเปลี่ยนเป็นสีเทาจากนั้นขอบใบจะแห้งและม้วนตามยาว พบว่าใน

ระยะแรกของการเป็นโรคที่บริเวณแผลจะมีหยดน้ำสีเทาหรือสีเหลืองครีม ในหยดน้ำนี้จะมีเชื้อแบคทีเรียซึ่งถูกขับออกมาทางรูหยาดน้ำ (hydathode) ที่ปลายใบ หยดน้ำดังกล่าวมีลักษณะคล้ายยางสนกลมๆ ขนาดเล็กเท่าหัวเข็มหมุดซึ่งต่อมาจะกลายเป็นสีน้ำตาลและหลุดลอยไปตามลม น้ำหรือฝนทำให้เชื้อแพร่กระจายและเกิดการระบาดรุนแรงในช่วงที่เกิดฝนตกหนัก ส่วนอาการแบบ Kresek เกิดจากต้นข้าวได้รับเชื้อปริมาณสูงเข้าทำลายทำให้ท่อน้ำท่ออาหารอุดตันมีผลให้ต้นข้าวทั้งต้นเหี่ยวเฉาและตายโดยรวดเร็ว (กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, 2543) โดยทั่วไปถ้าเชื้อเข้าทำลายในระยะต้นกล้าจะทำให้ต้นกล้าตายภายใน 1-2 สัปดาห์ แต่ถ้าเข้าทำลายในระยะแตกกอต้นข้าวจะมีชีวิตรอด (Rahman *et al.*, 1991) แต่ผลผลิตและคุณภาพการหุงต้มของข้าวที่ได้จะลดลง (Lin, 1990)

2.2 การประเมินอาการของโรค

การประเมินอาการของโรคใช้ระบบ SES หรือ Standard Evaluation System ของสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ โดยให้คะแนนเป็น 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ตามระดับความเสียหายของข้าว ซึ่งคิดจากเปอร์เซ็นต์พื้นที่บนใบที่เกิดโรค โดย 1 เป็น highly resistance ส่วน 8 และ 9 เป็น highly susceptible (IRRI, 1996)

2.3 ยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรค

พบว่ายีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งของข้าวที่นำมาใช้ประโยชน์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวมีอย่างน้อย 24 ยีน โดยมีทั้งยีนที่มีการแสดงออกแบบยีนเด่น (*Xa1, Xa2, Xa3, Xa4, Xa6, Xa7, Xa9, Xa10, Xa11, Xa12, Xa14, Xa16, Xa17, Xa18, Xa19, Xa21, Xa23, Xa24*) และยีนที่แสดงออกแบบยีนด้อย (*xa5, xa8, xa13, xa19, xa20, xa22*) นอกจากข้าวปลูกพันธุ์ต่างๆ ที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง เช่น พันธุ์ Kogyoku (*Xa1*) น้ำสะกุย (*Xa4*) DV85 (*xa5*) และพันธุ์ IR8 (*Xa11*) แล้วยังพบแหล่งพันธุกรรมของยีนต้านทานในข้าวป่าบางชนิด เช่น *Oryza logistaminata, O. officinalis* no. 100896, *O. minuta* no. 101141, *O. latifolia* no. 100914, *O. australiensis* no. 100882 และข้าวป่า *O. brachyxantha* no. 101232 เป็นต้น (Sidhu *et al.*, 1986; Nelson *et al.*, 1996; Kameswara *et al.*, 2002; Khush *et al.*, 2005)

จากความก้าวหน้าของเทคโนโลยีเกี่ยวกับการศึกษาจีโนมของข้าวทำให้มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งใกล้ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งของ

ข้าว ดังปรากฏในตารางผนวกที่ 1 ต่อมาจึงมีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งใกล้ชิดกับยีนต้านทานต่อโรคเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกต้นต้านทานทั้งในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวและเพื่อคัดเลือกหาต้นต้านทานจากแหล่งพันธุกรรมต่างๆ โดยการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวไปเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด PCR- based markers เพื่อให้สะดวกต่อการนำไปใช้งาน

3. <u>เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)</u>

เครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึง ดีเอ็นเอหรือลำดับเบสช่วงหนึ่งๆ ซึ่งถูกใช้เป็นเครื่องหมายเพื่อบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ หรือเพื่อติดตามลักษณะพันธุกรรมลักษณะหนึ่งๆ ของสิ่งมีชีวิต (สุรินทร์, 2545) โดยทั่วไปเครื่องหมายดีเอ็นเอจะมีแบบแผนของการถ่ายทอดตามกฎเมนเดล (สมาคมพันธุศาสตร์, 2548) และมีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่างๆ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาทางพันธุศาสตร์ รวมถึงการนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น เครื่องหมาย Restriction Fragment Length Polymorphism หรือ RFLP marker, Random Amplified Polymorphic DNA หรือ RAPD marker (Williams *et al.*, 1990), Amplified Fragment Length Polymorphism หรือ AFLP marker (Vos *et al.*, 1995) และ Sequence Tag Site หรือ STS marker เป็นต้น

Amplified Fragment Length Polymorphism หรือ AFLP เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่รวบรวมหลักการของเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (RFLP) และ อาร์เอพีดี (RAPD) เข้าไว้ด้วยกันเพื่อหลีกเลี่ยงข้อด้อยของแต่ละเทคนิค ทำให้การตรวจสอบมีประสิทธิภาพมากกว่าเทคนิคทั้งสอง วิธีการแบ่งเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้คือขั้นตอนที่หนึ่ง ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดตัด genomic DNA เอนไซม์ชนิดหนึ่งสามารถตัดดีเอ็นเอได้ถี่ซึ่งมักใช้ 4 base cutter enzyme เช่น เอนไซม์ *Mse*I , *Tag*I และอีกชนิดหนึ่งสามารถตัดได้ด้วยความถี่น้อยกว่าโดยนิยมใช้ 6-8 base cutter enzyme เช่น *Eco*RI , *Pst*I จากนั้นนำ adaptor ของเอนไซม์ทั้งสองมาเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ ขั้นตอนที่สองทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR) ด้วยไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสทางปลาย 5′ เหมือนกับลำดับเบสของ adaptor แต่ละชนิดและเพิ่ม selective base ในส่วนท้ายของไพรเมอร์จำนวน 2-3 เบสเพื่อเพิ่มความจำเพาะของชิ้นดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณหรือต้องการตรวจสอบ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสที่ปลาย 3′ จะทำ 2 ครั้ง ครั้งแรกเรียกว่า preselective amplification และครั้งที่ 2 เรียกว่า selective amplification ขั้นตอนที่สามนำผลผลิตที่ได้จากการ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ไปแยกขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis และตรวจสอบด้วย autoradiography หรือ silver staining แบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาโดยใช้ไพรเมอร์คู่หนึ่งๆ เรียกว่า ลายพิมพ์เอเอฟแอลพี (AFLP fingerprint) ซึ่งมีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม (random fingerprint) ทั้งนี้แถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ของแต่ละตัวอย่างจะบ่งบอกถึงความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเรียกว่า เครื่อง หมายเอเอฟแอลพี หรือ AFLP marker (สุรินทร์, 2545; Vos *et al.*, 1995; Mackill *et al.*, 1996) คุณสมบัติที่สำคัญของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้คือ จำนวนโพลีมอร์ฟิซึมที่สามารถตรวจสอบได้มีค่าสูงต่อการทำแต่ละครั้ง และสามารถเป็นได้ทั้ง codominant และ dominant marker แต่โดยทั่วไปจะพบเครื่องหมายเอเอฟแอลพีแบบที่เป็นลักษณะข่มมากกว่า (ธีรยุทธิ์, 2544; สุรินทร์, 2545)

การนำเครื่องหมายเอเอฟแอลพีไปใช้ประโยชน์มีหลายวัตถุประสงค์ เช่น การทำแผนที่ยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณบางลักษณะ (Redona and Mackill, 1996) การศึกษาความแตกต่างของลูกผสมซึ่งได้จากการผสมระหว่างข้าว indica และ japonica (Maheswaran *et al.*, 1997) การติดตามลักษณะความต้านทานโรคโดยตรวจหาเครื่องหมายที่มีตำแหน่งใกล้ชิดกับยีน ตรวจหายีนทนทานต่อความเค็ม (Gregorio, 1997) และวิเคราะห์ลายพิมพ์เอเอฟแอลพี (Zhu *et al.*, 1998) เป็นต้น Fuentes *et al.* (1999) ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในประ-เทศคิวบาด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีและอาร์เอพีดี พบว่าจากการใช้ไพรเมอร์ 4 คู่สามารถตรวจพบโพลีมอร์ฟิซึม(polymorphism) ของเอเอฟแอลพีในตัวอย่างได้สูงกว่าอาร์เอพีดีมากกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเฉลี่ยของแถบที่เป็นโพลีมอร์ฟิก 19.25 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ เช่นเดียวกับการทดลองของ Agrawal *et al.* (1999) ซึ่งพบว่าลายพิมพ์เอเอฟแอลพีสามารถตรวจพบความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ต่างๆ ได้มากกว่าลายพิมพ์อาร์เอฟแอลพี 1.5 เท่า Saini *et al.* (2004) ใช้ไพร์เมอร์ 5 คู่เพื่อศึกษาลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของข้าว Basmati (indica) และ non-Basmati (japonica) รวม 18 พันธุ์ พบว่ามีค่าเฉลี่ยของแถบเท่ากับ 34.3 แถบต่อไพรเมอร์และมีเปอร์เซ็นต์ของแถบที่มีลักษณะโพลีมอร์ฟิก 64.0 เปอร์เซ็นต์ การจัดกลุ่มข้าวโดยอาศัยลายพิมพ์เอเอฟแอลพีดังกล่าวให้ผลที่สอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยอาศัยฟีโนไทป์

Sequence Tag Site หรือ STS marker หรือเครื่องหมายเอสทีเอส เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของตำแหน่งเฉพาะในจีโนมมาออกแบบเป็นไพรเมอร์ จากนั้นจึงเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้นๆ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ ผลผลิตที่ได้นำไปแยกขนาดโดย

ใช้ agarose gel electrophoresis ความแตกต่างของแต่ละต้นในประชากรเกิดจากเพิ่ม (addition) หรือ ขาดหายไป (deletion) ของบริเวณจำเพาะนั้น คุณสมบัติที่สำคัญของโมเลกุลเครื่องหมายชนิดนี้คือ ความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลบนจีโนม และการเป็น codominant marker สำหรับข้อจำกัดของการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้คือจะต้องมีข้อมูลของลำดับเบสสำหรับใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ (ธีรยุทธิ์, 2544; Masojc, 2002)

4. <u>การคัดเลือกพันธุ์พืชด้วยเครื่องหมายโมเลกุล (marker assisted selection)</u>

การคัดเลือกพันธุ์พืชด้วยเครื่องหมายโมเลกุล หมายถึง การนำเครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers) ชนิดต่างๆ ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่สำคัญของพืชมาใช้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกต้นพืชในโครงการปรับปรุงพันธุ์ (ศูนย์พันธุวิศวกรรม, 2542) การนำเครื่องหมายโมเลกุลโดยเฉพาะเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการคัดเลือก นักปรับปรุงพันธุ์สามารถคัดเลือกพืชโดยการสกัดดีเอ็นเอจากส่วนใดส่วนหนึ่งของต้นพืชแต่ละต้นในขณะที่ต้นพืชยังไม่โตเต็มที่ โดยไม่มีข้อจำกัดเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน อายุ ชนิดของเนื้อเยื่อ หรือผลของสิ่งแวดล้อมมาเกี่ยวข้อง ซึ่งมีผลให้สามารถคัดเลือกต้นพืชที่มีพันธุกรรมตรงตามความต้องการเนื่องจากเป็นการคัดเลือกในระดับดีเอ็นเอ และยังช่วยลดจำนวนประชากรพืชที่จะใช้ในการคัดเลือกในขั้นตอนหลังด้วย และเนื่องจากสามารถคัดเลือกพืชตั้งแต่ระยะต้นๆ (earlier selection) ได้จึงมีผลให้ระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ลดลงได้อีกด้วย

ความก้าวหน้าในการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อคัดเลือกต้นพืชที่มีลักษณะที่ต้องการ ขึ้นอยู่กับว่ามีเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งใกล้ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการหรือไม่ ทั้งนี้การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อนำมาใช้ในการคัดเลือกต้นพืชในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชเกี่ยวข้องกับความก้าวหน้าของการทำแผนที่ของจีโนม (genome mapping) และการบ่งชี้ยีน (gene tagging) เพื่อระบุตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอว่าอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะที่สนใจเพียงใด ต่อมาจึงมีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกต้นพืชได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามในการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อคัดเลือกต้นพืชในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชมีข้อที่ควรคำนึงหลายประการ เช่น เครื่องหมายดีเอ็นเอที่นำมาใช้ควรมีตำแหน่งใกล้ชิดและกระจายตัวแบบ co-segregate กับลักษณะที่ต้องการคัดเลือก วิธีการคัดหาต้นพืช(screening technique) ด้วยเครื่องหมายดังกล่าวต้องสามารถทำซ้ำ (repeatability) และสามารถนำไปใช้กับประชากรพืชจำนวนมากได้ นอกจากนี้การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือกต้นพืชควรมีความคุ้มค่าคุ้มทุน

อีกด้วย (Mohan *et al.*, 1997; Staub and Serquen, 1996) Kennard *et al.* (1994) พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งใกล้ชิดกับลักษณะเชิงคุณภาพหนึ่งๆ น้อยกว่า 10 cM จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกได้ ส่วนการคัดเลือกลักษณะปริมาณที่ควบคุมด้วยกลุ่มยีนที่เรียกว่า quantitative trait loci (QTL) โดยการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจะมีประสิทธิภาพถ้าเครื่องหมายกับลักษณะปริมาณนั้นมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ (Edwards *et al.*, 1987; Lande and Thompson, 1990) ทั้งนี้ Staub *et al.* (1996) พบว่าการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลจะมีประโยชน์อย่างยิ่งในกรณีการคัดเลือกลักษณะ ที่มีค่าอัตราการถ่ายทอดทางพันธุกรรม (heritability) ต่ำ

ในการปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานโรคและแมลงนิยมใช้วิธีการผสมกลับ (backcross method)โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อถ่ายทอดลักษณะต้านทานต่อโรคหรือแมลงจากพันธุ์ให้ไปสู่พันธุ์รับเพียงลักษณะเดียวเท่านั้นและคาดหวังว่าลักษณะส่วนใหญ่ของต้นที่ได้ภายหลังการผสมกลับไปหลายชั่วจะยังคงมีลักษณะที่ดีส่วนใหญ่ของพันธุ์รับอยู่ จึงอาจกล่าวได้ว่าการคัดเลือกในโครงการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีผสมกลับจะเกี่ยวข้องกับการคัดเลือกต้นพืชในสองทิศทาง กล่าวคือในทิศทางแรกจะเป็นการคัดเลือกต้นที่มียีนต้านทานจากพันธุ์ให้ การคัดเลือกในทิศทางที่สองเป็นการคัดเลือกต้นที่มียีนต้านทานซึ่งมีลักษณะส่วนใหญ่เหมือนกับพันธุ์รับมากที่สุด จากเหตุผลดังกล่าวจึงมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อช่วยในการคัดเลือกใน 2 รูปแบบ (Welz and Geigerb, 2001) ได้แก่ การคัดเลือกแบบ Marker-assisted foreground selection และการคัดเลือกแบบ Marker-assisted background selection

4.1 Marker-assisted foreground selection

Marker-assisted foreground selection หมายถึง การใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีตำแหน่งใกล้ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการจากพันธุ์ผู้ให้เพื่อคัดเลือกลูกที่ได้จากการผสมข้าม ผสมกลับ หรือผสมตัวเอง มีรายงานการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นเครื่องมือในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง และโรคไหม้ของข้าวหรือ leaf blast (Khush and Brar, 2005) ดังการทดลองของ Sanchez *et al.* (2000) ซึ่งนำเครื่องหมายดีเอ็นเอสองชนิดได้แก่ เครื่องหมายเอสทีเอสชื่อ RG556 ที่พัฒนาโดย Huang *et al.* (1997) และเครื่องหมายเอสทีเอสชื่อ RG207 (Yang *et al.*, 1998) ที่มีตำแหน่งอยู่ใกล้ชิดกับยีน *xa5* ที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งมาใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวลูกผสมที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคซึ่งเป็นลักษณะจาก

พันธุ์ให้ พบว่าผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โดยใช้เครื่องหมาย RG556 เป็นไพรเมอร์จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันในพันธุ์ไม่ต้านทานและพันธุ์ต้านทาน ภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mae* II ส่วนผลผลิตที่ได้จากการใช้เครื่องหมาย RG207 เป็นไพรเมอร์จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันและสามารถนำมาใช้คัดเลือกต้นข้าวลูกผสมที่มียีนต้านทานโรคได้ จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือกลักษณะที่ควบคุมด้วยยีนด้อยทำให้สามารถคัดเลือกต้นต้านทานได้ทันทีภายหลังการผสมข้ามโดยไม่ต้องปล่อยให้เกิดการผสมตัวเองเพื่อให้ต้นต้านทานที่มีลักษณะด้อยแสดงออก จึงเท่ากับว่าสามารถลดระยะเวลาในปรับปรุงพันธุ์ได้อย่างน้อย 1 ชั่วอายุ

Huang *et al.* (1997) พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเอสทีเอสที่พัฒนาจากเครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี RG556 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง (*xa5*) บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 5 เพื่อใช้ในการคัดเลือกต้นต้านทาน โดยออกแบบไพรเมอร์จากลำดับเบสจากปลายทั้งสองข้างของโคลน RFLP-RG556 ได้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RG556 ที่มีลำดับเบสของไพรเมอร์เป็น F: 5′TAGCTGCTGCCGTGCTGTGC 3′ และ R: 5′AATATTTCAGT GTGCATCTC 3′ ภายหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในพันธุ์ต้านทานและไม่ต้านทานไม่แตกต่างกัน (monomorphic band) จึงนำแถบดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dra* I เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ (specific amplicon polymorphism, SAP) ปรากฏว่าสามารถจำแนกต้นต้านทานและไม่ต้านทานได้ เมื่อนำเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวไปใช้ศึกษาในพันธุ์ข้าวต่างๆ จำนวน 187 accession พบว่ามีอัลลีลเครื่องหมาย (marker alleles) 3 อัลลีลที่ตรวจพบได้ภายหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ RG556 โดยกำหนดให้อัลลีลที่ปรากฏในสายพันธุ์ IRBB5 เป็นอัลลีลที่ 1 (resistant allele) ส่วนอัลลีลที่ 2 และ 3 เป็นรูปแบบของอัลลีลที่ปรากฏในพันธุ์ Tetep และพันธุ์ไม่ต้านทาน IR24 ตามลำดับ ส่วนดีเอ็นเอต้นแบบที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ใช้ไพรเมอร์ RG556 แสดงว่ามี null-allele ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Ramalingam *et al.* (2001) ซึ่งใช้เครื่องหมาย RG556 ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวต้านทานรวม 56 พันธุ์ และพบอัลลีล 3 รูปแบบในประชากรของพันธุ์ต้านทาน

Pha and Lang (2005) ทดลองนำเครื่องหมายดีเอ็นเอ RG 136 มาใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวที่มียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง *xa13* จากพันธุ์ข้าวท้องถิ่นจำนวน 166 accession พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการสร้างลูกผสมจำนวน 25 สายพันธุ์ และต้นข้าวลูกผสมกลับระหว่างพันธุ์ไม่

ต้านทาน (IR24) ซึ่งใช้เป็นพันธุ์รับกับพันธุ์ต้านทาน (Nang Som) พบว่าในต้นที่ต้านทานโรคจะปรากฏแถบขนาด 1500 คู่เบสส่วนในพันธุ์ไม่ต้านทานจะได้แถบขนาด 1,000 คู่เบสที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกได้

Singh *et al.* (2001) ปรับปรุงพันธุ์ข้าว PR106 ให้ต้านทานโรคขอบใบแห้งด้วยการผนวกยีนต้านทาน *xa5, xa13* และ *Xa21* และใช้เครื่องหมายเอสทีเอสเป็นเครื่องมือในการคัดเลือกแบบ foreground selection ในการปรับปรุงพันธุ์ครั้งนี้ใช้สายพันธุ์ IRBB62 ซึ่งมียีนต้านทานทั้ง 3 ยีนเป็นพันธุ์ให้ โดยนำมาผสมกับพันธุ์ PR106 แล้วนำลูกผสมชั่วที่1 (F_1) ผสมกลับไปยังพันธุ์ PR106 หลายครั้งสลับกับการผสมตัวเองเป็นบางชั่ว พบว่าสามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งใกล้ชิดกับยีนต้านทานแต่ละยีนเป็นเครื่องมือในการคัดเลือกต้นพืชในแต่ละชั่วอายุได้ โดยเครื่องหมายเอสทีเอส RG556 ซึ่งอยู่ใกล้ชิดกับยีน *xa5* จะให้แถบดีเอ็นเอเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *DraI* ขนาด 450 คู่เบส ส่วนเครื่องหมาย RG136 ซึ่งอยู่ใกล้ชิดกับยีน *xa13* จะให้แถบดีเอ็นเอเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI ขนาด 400 และ 506 คู่เบส ในขณะที่เครื่องหมาย pTA248 ซึ่งมีตำแหน่งใกล้ชิดกับยีน *Xa21* จะให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,000 คู่เบส

Davierwala *et al.* (2001) ปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งโดยการผนวก(pyramiding) ยีนต้านทาน *Xa4* จากพันธุ์ IR64 และ *xa5* จากพันธุ IET-14444 โดยใช้เครื่องหมายเอสทีเอส RG556 ในการคัดเลือกต้นข้าวลูกผสมที่มียีนต้านทาน *xa5* นอกจากนี้เมื่อศึกษาการถ่ายทอดเครื่องหมายเอสทีเอส RG556 ในลูกผสมชั่วที่ 3 (F_3) พบว่าการกระจายตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอสอดคล้องกับการกระจายตัวตามกฎของเมนเดล โดยมีอัตราส่วนของ homozygous susceptible: heterozygous susceptible: homozygous resistant เท่ากับ 7:16:8 (1:2:1)

ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว IR50 ให้ต้านทานต่อโรคไหม้โดย Narayanan *et al.* (2002) ด้วยวิธีผสมกลับ ใช้สายพันธุ์ต้านทาน CO39-NIL-C101A51 เป็นพันธุ์ให้ยีนต้านทาน *Piz-5* และใช้ครื่องหมายเอสทีเอส RG64 ในการคัดเลือก พบว่าสามารถคัดเลือกต้นที่มียีนต้านทาน *Piz-5* ได้ภายหลังนำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* II โดยพันธุ์ต้านทานและพันธุ์ไม่ต้านทานจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 750 คู่เบสและ650 คู่เบสตามลำดับ และเนื่องจากเครื่องหมายดังกล่าวแสดงออกแบบ codominance จึงสามารถจำแนกต้นที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous และ homozygous ได้

นอกจากการในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวแล้วยังมีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อคัดเลือกต้นพืชแบบ foreground selection ในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดต่างๆ อีก เช่น การคัดเลือกต้นองุ่นที่ต้านทานต่อโรคด้วยเครื่องหมายเอสทีเอสที่พัฒนาจากเครื่องหมายเอเอฟแอลพีที่อยู่ใกล้กับยีน *Run1* ที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรคราแป้ง (powdery mildew)ในองุ่น โดยนำลูกผสมกลับชั่วที่5 (BC_5) ที่ได้จากการผสมระหว่าง *Muscadinia rotundifolia* ซึ่งใช้เป็นพันธุ์ให้ กับ *Vitis vinifera* ซึ่งใช้เป็นพันธุ์รับมาคัดเลือกด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปรากฏว่าสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างต้นที่มียีน *Run1* กับต้นที่ไม่มียีน *Run1* ได้ (Pauquet *et al.*, 2001) เช่นเดียวกับ Von-Malek *et al.* (2000) ซึ่งพบว่ามีเครื่องหมายเอเอฟแอลพีจำนวน 7 เครื่องหมายที่มีตำแหน่งใกล้ชิดกับยีนต้านทานต่อโรค blackspot ในกุหลาบ จากนั้นจึงนำเครื่องหมายที่อยู่ชิดกับยีนต้านทานมากที่สุดไปโคลนและพัฒนาไปเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) เพื่อความสะดวกในการนำไปใช้ประโยชน์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์กุหลาบต่อไป

Lu *et al.* (1999) พบว่าเครื่องหมายเอเอฟแอลพี EAA / MCTA 10 ซึ่งมีการแสดงออกแบบ codominance มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานต่อไส้เดือนฝอย (*Meloidogyne incognita* และ *M. javanica*) ที่ทำให้เกิดโรครากปม (root-knot) ในต้นพีช (*Prunus persica* (L.) Batsch) จากนั้นจึงพัฒนาเครื่องหมาย EAA/MCTA 10 ไปเป็นเครื่องหมายเอสทีเอสและใช้ชื่อว่า EAA/MCTA10STS เมื่อนำเครื่องหมายเอสทีเอสดังกล่าวซึ่งมีการถ่ายทอดแบบ codominance ไปใช้ในการจำแนกลักษณะต้าน ทานในพันธุ์พ่อแม่ ลูกผสมชั่วที่ 1 และชั่วที่ 2 พบว่านอกจากจะสามารถจำแนกต้นต้านทานและไม่ต้านทานได้แล้วยังสามารถจำแนกต้นพืชที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous resistant, heterozygous resistant และ homozygous susceptible ได้อีกด้วย

4.2. Marker-assisted background selection

Marker-assisted background selection หมายถึง การใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่ปรากฏอยู่ในพันธุ์รับในการคัดเลือกลูกที่ได้จากการผสมข้าม ผสมกลับ หรือผสมตัวเอง ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเป็นการคัดเลือกโดยดูจากพื้นฐานพันธุกรรม (genetic background) ของต้นที่ทำการคัดเลือก ในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชหนึ่งๆ มักใช้การคัดเลือกแบบ marker-assisted foreground selection ในช่วงต้นๆ ของการคัดเลือกเพื่อลดจำนวนประชากรที่เข้าสู่การคัดเลือกในช่วงหลังๆและใช้ marker-assisted background selection ในช่วงหลังของโครงการ (Welz and Geigerb, 2001)

Brewer *et al.* (1999) ทดลองใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีในการตรวจสอบต้นพืชที่ได้จากการรวมโปรโทพลาสต์ (protoplast fusion) ระหว่าง *Thlaspi caerulescens* กับ*Brassica napus* พบว่าลายพิมพ์เอเอฟแอลพีที่ได้สอดคล้องกับผลการคัดเลือกในระดับฟีโนไทป์ (phenotype selection) ทั้งนี้แถบดีเอ็นเอเกือบทุกแถบที่จำเพาะในพืชแต่ละชนิดปรากฏอยู่ในต้นลูกที่ได้ จึงสันนิษฐานว่าต้นลูกเหล่านี้ได้รับพันธุกรรมจากพืชทั้งสองชนิดมาทั้งจีโนม

Chen *et al.* (2001b) ใช้การคัดเลือกทั้งในแบบ marker-assisted foreground selection และ marker-assisted background selection ในการปรับปรุงข้าวพันธุ์6078 โดยใช้ข้าวสายพันธุ์ IRBB21 เป็นพันธุ์ให้เพื่อถ่ายทอดลักษณะต้านทานโรคขอบใบแห้งที่ควบคุมด้วยยีนต้านทาน *Xa21* ไปสู่ข้าวพันธุ์ 6078 ซึ่งเป็นพันธุ์รับ ในการคัดเลือกแบบ marker-assisted foreground selection ใช้ PCR-based marker ที่มีตำแหน่งอยู่ใกล้ชิดกับยีน *Xa21* ร่วมกับการปลูกเชื้อ (pathogen inoculation) เพื่อคัดเลือกลูกผสมชั่วที่ 1 ลูกผสมกลับ และลูกที่เกิดจากการผสมตัวเอง ส่วนการคัดเลือกแบบ background selection ในลูกผสมกลับในรุ่น BC_1F_1 และ BC_2F_1 จะใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ 6078 และ IRBB21 จำนวน 129 แถบ พบว่าต้น BC_3F_2 หรือ 6078 (*Xa21*) ที่ถูกคัดเลือกจะมีชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3.8 cM ในบริเวณ Xa21 region ซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 11 จากพันธุ์ให้ และจะมีพันธุกรรมพื้นฐานของพันธุ์รับประมาณ 98.8 เปอร์เซ็นต์ จากการทดสอบความต้านทานและลักษณะอื่นๆ ปรากฏว่าต้น 6078 (*Xa21*) ที่คัดเลือกได้มีระดับของความต้านทานเช่นเดียวกับพันธุ์ให้ (IRBB21) ในขณะเดียวกันก็จะมีลักษณะทางเกษตรเหมือนกับพันธุ์รับ

Joseph *et al*. (2004) ปรับปรุงพันธุ์ข้าว Pusa Basmati 1 ให้ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง โดยนำไปผสมกับสายพันธุ์ IRBB55 ซึ่งมียีนต้านทาน *xa13* และ *Xa21* และนำลูกชั่วที่1 ผสมกลับไปยังพันธุ์ Pusa Basmati 1 ได้ลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1) ในการคัดเลือกต้นข้าวในรุ่น BC_1F_1 BC_1F_2 และ BC_1F_3 ใช้การคัดเลือกรวมทั้งสิ้น 3 วิธีเริ่มจากการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคด้วยวิธีการปลูกเชื้อ จากนั้นจึงคัดเลือกซ้ำโดยพิจารณาจากคุณภาพของเมล็ด สุดท้ายจึงนำต้นที่คัดเลือกได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายเอสทีเอส RG136 และ pTA248 เพื่อคัดเลือกต้นที่มียีนต้านทาน *xa-13* และ *Xa-21* อยู่ในสภาพโฮโมไซกัสทั้งสองตำแหน่ง พบว่าสามารถคัดต้น BC_1F_3 ที่มีลักษณะดังกล่าวได้ทั้งหมด 21 ต้น จากนั้นจึงนำไปคัดเลือกต้นที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับพันธุ์รับด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี จากการใช้ไพร์เมอร์ 8 คู่พบแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน 863 แถบโดยมี

แถบที่แตกต่างระหว่างพันธุ์ให้กับพันธุ์รับ 252 แถบ และพบว่าต้นข้าวที่คัดเลือกไว้ทั้ง 21 ต้นมีพันธุกรรมเหมือนกับพันธุ์รับ (Pusa Basmati 1) อยู่ระหว่าง 80.4-86.72 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ Shen *et al.* (2001) ได้ทดลองใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือกลักษณะ root depth ซึ่งมีรายงานว่าเป็นลักษณะเชิงปริมาณที่ถูกควบคุมด้วย QTLs ในการผลิตสายพันธุ์ NILs ของข้าวพันธุ์ IR64 ที่มีพันธุ์ IR64 เป็นพันธุ์รับและมีต้นดับเบิลแฮพลอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของต้นลูกผสมระหว่างพันธุ์ Azucena กับพันธุ์ IR64 เป็นพันธุ์ให้ ในการคัดเลือกต้นข้าวในรุ่น BC_2F_1 และ BC_3F_1 ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอรวม 17 เครื่องหมายซึ่งมีตำแหน่งใกล้กับ QTLs จากนั้นเก็บเมล็ด BC_3F_2 จากต้นที่คัดเลือกได้ไปปลูกและคัดเลือกอีกครั้งด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เพื่อให้ได้ต้นที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับพันธุ์ IR64 มากที่สุด เก็บเมล็ดจากต้น BC_3F_2 ที่คัดเลือกได้และคัดเลือกซ้ำพบว่าสามารถคัดเลือกต้นที่มีพันธุกรรมพื้นฐานใกล้เคียงกับพันธุ์ IR64 แต่มีพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะ root depth จากพันธุ์ Azucena ในลูกรุ่น BC_3F_3 ได้รวม 58 สายพันธุ์

5. <u>การเพาะเลี้ยงอับเรณู</u>

การเพาะเลี้ยงอับเรณู (anther culture) หมายถึง การนำอับเรณูที่ภายในมีไมโครสปอร์ในระยะที่มีเพียง 1 นิวเคลียส (uninucleate microspore) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น และแสงได้ (ประศาสตร์, 2536; เสาวนีย์, 2536; Powell, 1990) โดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงอับเรณูมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตต้นแฮพลอยด์ (haploid) ที่มีโครโมโซมเพียงชุดเดียว และเมื่อชักนำให้ต้นแฮพลอยด์เหล่านี้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่าจะได้ต้นดับเบิลแฮพลอยด์ (doubled haploid) ที่เป็นพันธุ์แท้ซึ่งมียีนทุกตำแหน่งอยู่ในสภาพโฮโมไซกัส (homozygous) จึงสามารถผลิตพืชพันธุ์แท้ (pure line) ได้ในเวลารวดเร็ว (Lynch *et al.*, 1991; Poehlman and Sleper, 1995)

การเกิดต้นแฮพลอยด์มีสาเหตุมาจากการที่ไมโครสปอร์ซึ่งนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสมถูกชักนำให้พัฒนาไปเป็นต้นโดยผ่านกระบวนการ direct embryogenesis หรือ indirect organogenesis ในกระบวนการ direct embryogenesis จะพบการแบ่งเซลล์ของไมโครสปอร์เกิดเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปในรูปแบบเดียวกับการพัฒนาของไซโกติกเอ็มบริโอ (zygotic embryo) ที่มีการพัฒนาของยอดและรากไปพร้อมๆกัน ส่วนการพัฒนาเป็นต้นอ่อนโดย

กระบวนการ indirect organogenesis จะพบการแบ่งเซลล์ของไมโครสปอร์เกิดเป็นแคลลัส (callus) แล้วจึงมีการพัฒนาของยอดและรากที่สมบูรณ์ในภายหลัง (Genovesi and Magill, 1982) เรียกกระบวนการพัฒนาของไมโครสปอร์ไปเป็นต้นอ่อนนี้ว่า microspore androgenesis (Foroughi-Wehr and Wenzel, 1993) การเกิด microspore androgenesis เริ่มต้นจากการแบ่งเซลล์ของไมโครสปอร์ซึ่งพบว่ามีวิถี (path-way) การเกิดขึ้นได้สองวิถี คือ pathway A และ pathway B ใน pathway A นั้นไมโครสปอร์ที่เพาะเลี้ยงจะแบ่งเซลล์ครั้งแรกแบบไม่สมมาตร (asymmetric division) ได้เซลล์ที่มี vegetative และ generative nuclei ซึ่งมีขนาดไม่เท่ากัน จากนั้น vegetative nucleus จะแบ่งตัวต่อไปในขณะที่ generative nucleus จะสลายไป สวนใน pathway B พบว่าไมโครสปอร์จะมีการแบ่งตัวแบบสมมาตร (symmetric division) ได้เซลล์ที่มีนิวเคลียสขนาดเท่ากันสองนิวเคลียสซึ่งจะแบ่งตัวต่อไป (Wei and Hong, 1991)

6. <u>การเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าว</u>

ภายหลังการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวได้เป็นครั้งแรก (Nizeki and Oono, 1968) จึงมีรายงานว่าสามารถเพาะเลี้ยงอับเรณูของพืชชนิดอื่นๆ ได้อีกเป็นจำนวนมาก จากการศึกษาผลการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมระหว่างข้าวจาปอนิกาและข้าวอินดิกาในเวลาต่อมา พบว่าความสามารถในการเพาะเลี้ยงอับเรณู (anther culturability) ซึ่งพิจารณาจากตัวแปร (parameters) 4 ชนิด ได้แก่ ความถี่ในการชักนำให้เกิดแคลลัส (callus induction frequency, CI) ความถี่ในการพัฒนาเป็นต้นสีเขียวของแคลลัส (green plantlet differentiation frequency, GPD) ความถี่ในการพัฒนาเป็นต้นเผือกของแคลลัส (albino plantlet differentiation frequency, APD) และความถี่ของการได้ต้นสีเขียวในการเพาะเลี้ยงต่อจำนวนอับเรณูทั้งหมดที่เพาะเลี้ยง (green plantlet yield frequency, GPY) เป็นลักษณะปริมาณที่ถูกควบคุมจากยีนหลายตำแหน่ง โดยพบว่าลักษณะการเกิดแคลลัสเป็นผลจากการทำงานร่วมกันของยีนในแบบบวกสะสม (additive gene effect) มากกว่าแบบไม่ใช่บวกสะสม (non-additive gene effect) ในขณะที่การพัฒนาเป็นต้นมีสาเหตุหลักมาจากการทำงานร่วมกันของยีนในแบบบวกสะสมเป็นส่วนใหญ่ (Zhang and Qifeng, 1993; He *et al*., 1998; Kwon *et al*., 2001; Kwon *et a*l., 2002) ด้วยเหตุนี้ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงอับเรณูในข้าวพันธุ์หนึ่งๆ จึงมีผลเนื่องมาจากจีโนไทป์ของพันธุ์ข้าวเอง ตลอดจนวิธีการและสภาพในการเพาะเลี้ยงที่จะมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณต่างๆ ดังกล่าวแล้วข้างต้น (Henry *et al.*, 1994) ดังรายงานของ Sugimoto and Takeoka (1998) ซึ่งพบว่าผลของยีนในการชักนำให้แคลลัสของข้าวพัฒนาไปเป็นต้นมีความผันแปรตามชนิดของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

7. <u>ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าว</u>

ความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ปัจจัยที่เกิดจากต้นพืชที่ใช้เป็นแหล่งอับเรณู เช่น พันธุกรรมหรือจีโนไทป์ และสภาวะการเจริญเติบโตของต้นที่นำอับเรณูมาเพาะเลี้ยง ปัจจัยในการเพาะเลี้ยง เช่น การเตรียมอับเรณูก่อนการเพาะเลี้ยง วิธีการเพาะเลี้ยง อาหารและสภาพในการเพาะเลี้ยงอับเรณู เป็นต้น (He *et al*., 1998; Afza *et al*., 2000)

7.1. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับต้นพืชที่ใช้เป็นแหล่งอับเรณู

7.1.1 พันธุกรรม

Wei and Hong (1991), Nizeki (1997) และ Bhojwani *et al.* (2001) ได้รวบรวมผลการเพาะเลี้ยงอับเรณูในข้าวพันธุ์ต่างๆ พบว่าพันธุกรรมของข้าวที่นำมาเพาะเลี้ยงทั้งในระดับสปีชีส์ (species) ซับสปีชีส์ (subspecies) และระดับพันธุ์ (cultivars) เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงอับเรณู ดังมีรายงานว่าข้าวป่า (*O. perennis*) มีความถี่ในการเกิดแคลลัสต่ำกว่าข้าวปลูก (*O. sativa* L.) เช่นเดียวกับข้าวพันธุ์ปลูกในกลุ่มอินดิกาซึ่งพบว่ามีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงได้ต่ำกว่าข้าวพันธุ์ปลูกในกลุ่มจาปอนิกา และสามารถจัดกลุ่มตามการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงได้ดังนี้ japonica > japonica/indica > indica/indica > indica (Shen *et al.*, 1982; Raina, 1997) สอดคล้องกับการทดลองของ Miah *et al.* (1985) ซึ่งพบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวจาปอนิกาพันธุ์ Minehikari และพันธุ์ Taipei 309 และข้าวอินดิกาพันธุ์ Mingolo และ พันธุ์ Suweon290 มีความผันแปรจาก 0 เปอร์เซ็นต์ (Suweon290) ถึง 42.9 เปอร์เซ็นต์ (Taipei390) นอกจากนี้ Bishnoi *et al.* (2000a) ซึ่งเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวอินดิกา 7 พันธุ์บนอาหารสูตรชักนำแคลลัสสูตรเดียวกัน ปรากฏว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้นสีเขียวมีค่าอยู่ระหว่าง 2.6-33.9 เปอร์เซ็นต์ โดยพันธุ์ Taraori Basmati มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุด ส่วนสายพันธุ์ CH_2 Doubled-dwarf เกิดแคลลัสได้น้อยที่สุด แสดงว่าข้าวในกลุ่ม ecospecies เดียวกันมีเปอร์เซ็นต์การตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงไม่เท่ากัน เช่นเดียวกับการทดลองของ Asaduzzaman *et al.* (2003) ซึ่งพบว่ามีข้าวอินดิกาเพียง 2 พันธุ์ (BR-5, BR-38)ใน 5 พันธุ์เท่านั้นที่สามารถตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 15.25 และ 22.15 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้ในรายงานการทดลองของ

Guiderdoni *et al.* (1992) พบว่าการเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมระหว่างข้าวอินดิกาและข้าวจาปอนิกาอาจเกี่ยวข้องกับอิทธิพลของไซโทพลาซึมของต้นแม่ด้วย

จากการศึกษาสารประกอบบางชนิดภายในไมโครสปอร์ในระยะที่มี 1 นิวเคลียส พบว่าในไมโครสปอร์ของข้าวอินดิกาปริมาณกรดอะมิโนอลานีน (alanine) สะสมอยู่ต่ำกว่าในไมโครสปอร์ของข้าวจาปอนิกา และเมื่อเติมกรดอะมิโนอลานีนลงในอาหารเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวอินดิกาปรากฏว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากขึ้น ความแตกต่างของปริมาณกรดอะมิโนอลานีนที่สะสมอยู่ภายในไมโครสปอร์อาจเป็นสาเหตุประการหนึ่งที่ทำให้ข้าวจาปอนิกาและอินดิกามีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงได้ต่างกัน และเป็นไปได้ว่าความแตกต่างของพันธุกรรมอาจมีผลต่อการสร้างสารสำคัญบางชนิดในไมโครสปอร์ซึ่งมีผลทางบวกต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู (Zhou *et al*., 1983)

7.1.2 สภาพทางสรีรวิทยาและสภาวะในการเพาะปลูก

สภาวะต่างๆ ในการเพาะปลูกที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและความสมบูรณ์ของต้นที่เป็นแหล่งอับเรณู (anther donor plant) ล้วนมีอิทธิพลต่อความสามารถในการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู อย่างไรก็ตามพบว่าปัจจัยวิกฤติที่มีผลต่อความถี่ในการเกิดแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้น ได้แก่ อุณหภูมิในระยะที่ต้นข้าวแต่ละพันธุ์เริ่มสร้างช่อดอก (Nizeki, 1997) ดังการทดลองของ Hu *et al.* (1987) ที่พบว่าต้นข้าวที่ปลูกในแปลงปลูกซึ่งมีอุณหภูมิเฉลี่ย 18-20 องศาเซลเซียสจะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้นสูงกว่าต้นข้าวที่ปลูกในโรง เรือนที่มีอุณหภูมิเฉลี่ย 26-28 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ต้นข้าวที่ปลูกในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงจะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเผือก (albino plantlet) สูงกว่าอีกด้วย ส่วน Raina *et al.* (1987) รายงานผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะปลูกต้นข้าวต่อการเกิดแคลลัสไว้ว่า อับเรณูที่เก็บจากต้นข้าวพันธุ์ Basmati 370 ที่ปลูกในฤดูปลูกที่มีอุณหภูมิในช่วงวันระหว่าง 23.3-34.2 องศาเซลเซียสจะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงกว่าอับเรณูที่เก็บจากต้นที่ปลูกในอุณหภูมิช่วง 16.4-29.1 องศาเซลเซียสแต่การเกิดต้นเผือกจะมีเปอร์เซ็นต์สูงกว่า

7.2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับอับเรณู

7.2.1 การเตรียมอับเรณูโดยการนำไปผ่านความเย็นก่อนการเพาะเลี้ยง

จากการศึกษาของ Ching (1882), Cornejo-Matin and Primo-Millo (1982), Nizeki (1997) และ Raina and Irfan (1998) พบว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูที่เก็บจากช่อดอกที่นำไปผ่านความเย็นสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากกว่าอับเรณูที่ไม่ผ่านความเย็น การนำช่อดอกข้าวไปผ่านความเย็นก่อนนำอับเรณูไปเพาะเลี้ยงจะมีผลอย่างยิ่งในการชักนำให้เกิดการเจริญแบบ non-gametophytic ของไมโครสปอร์และจะส่งเสริมให้เกิดการสร้างและการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนของแคลลัส ทั้งนี้ระยะเวลาในการผ่านความเย็นจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ใช้ซึ่งพบว่าถ้าใช้อุณหภูมิต่ำ (3-5 องศาเซลเซียส) จะใช้ระยะเวลาในการผ่านความเย็นน้อยกว่าการใช้อุณหภูมิสูง ในข้าวจาปอนิกาการใช้ความเย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสนาน 7 วันจะให้ผลดีกว่าการใช้อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสนาน 10 วันหรือ 13 องศาเซลเซียสนาน 10-14 วัน ส่วนในข้าวอินดิกาพบว่าสามารถใช้อุณหภูมิและระยะเวลาได้ในช่วงกว้างกว่าข้าวจาปอนิกา เช่นอาจใช้อุณหภูมิ 3-5 องศาเซลเซียสนาน 10 วัน หรือ 6-8 องศาเซลเซียสนาน 10-15 วัน หรือ 9-10 องศาเซลเซียสนาน 15-20 วัน เป็นต้น นอกจากนี้ Xie *et al.* (1995) ยังพบว่าเมื่อนำช่อดอกของข้าวพันธุ์ Xiushui ไปผ่านความเย็นอุณหภูมิ 4-13 องศาเซลเซียสนานถึง 28 วันยังสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ อย่างไรก็ตามพบว่าการเพิ่มระยะเวลาในการผ่านความเย็นมักมีผลให้เกิดต้นเผือกมากขึ้น Wei and Hong (1991), Sopory and Munshi (1996), Xie *et al.* (1995) และ Kiviharju and Pehu (1998) อธิบายผลของการเตรียมอับเรณูก่อนการเพาะเลี้ยงโดยการนำช่อดอกไปผ่านความเย็นว่าอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ต่อไปนี้ เช่น การยับยั้งการเปลี่ยนแปลงไปเป็นแกมีโทไฟท์ (gametophye) ของไมโครสปอร์และกระตุ้นการพัฒนาไปเป็นสปอโรไฟท์ (sporophytic stage) การชะลอการแก่ตัวของผนังเรณู (pollen wall) และผนังอับเรณู (anther wall) ซึ่งทำให้ไมโครสปอร์มีชีวิตอยู่นานขึ้น และการชักนำให้มีการปลดปล่อยสารที่จำเป็นต่อการเกิด androgenesis เช่น กรดอะมิโนบางชนิด เป็นต้น ทั้งนี้พบว่าอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมอับเรณูของข้าวจะแตกต่างไปตามจีโนไทป์ของพันธุ์ข้าว (Wei and Hong, 1991; Tapia *et al.*, 2002) ตัวอย่างการทดลองและผลของการเตรียมอับเรณูก่อนการเพาะเลี้ยงโดยการนำช่อดอกไปผ่านความเย็น มีดังนี้

Cho and Zapata (1988) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์ของข้าวจาปอนิกาพันธุ์ Taipei 309 ที่ได้จากช่อดอกที่นำไปผ่านความเย็นที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสนาน 8 วัน สามารถชัก

นำให้เกิดแคลลัสได้มากกว่าไมโครสปอร์จากช่อดอกที่ไม่ผ่านความเย็น สอดคล้องกับ Alemano and Guiderdoni (1994) และ Farfugue *et al.* (1998) ส่วน Chen *et al.* (2001a) ทดลองผลของระยะเวลาในการเตรียมอับเรณูโดยการบ่มช่อดอกของข้าวพันธุ์ Taipei 309 ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียสนาน 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจะสูงขึ้นเมื่อเวลาในการบ่มช่อดอกเพิ่มขึ้นจาก 1, 3 และ 5 วันตามลำดับ การบ่มช่อดอกนานกว่า 5 วันจะมีผลให้การเกิดแคลลัสลดลง และพบว่าการบ่มช่อดอกนานกว่า 11 วันจะไม่มีการเกิดแคลลัสเลย

Lee *et al.* (2004) เพาะเลี้ยงอับเรณูของต้นข้าว BC_4F_1 ที่ได้จากการผสมกลับระหว่างข้าวจาปอนิกาพันธุ์ Mankeumbyeo และข้าวอินดิกาพันธุ์ Ranta Emas และนำช่อดอกไปผ่านความเย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสนาน 10 วัน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 5.9-28.6 เปอร์เซ็นต์

7.2.2 ระยะการพัฒนาของไมโครสปอร์ภายในอับเรณูที่เหมาะสมต่อการนำมาเพาะเลี้ยง

ระยะการพัฒนาของไมโครสปอร์ที่นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์มีอิทธิพลต่อการชักนำและการพัฒนาของแคลลัส โดยทั่วไปไมโครสปอร์ในระยะที่มีเพียงหนึ่งนิวเคลียส (uninucleate stage) จะมีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงได้ดี เนื่องจากไมโครสปอร์ในระยะที่มีสองนิวเคลียสจะมีการสะสมแป้งซึ่งมีผลต่อการพัฒนาไปเป็นแคลลัสหรือเป็นต้นของไมโครสปอร์ (Genovesi and Magill, 1979; Sopory and Munshi, 1996) สอดคล้องกับการทดลองของ Guha-Mukherjee (1973) ซึ่งเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์ของข้าวพันธุ์ต่างๆ รวม 20 พันธุ์และรายงานว่าเฉพาะไมโครสปอร์ในระยะที่มีเพียงหนึ่งนิวเคลียสเท่านั้นที่สามารถพัฒนาไปเป็น pollen embryo ได้ ส่วนไมโครสปอร์ในระยะ tetrad จะไม่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยง

จากรายงานผลการทดลองดังกล่าวจำนวนมากทำให้ทราบว่าในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวนิยมใช้อับเรณูที่มีไมโครสปอร์ที่มีการพัฒนาอยู่ในระยะ mid uninucleate จนถึงระยะ late uninucleate (Ching, 1982; Shahjahan *et al*., 1992; Alejar *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2001a; Lee *et al*., 2003) โดยสามารถคัดเลือกดอกข้าวที่มีไมโครสปอร์ในระยะดังกล่าวได้โดยดูจากลักษณะภายนอกของดอกซึ่งส่วนใหญ่จะมีสีเหลืองอ่อนปนเขียวและมีอับเรณูอยู่สูงไม่เกินครึ่งหนึ่งของดอก (รัตน์ดา, 2538; ยี่โถ, 2540; จันทร์วิภา, 2547; Ching, 1982; Shahjahan *et al*.,1992)

อย่างไรในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวบางพันธุ์พบว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูที่มีไมโครสปอร์ในระยะ early-uninucleate ซึ่งเป็นไมโครสปอร์ที่มีนิวเคลียสขนาดเล็กอยู่บริเวณกลางเซลล์และไม่มีแวคิวโอลมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุด (62.5-80.2 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาได้แก่ไมโครสปอร์ในระยะ mid-uninucleate (59.7-67.3 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเป็นระยะที่นิวเคลียสของไมโครสปอร์จะถูกแวคิวโอลดันมาอยู่ชิดกับขอบด้านข้างของเซลล์ ส่วนไมโครสปอร์ในระยะ late-uninucleate ซึ่งเป็นระยะที่นิวเคลียสของไมโครสปอร์ถูกดันไปอยู่ด้านตรงข้ามกับ germinative pore มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสต่ำที่สุด (36.7-75.0 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้ยังพบว่าแคลลัสที่เจริญจากไมโครสปอร์ในระยะ late-uninucleate มีอัตราส่วนของต้นสีเขียวต่อต้นเผือกต่ำที่สุด (Chen, 1978) พบว่าไมโครสปอร์ที่มีการพัฒนาอยู่ในระยะเดียวกันแต่เก็บมาจากตำแหน่งที่ต่างกันของช่อดอกจะมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสได้แตกต่างกัน โดยไมโครสปอร์ที่อยู่ในระยะ mid-uninucleate ที่เก็บมาจากบริเวณส่วนยอด (top) ส่วนกลาง (middle) และส่วนฐาน (basal) ของช่อดอก มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 7.67, 12.07 และ 16.23 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่ไมโครสปอร์ในระยะ late-uninucleate มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 9.91, 14.85 และ 28.93 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สันนิษฐานว่าอาจเป็นผลมาจากการกระจายตัวของสารประกอบและแร่ธาตุซึ่งมีความสำคัญต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสที่ไม่เท่ากันภายในช่อดอก (Afza *et al.,* 2000)

7.3 ปัจจัยที่เกี่ยวกับอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงอับเรณู

ส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงอับเรณูซึ่งได้แก่สารอนินทรีย์ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโต ตลอดจนวิตามินชนิดต่างๆ เป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งในการชักนำให้ไมโครสปอร์เกิดการแบ่งตัวและพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ อาหารสังเคราะห์สูตรหนึ่งๆ อาจมีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์หนึ่งๆ หรือกลุ่มหนึ่งๆ เท่านั้น เนื่องจากการตอบสนองต่ออาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงขึ้นอยู่กับจีโนไทป์ของต้นที่เป็นแหล่งเรณู (Sopory and Munshi, 1996)

7.3.1 องค์ประกอบของสูตรอาหารพื้นฐาน

Chu *et al.* (1975) พัฒนาสูตรอาหารพื้นฐาน N_6 โดยอาศัยหลักที่ว่าปริมาณของ NH_4^+ ions ในอาหารเพาะเลี้ยงมีผลต่อการชักนำไมโครสปอร์ของข้าวให้เกิดการแบ่งตัวเป็นแคลลัส และการลดปริมาณ NH_4^+ ions จะส่งเสริมการเกิดแคลลัสในข้าวอินดิกาได้ดี ต่อมามีการ

ดัดแปลงอาหารสูตร N_6 โดยการปรับความเข้มข้นของ NH_4^+ ions และสารอินทรีย์บางชนิดทำให้การเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ต่างๆ มีความถี่ในการเกิดแคลลัสเพิ่มขึ้น เช่น สูตร SK-1 (Raina *et al.,* 1989) และสูตร Chu (Chu *et al.*, 2003) เป็นต้น ส่วนการชักนำให้แคลลัสเกิดการพัฒนาไปเป็นต้นนั้นนิยมใช้สูตรอาหารพื้นฐาน MS ดัดแปลงที่เติมแร่ธาตุต่างๆ ที่ส่งเสริมการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัส (Nizeki, 1997) พบว่าจีโนไทป์มีผลในการตอบสนองต่อสูตรอาหารพื้นฐาน ดังการทดลองของ Mandal and Gupta (1997) ซึ่งเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมระหว่าง *Oryza sativa* L. cv pankaj กับ *O. rufipogon* Grift. บนอาหารสูตร N_6, He_2, He_5, R_3 และสูตร N_6 ดัดแปลง พบว่าอับเรณูที่เพาะเลี้ยงตอบสนองต่อสูตร He_2 มากที่สุดและตอบสนองต่อสูตร R_3 น้อยที่สุด

7.3.2 แหล่งธาตุอาหารคาร์บอน

โดยทั่วไปแล้วนิยมเติมน้ำตาลซูโครสลงในอาหารเพาะเลี้ยงอับเรณูเพื่อใช้เป็นแหล่งธาตุอาหารคาร์บอนและเป็น osmoregulator เพื่อรักษาแรงดันออสโมติกของอาหาร การเติมน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงไม่เพียงแต่จะมีผลต่อการเกิดแคลลัสเท่านั้นแต่ยังมีผลต่อการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสอีกด้วย ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้โดยทั่วไปคือ 2-4 เปอร์เซ็นต์แต่ก็มีรายงานว่าการเติมน้ำตาล 6-12 เปอร์เซ็นต์สามารถชักให้เกิดแคลลัสได้ดีในพืชหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวสาลี และข้าวบาเลย์ เป็นต้น (Bajaj, 1990; Wei and Hong, 1991) ดังการทดลองของ Chen (1978) ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ Tainan5 ในอาหารที่เติมซูโครส 6 และ 9 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้นสูงกว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับรายงานของ Ching (1982), Yadav *et al.* (1991), Alemano and Guiderdoni (1994) และ Chu *et al.* (2003) ซึ่งพบว่าการเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่ำๆ จะช่วยชักนำให้เกิดแคลลัส ส่วนการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงมีผลให้ความถี่ของการพัฒนาเป็นยอดของแคลลัสมีค่ามากขึ้น

ตั้งแต่ปี คศ. 1983 เป็นต้นมามีรายงานการเพาะเลี้ยงอับเรณูของพืชหลายชนิดที่แสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำตาลมอลโตสเป็นแหล่งธาตุอาหารคาร์บอนสามารถชักนำให้เกิดกระบวนการ androgenesis ได้ดีกว่าน้ำตาลซูโครส (Last and Brettell, 1990; Zhang, 1995; Bhojwani *et al*., 2001) Asano *et al.* (1994), Alejar *et al*. (1995) และTapia *et al.* (2002) รายงานว่าเปอร์เซ็นต์การตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวอินดิกาและข้าวจาปอนิกาเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำตาลมอลโตสมีค่าสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส เช่นเดียวกับ Jain *et al.*

(1996a) ซึ่งเปรียบเทียบผลการเพาะเลี้ยงโปรโทพลาสต์ของข้าวอินดิกาและข้าวจาปอนิกาพันธุ์ Pusa Basmati 1 พันธุ์ IR43 และพันธุ์ Taipei 309 ในอาหารที่เติมน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น cellobiose, fructose, glucose lactose, maltose, sorbitol และ sucrose ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 8 mM พบว่าน้ำตาลมอลโตสสามารถชักนำให้มีการสร้างแคลลัสและการพัฒนาไปเป็นต้นได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลอง Roy and Mandal (2005) ที่เพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวอินดิกาพันธุ์ต่างๆ บนอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่เติมน้ำตาลต่างชนิดกัน เช่น sucrose, glucose, maltose, dextrose, galactose และ cane sugar และพบว่าพันธุ์ข้าวส่วนใหญ่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุดในอาหารที่เติมน้ำตาลมอลโตส 3 และ 6 เปอร์เซ็นต์

Lentini *et al.*(1995)ศึกษาผลของน้ำตาลมอลโตสในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ต่างๆ พบว่าอับเรณูที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมมอลโตสมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส (6.3-10.1 เปอร์เซ็นต์) และการเกิดต้นสีเขียว (0.6-1 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าอับเรณูที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมซูโครสที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากัน โดยเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นสีเขียวมีค่ามากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตสเพิ่มขึ้น ส่วนการเติมกลูโคสลงในอาหารมีผลให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสลดลง จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลมีความสำคัญต่อการเกิด androgenesis นอกเหนือไปจากการทำหน้าที่เป็น osmoregulator ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าว เช่นเดียวกับการทดลองของ Raina and Irfan (1998) ซึ่งพบว่าการเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์ของข้าวอินดิกาในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ไม่สามารถชักนำให้ไมโครสปอร์เกิดการแบ่งเซลล์ได้ แต่ถ้าเติมน้ำตาลมอลโตส 9 เปอร์เซ็นต์แทนซูโครสจะทำให้ไมโครสปอร์เกิดการแบ่งเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวบางพันธุ์พบว่าการเติมน้ำตาลมากกว่าหนึ่งชนิดลงในอาหารจะช่วยส่งเสริมการเกิดแคลลัสได้ ดังการทดลองของ Chu *et al*. (2003) ซึ่งพบว่าการเติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำตาลมอลโตส 20 กรัมต่อลิตร และ sorbital 20 กรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าการเติมน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียวลงในอาหาร

ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวอินดิกาบางพันธุ์พบว่าการตอบสนองต่ออาหารที่เติมน้ำตาลมอลโตสไม่แตกต่างจากอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส อย่างไรก็ตามแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมมอลโตสมักมีลักษณะเชิงคุณภาพดีกว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมซูโครส (Zhang, 1995)

7.3.3 สารควบคุมการเจริญเติบโต

ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารมีอิทธิพลต่อการพัฒนาของไมโครสปอร์ภายในอับเรณู โดยพบว่าการเติม IAA จะชักนำการเกิด direct embryogenesisในขณะที่ 2,4-D จะส่งเสริมการเกิดและการแบ่งตัวของแคลลัส ส่วนการเติม NAA มักกระตุ้นให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นได้ในอาหารสูตรชักนำแคลลัส (Ball *et al*., 1993) ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวนิยมเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน(auxin) ลงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส โดยอาจเติมออกซิน เช่น 2,4-D หรือ NAA หรือ 2,4,5-T เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งหรือสองชนิดร่วมกันหรืออาจเติมออกซินร่วมกับไซโตไคนิน (cytokinin) ในอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการส่งเสริมให้เกิดแคลลัสหรือกระบวนการ embryogenesis ของไมโครสปอร์ (Croughan and Chen, 1991; Wei and Hong, 1991; Mori, 1997) พบว่าในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวอินดิกามักใช้ความเข้มข้นของ 2,4-D หรือ NAA ต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงข้าวจาปอนิกา และการใช้ 2,4-D ความเข้มข้นต่ำร่วมกับ NAA และ kinetin ความเข้มข้นสูงจะสามารถกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของไมโครสปอร์แบบ direct embryogenesis โดยไม่ต้องผ่านระยะการเป็นแคลลัสได้ (Lynch *et al*., 1991)

เนื่องจากการตอบสนองต่อชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของข้าวแต่ละพันธุ์ได้รับอิทธิพลจากจีโนไทป์ของต้นที่ใช้เป็นแหล่งอับเรณูเป็นปัจจัยหลัก ดังนั้นการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดหนึ่งๆ ลงในอาหารสูตรชักนำแคลลัสอาจมีผลต่อการเกิดแคลลัสและการพัฒนาของแคลลัสในข้าวแต่ละพันธุ์แตกต่างกันไปดังการทดลองของ Huang *et al*. (1986) ซึ่งพบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ Tainan 5 บนอาหารที่เติม 2,4-D 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตรไม่แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้นเท่ากัน ผลการทดลองดังกล่าวไม่สอดคล้องกับรายงานของ Roy and Mandal (2005) ที่พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของอับเรณูของข้าวอินดิกาพันธุ์ Karnal local 95 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตรมีค่าสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยมีค่าเท่ากับ 2.06 และ 1.51 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อนำแคลลัสไปชักนำให้เกิดต้นปรากฏว่าแคลลัสที่ผ่านการเลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D สามารถพัฒนาเป็นต้นได้มากกว่าแคลลัสที่ผ่านการเลี้ยงในอาหารที่เติม NAA ส่วน Rout and Sarma (1991) พบว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสม (*Oryza sativa* L. X *O. rufipogon* Grift.) บนอาหารที่เติม 2,4-D เพียงอย่างเดียวมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสต่ำกว่าอาหารที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA 2

มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพบว่าการเติม NAA เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับ 2,4-D ก็สามารถชักนำการเกิดแคลลัสจากอับเรณูของข้าวลูกผสมดังกล่าวได้ เช่นเดียวกับการทดลองของ Farfuque *et al*. (1998) ซึ่งเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ IR 43 ในอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 22.8 เปอร์เซ็นต์

สารควบคุมการเจริญเติบโตที่นิยมเติมลงในอาหารสูตรชักนำต้น ได้แก่ kinetin BAP, NAA และ IAA เป็นต้น พบว่าการลดความเข้มข้นของ 2,4-D หรือแทนที่ด้วย NAA หรือ IAA จะสามารถชักนำการพัฒนาเป็นต้นของแคลลัสได้ (Mori, 1997) จากรายงานการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวจำนวนมากชี้ให้เห็นว่าความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ ระหว่างจีโนไทป์และองค์ประกอบของสูตรอาหารที่ใช้ (Xie *et al*., 1995; Khanna and Raina, 1998) ดังการทดลองของ Rout and Sarma (1986) ซึ่งทดลองนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวอินดิกาและข้าวจาปอนิกาบางชนิดไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อชักนำให้เกิดต้น พบว่าเปอร์เซ็นต์การ พัฒนาของแคลลัสไปเป็นต้นของข้าวอินดิกาและข้าวจาปอนิกามีค่าอยู่ระหว่าง 45.5-87.5 เปอร์เซ็นต์และ 68.0-77.7 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เช่นเดียวกับการทดลองของ Reiffer and Freire (1989) ที่พบว่าเมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสม (Catetao Precoce/ Metica1) ไปเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้นสูตร MS ที่เติม kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาไปเป็นต้นได้สูงสุด 44.4 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แคลลัสของข้าวลูกผสมระหว่างพันธุ์ Guarani กับพันธุ์ L13 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้เลย

Bishnoi *et al*. (2000b) พบว่าเมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวบางพันธุ์ไปเลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดต้นสูตร MSR1 ซึ่งประกอบด้วย MS ที่เติม kinetin และ BA อย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาไปเป็นต้นได้สูงกว่าแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MSR2 ซึ่งประกอบด้วย MS ที่เติม kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

Tapia *et al*. (2002) รายงานว่าเมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ Koshihikari, Sasanishiki และ Morelos A-92 ไปชักนำให้เกิดต้นบนอาหารสูตร MS ที่

เติม kinetin 9.29 μM และ IAA 5.71 μM ปรากฏว่าเฉพาะแคลลัสจากพันธุ์ Koshihikari และ Morelos A-92 เท่านั้นที่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้บนอาหารสูตรดังกล่าว

Asaduzzaman *et al*. (2003) ชักนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ต่างๆ รวม 5 พันธุ์ให้เป็นต้นโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำต้นที่ต่างกัน 2 สูตร พบว่าแคลลัสของข้าวพันธุ์ BR-5 BR-31 และ BR-37 สามารถพัฒนาเป็นต้นได้สูงสุด 25.44, 10.20 และ 33.32 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนแคลลัสจากพันธุ์ BR-34 และ BR-38 สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ 25.86 และ 30.15 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

การพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสนั้นนอกจากจะขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์กับสูตรอาหารที่ใช้แล้ว ยังขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ของสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสกับสูตรชักนำให้เกิดต้นอีกด้วย ดังการทดลองของ Raina *et al*. (1989) ซึ่งพบว่าเมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวอินดิกาบางพันธุ์บนอาหารสูตร MSN และ SK-1 ไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น ปรากฏว่าแคลลัสที่ได้จากสูตร SK-1 มีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้น (33.7 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าแคลลัสที่ได้จากสูตร MSN (11.1 เปอร์เซ็นต์) เช่นเดียวกับ Xie *et al*. (1995) ที่พบว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูในอาหารสูตร N_6 ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำตาลมอลโตส 60 กรัมต่อลิตรเท่านั้น ที่สามารถเจริญไปเป็นต้นได้หลังจากนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นที่ประกอบด้วย MS ที่เติม kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ส่วนแคลลัสที่ได้จากอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้เลย Bishnoi *et al*. (2000a) พบว่าเมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมบนอาหารชักนำแคลลัสสูตรต่างๆ ไปชักนำให้เกิดต้นบนอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 1มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 1มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรากฏว่าแคลลัสที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำแคลลัสสูตร RZM มีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นอยู่ระหว่าง 0-51 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแคลลัสที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6M และ Heh 5 มีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นเพียง 0-3.7 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

การเติมสารอินทรีย์และกรดอะมิโนบางชนิด เช่น น้ำมะพร้าว สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) สารสกัดจากมันฝรั่ง(potato extract) เคซีนไฮโดรไลเซท (casein hydrolysate)

(Iyer and Raina, 1972; Rout and Sarma, 1986; Kim *et al*., 1989; Hirabayashi *et al*., 1992; Zhao, 1999; Roy and Mandal, 2005) กรดอะมิโนโพรลีน (proline) กลูตามีน (glutamine) (Cho and Zapata, 1988) และ polyamine (Shoeb *et al.,* 2001) ในอาหารเพาะเลี้ยงอับเรณูจะช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์การชักนำแคลลัสและการพัฒนาของแคลลัสได้

7.4 อายุและขนาดของแคลลัส

อายุและขนาดของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูเป็นปัจจัยประการหนึ่งที่มีผลต่อการพัฒนาจากแคลลัสไปเป็นต้น โดยพบว่าความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นจะลดลงเมื่ออายุของแคลลัสเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าแคลลัสที่มีขนาดเล็กกว่า 1 มิลลิเมตรจะไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ (Wei and Hong, 1991) Ching (1982) พบว่าแคลลัสที่มีอายุ 10-15 วันสามารถพัฒนาเป็นต้นได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าแคลลัสมีอายุมากกว่า 50 วันจะพัฒนาไปเป็นต้นได้น้อยหรือไม่พัฒนาเป็นต้นเลย สอดคล้องกับการทดลองของ Chen *et al.* (2001a) ซึ่งพบว่าเมื่อนำแคลลัสขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตรที่มีอายุ 35, 45 และ 55 วันไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นจะสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้เพียง 7.7, 10.6 และ 16.7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแคลลัสที่มีอายุตั้งแต่ 65 วันขึ้นไปจะไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้เลย

8. <u>การเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมแบบทวีคูณ</u>

ต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูมักมีจำนวนโครโมโซมเพียงครึ่งหนึ่งของจำนวนโครโมโซมในต้นที่เป็นแหล่งเรณู (anther donor plant) และไม่สามารถติดเมล็ดได้ นิยมเรียกต้นพืชเหล่า นี้ว่า ต้นแฮพลอยด์ (haploid plant) โดยทั่วไปมักนำต้นแฮพลอยด์ที่ได้นี้เข้าสู่กระบวนการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมแบบทวีคูณ (chromosome doubling) ทั้งนี้เพื่อให้ได้ต้นดับเบิลแฮพลอยด์ (doubled haploid plant) ที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเท่าตัว และคาดว่ามีพันธุกรรมอยู่ในสภาพพันธุ์แท้ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไปของกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชได้ (Rao and Suprasanna, 1996) การเพิ่มจำนวนโครโมโซมของต้นแฮพลอยด์ อาจเกิดจากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยธรรมชาติ (spontaneous chromosome doubling) หรือโดยการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซม (induced chromosome doubling หรือ artificial chromosome doubling) การเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยธรรมชาติอาจเกิดขึ้นระหว่างการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส (meiotic doubling) โดยกลไกการเกิด unreduced gametes หรืออาจเกิดขึ้นระหว่าง

การแบ่งเซลล์แบบไมโทซีส (somatic ploidy increasing) โดยกระบวนการ endomitosis และ endoreduplication นอกจากนี้ยังอาจเป็นผลมาจากการเกิด nuclear fusion ได้อีกด้วย พบว่าอัตราการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยธรรมชาติในต้นแฮพลอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูมีความผันแปรทั้งในระดับสปีชีส์และในระดับพันธุ์ (Bajaj, 1990; Rao and Suprasanna, 1996)

สำหรับการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมนั้น ทำได้โดยการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมีที่มีคุณสมบัติเป็น antimitotic agent ชนิดต่างๆ เช่น colchicine, nitrous oxide, podophyllin, oryzalin, trifluralin และ amiprophosmethyl เช่น การทดลองของ Ramulu *et al.* (1991) ซึ่งใช้ colchicine ความเข้มข้น 0.5-5.0 mM oryzalin และ amiprophosmethy ความเข้มข้น 15-32 μM ในการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมในการเพาะเลี้ยงโปรโทพลาสต์ของมันฝรั่ง นอกจากนี้การเพิ่มจำนวนโครโมโซมยังถูกเหนี่ยวนำได้ด้วยสภาพทางกายภาพบางประการ เช่น อุณหภูมิ เป็นต้น อย่างไรก็ตามพบว่าโดยทั่วไปนิยมใช้สารโคลชิซิน (colchicine) ในการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของต้นแฮพลอยด์ (Rao and Suprasanna, 1996; Sopory and Munshi, 1996; Arzari and Darvey, 2001; Chen *et al.*, 2001a)

โคลชิซินเป็นสารประเภทอัลคาลอยด์ (alkaloid) สกัดได้จากเมล็ด ดอก ใบ และหัว ของ autum crocus (*Colchicum autummnale*) ลักษณะเป็นผลึกสีเหลือง มีคุณสมบัติเป็นเบสอ่อนๆ หรือเป็นกลาง ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม แอลกอฮอล์ และน้ำเย็น (Hussein and Narsa, 1974) โคลชิซินมีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งการสร้างและการทำงานของสายใยสปินเดิล (spindle fibre inhibitor) โดยพบว่าโคลชิซินจะเข้าจับกับโปรตีนทูบูลิน(tubulin) ทำให้โปรตีนเหล่านี้ไม่สามารถจัดเรียงตัวต่อกันเป็นไมโครทูบูล (microtubule)ได้ ส่งผลให้การสร้างและการทำงานของสายใยสปินเดิลถูกขัดขวาง การเคลื่อนที่ของโครโมโซมเข้าสู่ขั้วเซลล์จึงไม่สามารถเกิดขึ้นอย่างปกติ เป็นผลให้มีการรวมตัวกันใหม่ (restitution) ของโครโมโซมเกิดเป็นนิวเคลียสที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเท่าตัว โดยทั่วไปการใช้สารโคลชิซินเพื่อชักนำให้มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมนิยมใช้ในรูปของสารละลายที่ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.006-3 เปอร์เซ็นต์ และมักเติม dimethyl sulphoxide (DMSO) 1-4 เปอร์เซ็นต์เพื่อทำหน้าที่เป็น wetting agent ที่ช่วยให้โคลชิซินถูกดูดซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชได้มากขึ้น (Artvini, 1987; Wong, 1989; Rao and Suprasanna, 1996; Antoine-Michard and Beckert, 1997; Arzari and Darvey, 2001)

เนื่องจากโคลชิซินสามารถทำงานได้ดีในเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว จึงมีแนวโน้มว่าชิ้นส่วนทุกชนิดของพืชที่ประกอบด้วยเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวสามารถถูกชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมได้ (Eigsti and Dustin, 1954) ส่วนต่างๆ ของพืชที่นิยมนำมาชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมด้วยสารโคลชิซิน ได้แก่ เมล็ด (อมรา, 2508) ต้นกล้า (Gupta and Gill, 1985) ตาข้าง (Rose *et al.*, 2000) ตายอด (Lotfi *et al.*, 2003) อับเรณู (Antoine-Michard and Beckert, 1997) แคลลัส (Chen and Yvonne, 1978) และหน่อ (Chen *et al.,* 2001a) เป็นต้น

กาญจนา (2537) นำหน่อของต้นข้าวทริปพลอยด์(triploid)ไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งที่เติมสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์นาน 3, 5 และ 7 วัน เมื่อนำออกปลูกพบว่าเฉพาะหน่อที่ได้รับสารนาน 7 วันเท่านั้นที่สามารถติดเมล็ดได้

รัตน์ดา (2538) ทดลองนำหน่อของต้นข้าวแฮพลอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งที่เติมโคลชิซินความเข้มข้น 0.01 และ 0.03 เปอร์เซ็นต์นาน 3 และ 5 วัน พบว่าหน่อที่เลี้ยงในอาหารที่มีโคลชิซิน 0.03 เปอร์เซ็นต์นาน 3 วันสามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมแบบทวีคูณได้สูงสุด 50 เปอร์เซ็นต์

Chen *et al.* (2001a) แบ่งหน่อของต้นข้าวแฮพลอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ Taipei 309 เป็นสองกลุ่ม กลุ่มที่หนึ่งนำไปแช่ในสารละลายโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่เหลือแช่ในสารละลาย oryzalin ความเข้มข้น 25 μM พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นดับเบิลแฮพลอยด์จากหน่อข้าวที่แช่ในสารละลาย oryzalin และหน่อข้าวที่แช่ในสารละลายโคลชิซินมีค่าเท่ากับ 31.0 และ 11.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Alemanno and Guiderdoni (1994) เพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ Miara บนอาหารกึ่งแข็งสูตรชักนำแคลลัสที่เติมสารโคลชิซิน 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายหลังจากนำไปชักนำให้เกิดต้นและนำออกปลูก พบว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมโคลชิซินนาน 24 และ 48 ชั่วโมงมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นดับเบิลแฮพลอยด์เท่ากับ 51.4 และ 65.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ทั้งนี้ Morais *et al.* (1991) เสนอว่าในการใช้สารโคลชิซินเพื่อชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมแบบทวีคูณมีสิ่งที่ต้องคำนึง ได้แก่ ชนิดของพืช ชิ้นส่วนของพืชที่ได้รับสาร ระดับความเข้มข้นของสาร ระยะเวลาในการให้สาร และวิธีการให้สาร เนื่องจากพืชแต่ละชนิด

ตลอดจนส่วนต่างๆ ของพืชที่ได้รับสารมีการตอบสนองต่อระดับความเข้มข้น ระยะเวลาในการให้สาร และวิธีการให้สารได้แตกต่างกัน สอดคล้องกับการทดลองของ Sun *et al.* (1994) ซึ่งนำต้นกล้าของ *Sorghum vesicolor* มาแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ โดยเปรียบเทียบผลการแช่เฉพาะส่วนปลายยอด ปลายรากและการแช่ทั้งต้น พบว่าการแช่ต้นกล้าทั้งต้นในสารโคลชิ-ซินความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์มีการเกิดต้นพอลิพลอยด์สูงสุด 8.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการแช่ปลายยอดหรือปลายรากในสารที่มีความเข้มข้น 0.2 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นพอลิพลอยด์สูงสุด 6.7 เปอร์ เซ็นต์

Currah and Ockendon (1987) ทดลองฉีดสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์เข้าสู่ยอดของ Brussels sprout plants ที่เป็นแฮพลอยด์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมได้ 71.2 เปอร์เซ็นต์

Saisingtong *et al.* (1996) รายงานผลการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวโพดในอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่เติมโคลชิซิน พบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมโคลชิซิน 250 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมแบบทวีคูณได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมโคลชิซินถึง 7 เท่า เช่นเดียวกับ Barnabus *et al.* (1991) ซึ่งเพาะเลี้ยงอับเรณูของ *Triticum aestivum* L. ในอาหารที่เติมโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.01, 0.02 และ 0.04 เปอร์เซ็นต์นาน 3 วัน แล้วเพาะเลี้ยงต่อในอาหารสูตรปกติ ภายหลังการชักนำให้เกิดต้นและนำออกปลูกพบว่าที่ความเข้มข้น 0.02 และ 0.04 เปอร์เซ็นต์สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมแบบทวีคูณและติดเมล็ดได้ 68.8 และ 62.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วน Redha *et al.* (1998) พบว่าอับเรณูของข้าวสาลีที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่เติมโคลชิซินความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดต้นดับเบิลแฮพลอยด์ได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์

9. <u>การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยการเพาะเลี้ยงอับเรณู</u>

การเพาะเลี้ยงอับเรณูเพื่อชักนำให้เกิดต้นแฮพลอยด์และดับเบิลแฮพลอยด์เป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่มีผลให้ได้ต้นข้าวที่อยู่ในสภาพพันธุ์แท้ได้ในเวลาที่รวดเร็ว ดังการทดลองของ Zapata *et al.* (1991a) ซึ่งใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงอับเรณูในการสร้างลูกผสมระหว่างข้าวอินดิกาสายพันธุ์ต่างๆ ให้มีลักษณะต้นเตี้ย ทนเค็ม และมีผลผลิตสูง พบว่าสามารถสร้างต้นดับเบิลแฮพลอยด์ที่มีลักษณะดีตามต้องการได้ในเวลาอันรวดเร็ว

รัตน์ดา (2538) ปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ105 โดยการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมระหว่างข้าวพันธุ์เลมอนท์ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่ให้ผลผลิตสูงกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยนำอับเรณูจากช่อดอกที่มีระยะห่างระหว่างข้อของใบธงกับข้อใบที่อยู่ถัดลงมา 6-12 เซนติเมตร ซึ่งมีไมโครสปอร์อยู่ในระยะ mid-uninucleate เป็นส่วนใหญ่ และผ่านการเตรียมช่อดอกด้วยความเย็นที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียสนาน 8-10 วัน มาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารสูตร N_6 ที่เติมน้ำตาลมอลโตส 50 กรัมต่อลิตร casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอับเรณูสามารถเกิดแคลลัสได้ 8.60-11.97 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ casein hydrolysate 300 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อนำต้นที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารที่เติมสารโคลชิซิน 0.0.1 หรือ 0.03 เปอร์เซ็นต์นาน 3 หรือ 5 วัน ปรากฏว่าได้ต้นที่มีโครโมโซม 2 ชุดและอยู่ในสภาพพันธุ์แท้

ภัทรพร (2540) ปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้มีลักษณะต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลด้วยการเพาะเลี้ยงอับเรณูของลูกผสมชั่วที่1 โดยนำอับเรณูจากช่อดอกที่มีระยะห่างระหว่างข้อของใบธงกับข้อใบที่อยู่ถัดลงมา 5-10 เซนติเมตร ซึ่งมีไมโครสปอร์อยู่ในระยะ mid-late uninucleate และผ่านการเตรียมช่อดอกด้วยความเย็นที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสนาน 8 วัน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6A ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลมอลโตส 50 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำอับเรณูให้สร้างแคลลัสได้ 3.12 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดสีเขียวได้ 1.96 เปอร์เซ็นต์และสามารถเจริญเป็นต้นที่มียอดและรากสมบูรณ์ได้ในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

Afza *et al.* (2000) ปรับปรุงพันธุ์ข้าว Taipei ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงอับเรณูของโดยนำอับเรณูจากช่อดอกซึ่งมีระยะห่างระหว่างข้อของใบธงกับข้อใบที่อยู่ถัดลงมา 7-13 เซนติเมตรและผ่านการเตรียมช่อดอกด้วยความเย็นนาน 8 วัน มาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหารกึ่งแข็งสูต N_6 ที่เติมน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร และ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ pH 5.8 พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 13.38 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำแคลลัสที่มีขนาดอย่างน้อย 2 มิลลิเมตรไปเลี้ยงใน

อาหารชักนำให้เกิดต้นสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นได้ 22.61 เปอร์เซ็นต์

Marassi (2000) เพาะเลี้ยงอับเรณูจากต้นข้าวชั่วที่ 2 ของข้าวลูกผสมโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตข้าวพันธุ์ใหม่ โดยนำอับเรณูที่มีเรณูในระยะ mid-uninucleate จากช่อดอกที่ผ่านการเตรียมช่อดอกด้วยความเย็นนาน 8 วัน มาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหารสูตร N_6 เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส 14.6 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสสามารถเกิดยอดสีเขียวได้ 85 เปอร์เซ็นต์เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดยอด และจะเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์เมื่อย้ายแคลลัสที่เกิดยอดเขียวนั้นไปเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดราก

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การผสมพันธุ์ข้าวเพื่อสร้างลูกผสมชั่วที่1 (F_1) และลูกผสมกลับ BC_1F_1

1.1 ผสมพันธุ์ข้าวสายพันธุ์ IRBB5 กับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เพื่อสร้างลูกผสมชั่วที่1

นำเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และสายพันธุ์ IRBB5 ซึ่งได้ความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี มาเพาะในจานแก้วที่รองพื้นด้วยกระดาษทิชชูและพรมน้ำให้ชื้นนานประมาณ 1 สัปดาห์ แล้วย้ายออกปลูกในกระถางดินเผา เมื่อต้นข้าวออกดอกพร้อมผสมจึงทำลายเกสรตัวผู้ (emasculation) ในต้น IRBB5 ที่ใช้เป็นพันธุ์แม่ด้วยวิธีใช้ความร้อน (hot water method) แล้วจึงนำเกสรตัวผู้จากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มาผสม จากนั้นคลุมช่อดอกที่ได้รับการผสมด้วยถุงกระดาษทิ้งไว้ประมาณ 25-30 วันจึงเก็บเมล็ดลูกผสมชั่วที่1 ตากเมล็ดให้แห้งเพื่อลดความชื้นนานประมาณ 2 วัน นำเมล็ดไปอบในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียสนาน 5-7 วันเพื่อทำลายการพักตัวของเมล็ด

1.2 การผสมข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับลูกผสมชั่วที่1 เพื่อสร้างลูกผสมกลับ BC_1F_1

นำเมล็ดลูกผสมชั่วที่1 ที่ผ่านการทำลายการพักตัวของเมล็ดแล้วไปเพาะและปลูกด้วยวิธีในข้อ 1.1 เมื่อต้นลูกผสมชั่วที่1 ออกดอกพร้อมผสมจึงใช้เป็นต้นพ่อเพื่อผสมกลับไปยังข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งใช้เป็นต้นแม่ เมื่อเมล็ดลูกผสมกลับ BC_1F_1 มีอายุประมาณ 25-30 วันจึงเก็บเมล็ดนำ ไปตากแดดให้แห้งเพื่อลดความชื้นนานประมาณ 2 วัน จากนั้นจึงนำเมล็ดไปอบในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียสนาน 5-7 วันเพื่อทำลายการพักตัวของเมล็ด แล้วจึงเพิ่มจำนวนต้นลูกผสมกลับชั่วที่1 โดยการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

1.3 การเพิ่มจำนวนต้นข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 ในอาหารสังเคราะห์

นำเมล็ดลูกผสมกลับ BC_1F_1 ที่ผ่านการทำลายการพักตัวเรียบร้อยแล้วไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 2-3 นาที จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ที่เติม Tween 20 จำนวน 2-3 หยด เขย่าเป็นครั้งคราวนาน 25-30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง เพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัม

ต่อลิตร น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ casein hydrolysate 1 กรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ระดับ pH 5.7 เพาะเลี้ยงในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25± 2 องศาเซลเซียส

เมื่อต้นข้าวเจริญแข็งแรงดี จึงเพิ่มจำนวนต้นโดยย้ายลงในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ casein hydrolysate 1 กรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร วุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่าน (activated charcoal) 0.3 เปอร์เซ็นต์ ระดับ pH 5.7 (ประดิษฐ์และคณะ, 2536) เลี้ยงในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25± 2 องศาเซลเซียส เมื่อเพิ่มจำนวนต้นได้มากพอจึงนำต้นข้าวบางส่วนออกปลูกในกระถางดินเผาเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. <u>การคัดเลือกต้นข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1</u>

สกัดดีเอ็นเอจากใบของต้นข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 ตามวิธีของ Agrawal *et al.* (1992) นำมา วิเคราะห์เพื่อคัดเลือกต้นที่มียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง (*xa5*) ด้วยเครื่องหมาย RG556 ซึ่งเป็นเครื่องหมายชนิด PCR-based marker (Huang *et al*., 1997; Sanchez *et al*., 2000) โดยมีลำดับเบสของไพร์เมอร์ที่ใช้คือ F : 5′TAGCTGCTGCCGTGCTGTGC 3′ และ R : 5′AATATTT CAGTGTGCATCTC 3′ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ใช้ปริมาณสารต่างๆ ดังนี้

จีโนมิกดีเอ็นเอ (25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10X PCR buffer + $MgCl_2$	2	ไมโครลิตร
dNTP ความเข้มข้นชนิดละ 2 มิลลิโมลาร์	2	ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ F (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ R (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
Ultrapure H_2O	11.9	ไมโครลิตร
Taq polymerase	0.1	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20.0	ไมโครลิตร

นำเข้าเครื่อง PCR โดยใช้สภาวะดังนี้

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที
ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที

อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที
ทำปฏิกิริยา 35 รอบแล้วจึงบ่มต่อที่ 72 องศาเซลเซียส อีก 5 นาที
ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

จากนั้นนำผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ปริมาณ 5 ไมโครลิตรมาแยกขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้วิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel 0.8% ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์และตรวจสอบภายใต้กล้อง UV แล้วจึงนำผลผลิตที่เหลือไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำ เพาะ *Hpy* CH4 IV โดยเติมเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpy* CH4 IV (10U/µl) 1 ไมโครลิตร บับเฟอร์สำหรับเอนไซม์ 2 ไมโครลิตรและน้ำกลั่น 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนานข้ามคืน แล้วนำไปแยกขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้วิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel 1 % ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์และตรวจสอบด้วย UV transilluminator

3. <u>การคัดเลือกต้นข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_2</u>

นำต้นข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 ออกปลูกและปล่อยให้ผสมตัวเองจากนั้นจึงเก็บเมล็ดลูกผสมกลับ BC_1F_2 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.1 การคัดเลือกต้นข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_2 ที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งด้วยวิธีปลูกเชื้อ

เพาะเมล็ดลูกผสมกลับ BC_1F_2 และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เพื่อใช้เป็นพันธุ์ไม่ต้านทานมาตรฐาน (susceptible check variety) และสายพันธุ์ IRBB5 เพื่อใช้เป็นพันธุ์ต้านทานมาตรฐาน (resistant check variety) แล้วนำไปปลูกเชื้อเพื่อทดสอบความต้านทานโรคด้วยวิธี Clipping technique (Kauffman *et al.*, 1973) โดยใช้กรรไกรจุ่มสารละลายแบคทีเรียที่เตรียมไว้ ตัดปลายใบของต้นข้าวที่มีอายุ 4 สัปดาห์ยาวประมาณ 1 เซนติเมตรทุกๆ ต้นๆ ละ 2-3 ใบ ทั้งนี้จะไม่ใช้ใบที่แก่หรืออ่อนเกินไป ตรวจสอบการเกิดโรคที่ 14 วันหลังการปลูกเชื้อ ประเมินความต้านทานโรคด้วยระบบ Standard Evaluation System (SES) ของสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI, 1996) โดยให้คะแนนเป็น 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ตามระดับความเสียหายของข้าว ซึ่งคิดจากเปอร์เซ็นต์พื้นที่บนใบที่เกิดโรค ดังนี้

ระดับคะแนน	ความเสียหายจากการทำลายของโรค	ระดับความต้านทานโรค
1	0-3%	HR (highly resistant)
2	4-6%	R (resistant)
3	7-12%	MR (moderately resistant)
4	13-25%	MS (moderately susceptible)
5	26-50%	MS (moderately susceptible)
6	51-75%	MS (moderately susceptible)
7	76-87%	S (susceptible)
8	88-94%	HS (highly susceptible)
9	95-100%	HS (highly susceptible)

3.2 การคัดเลือกต้นข้าว BC_1F_2 ที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบของต้นข้าว BC_1F_2 ตามวิธีของ Agrawal *et al.* (1992) นำมาวิเคราะห์เพื่อ คัดเลือกต้นที่มียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง (*xa5*) ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RG556 (Huang *et* al. 1997; Sanchez *et al.*, 2000) เช่นเดียวกับวิธีการทดลองข้อที่ 2

3.3 การคัดเลือกต้นข้าว BC_1F_2 ที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ105

นำดีเอ็นเอจากต้นข้าว BC_1F_2 ที่ผ่านการคัดเลือกในข้อ 3.1 และ 3.2 แล้ว มาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี (สุรินทร์, 2544; Vos *et al.*, 1995) เปรียบ เทียบกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 และสายพันธุ์ IRBB5 เพื่อคัดเลือกต้นข้าว BC_1F_2 ที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 มากที่สุด โดยใช้จำนวนไพรเมอร์ทั้งหมด 64 คู่ คือ *EcoR*I+3 และ *Mse*I+3 อย่างละ 8 ชนิด ดังนี้

*EcoR*I ไพรเมอร์ : E1 = GACTGCGTACCAATTC**AAC**

E2 = GACTGCGTACCAATTC**AAG**

E3 = GACTGCGTACCAATTC**ACA**

E4 = GACTGCGTACCAATTC**ACT**

E5 = GACTGCGTACCAATTC**AGC**

E6 = GACTGCGTACCAATTC**ACC**

E7 = GACTGCGTACCAATTC**ACG**

E8 = GACTGCGTACCAATTC**AGG**

*Mse*I ไพรเมอร์ : M1 = CAGGATTCCTGAGTA A**CAG**

M2 = CAGGATTCCTGAGTA A**CAC**

M3 = CAGGATTCCTGAGTAA**CAA**

M4 = CAGGATTCCTGAGTAA**CTA**

M5 = CAGGATTCCTGAGTAA**CTG**

M6 = CAGGATTCCTGAGTAA**CTT**

M7 = CAGGATTCCTGAGTAA**CAT**

M8 = CAGGATTCCTGAGTAA**CTC**

โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ 2 ขั้นตอน แล้ววิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (สุรินทร์, 2544)

4. <u>การเพาะเลี้ยงอับเรณูของลูกผสมกลับ BC_1F_1 ที่มียีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง</u>

4.1 การเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

นำต้นข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 2 ออกปลูกจนเข้าสู่ระยะตั้งท้อง (booting stage) จึงเลือกเก็บช่อดอกที่มีระยะระหว่างข้อของใบธงกับข้อใบที่ถัดลงมาประมาณ 6-12 เซนติเมตร ทำความสะอาดช่อดอกแล้วห่อช่อดอกด้วยกระดาษบาง พรมน้ำให้ชุ่ม ห่อด้วยถุงพลาสติก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียสเพื่อทำ cold pretreatment นาน 8-10 วัน จากนั้นจึงทำความสะอาดช่อดอกโดยการฉีดพ่นด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ คัดเลือกดอกข้าวที่มีกลีบดอกเป็นสีเขียวอ่อนปนขาว และมีอับเรณูที่มีความสูงไม่เกินครึ่งหนึ่งของความยาวดอก (รัตน์ดา, 2538; ภัทรพร, 2540; ยี่โถ, 2540) ตัดกลีบดอกออกครึ่งหนึ่งและนำอับเรณูมาเพาะเลี้ยงในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน บนอาหารสูตรต่างๆ (รัตน์ดา, 2538) ดังนี้

S1 คือ อาหารสูตร N_6 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 40 กรัมต่อลิตร

S2 คือ อาหารสูตร N_6 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 50 กรัมต่อลิตร

S3 คือ อาหารสูตร N_6 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 60 กรัมต่อลิตร

M1 คือ อาหารสูตร N_6 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และมอลโตส 40 กรัมต่อลิตร

M2 คือ อาหารสูตร N_6 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และมอลโตส 50 กรัมต่อลิตร

M3 คือ อาหารสูตร N_6 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และมอลโตส 60 กรัมต่อลิตร

อาหารทุกสูตรเติมวุ้น 7 กรัมต่อลิตร และปรับให้มี pH 5.8 บันทึกผลการเกิดแคลลัสจากอับเรณู โดยนับจำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้น และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากจำนวนอับเรณูที่เพาะเลี้ยงทั้งหมดในอาหารสูตรต่างๆ (รัตน์ดา, 2538; ภัทรพร, 2540; Yan *et al.*, 1996)

4.2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของลูกผสมกลับ BC_1F_1

เพื่อศึกษาผลของ 2,4-D ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในการเพาะเลี้ยงอับเรณู เมื่อได้ผลการเพาะเลี้ยงอับเรณูจากการทดลองในข้อ 4.1 จึงทดลองเพาะเลี้ยงอับเรณูบนอาหารชักนำแคลลัสสูตร N_6 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลมอลโตสหรือซูโครสซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่ดีจากการทดลองที่ 4.1 ซึ่งมีความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นจึงบันทึกผลการเกิดแคลลัสจากอับเรณู โดยนับจำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้น และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากจำนวนอับเรณูที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด

4.3 การชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นแฮพลอยด์

นำแคลลัสที่ได้จากข้อ 4.1และ 4.2 ที่มีขนาดประมาณ 2-3 มิลลิเมตรไปเพาะเลี้ยงต่ในอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น ดังนี้

MR1 คือ อาหารสูตร MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ casein hydrolysate 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟทาเจล (phytagel) 2.5 กรัมต่อลิตร (รัตน์ดา, 2538)

SR1 คือ อาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร L-proline 1 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ casein hydrolysate 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟทาเจล 2.5 กรัมต่อลิตร (ลาวัลย์, 2543)

SR2 คือ อาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร L-proline 1 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ casein hydrolysate 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟทาเจล 2.5 กรัมต่อลิตร

SR3 คือ อาหารสูตร MS ที่ kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตร L-proline 1 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ casein hydrolysate 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟทาเจล 2.5 กรัมต่อลิตร

เพาะเลี้ยงแคลลัสในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน นับจำนวนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงทั้งหมดและแคลลัสที่พัฒนาไปเป็นต้น โดยนับจำนวนต้นปกติซึ่งมีสีเขียวและต้นเผือก และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นจากจำนวนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงทั้งหมดในอาหารแต่ละสูตร (รัตน์ดา, 2538; Zhang and Qifeng, 1993) จากนั้นจึงเพิ่มจำนวนต้นที่ได้ในอาหารสูตรเพิ่มจำนวนต้น นำต้นข้าวส่วนหนึ่งออกปลูกในกระถางเพื่อดูการติดเมล็ด

4.4 การคัดเลือกและตรวจสอบต้นข้าวแฮพลอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู

4.4.1 การคัดเลือกต้นข้าวแฮพลอยด์ที่มียีนต้านทาน *xa5* ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบของต้นข้าวแฮพลอยด์ที่ได้จากข้อ 4.2 ตามวิธีของ Agrawal *et al.* (1992) และนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2 เพื่อคัดเลือกต้นที่มียีนต้าน ทานต่อโรคขอบใบแห้ง

4.4.2 การตรวจสอบความเหมือนระหว่างต้นแฮพลอยด์และข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105

สกัดดีเอ็นเอจากต้นข้าวแฮพลอยด์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.3 และนำมาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 เพื่อคัดเลือกต้นแฮพลอยด์ที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 มากที่สุดโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพีเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.3 จากนั้นจึงเพิ่มจำนวนต้นข้าวแฮพลอยด์ที่คัดเลือกไว้โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อนำเข้าสู่ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนโครโมโซมในการทดลองต่อไป

4.5 การชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมในต้นข้าวแฮพลอยด์

นำต้นแฮพลอยด์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.4.2 มาเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์นาน 3 วัน และ 5 วัน แล้วจึงย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารโคลชิซิน บันทึกผลการรอดชีวิตและการตายของต้นข้าวภายหลังได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน เลี้ยงต้นข้าวที่รอดชีวิตจนเจริญเป็นต้นที่มีระบบรากสมบูรณ์และมีการแตกหน่อใหม่เพิ่มขึ้น แล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ บันทึกผลการติดเมล็ด

5. <u>สถานที่ทำการทดลอง</u>

สถานที่ดำเนินงานวิจัยมี 3 แห่งคือ โรงเรือนปลูกข้าวของสถานีทดลองข้าวบางเขน กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร บางเขน กรุงเทพฯ และห้องปฏิบัติการวิจัยภาควิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ

6. <u>ระยะเวลาทำการทดลอง</u>

เริ่มทำการทดลองตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2544 และสิ้นสุดการทดลองในเดือนมกราคม 2549

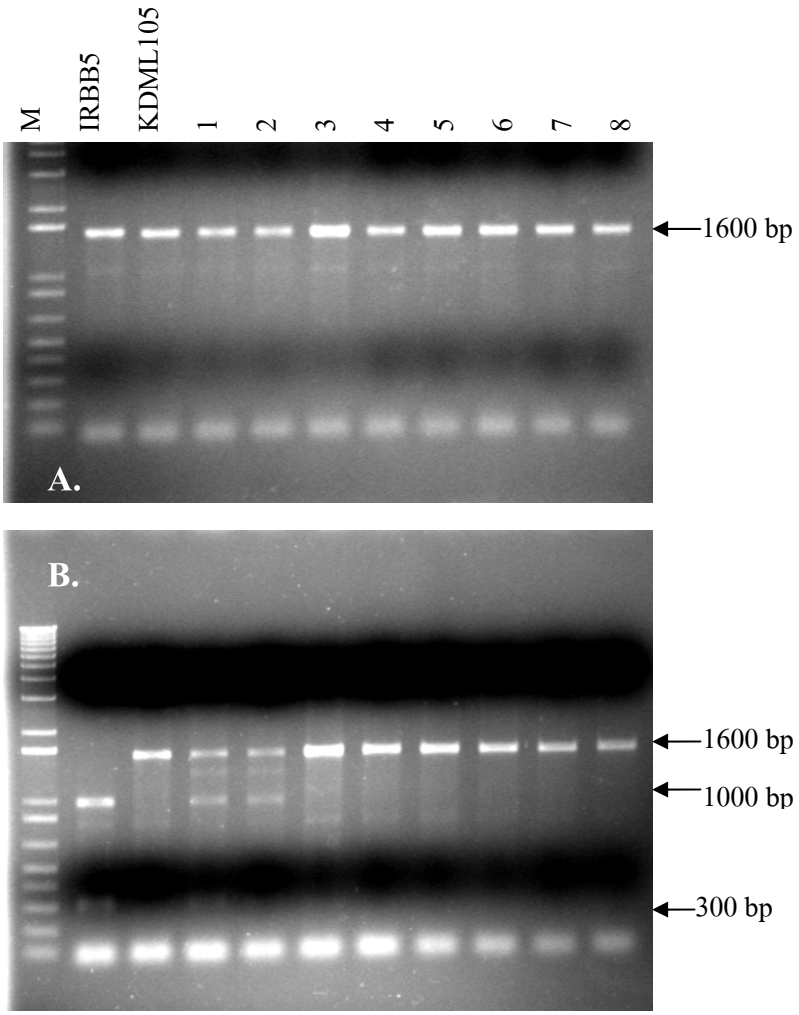
ผลและวิจารณ์

1. ผลการคัดเลือกต้นข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 ที่มียีนต้านทาน *xa5* ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

เมื่อนำเมล็ดข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 (KDML105//IRBB5/KDML105) ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มจำนวนต้น ที่เติม BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตรในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าได้ต้นข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 ที่แข็งแรงซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ดีบนสูตรอาหารดังกล่าวจำนวน 14 ต้น ซึ่งเมื่อเพาะเลี้ยงไปนานประมาณ 30 วันต้นข้าวจะแตกยอดใหม่จำนวนมาก (กำหนดให้เป็นต้นที่ 1 -14) จากนั้นจึงแยกหน่อข้าวจากแต่ละต้นไปคัดเลือกว่าต้นใดมียีน *xa5* ซึ่งควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง เนื่องจากการคัดเลือกต้นข้าวที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในลูกผสมกลับ BC_1F_1 นั้น ไม่สามารถคัดเลือกได้ด้วยการปลูกเชื้อ (pathogen inoculation) เพราะลักษณะดังกล่าวในสายพันธุ์ IRBB5 ถูกควบคุมด้วยยีนด้อย *xa5* จึงไม่สามารถแสดงฟีโนไทป์ที่ตรวจสอบได้เนื่องจากอิทธิพลของยีนเด่นที่ควบคุมลักษณะไม่ต้านทานโรค ดังนั้นจึงใช้วิธี marker-assisted foreground selection โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีนต้านทาน *xa5* เพื่อคัดเลือกต้นข้าวในลูกรุ่นนี้

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดจากใบของต้นลูกผสมกลับ BC_1F_1 ทั้ง 14 ต้น มาวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด PCR-based marker โดยใช้ไพรเมอร์ RG556 ซึ่งมีตำแหน่งใกล้ชิดกับยีน *xa5* (Sanchez *et al.*, 2000) พบว่าการคัดเลือกแบบ foreground selection ด้วยเครื่องหมายดังกล่าวสามารถคัดเลือกต้นที่มียีนต้านทานโรคได้ 7 ต้น จากนั้นจึงนำหน่อข้าวบางส่วนจากทั้ง 7 ต้นออกปลูกในกระถางโดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มหนึ่งใช้เป็นแหล่งเรณู ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งปล่อยให้มีการผสมตัวเอง (selfing) เพื่อให้ได้เมล็ดลูกผสมกลับ BC_1F_2 ไว้ใช้สำหรับการทดลองต่อไป

ผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โดยใช้ไพรเมอร์ RG556 พบว่าทั้งสายพันธุ์ IRBB5 ซึ่งใช้เป็นพันธุ์ให้และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งใช้เป็นพันธุ์รับ ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็น monomorphic band ขนาดประมาณ 1.6 kb จำนวน 1 แถบ (ภาพที่ 1A) เมื่อตัดแถบดีเอ็นเอดังกล่าวด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpy* CH4 IV จะสามารถแยกความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอได้ โดยดีเอ็นเอจากสายพันธุ์ IRBB5 จะปรากฏแถบขนาดประมาณ 1 kb จำนวน 1 แถบและแถบขนาด 0.3 kbจำนวน 2 แถบ ส่วนดีเอ็นเอจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 นั้นพบว่าไม่สามารถตัดด้วยเอนไซม์



ภาพที่ 1 แถบดีเอ็นเอที่พบในต้นข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 ที่ต้านทานโรค
ตัวอย่างที่ 1-8 เป็นดีเอ็นเอจากต้น BC_1F_1 , M= 1 kb plus DNA marker
(ต้นต้านทานโรคได้แก่ตัวอย่างที่ 1, 2 ส่วนต้นไม่ต้านทานโรคคือตัวอย่างที่ 3, 4, 5, 6, 7 และ 8)
A: แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ RG665
B: แถบดีเอ็นเอที่ได้ภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpy* CH4 IV

ตัดจำเพาะ *Hpy* CH4 IV จึงปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเท่าเดิม (ภาพที่ 1B) เมื่อวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากต้นข้าวที่ให้ผลบวกในการคัดเลือกพบว่าทั้ง 7 ต้นมีจีโนไทป์ในตำแหน่งของยีนต้านทานอยู่ในสภาพเฮเทอโรไซกัส (ภาพที่ 1B, ตัวอย่างที่ 1,2)

ผลการคัดเลือกที่ได้สอดคล้องกับหลักการกระจายตัวของยีนด้อย *xa5* ซึ่งอยู่บนพื้นฐานการแยกตัวของยีนตามกฎของเมนเดล (Mendelian laws) ดังนั้นเมื่อผสมข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งไม่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งกับพันธุ์ต้านทาน (IRBB5) และนำลูกผสมชั่วที่ 1 ผสมกลับไปยังพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 1 ครั้งจะได้ลูกผสมกลับ BC_1F_1 ที่มีการกระจายตัวของจีโนไทป์ที่มียีนต้านทานโรคต่อจีโนไทป์ที่ไม่มียีนต้านทานโรคเท่ากับ 1:1 โดยจีโนไทป์ที่มียีนต้านทานโรคจะอยู่ในสภาพเฮเทอโรไซกัสเท่านั้น

ในการทดลองนี้ปรากฏว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จากพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ไม่สามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpy* CH4 IV ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ Yang *et al.* (1998) ที่รายงานว่าเมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ชนิดเดียวกันนี้ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mae* II ซึ่งเป็น isochizomer กับเอนไซม์ *Hpy* CH4 IV และพบว่าเอนไซม์ *Mae* II สามารถตัดดีเอ็นเอจากพันธุ์ต้านทาน IRBB5 และพันธุ์ไม่ต้านทาน IR65598 ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน จึงสันนิษฐานว่าแถบดีเอ็นเอจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ซึ่งไม่ต้านทานต่อโรคและไม่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpy* CH4 IV ในการทดลองครั้งนี้เป็นแถบดีเอ็นเอหรืออัลลีลต่างชนิดกับที่พบในพันธุ์ไม่ต้านทาน IR65598 เนื่องจาก Huang *et al.* (1997) รายงานว่าแถบดีเอ็นเอหรืออัลลีลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ RG556 ในต้นไม่ต้านทานโรคมีมากกว่า 1 ชนิด

โดยทั่วไปการคัดเลือกลักษณะที่ควบคุมด้วยยีนด้อยในลูกที่มีจีโนไทป์ของยีนที่ควบคุมลักษณะดังกล่าวอยู่ในสภาพเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ทำได้โดยการผสมกับต้นทดสอบ (tester) ที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous recessive หรือทำการคัดเลือกในรุ่นลูกภายหลังการผสมตัวเอง (selfing) แต่ในการทดลองครั้งนี้สามารถคัดเลือกต้นลูกผสมกลับ BC_1F_1 ที่มียีนต้านทานโรคได้ทันทีโดยใช้วิธี marker-assisted foreground selection จึงเท่ากับเป็นการลดระยะเวลาในการคัดเลือกได้ 1 ชั่ว

2. ผลการคัดเลือกต้นข้าวที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในลูกผสมกลับ BC_1F_2

การคัดเลือกต้นลูกผสมกลับ BC_1F_2 ที่ต้านทานโรคนั้นใช้วิธี pathogen inoculation ร่วมกับการคัดเลือกแบบ marker-assisted foreground selection โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีนต้านทาน *xa5* และการคัดเลือกแบบ background selection โดยการวิเคราะห์เอเอฟแอลพี

2.1 ผลการคัดเลือกลูกผสมกลับ BC_1F_2 ที่ต้านทานโรคด้วยวิธี pathogen inoculation

จากการทดสอบและประเมินลักษณะต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในลูกรุ่น BC_1F_2 จำนวน 318 ต้น โดยใช้พันธุ์ขาวดอกมะลิ105 เป็นพันธุ์ไม่ต้านทานมาตรฐาน และใช้สายพันธุ์ IRBB5 เป็นพันธุ์ต้านทานมาตรฐาน ปลูกเชื้อด้วยวิธี Clipping technique (Kauffman *et al.*, 1973) และประเมินความต้านทานด้วยระบบ SES (IRRI, 1996) พบว่าลูกผสมกลับ BC_1F_2 มีระดับความ

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบลักษณะความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งที่ควบคุมด้วยยีน *xa5* ในต้นข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_2

ระดับความต้านทานโรค		จำนวนต้น
ต้านทานสูง	(HR)	1
ต้านทาน	(R)	12
ค่อนข้างต้านทาน	(MR)	45
ค่อนข้างไม่ต้านทาน	(MS)	60
ไม่ต้านทาน	(S)	61
ไม่ต้านทานสูง	(HS)	139
รวม		318

หมายเหตุ HR = highly resistant MS = moderately susceptible
R = resistant S = susceptible
MR = moderately resistant HS = highly susceptible

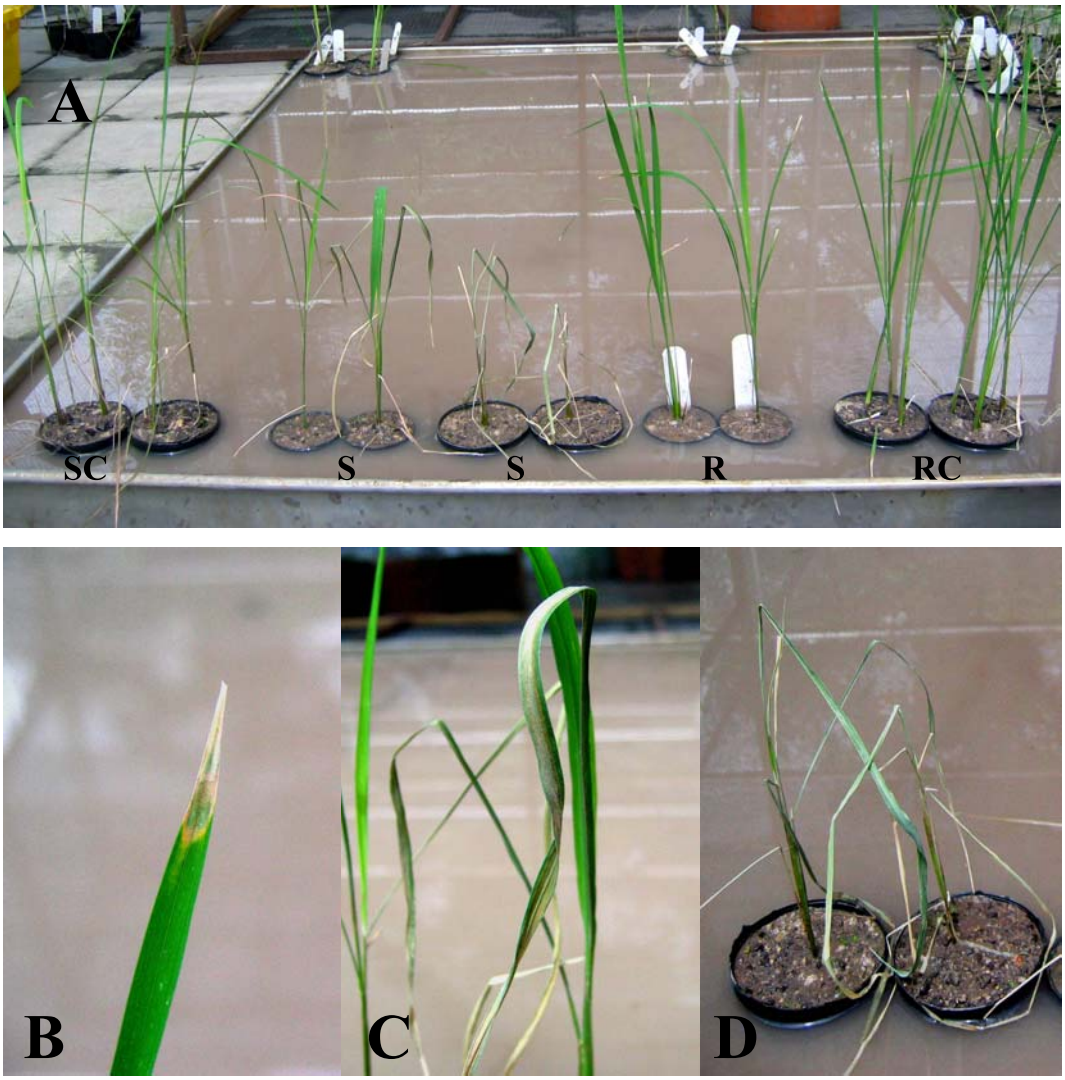
ต้านทานโรคตั้งแต่ HS จนถึง HR โดยมีต้นที่แสดงลักษณะต้านทานโรคในระดับต้านทานสูง (HR) จำนวน 1 ต้นและระดับต้านทาน (R) จำนวน 12 ต้น ส่วนพันธุ์ต้านทานมาตรฐานแสดงความต้านทานต่อเชื้อที่ใช้ทดสอบในระดับ R ในขณะที่พันธุ์ไม่ต้านทานมาตรฐานแสดงความต้านทานโรคในระดับ HS (ตารางที่ 1 และ 2)

ระดับคะแนนเฉลี่ยของต้นข้าวในลูกผสมกลับ BC_1F_2 ที่แสดงระดับความต้านทานโรคแบบ HR และ R รวม 13 ต้นมีค่าอยู่ระหว่าง 1-2.33 (ตารางที่2) ส่วนพันธุ์ต้านทานมาตรฐาน (IRBB5) มีค่าระดับคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 1.5 ในขณะที่พันธุ์ไม่ต้านทานมาตรฐาน (KDML105) มีค่าระดับคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 7.5 อาการของโรคที่ปรากฏในต้นต้านทานและต้นไม่ต้านทานแสดงดังภาพที่ 2 (B,C) นอกจากนี้ยังพบว่าต้นข้าวที่มีระดับความไม่ต้านทานโรคแบบ HS จำนวนหนึ่งแสดงอาการของโรคแบบ kreseck (กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, 2543) โดยต้นข้าวจะเหี่ยวเฉาและตายโดยรวดเร็ว (ภาพที่ 2 D)

ตารางที่ 2 ระดับคะแนนเฉลี่ยและระดับความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งที่ควบคุมด้วยยีน *xa5* ตามมาตรฐานของ SES (IRRI, 1996)ในลูกผสมกลับ BC_1F_2 ที่แสดงลักษณะต้านทานโรค

ต้นที่	ระดับคะแนนเฉลี่ย	ระดับความต้านทานโรค	ต้นที่	ระดับคะแนนเฉลี่ย	ระดับความต้านทานโรค
1	1.5	R	8	2	R
2	1.5	R	9	2.33	R
3	2	R	10	2.33	R
4	2.3	R	11	2.33	R
5	2	R	12	1	HR
6	2	R	13	2	R
7	2	R	-	-	-
KDML105[a]	7.5	HS	-	-	-
IRBB5[b]	1.5	R	-	-	-

หมายเหตุ a = Susceptible check variety b = Resistant check variety



ภาพที่ 2 การเกิดโรคของต้นข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_2 ที่ได้รับการปลูกเชื้อ

A: ลักษณะต้นข้าวที่อ่อนแอต่อโรค (S) และต้านทานโรค (R);
SC=susceptible check variety, RC= resistant check variety

B: ใบของต้นที่แสดงลักษณะต้านทานโรค

C: ใบของต้นที่แสดงลักษณะไม่ต้านทานโรค

D: ต้นที่แสดงอาการของโรคแบบ Kreseck

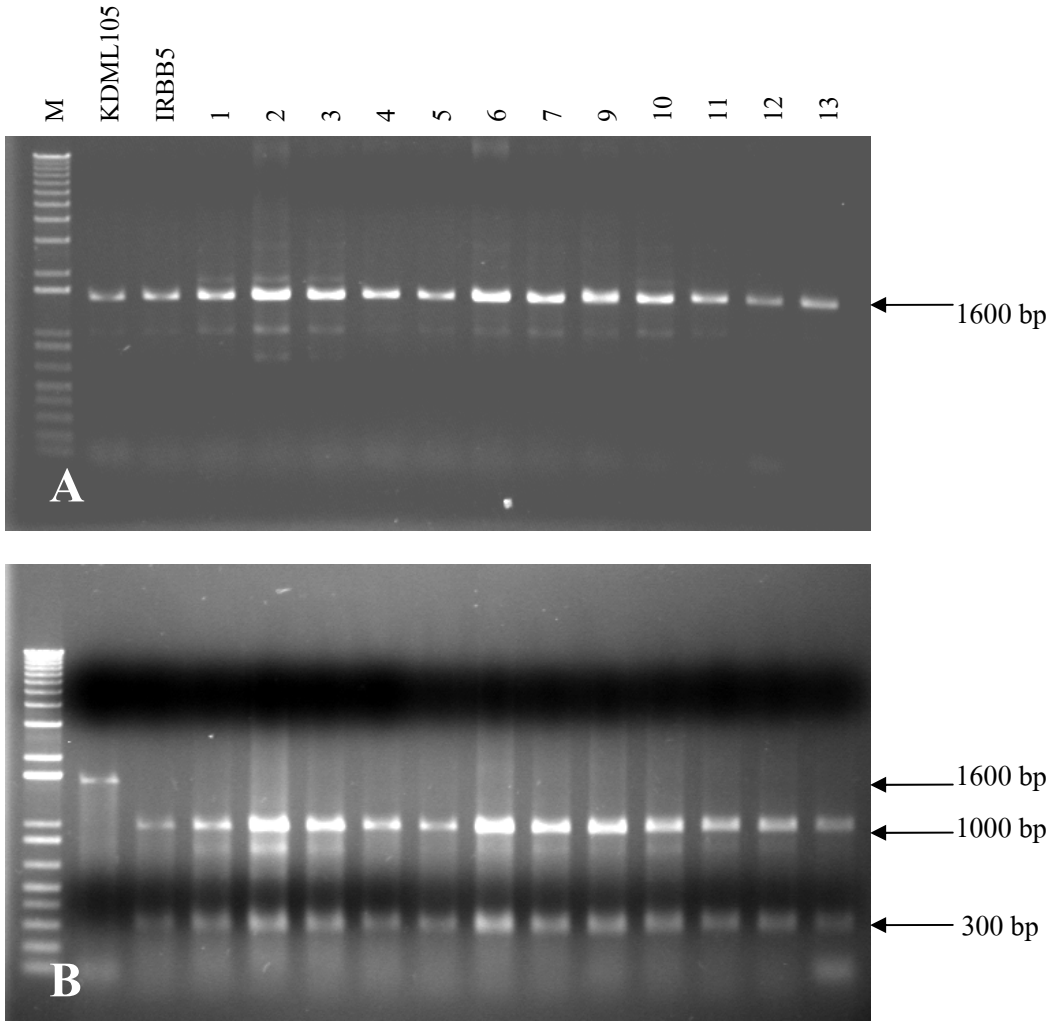
เมื่อนำต้นข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_2 ที่แสดงลักษณะต้านทานโรค (HR และ R) ทั้ง 13 ต้น ออกปลูกเพื่อเก็บเมล็ด BC_1F_3 และนำใบมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ปรากฏว่าต้นข้าวต้นที่ 8 ตายไป 1 ต้น (R) จึงเหลือต้นต้านทานโรครวม 12 ต้น

จากผลการทดสอบลักษณะต้านทานต่อโรคในต้นข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_2 ซึ่งปรากฏว่าต้นข้าวที่แสดงลักษณะต้านทานรวม 58 ต้น (ตารางที่ 1) ซึ่งประกอบด้วยต้นข้าวที่แสดงลักษณะต้านทานโรคสูง (HR) 1 ต้น ต้นที่แสดงลักษณะต้านทาน (R) 12 ต้น และต้นข้าวที่แสดงลักษณะค่อนข้างต้านทาน (MR) 45 ต้นมีอัตราส่วนของต้นต้านทานโรค : ต้นไม่ต้านทานโรคไม่สอดคล้องกับอัตราส่วน 1:3 โดยอาจมีสาเหตุมาจากอิทธิพลของ modifier genes ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรค (กาญจนา, 2544; Petpisit *et al.*, 1977) นอกจากนี้ยังอาจมีผลมาจากความคลาดเคลื่อนของการให้คะแนนในการเกิดโรค เนื่องจากมีจำนวนใบที่ได้รับการปลูกเชื้อเพียง 2-3 ใบต่อต้นซึ่งอาจทำให้ระดับคะแนนเฉลี่ยในการเกิดโรคคลาดเคลื่อนไปจากค่าเฉลี่ยที่ควรจะเป็น

2.2. <u>ผลการคัดเลือกต้นข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_2 ที่ต้านทานโรคด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ</u>

เมื่อนำดีเอ็นเอจากต้นข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_2 ที่คัดเลือกได้จากวิธีปลูกเชื้อมาตรวจสอบจีโนไทป์ด้วย PCR-based marker โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RG556 เป็นไพรเมอร์ พบว่าต้นข้าวที่แสดงลักษณะต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งทั้ง 12 ต้นมีจีโนไทป์ในตำแหน่งของยีนต้านทานโรค *xa5* อยู่ในสภาพโฮโมไซกัส โดยปรากฏขนาดของแถบดีเอ็นเอภายหลังการตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่ด้วยเอนไซม์ *Hpy* CH4 IV เช่นเดียวกับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในสายพันธุ์ IRBB5 (ภาพที่ 3)

แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในต้นข้าวที่แสดงลักษณะต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งทั้ง 12 ต้น แสดงให้เห็นว่าลักษณะต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในข้าวสายพันธุ์ IRBB5 ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีนด้อย *xa5* จะสามารถแสดงลักษณะต้านทานต่อโรคได้เมื่อมีจีโนไทป์อยู่ในสภาพโฮโมไซกัส นอกจากนี้ยังพบว่าการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความสอดคล้องกับลักษณะต้านทานโรค แสดงว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RG556 ที่ใช้ในการคัดเลือกมีตำแหน่งใกล้ชิดกับยีนต้านทาน *xa5* ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานทดลองของ Yoshimura *et al.*(1995) ซึ่งรายงานว่าไม่พบการเกิดครอสซิงโอเวอร์ในตำแหน่งระหว่างยีน *xa5* กับเครื่องหมายดีเอ็นเอ RG556 ดังกล่าว



<u>ภาพที่ 3</u> แถบดีเอ็นเอที่พบในต้นต้านทานโรคที่คัดเลือกได้จากลูกผสมกลับ BC_1F_2
ตัวอย่างที่ 1-7 และ9-13 เป็นดีเอ็นเอจากต้นลูกผสมกลับ BC_1F_2ที่ต้านทานโรค,
M= 1 kb plus DNA marker
A: แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ RG665
B: แถบดีเอ็นเอที่ได้ภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpy* CH4 IV

2.3. ผลการคัดเลือกแบบ background selection ในต้นข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_2 โดยการวิเคราะห์เอเอฟแอลพี

เมื่อนำดีเอ็นเอจากต้นข้าวในรุ่น BC_1F_2 ที่มีลักษณะต้านทานโรคและวิเคราะห์จีโนไทป์แล้วมาคัดเลือกโดยพิจารณาจากพันธุกรรมพื้นฐานที่ปรากฏในแต่ละต้น (background selection) โดยการวิเคราะห์เอเอฟแอลพี เพื่อให้ได้ต้นต้านทานโรคที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

ตารางที่ 3 คู่ไพรเมอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการตรวจสอบเอเอฟแอลพีและคู่ไพรเมอร์ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ในตำแหน่งเดียวกัน

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
	CAG	CAC	CAA	CTA	CTG	CTT	CAT	CTC
E1								
AAC	*			*				*
E2								
AAG	*		*					
E3								
ACA		*		*				
E4								
ACT						*	*	*
E5								
AGC						*	*	
E6								
ACC								
E7								
ACG	*							
E8								
AGG						*		*

พบว่าจากไพรเมอร์ที่ทดลองใช้จำนวน 64 คู่ มีไพรเมอร์ 15 คู่ที่สามารถแสดงความแตกต่างอย่างชัดเจนของแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ KDML105 กับสายพันธุ์ IRBB5 ตารางที่ 3 แสดงคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ทั้งหมดและคู่ไพรเมอร์ที่แสดงความแตกต่างอย่างชัดเจน

จากการวิเคราะห์เอเอฟแอลพีด้วยไพรเมอร์ 15 คู่ ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนสามารถตรวจนับได้ทั้งหมด 376 แถบ (ตารางที่ 4) โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในข้าวทั้ง 2 พันธุ์ (mono-

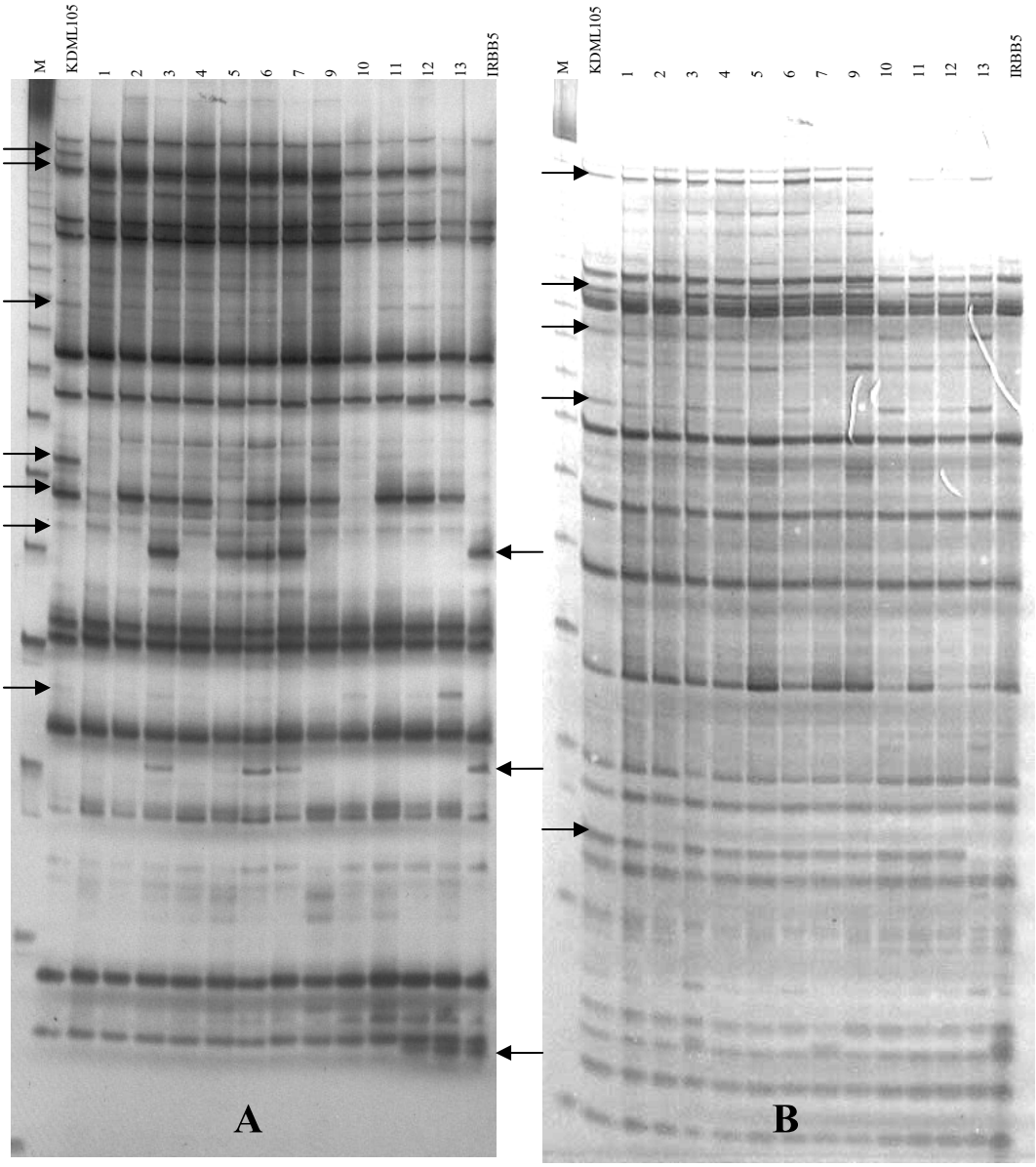
ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์เอเอฟแอลพีที่ได้จากไพรเมอร์ 15 คู่

คู่ไพรเมอร์	จำนวนแถบที่ปรากฏทั้งหมด	จำนวนแถบที่ต่างกันในตำแหน่งเดียวกัน	% แถบที่ต่างกัน	จำนวนแถบที่ปรากฏเฉพาะในพันธุ์ KDML105	จำนวนแถบที่ปรากฏเฉพาะในสายพันธุ์ IRBB5
E1/M1	25	8	32.00	5	3
E1/M4	24	6	25.00	5	1
E1/M8	21	6	28.57	5	1
E2/M1	25	2	8.00	2	0
E2/M3	30	3	10.00	3	0
E3/M2	34	6	17.65	4	2
E3/M4	30	2	6.67	2	0
E4/M6	25	5	20.00	1	4
E4/M7	31	3	9.68	1	2
E4/M8	20	8	40.00	6	2
E5/M6	18	2	11.11	1	1
E5/M7	25	2	8.0	1	1
E7/M1	16	3	18.75	3	0
E8/M6	27	7	25.93	4	3
E8/M8	25	10	40.00	7	3
รวม	376	73	-	50	23
ค่าเฉลี่ย	25.07	4.87	20.10	3.33	1.53
Range	16-34	2-10	6.67-40.00	1-7	0-4

morphic bands) จำนวน 303 แถบ และแถบที่ปรากฏเฉพาะในพันธุ์ KDML105 หรือ IRBB5 พันธุ์ใดพันธุ์หนึ่งเท่านั้น (polymorphic bands) จำนวน 73 แถบ โดยแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเฉพาะในพันธุ์ KDML105 มีจำนวน 50 แถบ ส่วนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเฉพาะในสายพันธุ์ IRBB5 เท่านั้นมีจำนวน 23 แถบ แถบที่ปรากฏชัดเจนมีขนาดตั้งแต่ 45-500 คู่เบส โดยมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้ในแต่ละคู่ไพรเมอร์อยู่ระหว่าง 16-34 แถบ เฉลี่ย 25 แถบต่อไพรเมอร์ และมีค่าเฉลี่ยของแถบที่เป็นโพลีมอร์ฟิกเท่ากับ 4.87 แถบต่อชนิดไพรเมอร์ พบว่าคู่ไพรเมอร์ E8-AGG/M8-CTC ให้จำนวนแถบที่เป็นโพลีมอร์ฟิกมากที่สุด (10 แถบ)โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อพันธุ์ KDML105 จำนวน 7 แถบ อาจกล่าวได้ว่าคู่ไพรเมอร์ที่เลือกใช้ในการทดลองครั้งนี้มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เพื่อคัดเลือกต้นข้าวที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 เนื่องจากให้แถบที่ปรากฏเฉพาะในพันธุ์ดังกล่าวเท่านั้นมากถึง 50 แถบโดยมีค่าเฉลี่ย 3.33 แถบต่อชนิดไพรเมอร์ ตัวอย่างลายพิมพ์เอเอฟแอลพีจากการใช้ไพร์เมอร์บางชนิดแสดงในภาพที่ 4

เมื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์พันธุกรรมของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ที่มีอยู่ในต้นข้าวแต่ละต้นโดยพิจารณาจากจำนวนเครื่องหมายเอเอฟแอลพีที่ปรากฏ (present) หรือไม่ปรากฏ (absent) ในตำแหน่งเดียวกันเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์รับและพันธุ์ให้ เมื่อพิจารณาเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นโพลีมอร์ฟิกและอนุมานว่าการกระจายตัวของเครื่องหมายเอเอฟแอลพีเป็นไปโดยสุ่มภายในจีโนมของข้าว (Maheswaran *et* al., 1997; Zhu *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2001b) พบเปอร์เซ็นต์การกระจายตัวของพันธุกรรมจากพันธุ์รับ(ขาวดอกมะลิ105) อยู่ระหว่าง 67.12-82.19 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 72.86 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5) ทั้งนี้ต้นที่มีพันธุกรรมเหมือนกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 มากที่สุด (82.19 เปอร์เซ็นต์) มีจำนวน polymorphic alleles ที่เหมือนกับสายพันธุ์ IRBB5 เพียง 13 อัลลีลเท่านั้น

เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของการกระจายตัวของพันธุกรรมจากพันธุ์รับ (72.86 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งปรากฏในการทดลองจะเห็นว่ามีความใกล้เคียงกับค่าการกระจายตัวตามทฤษฎีซึ่งมีค่าเท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์ ส่วนต้นข้าวที่มีระดับความต้านทานโรค HR (ต้นที่ 12) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การกระจายตัวของพันธุกรรมจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เท่ากับ 67.12 เปอร์เซ็นต์นั้นอาจเป็นไปได้ว่าเกิดจากการมี modifier genes ที่มีความเกี่ยวข้องกับลักษณะต้านทานโรคจากสายพันธุ์ IRBB5 มาด้วยจึงทำให้มีพันธุกรรมของพันธุ์รับอยู่น้อยกว่าต้นต้านทานอื่นๆ อย่างไรก็ตามผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีเพื่อศึกษาการกระจายตัวของพันธุกรรมจากพันธุ์รับนั้นสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกด้วยวิธี marker-assisted background selection ได้ผลการทดลอง



ภาพที่ 4 ตัวอย่างลายพิมพ์เอเอฟแอลพีที่ได้จากคู่ไพร์เมอร์ต่างๆ
(ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งของแถบที่ต่างกันที่ตำแหน่งเดียวกัน)
ตัวอย่างที่ 1-7 และ9-13 เป็นดีเอ็นเอจากต้นลูกผสมกลับ BC_1F_2 ที่ต้านทานโรค
A: ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพร์เมอร์ E-AGG/M-CTC
B: ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพร์เมอร์ E-AAC/M-CTC

ตารางที่ 5 ผลการกระจายตัวของพันธุกรรมของพันธุ์รับ (ขาวดอกมะลิ105) ในต้นลูกผสมกลับ BC_1F_2 โดยการวิเคราะห์เอเอฟแอลพี

ต้นที่ (ระดับต้านทานโรค)	จำนวนแถบที่ปรากฏเฉพาะในพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	จำนวนแถบที่ปรากฏเฉพาะในสายพันธุ์ IRBB5	เปอร์เซ็นต์พันธุกรรมของพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105
1 (R)	49	24	67.12
2 (R)	53	20	72.60
3 (R)	56	17	76.71
4 (R)	60	13	82.19
5 (R)	51	22	68.86
6 (R)	60	13	82.19
7 (R)	52	21	71.23
8 (R)[a]	-	-	-
9 (R)	52	21	71.23
10 (R)	52	21	71.23
11 (R)	52	21	71.23
12 (HR)	49	24	67.12
13 (R)	53	20	72.60
	เฉลี่ย		72.86

หมายเหตุ a = ตายเมื่อนำออกปลูก

ดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Chen *et al.* (2001b) ซึ่งพบว่าเมื่อใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีคัดเลือกต้นข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 สามารถคัดเลือกต้นที่มีสัดส่วนพันธุกรรมจากพันธุ์รับ(สายพันธุ์ 6078) อยู่ระหว่าง 72-78 เปอร์เซ็นต์ได้เป็นจำนวนมาก แต่ Joseph *et al.* (2004) เสนอว่าการคัดเลือกฟีโนไทป์ที่ดีของพันธุ์รับควบคู่ไปกับการคัดเลือกโดยพิจารณาจากสัดส่วนพันธุกรรมที่ปรากฏในต้นจะทำให้ได้ต้นที่มีพันธุกรรมจากพันธุ์รับสูงขึ้นเนื่องจากพบว่าเมื่อใช้การคัดเลือกทั้ง 2 วิธีควบคู่กันไปจะสามารถคัดเลือกต้นที่มีพันธุกรรมจากพันธุ์รับสูงถึง 82.72 เปอร์เซ็นต์ภายหลังการผสมกลับ 1 ครั้งและผสมตัวเอง 3 ครั้ง

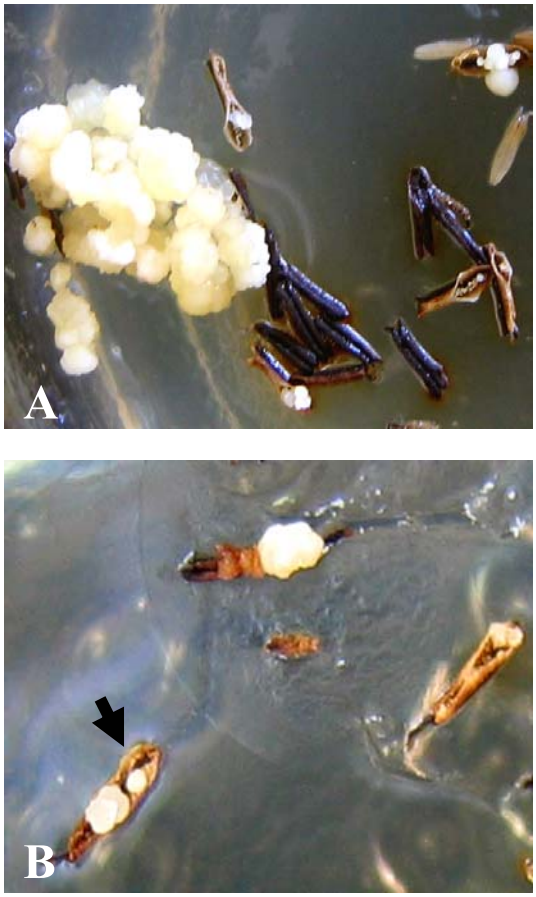
ทั้งนี้ต้นข้าว BC_1F_2 ที่คัดเลือกได้จากการทดลองนี้ทั้ง 12 ต้นสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้ โดยอาจคัดเลือกต้นที่มีเปอร์เซ็นต์พันธุกรรมของพันธุ์ขาวดอกมะลิสูงๆ แล้วปล่อยให้ผสมตัวเองจะได้ต้นลูกที่มีพันธุกรรมจากพันธุ์รับสูงขึ้นและมียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งทุกต้น เนื่องจากต้นข้าวที่คัดเลือกได้ในการทดลองนี้มีจีโนไทป์ของยีนต้านทานอยู่ในสภาพโฮโมไซกัสทุกต้น

3. ผลการเพาะเลี้ยงอับเรณูของลูกผสมกลับ BC_1F_1

3.1 ผลการเพาะเลี้ยงอับเรณูของลูกผสมกลับ BC_1F_1 เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

เมื่อนำอับเรณูของข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 ที่ผ่านความเย็นนาน 8-10 วัน และมีเรณูอยู่ในระยะ mid-uninucleate หรือ late-uninucleate มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส พบว่าภายหลังการเพาะเลี้ยงนานประมาณ 10 วันอับเรณูบางส่วนจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำ และภายหลังการเพาะเลี้ยงนานประมาณ 45-50 วันจะเริ่มพบการเกิดแคลลัส โดยจะมีการปริแตกของอับเรณูและพบการเกิดแคลลัสขนาดเล็กๆ ที่มีสีเหลืองอ่อน สังเกตว่าภายในอับเรณูหนึ่งๆ อาจมีแคลลัสเกิดขึ้นได้หลายตำแหน่ง ซึ่งคาดว่าจะเกิดจากไมโครสปอร์คนละไมโครสปอร์ (Bhojwani *et al.*, 2001) จากนั้นแคลลัสเหล่านี้จะมีการแบ่งตัวขยายขนาดใหญ่ขึ้นและมักอยู่ใกล้ชิดกัน ทำให้จำแนกได้ไม่ชัดเจนว่าเป็นแคลลัสเดียวกันหรือไม่ นอกจากนี้ยังพบว่าแคลลัสที่ได้มักเจริญมาจากไมโครสปอร์ภายในอับเรณูที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล(ภาพที่5A,B) ส่วนในอับเรณูที่เปลี่ยนเป็นสีดำหรือไม่เปลี่ยนสีจะไม่พบการเจริญของไมโครสปอร์เช่นเดียวกับการทดลองของรัตน์ดา (2538), ภัทรพร (2540), จันทร์วิภา (2547) และ Guzman and Zapata-Arias (2000) การเปลี่ยนแปลงของอับละอองเรณูจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีน้ำตาลภายหลังการเพาะเลี้ยง อาจมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงของเรณูจากสภาพ gametophytic ไปเป็นสภาพ sporophytic (Tsay *et al.*, 1982) หรืออาจเป็นผลมาจากการเติม casein hydrolysate ลงในอาหารเพาะเลี้ยง (Lentini *et al.*, 1995)

ผลการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมกลับBC_1F_1 บนอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่เติมน้ำตาล ซูโครสหรือมอลโตสปริมาณต่างๆ กันรวม 6 สูตรในสภาพมีแสงและบันทึกผลภายหลังการเพาะเลี้ยงนาน 50-60 วัน พบว่าอับเรณูที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลมอลโตส 60 กรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุดเป็น 6.11 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลมอลโตส 50 กรัมและ 40 กรัมต่อลิตรซึ่งสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 5.58 และ 4.61



<u>ภาพที่5</u> การเกิดแคลลัสจากอับเรณูของข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส

A : อับเรณูที่เกิดแคลลัส

B : อับเรณูที่เกิด microcalli (ลูกศรชี้)

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 บนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสภายหลังการเพาะเลี้ยงนาน 50-60 วัน

สูตรอาหาร	จำนวนอับเรณูที่เพาะเลี้ยง	จำนวนอับเรณูที่สร้างแคลลัส	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส
S1	1,140	38	3.33
S2	1,808	62	3.43
S3	848	29	3.42
M1	4,252	196	4.61
M2	9,979	557	5.57
M3	7,695	470	6.11

หมายเหตุ อาหารทุกสูตรประกอบด้วย N_6 + NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + kinetin 1มิลลิกรัมต่อลิตร + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + agar 7 กรัมต่อลิตรและเติมน้ำตาลต่างกันดังนี้ S1 : เติมซูโครส 40 กรัมต่อลิตร M1 : เติมมอลโตส 40 กรัมต่อลิตร
S2 : เติมซูโครส 50 กรัมต่อลิตร M2 : เติมมอลโตส 50 กรัมต่อลิตร
S3 : เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร M3 : เติมมอลโตส 60 กรัมต่อลิตร

เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงอับเรณูบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 3.33 - 3.43 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6)

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของอับเรณูที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่เติมน้ำตาลต่างชนิดกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเพาะเลี้ยงอับเรณูบนอาหารที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 40, 50 และ 60 กรัมต่อลิตรมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลไม่มีปฏิสัมพันธ์ต่อกันในการชักนำให้เกิดแคลลัส (ตารางที่7)

จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสนั้น พบว่าแคลลัสจำนวนหนึ่งมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะในรูปแบบต่างๆ เช่น แคลลัสที่มีการพัฒนาไปเป็นรากเพียงอย่างเดียวและแคลลัสที่เริ่มมีการพัฒนาไปเป็นอวัยวะ(ภาพที่ 6A,B) แคลลัสที่เกิดจุดเขียว (green spots) ซึ่งส่วนใหญ่ไม่สามารถพัฒนาต่อไปเป็นยอดได้ เนื่องจากแคลลัสเหล่านี้มักเกิดอาการฉ่ำน้ำและตาย

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 บนอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่เติมน้ำตาลมอลโตสหรือซูโครสความเข้มข้น 40, 50 และ 60 กรัมต่อลิตร

Source of variation	df	SS	MS	F(cal)	F(table)	
					5%	1%
Treatment	5	22.16				
- ชนิดของน้ำตาล (A)	1	18.68	18.68	14.83**	4.75	9.33
- ความเข้มข้นของน้ำตาล (B)	2	1.69	0.98	0.78 ns	3.88	6.93
- A x B	2	1.52	0.76	0.60 ns	3.88	6.93
Error	12	15.12	1.26			
Total	17	37.28				

หมายเหตุ ** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99%, ns ไม่แตกต่างกัน

ไปก่อนจะเกิดการพัฒนาต่อไป อย่างไรก็ตามพบว่าแคลลัสส่วนหนึ่งสามารถพัฒนาไปเป็นต้นที่มีทั้งยอดและรากได้โดยจะพบทั้งต้นเผือก (albino plantlets) และต้นที่มีสีเขียว (green plantlets) ดังภาพที่6 (C,D) เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เกิดรากและแคลลัสที่เกิดยอดบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสแสดงในตารางที่ 8

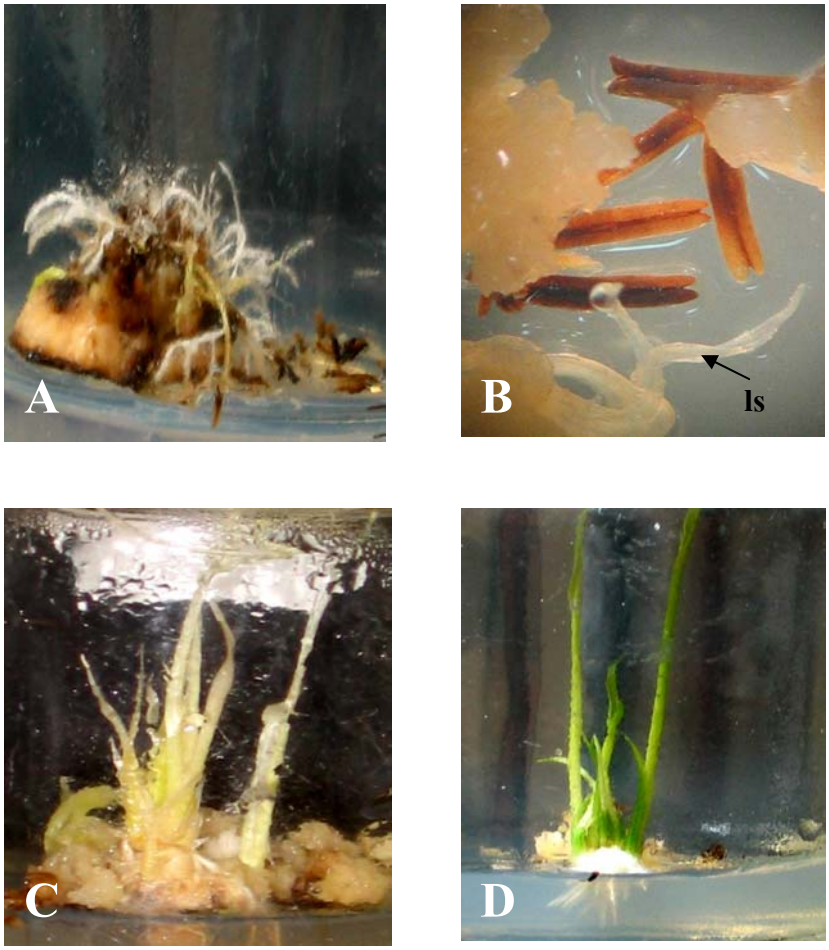
จากตารางที่ 6 และตารางที่ 8 พบว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูบนอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่เติมน้ำตาลมอลโตสมีเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นอยู่ระหว่าง 2.33-6.17 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเปอร์เซ็นต์รวมของแคลลัสที่เกิดต้นสีเขียวและต้นเผือกเป็น 2.52 และ 8.53 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ทั้งนี้แคลลัสจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูบนอาหารสูตร S1, M2 และ M3 สามารถเจริญเป็นต้นสีเขียวที่สมบูรณ์ได้สูตรละ 1 ต้น ส่วนสูตร S2, S3 และ M1 ไม่มีต้นสีเขียวเกิดขึ้นเลย เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในขั้นตอนนี้จึงได้ต้นที่สมบูรณ์รวม 3 ต้น (anther culture-derived lines) จากนั้นจึงนำต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูทั้ง 3 ต้นไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มจำนวนต้นที่เติม BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อไป

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เกิดรากและแคลลัสที่เกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 บนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส

สูตรอาหาร	จำนวนแคลลัส	แคลลัสเกิดราก (%)	แคลลัสเกิดยอด (%)		
			ยอดสีเขียว	ยอดเผือก	รวม
S1	38	10.53	2.63	0	2.63
S2	62	8.06	0	3.23	3.23
S3	29	0	0	3.45	3.45
		รวม	2.63	6.68	9.31
M1	196	3.06	0	2.55	2.55
M2	557	1.97	0.18	2.15	2.33
M3	470	1.70	2.34	3.83	6.17
		รวม	2.52	8.53	11.05

หมายเหตุ อาหารทุกสูตรประกอบด้วย N_6 + NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + kinetin 1มิลลิกรัมต่อลิตร + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + agar 7 กรัมต่อลิตรและเติมน้ำตาลต่างกันดังนี้ S1 : เติมซูโครส 40 กรัมต่อลิตร M1 : เติมมอลโตส 40 กรัมต่อลิตร
S2 : เติมซูโครส 50 กรัมต่อลิตร M2 : เติมมอลโตส 50 กรัมต่อลิตร
S3 : เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร M3 : เติมมอลโตส 60 กรัมต่อลิตร

ผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูบนอาหารที่เติมน้ำตาลมอลโตสมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส สอดคล้องกับรายงานของรัตน์ดา (2538), Alejar *et al.* (1995), Lentini *et al.* (1995), Xie *et al.* (1995), Zhang (1995), Pande and Bhojwani (1999), Bishoi *et al.*(2000) และ Roy and Mandal (2005) ซึ่งเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ต่างๆ และพบว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากันเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและคุณภาพของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมมอลโตสมีค่าสูงกว่าการ



ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของแคลลัสในลักษณะต่างๆ ขณะเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 บนอาหารสูตรชักนำแคลลัส

A: แคลลัสที่เกิดรากเพียงอย่างเดียว

B: แคลลัสที่เริ่มมีการพัฒนาของใบ (ls=leaf-like structure)

C: แคลลัสที่เกิดต้นเผือก

D: แคลลัสที่เกิดต้นสีเขียว

เพาะเลี้ยงในอาหารที่ เติมน้ำตาลซูโครส ผลการทดลองดังกล่าวยังพบได้ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของพืชชนิดอื่นๆ อีกด้วย เช่น พิทูเนีย(Raquin, 1983) และข้าวสาลี (Mendoza, 2002) เป็นต้น การที่มอลโตสสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าซูโครสนั้นเป็นผลมาจากคุณสมบัติของมอลโตสที่สามารถรักษา osmotic potential ของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงให้มีความคงตัวได้ดีกว่าซูโครส (Kuhlmann and Foroughi-Wehr, 1989) ดังการทดลองของ Xie *et al.* (1995) ซึ่งพบว่าอับเรณูที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมมอลโตสมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมซูโครส เนื่องจากการเติมมอลโตสในอาหารจะช่วยให้ไมโครสปอร์ที่มีลักษณะบวมเต่ง (swollen microspores) ซึ่งเป็นไมโครสปอร์ที่สามารถแบ่งตัวและเจริญไปเป็นแคลลัสมีชีวิตอยู่ได้นานกว่าไมโครสปอร์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมซูโครสซึ่งมักตายไปก่อนจะพัฒนาเป็นแคลลัสเนื่องจากการเกิด plasmolysis ทั้งนี้อาหารที่เติมซูโครสสูญเสีย osmotic potential ได้เร็วเนื่องจากซูโครสจะถูกไฮโดรไลซ์ไปเป็นกลูโคส (glucose) และ ฟรุกโตส (fructose) อย่างรวดเร็วจากการทำงานของเอนไซม์ invertase ที่มีอยู่ในอับเรณู ในขณะที่มอลโตสจะถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์ glucosidase ไปเป็นกลูโคสได้ช้ากว่า (Powell, 1990; Raina and Irfan, 1998; Scott *et al.*, 1995) การถูกไฮโดร-ไลซ์อย่างรวดเร็วของซูโครสนอกจากจะมีผลทำให้ osmotic potential ของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเปลี่ยนแปลงไปภายใน 3 สัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยงแล้ว ยังพบว่าฟรุกโตสซึ่งเป็นผลผลิตชนิดหนึ่งจากการไฮโดรไลซ์น้ำตาลซูโครสมีความเป็นพิษโดยจะทำให้ไมโครสปอร์ตายไปอย่างรวดเร็ว (Last and Brettell, 1990; Scott and Lyne, 1994; Blanc *et al.*, 2002)

สาเหตุประการหนึ่งที่ส่งเสริมให้แคลลัสบางส่วนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของต้นลูกผสมกลับ BC_1F_1 มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะในรูปแบบต่างๆ เช่น การเกิดจุดเขียว การพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากเพียงอย่างเดียวหรือสามารถพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ดังแสดงในตารางที่ 8 นั้น คาดว่าอาจเกิดจากผลของ NAA และชนิดของน้ำตาลที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง เนื่องจากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Cornejo-Martin and Primo-Millo (1981) ซึ่งเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ Bahia และลูกผสมระหว่างพันธุ์ Balilla กับพันธุ์ Sollana และพบว่าแคลลัสส่วนหนึ่ง (14.28-53.33เปอร์เซ็นต์) สามารถพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ในขณะที่ยังเพาะเลี้ยงอยู่ในอาหารสูตรชักนำแคลลัส (one-step plantlet formation) ที่เติมออกซิน NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับการทดลองของ Rout and Sarma (1991) ซึ่งเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสม (*Oryza sativa* X *O. rufipogon*) บนอาหารที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและพบว่ามีต้น (plantlets) เกิดขึ้นจำนวนหนึ่ง Nizeki (1997) อธิบายผลของ NAA ที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวว่าสามารถส่งเสริมให้แคลลัสเกิดการพัฒนาเป็นต้นได้ถ้าหากอิทธิพลของ NAA ในอาหารมีค่า

สูงกว่าอิทธิพลของ 2,4-D นอกจาก NAA แล้วการเติม phenylacetic acid (PAA) ลงในอาหารสูตรชักนำแคลลัสก็สามารถกระตุ้นการเกิด one-step plantlet formation ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวอินดิกาได้ดี (Zhuo *et al.*, 1996) การพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากตลอดจนต้นที่สมบูรณ์ของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ นอกจากจะขึ้นอยู่กับอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารแล้ว ยังขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลซึ่งใช้เป็นแหล่งธาตุอาหารคาร์บอนและ osmoregulator ในการเพาะเลี้ยงด้วย Ching (1982) พบว่าการเติมน้ำตาลปริมาณสูงๆ ในอาหารจะมีผลให้ความถี่ในการพัฒนาเป็นยอดสูงขึ้น เช่นเดียวกับ Zhao *et al.*(1999) พบว่าน้ำตาลมอลโตสปริมาณสูงจะช่วยส่งเสริมการพัฒนาของ pro-embryo ของข้าว Huang and Liu (2002) พบว่ากระบวนการเมทาบอลิซึมของน้ำตาลจะมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลง osmotic potential ของอาหารที่เพาะเลี้ยงและภายในเซลล์ที่ประกอบกันเป็นแคลลัส ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลง osmotic potential มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงเชิงสรีระต่างๆ เช่น การเติบโตของแคลลัส การเกิดและการเติบโตของโซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo) ตลอดจนกระบวนการเจริญไปเป็นยอดของแคลลัส เป็นต้น ผลจากการทดลองหลายการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติมน้ำตาลมอลโตสในอาหารสูตรชักนำแคลลัสสามารถส่งเสริมการเกิด somatic embryogenesis ซึ่งช่วยเพิ่มโอกาสให้ได้ต้นพืชจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูได้มากขึ้น (Batty and Dunwell, 1989; Jain *et al.*, 1997; Blanc *et al.*, 1999)

การเพาะเลี้ยงอับเรณูในอาหารที่มีน้ำตาลปริมาณ 40, 50 และ 60 กรัมต่อลิตรในการทดลองครั้งนี้พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสไม่แตกต่างกันนั้น (ตารางที่6) แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูของลูกผสมกลับ BC_1F_1 (KDML105//IRBB5/KDML105) มีการตอบสนองต่อความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารในลักษณะการเกิดแคลลัสได้ในช่วงกว้าง จึงอาจกล่าวได้ว่าในการเพาะเลี้ยงอับเรณูจากข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 ดังกล่าวนี้สามารถเติมน้ำตาลลงในอาหารสูตรชักนำแคลลัสได้ตั้งแต่ 40 กรัมต่อลิตรถึง 60 กรัมต่อลิตร แนวโน้มการตอบสนองต่อปริมาณของน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นเช่นนี้พบได้ทั้งในพันธุ์ข้าวในกลุ่มอินดิกาและพันธุ์ข้าวในกลุ่มจาปอนิกา โดยการตอบสนองจะเป็นไปในทางใดขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าว (Lentini *et al*,. 1995; Roy and Mandal, 2005)

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับรายงานการทดลองของรัตน์ดา (2538) ซึ่งเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (Lemont/KDML105) บนอาหารสูตร M2 (มอลโตส 50 กรัมต่อลิตร) เช่น เดียวกันกับที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของลูกผสมกลับ BC_1F_1 ในการทดลองครั้งนี้มีค่าต่ำกว่าการเกิดแคลลัสของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (Lemont/KDML105) โดยมี

ค่าเท่า กับ 5.57 และ 8.60 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงอิทธิพลของจีโนไทป์ของต้นข้าวที่เป็นแหล่งเรณูต่อการเกิดแคลลัส

3.2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของลูกผสมกลับ BC_1F_1

เมื่อทดลองเพาะเลี้ยงอับเรณูที่ได้จากต้นลูกผสมกลับ BC_1F_1 บนอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่เติมน้ำตาลมอลโตส 50 กรัมต่อลิตรสูตรเดียวกับการทดลองที่ 3.1 แต่เพิ่มสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินอีกชนิดหนึ่งคือ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและเพิ่มปริมาณ kinetin เป็น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อให้ส่วนต่างของออกซินต่อไซโตไคนินมีค่าเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่าเดิม พบว่าอับเรณูที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D (สูตร MM2) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงกว่า (10.19 เปอร์เซ็นต์) การเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ไม่เติม 2,4-D สูตร M2 (5.58 เปอร์เซ็นต์) ผลการทดลองปรากฏดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 บนอาหารที่ไม่เติม (M2) และเติม 2,4-D (MM2)

สูตรอาหาร	จำนวนอับเรณูที่เพาะเลี้ยง	จำนวนอับเรณูที่สร้างแคลลัส	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส (%)
M2	9,979	557	5.57
MM2	4,378	446	10.19

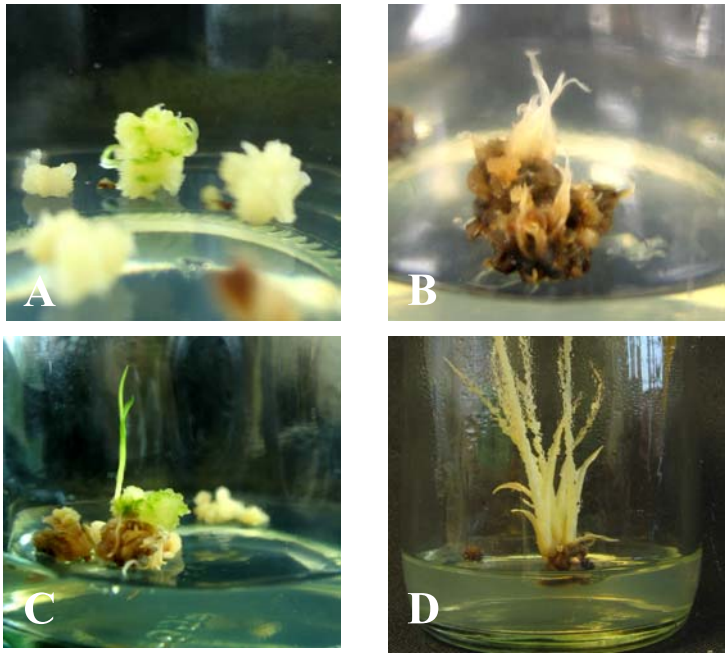
หมายเหตุ M2 = N_6 + NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + maltose 50 กรัมต่อลิตร + agar 7 กรัมต่อลิตร

MM2 = N_6 + NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตร + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + maltose 50 กรัมต่อลิตร + agar 7 กรัมต่อลิตร

จากผลการทดลองซึ่งพบว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 3 ชนิดได้แก่ NAA และ 2,4-D ชนิดละ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 3มิลลิกรัมต่อลิตรมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติม kinetin และออกซินชนิด NAA เพียงอย่างเดียวนั้น อาจมีผลมาจากปัจจัยหลายประการได้แก่ การเติม 2,4-D และการเพิ่มปริมาณ kinetin เพื่อปรับสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนิน (รัตน์ดา, 2536 ; Mori, 1997) รวมทั้งการใช้มอลโตสเป็นแหล่งธาตุอาหารคาร์บอนในอาหารสูตรดังกล่าว ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Xie *et al.* (1995) ซึ่งพบว่าการเติม 2,4-D, NAA และ kinetin ลงในอาหารมีผลให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงขึ้น โดยพบว่า 2,4-D จะช่วยลดการสลายตัวของไมโครสปอร์ที่มีสองนิวเคลียสและส่งเสริมการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ภายในแคลลัส ถ้าเติม 2,4-D มากจะทำให้เกิด non-embryogenic calli อย่างไรก็ตาม Tapia *et al.* (2002) พบว่าอับเรณูที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D จะมีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับจีโนไทป์ของต้นข้าวที่ใช้เป็นแหล่งเรณู นอกจากนี้ Cornejo-martin and Primo-Millo (1981) พบว่าการเติม 2,4-D ลงในอาหารเพาะเลี้ยงอับเรณูมักมีผลยับยั้งการพัฒนาของยอดหรือราก สอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ซึ่งปรากฏว่าไม่พบการเกิด one-step plantlet formation ของแคลลัสที่เกิดจากอับเรณูที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D การตอบสนองของไมโครสปอร์ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อต่อชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตนอกจากขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างชนิดของสารควบคุมการเจริญที่ใช้แล้ว ยังพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างชนิดของน้ำตาลที่ใช้กับชนิดของสารควบคุมการเจริญในการชักนำให้เกิดแคลลัสอีกด้วย โดยพบว่าการใช้ NAA ร่วมกับ 2,4-D จะส่งผลในทางบวกต่อการเกิดแคลลัสเมื่อใช้น้ำตาลมอลโตสเป็นแหล่งธาตุอาหารคาร์บอน (Lentini, 1995; Tapia *et al.* , 2002)

3.3 ผลการชักนำให้แคลลัสเกิดการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์

เมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการทดลองที่ 3.1 และ 3.2 ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ เพื่อชักนำให้เกิดต้น พบว่าสามารถจำแนกแคลลัสโดยพิจารณาจากการเจริญของแคลลัสภายหลังการเพาะเลี้ยงออกเป็นกลุ่มๆ ได้ โดยแคลลัสกลุ่มหนึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาล (browning) และค่อยๆ ตายไปภายใน 5-15 วัน ในขณะที่แคลลัสอีกกลุ่มหนึ่งจะแบ่งตัวและขยายขนาดใหญ่ขึ้น แคลลัสในกลุ่มนี้ส่วนหนึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะโดยอาจมีการพัฒนาในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ การเกิดรากหรือยอด เกิดจุดเขียว และการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ซึ่งมีทั้งต้นที่มีสีเขียวและต้นเผือก (ภาพที่ 7) ทั้งนี้แคลลัสที่เกิดรากเพียงอย่างเดียวไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์



ภาพที่7 ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอดหรือต้น

A, C: แคลลัสที่เริ่มมีการพัฒนาเป็นยอดและต้นสีเขียว

B, D: แคลลัสที่เริ่มมีการพัฒนาเป็นยอดและต้นเผือก

ได้เลยเช่นเดียวกับแคลลัสที่เกิดจุดเขียวซึ่งส่วนใหญ่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ เนื่องจากมักเกิดอาการฉ่ำน้ำและตายไปในลักษณะเดียวกับแคลลัสที่มีจุดเขียวซึ่งพบในการทดลองที่ 3.1

จากผลการทดลองพบว่าแคลลัสที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำแคลลัสต่างชนิดกันมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของแคลลัสไม่เท่ากัน(ตารางที่10) โดยแคลลัสที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม 2,4-D (สูตร M) มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของแคลลัสและเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นสีเขียวอยู่ระหว่าง 10.72-40.16 เปอร์เซ็นต์และ 0.00-1.29 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนแคลลัสที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D (สูตร MM2) มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของแคลลัสอยู่ระหว่าง 3.26-12.12 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นสีเขียว 0.00-1.09 เปอร์เซ็นต์

แคลลัสที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตร M มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของแคลลัสสูงที่สุด (40.06 เปอร์เซ็นต์) และสามารถชักนำให้เกิดต้นสีเขียวที่สมบูรณ์ได้ 1.29 เปอร์เซ็นต์บนอาหารชักนำให้เกิดต้นสูตร MR1 ส่วนการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร SR1, SR2 และ SR3 ซึ่งเติมไคเนติน 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของแคลลัสเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณ kinetin สูงขึ้น (10.72, 15.45 และ 32.22 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) โดยสูตร SR2 สามารถชักนำให้เกิดต้นสีเขียวที่สมบูรณ์ได้สูงสุด 0.81 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ได้จากอาหารสูตร MM2 มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของแคลลัสสูงที่สุด 12.12 เปอร์เซ็นต์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น SR2 และสามารถชักนำให้เกิดต้นสีเขียวที่สมบูรณ์ได้ 1.09 เปอร์เซ็นต์ในอาหารสูตร MR1 เมื่อสิ้นสุดการทดลองนี้พบว่าได้ต้นสีเขียวรวมทั้งสิ้น 4 ต้น โดยเป็นต้นสีเขียวที่พัฒนาจากแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร MR1 2 ต้นและจากสูตร SR1 และ SR2 อย่างละ 1 ต้น แต่ตายไประหว่างเพาะเลี้ย 1 ต้นจึงเหลือต้นข้าวที่สมบูรณ์รวม 3 ต้น

เมื่อนำต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูทั้งจากการทดลองที่ 3.1 และ 3.3 รวม 6 ต้น ออกปลูกในกระถางและเพาะเลี้ยงภายในโรงเรือน พบว่ามีต้นข้าวที่สามารถติดเมล็ดได้ 2 ต้นคิดเป็น 33.33 เปอร์เซ็นต์ โดยเป็นต้นข้าวที่ได้จากการทดลอง 3.1 จำนวน 1 ต้น (DH-1) และต้นข้าวที่ได้จากการทดลองที่ 3.3 อีก 1 ต้น (DH-2)

จากผลการทดลองพบว่าแคลลัสที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่ต่างกันมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของแคลลัสไม่เท่ากันนั้น ชี้ให้เห็นว่าอิทธิพลของอาหารสูตรชักนำแคลลัสมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น สอดคล้อง

ตารางที่10 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 บนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นสูตรต่างๆ

สูตรชักนำแคลลัส	สูตรชักนำต้น	จำนวนแคลลัสที่เพาะเลี้ยง	แคลลัสที่เกิด browning (%)	แคลลัส ที่มีการขยายขนาด (%)	แคลลัสที่มีการเปลี่ยนแปลง					
					เกิดต้น (%)			เกิดราก (%)	เกิดจุดเขียว (%)	รวม (%)
					ต้นเขียว	ต้นเผือก	รวม			
M	SR1	140	14.29	74.29	0.71	4.29	5	4.29	1.43	10.72
	SR2	123	18.71	65.85	0.81	1.63	2.44	13.01	0.00	15.45
	SR3	180	10.0	58.33	0.00	13.89	13.89	17.22	1.11	32.22
	MR1	77	9.09	12.89	1.29	12.99	14.24	12.89	12.89	40.06
MM2	SR1	15	13.33	80	0.00	0.00	0.00	0.00	6.67	6.67
	SR2	82	2.44	96.34	0.00	12.12	12.12	0.00	0.00	12.12
	SR3	93	0.00	92.47	0.00	4.30	4.30	2.15	1.08	7.53
	MR1	92	4.34	92.39	1.09	0.00	1.09	2.17	0.00	3.26

ตารางที่ 10 (ต่อ) เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นสูตรต่างๆ

หมายเหตุ

M = N_6 + NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + maltose 40, 50 และ60 กรัมต่อลิตร + agar 7 กรัมต่อลิตร (pH 5.8)

MM2 = N_6 + NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร + maltose 50 กรัมต่อลิตร + agar 7 กรัมต่อลิตร (pH 5.8)

SR1, SR2, SR3 = MS + kinetin 1, 2,3 มิลลิกรัมต่อลิตร+ L-proline 1 กรัมต่อลิตร + casein hydrolysate 300 มิลลิกรัมต่อลิตร + น้ำมะพร้าว 15% + sucrose 30 กรัมต่อลิตร + ไฟทาเจล 2.5 กรัมต่อลิตร (pH 5.8)

MR1 = MS + BAP 2 กรัมต่อลิตร + NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร+ casein hydrolysate 300 มิลลิกรัมต่อลิตร + น้ำมะพร้าว 15% + sucrose 30 กรัมต่อลิตร + ไฟทาเจล 2.5 กรัมต่อลิตร (pH 5.8)

กับรายงานของ รัตน์ดา (2538), Huang *et al.* (1986), Rout and Sarma (1991) และ Wei and Hong (1991) ซึ่งพบว่าแคลลัสจากอาหารที่เติม 2,4-D มีการพัฒนาเป็นส่วนต่างๆ รวมทั้งเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้น้อยกว่าแคลลัสที่ได้จากอาหารที่เติม NAA และ kinetin ทั้งในขั้นตอนการชักนำให้เกิดแคลลัสและการชักนำให้เกิดต้น เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ Bahia, Balilla x Sollana และพันธุ์ Sequail ในอาหารที่เติม 2,4-D เปรียบเทียบอาหารที่เติม NAA โดย Cornejo-Martin and Primo-Millo (1981) ปรากฏว่า 2,4-D มีผลยับยั้งการเกิดยอดและรากของแคลลัส แต่จะมีผลส่งเสริมการแบ่งตัวและขยายขนาดของแคลลัส (callus proliferation) ซึ่งผลดังกล่าวพบได้ในการทดลองนี้เช่นกัน โดยจะเห็นว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MM2 มีเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่มีการแบ่งตัวและขยายขนาดเพียงอย่างเดียวค่อนข้างสูง (80.00-96.34 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสที่ได้จากสูตร M จากรายงานผลการทดลองในครั้งนี้จึงอาจสรุปในเบื้องต้นได้ว่าการที่แคลลัส ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MM2 มีการพัฒนาเป็นต้นในอาหารสูตรชักนำต้นได้น้อยกว่าแคลลัสที่ได้จากสูตร M2 น่าจะมีสาเหตุมาจากชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารสูตรชักนำแคลลัสเอง นอกจากนี้ยังอาจมีผลจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารสูตรชักนำแคลลัส และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นด้วย

เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงภายในกลุ่มของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA (สูตร M) หลังจากนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นสูตรต่างๆ และพบว่าการใช้ BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (สูตร MR1) สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของแคลลัสได้มากกว่าอาหารที่เติม kinetin 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว (สูตร SR1, SR2 และ SR3 ตามลำดับ) และสอดคล้องกับผลการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ต่างๆ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินร่วมกับไซโตไคนินในปริมาณที่เหมาะสมสามารถชักนำให้แคลลัสเกิดการพัฒนาเป็นต้นได้ดีกว่าการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพียงชนิดเดียว (Croughan and Chen, 1991; Burikam *et al*., 1996; Bishnoi, 2000) เช่นเดียวกับการทดลองของ Chen (1977) และ Huang *et al.* (1986) ซึ่งพบว่าเมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นที่เติม kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ตั้งแต่ 74-78 เปอร์เซ็นต์

นอกจากการเติม kinetin เพียงชนิดเดียวลงในอาหารสูตรชักนำต้นซึ่งมีผลให้แคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นได้น้อยแล้ว เหตุผลอีกประการหนึ่งที่ทำให้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร SR1, SR2 และ SR3 มีค่าน้อยกว่าการเลี้ยงบนสูตร MR1 อาจเนื่องมาจากการเติม L-proline ลงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น SR1, SR2 และ SR3 เนื่องจาก Jain *et al.* (1996a) พบว่าการเพาะเลี้ยงโปรโทพลาสต์ของข้าวพันธุ์ต่างๆ บนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นที่เติม L-proline มีผลยับยั้งการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัส ซึ่งไม่สอดคล้องกับการทดลองของ ลาวัลย์ (2543) ที่รายงานว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดแก่ของ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สามารถพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์บนอาหารสูตรชักนำต้นที่เติม L-proline 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และการทดลองของ Cho and Zapata (1988) และ Zapata *et al.* (1991a) ซึ่งพบว่าการเติม L-proline มีผลส่งเสริมการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้นของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูและไมโครสปอร์ของข้าวจาปอนิกาพันธุ์ Taipei 309 แต่ต้นที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่เป็นต้นเผือก

ในการทดลองครั้งนี้พบว่ามีต้นเผือกเกิดขึ้นมากกว่าต้นสีเขียวทั้งในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงอับเรณูเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส (ตารางที่8) และในขั้นตอนการชักนำให้เกิดต้นในการทดลองที่ 3.3 (ตารางที่ 11) ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการเติมน้ำตาลความเข้มข้นสูงกว่าปกติ (40, 50 และ 60 กรัมต่อลิตร) ลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสูตรชักนำแคลลัส รวมทั้งการใช้มอลโตสเป็นแหล่งธาตุอาหารคาร์บอน ดังที่ Chen (1978) ได้รายงานผลการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวจาปอนิกาพันธุ์ Tainan 5 ในอาหารที่เติมน้ำตาล

ซูโครสความเข้มข้น 3, 6 และ 9 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าจำนวนต้นเผือกเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูงขึ้น เช่นเดียวกับการทดลองของ Bishoi *et al.*(2000a) ซึ่งพบว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมระหว่างพันธุ์ข้าวในกลุ่มอินดิกากับข้าวพันธุ์ Basmati ในอาหารที่เติมน้ำตาลมอลโตส 50 กรัมต่อลิตรนั้นแม้จะมีผลให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงขึ้น แต่แคลลัสที่ได้มีการพัฒนาเป็นต้นเผือกสูงถึง 45 เปอร์เซ็นต์

การเกิดต้นเผือกนอกจากจะมีสาเหตุจากความเข้มข้นของน้ำตาลที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงดังกล่าวข้างต้นแล้วยังอาจมีผลมาจากพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวเองอีกด้วย โดยพบว่าการพัฒนาไปเป็นต้นเผือกในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวถูกควบคุมโดยกลุ่มยีน QTLs ที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 9 และ10 โครโมโซมละ 1 ตำแหน่งซึ่งควบคุมลักษณะการพัฒนาเป็นต้นเผือก และความถี่ของการเกิดลักษณะต้นเผือก ตามลำดับ (He *et al.*, 1998; Yamagishi, 2002; Sugimito and Takeoka, 1998) ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวจะพบการเกิดลักษณะเผือกได้ตั้งแต่ 5 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าว (Wei and Hong, 1991; Bhojwani *et al.*, 2001) โดยพบว่าการเกิดลักษณะเผือกในข้าวกลุ่มอินดิกาและจาปอนิกามีอัตราการเกิดไม่เท่ากันดังนี้ indica > indica/japonica hybrids > japonica ตามลำดับ (Nizeki, 1997) ต้นข้าวที่มีลักษณะเผือกมักมีปริมาณคลอโรฟิลล์ต่ำ มีความผิดปกติของ proplastids ไม่มีการสร้าง grana ขึ้นภายใน stroma ไม่พบ 16S และ 23S rRNA ในขณะที่ยังคงพบ 18S และ 25S rRNA ได้ตามปกติ และมีการขาดหายไปของชิ้นดีเอ็นเอในจีโนมของพลาสติด ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้เนื่องจากความผิดปกติของกระบวนการพัฒนาของไมโครสปอร์เองหรือเกิดจากความไม่เหมาะสมของระยะเวลาและสภาวะในการเพาะเลี้ยงแคลลัส เมื่อสังเกตลักษณะของแคลลัสที่จะพัฒนาไปเป็นต้นเผือกจะพบว่ามักเป็นแคลลัสที่เกาะกันอย่างหลวมๆ ประกอบด้วยเซลล์ที่มีลักษณะค่อนข้างเหี่ยวย่น ในขณะที่แคลลัสที่จะพัฒนาไปเป็นต้นสีเขียวจะประกอบด้วยเซลล์ที่มีลักษณะกลมและเต่ง (Wang *et* al., 1978; Zhou, 1996)

นอกจากสาเหตุดังกล่าวแล้วการเกิดต้นเผือกในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์หนึ่งๆ มีสาเหตุจากปัจจัยประการอื่นๆ ได้อีก เช่น ระยะการพัฒนาของเรณูที่นำมาเพาะเลี้ยงโดยมักพบว่าการเกิดต้นเผือกจะมีอัตราสูงถ้าเรณูที่นำมาเพาะเลี้ยงอยู่ในระยะ binucleate stage (Wang *et* al., 1978; Zhou, 1996) อุณหภูมิที่ใช้ทั้งในการปลูกต้นข้าวที่เป็นแหล่งเรณูและการเตรียมช่อดอกก่อนการเพาะเลี้ยง อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง สภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง อายุของแคลลัสที่เพาะเลี้ยง ตลอดจนชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง เป็นต้น (Wang *et al.*, 1978; Cornejo-Martin and Primo-Millo,1981; Ching, 1982; Wei and Hong, 1991; Nizeki, 1997; Shivanna, 2003) Roy and Mandal (2005) รายงานผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตว่าแคลลัสที่

ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวหอมพันธุ์ Pusa Basmati, Taraori Basmati และพันธุ์ Karnal local 95 บนอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่เติม NAA 0.5-3 มิลลิกรัมต่อลิตรส่วนใหญ่พัฒนาเป็นต้นเผือก

จากผลการทดลองซึ่งพบว่าต้นข้าวที่นำออกปลูกซึ่งยังไม่ผ่านขั้นตอนการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมด้วยสารโคลชิซินสามารถติดเมล็ดได้ 2 ต้น (DH-1, DH-2) นั้น อธิบายได้ว่าน่าจะเป็นผลมาจากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยธรรมชาติ (spontaneous chromosome doubling) เนื่องจากโดยทั่วไปแล้วต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูจะมีจำนวนโครโมโซมเพียงครึ่งหนึ่งของจำนวนโครโมโซมที่พบในเซลล์ร่างกาย (somatic cells) ของต้นที่ใช้เป็นแหล่งเรณู และมักมีความเป็นหมัน (sterility) Ching (1982) และ Mercy and Zapata (1986) รายงานว่าโอกาสการเกิดต้นดับเบิลแฮพลอยด์จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวมีมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าการเพิ่มจำนวนโครโมโซมดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้ระหว่างขั้นตอนต่างๆ ของการเพาะเลี้ยง เช่น ระยะการชักนำให้เกิดแคลลัส ระยะการเกิด re-differentiation และ embryogenesis ของแคลลัส นอกจากนี้ยังสามารถเกิดขึ้นได้ในหน่อของข้าวอีกด้วย (Bishoi *et al.*, 2000) กลไกการเพิ่มจำนวนโครโมโซมในธรรมชาติในระหว่างการเพาะเลี้ยงอับเรณูอาจเกิดขึ้นจากกระบวนการต่างๆ ต่อไปนี้ ได้แก่ endomitosis, endoreduplication, nuclear fusion และการเกิด unreduced microspores เป็นต้น ทั้งนี้พบว่าอัตราการเกิดเหตุการณ์ต่างๆ ดังกล่าวนี้ได้รับอิทธิพลจากปัจจัยหลายประการ เช่น จีโนไทป์ อุณหภูมิที่ใช้ในการเตรียมช่อดอกก่อนการเพาะเลี้ยง และสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง เป็นต้น (Sopory and Munshi, 1996; Testillano *et al.*, 2004) Marassi *et al.* (1993) ศึกษาวิธีการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมในข้าวแบบขั้นตอนเดียว และเสนอว่าการเพาะเลี้ยงแคลลัสในที่มืดแล้วจึงนำไปชักนำให้เกิดต้นในสภาพมีแสงโดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหารใหม่จะสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นดับเบิลแฮพลอยด์ได้ จากการทดลองของ Filloux *et al.* (1995) ชี้ให้เห็นผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเตรียมช่อดอกก่อนการเพาะเลี้ยงต่อการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยธรรมชาติ โดยพบว่าการนำช่อดอกไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8-10 วันสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นดับเบิลแฮพลอยด์ได้

ในการทดลองครั้งนี้พบว่ามีต้นดับเบิลแฮพลอยด์เกิดขึ้น 33.33 เปอร์เซ็นต์สอดคล้องกับการทดลองของจันทร์วิภา (2547) ที่เพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมชั่วที่ 2 ของข้าวขาวดอกมะลิ105 กับข้าวพันธุ์ชัยนาท1 และได้ต้นดับเบิลแฮพลอยด์ 33.33 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นดับเบิลแฮพลอยด์ในการทดลองนี้มีค่าสูงกว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (Lemont/KDML105) โดยรัตน์ดา (2538) ซึ่งพบการเกิดต้นดับเบิลแฮพลอยด์ 25 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นดับเบิลแฮพลอยด์ในการทดลองครั้งนี้ก็ยังมีค่าน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของ ประภา

และคณะ (2537) ภัทรพร (2540) และยี่โถ (2540) ที่เพาะเลี้ยงเรณูของข้าวลูกผสมระหว่างพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 กับข้าวอินดิกาพันธุ์ต่างๆ และพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นดับเบิลแฮพลอยด์ เป็น 36.7, 86.1และ 75 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นเพราะในการทดลองครั้งนี้ใช้อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียสในการเตรียมช่อดอกก่อนการเพาะเลี้ยงนาน 8-10 วัน ในขณะที่ยี่โถ (2540) เตรียมช่อดอกของข้าวลูกผสมระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับพันธุ์ CT9993-5-10-1-M ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสนาน 7-10 วันและพบว่าเกิดต้นดับเบิลแฮพลอยด์ได้ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ในขั้นตอนการย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำต้นในการทดลองนี้ บางครั้งได้นำแคลลัสที่มีขนาดใหญ่กว่า 2 มิลลิเมตรไปเลี้ยงเนื่องจากพบว่าถ้านำแคลลัสขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตรไปเพาะเลี้ยงแล้วแคลลัสส่วนใหญ่จะตายไปจึงต้องใช้แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่ง Yoshida (1995) รายงานว่าต้นที่พัฒนาจากแคลลัสที่มีขนาดใหญ่กว่า 2 มิลลิเมตรมักเป็นต้นแฮพลอยด์ จากผลการทดลองและรายงานดังกล่าวชี้ให้เห็นว่านอกจากความแตกต่างของจีโนไทป์ ชนิดของอาหารที่ใช้ และสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงแล้ว อาจเป็นไปได้ว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการเตรียมช่อดอกและขนาดของแคลลัสที่ย้ายไปเพาะเลี้ยงในสูตรชักนำต้นที่ไม่เหมาะสม จึงทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นดับเบิลแฮพลอยด์ในการทดลองครั้งนี้มีค่าน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการทดลองดังกล่าวแล้ว

เมื่อพิจารณาผลการเพาะเลี้ยงอับเรณูของต้นข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 (KDML105//IRBB5 /KDML105) จากการทดลองที่ 3.1, 3.2 และ 3.3 ซึ่งพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส (3.33-6.11 เปอร์เซ็นต์) การพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัส (0.71-1.29 เปอร์เซ็นต์) และเปอร์เซ็นต์ต้นดับเบิลแฮพลอยด์ (33.33 เปอร์เซ็นต์) ค่อนข้างน้อยนั้นอาจมีสาเหตุจากจีโนไทป์ของพันธุ์ข้าวเอง เนื่องจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์ข้าวที่มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูได้ค่อนข้างต่ำ ประกอบกับพันธุ์ข้าว IR24 ซึ่งเป็นพันธุ์รับในการสร้างสายพันธุ์ IRBB5 ที่ใช้เป็นแหล่งของยีนต้านทานในการทดลองครั้งนี้ก็ถูกจำแนกให้เป็น recalcitrant variety ซึ่งมีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ต่ำเช่นกัน (Chowdhury and Mandal, 2001; Ogawa, 2003) จึงเป็นไปได้ว่าสาเหตุจากพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวเองน่าจะเป็นปัจจัยสำคัญต่อความสำเร็จของการทดลองครั้งนี้ นอกจากนี้องค์ประกอบของอาหารที่ใช้อาจยังไม่เหมาะสมกับจีโนไทป์ของพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลอง ในการทดลองนี้ยังพบปัญหาการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของแคลลัส (callus browning) และปัญหาการฉ่ำน้ำของแคลลัสอีกด้วยซึ่งทำให้จำนวนแคลลัสที่จะพัฒนาเป็นต้นมีน้อยลงไปอีก มีรายงานจำนวนมากที่แสดงให้เห็นแนวโน้มของวิธีการในการที่จะเพิ่มอัตราการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ของแคลลัส เช่น การปรับสัดส่วนของ polyamine โดยการเติมสาร putrescine 10 มิลลิกรัมต่อลิตรลงในอาหารเพื่อชะลอการเปลี่ยนเป็นสีนำตาลของแคลลัส (ยี่โถ, 2540) การดึงน้ำออกจากแคลลัสก่อนนำไปชักนำ

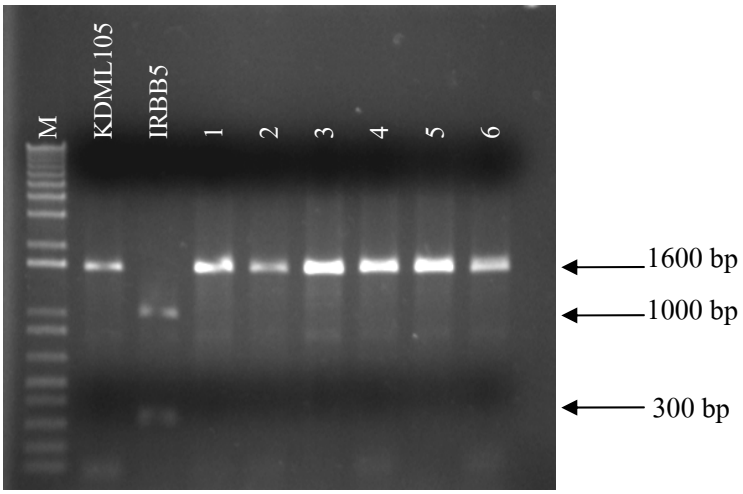
ให้เกิดต้นเพื่อลดอาการฉ่ำน้ำ (Jain *et al.*, 1996b) การปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารบางชนิดในอาหารเพาะเลี้ยงตลอดจนการปรับสภาวะในการเพาะเลี้ยง (Shoeb *et al*, 2001) เป็นต้น

3.3 <u>ผลการคัดเลือกต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูที่มียีนต้านทาน *xa5* ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ</u>

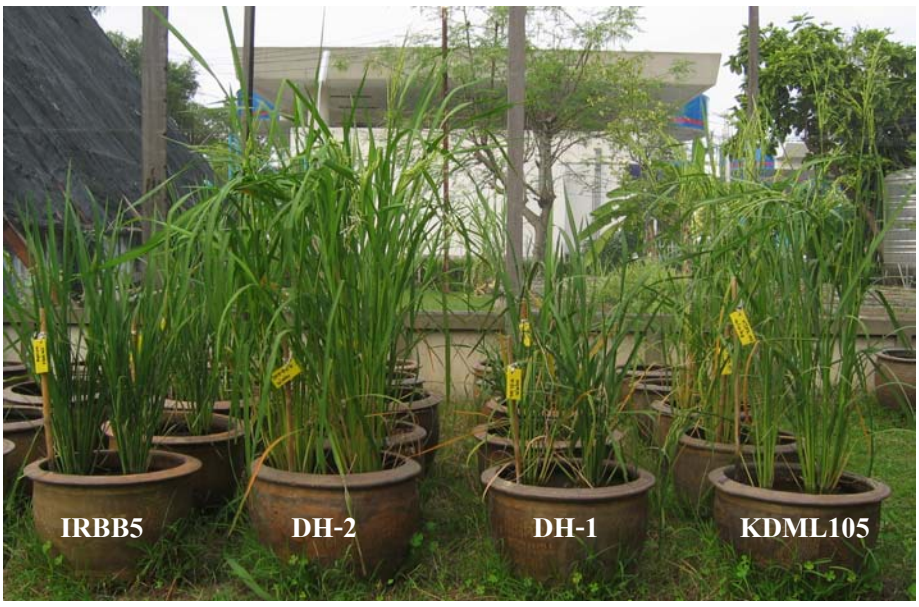
เมื่อนำดีเอ็นเอจากต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูทั้ง 6 ต้นมาวิเคราะห์เพื่อคัดเลือกต้นที่มียีนต้านทาน *xa5* ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด PCR-based marker โดยใช้ RG556 เป็นไพร-เมอร์เช่นเดียวกับการคัดเลือกต้นต้านทานในรุ่น BC_1F_1 และ BC_1F_2 พบว่าไม่มีต้นใดปรากฏแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับพันธุ์ให้ (IRBB5) แสดงว่าต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูทั้ง 6 ต้นไม่มียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง (*xa5*) เลย (ภาพที่ 8) แม้ว่าต้นข้าวดังกล่าวจะเจริญมาจากอับเรณูของต้นข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 ที่คัดเลือกแล้วว่ามียีนต้านทานโรคก็ตาม

เมื่อทดลองนำเมล็ด DH_2 ของต้นดับเบิลแฮพลอยด์ที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยธรรมชาติ (DH-1) จำนวน 15 เมล็ดไปปลูกเพื่อทดสอบลักษณะต้านทานโรคด้วยวิธีปลูกเชื้อเช่นเดียวกับการคัดเลือกในรุ่น BC_1F_2 พบว่าต้นข้าวทั้งหมดแสดงลักษณะไม่ต้านทานต่อโรค โดยมีความไม่ต้านทานระดับ HS และมีคะแนนเฉลี่ยการทำลายของโรคอยู่ระหว่าง 7.5-9 ทั้งนี้การแสดงลักษณะไม่ต้านทานต่อโรคสอดคล้องกับผลการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวข้างต้น

การที่ต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูทั้ง 6 ต้นไม่ปรากฏยีนต้านทานโรคเมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RG556 ซึ่งมีรายงานว่ามีตำแหน่งใกล้ชิดกับยีนต้านทาน *xa5* (Yoshimura, 1995; Sanchez, 2000) นั้น เมื่อพิจารณาจากการทดลองของ Sanchez *et al.* (2000) ซึ่งพบว่าความแม่น ยำของเครื่องหมายดีเอ็นเอซึ่งใช้ RG556 เป็นไพรเมอร์ในการคัดเลือกต้นต้านทานโรคมีค่าสูงถึง 96 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองนี้แล้วเท่ากับว่ามีต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูที่มีโอกาสจะถูกคัดเลือกอย่างผิดพลาดอันเนื่องมาจากการเกิดครอสซิงโอเวอร์ในตำแหน่งระหว่างยีน *xa5* กับเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวมีน้อยกว่า 1 ต้น ดังนั้นการไม่ปรากฏยีนต้านทานในต้นข้าวทั้ง 6 ต้นน่าจะมีสาเหตุมาจากการกระจายตัวของยีนต้านทาน *xa5* ในขณะที่มีการสร้างเรณูของต้น BC_1F_1 ที่ทดสอบแล้วว่ามีจีโนไทป์ของยีนต้านทานอยู่ในสภาพเฮเทอโรไซกัส ทั้งนี้อัตราส่วนของเรณูที่มียีนต้านทานต่อเรณูที่ไม่มียีนต้านทานเท่ากับ 1:1 ดังนั้นต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูทั้ง 6 ต้นจึงน่าจะเจริญมาจากเรณูที่ไม่มียีนต้านทานนั่นเอง



ภาพที่ 8 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่และนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpy* CH4 IV
M= 1 kb plus DNA marker
ตัวอย่างที่ 1-6 เป็นดีเอ็นเอจากต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของลูกผสมกลับ BC_1F_1



ภาพที่9 ลักษณะต้นข้าวดับเบิลแฮพลอยด์รุ่น DH_2 ที่นำออกปลูกเปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อแม่

3.4 ผลการคัดเลือกแบบ background selection ในต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูโดยการวิเคราะห์เอเอฟแอลพี

ผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูเพื่อคัด เลือกต้นที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 พบว่าพันธุกรรมของพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีค่าการกระจายตัวอยู่ระหว่าง 57.53-67.12 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11) โดยต้นข้าวดับเบิลแฮพลอยด์ DH-1 และ DH-2 มีเปอร์เซ็นต์พันธุกรรมของพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เท่ากับ 64.38 เปอร์เซ็นต์ทั้งสองต้น และเมื่อนำเมล็ดชั่วที่ 2 (DH_2) ของต้น DH-1 และ DH-2 ออกปลูกในกระถางและศึกษาลักษณะทั่วไปบางประการเปรียบเทียบกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่าต้น DH-1 ที่ได้มีลักษณะต้นเตี้ย ใบสีเขียวเข้ม มีจำนวนเมล็ดต่อรวงน้อยกว่าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 แต่มีขนาดของเมล็ดใหญ่กว่าเล็กน้อย ส่วนต้น DH-2 มีความสูงของต้นและขนาดของรวงใกล้เคียงกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 แตกกอได้ดี (ภาพที่ 9)

ตารางที่ 11 การกระจายตัวของพันธุกรรมของพันธุ์รับ (ขาวดอกมะลิ105) ในต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1

ต้นที่	จำนวนแถบที่ปรากฏเฉพาะในพันธุ์ขาวดอกมะลิ105	จำนวนแถบที่ปรากฏเฉพาะในสายพันธุ์ IRBB5	เปอร์เซ็นต์พันธุกรรมของพันธุ์ขาวดอกมะลิ (%)
1	49	24	67.12
2 (DH-2)	47	26	64.38
3	42	31	57.53
4 (DH-1)	47	26	64.38
5	45	28	61.64
6	43	30	58.90
	เฉลี่ย		62.33

3.6 การชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมด้วยสารโคลชิซิน

ภายหลังจากการทดลองนำหน่อจำนวนหนึ่งของต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูออกปลูกในกระถางและพบว่าสามารถติดเมล็ดได้เพียง 2 ต้นนั้น จึงทดลองนำหน่อข้าวที่ไม่สามารถติด

เมล็ดได้ซึ่งเพาะเลี้ยงอยู่ในอาหารสูตรเพิ่มจำนวนต้น (ประดิษฐ์ และคณะ, 2536) มาชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งที่เติมสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 3 วันและ 5 วันในสภาพมืด พบว่าหน่อข้าวที่ได้รับสารนาน 3 วันและ 5 วันมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 81.9เปอร์เซ็นต์และ 53.39 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 อัตราการรอดชีวิตของหน่อข้าวแฮพลอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 ภายหลังได้รับสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 3 วันและ 5 วัน

จำนวนวันได้รับสาร (วัน)	จำนวนหน่อที่ชักนำ (หน่อ)	หน่อที่รอดชีวิต (%)	หน่อที่ตาย (%)
3	150	81.9	18.1
5	114	53.39	46.61

นำหน่อข้าวที่รอดชีวิตและมีการเจริญของรากสมบูรณ์ดีออกปลูกในกระถางในสภาพโรง-เรือน โดยการปลูกครั้งที่ 1 นั้นอยู่ในช่วงเดือนเมษายนซึ่งอยู่ในช่วงนอกฤดูปลูกและออกดอกของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ จึงทดลองชักนำให้ต้นข้าวออกดอกโดยการควบคุมให้ต้นข้าวอยู่ในสภาพมืดอย่างต่ำ 13 ชั่วโมงต่อวันนาน 14-15 วัน พบว่าต้นข้าวที่นำออกปลูกสามารถออกดอกได้เพียง 1-2 ช่อ และไม่มีการติดเมล็ดทำให้ไม่สามารถบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับการติดเมล็ดที่แน่นอนได้ ดังนั้นจึงนำหน่อข้าวที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมโคลชิซินออกปลูกอีกครั้งหนึ่งในช่วงฤดูปลูกปกติ แต่เนื่องจากการขาดระบบการจัดการเกี่ยวกับการป้องกันสัตว์ที่เป็นศัตรูของต้นข้าวที่มีประสิทธิภาพ ทำให้ผู้วิจัยไม่สามารถบันทึกผลการติดเมล็ดในเวลาที่กำหนดได้เนื่องจากต้นข้าวทั้งหมดถูกทำลายจากสัตว์และแมลงที่เป็นศัตรูของต้นข้าว จากปัญหาดังกล่าวทำให้สามารถสรุปผลของสารโคลชิซินที่ทำให้เกิดการตายและการรอดชีวิตของหน่อข้าวที่ได้รับสารนาน 3 วันและ5 วันเท่านั้น โดยไม่สามารถสรุปผลของสารต่อการชักนำให้ต้นข้าวเกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมและการติดเมล็ดได้

ในการทดลองนี้พบว่าเมื่อระยะเวลาในการได้รับสารยาวนานขึ้นมีผลให้มีจำนวนหน่อที่รอดชีวิตน้อยลง สอดคล้องกับผลการทดลองของ Wong (1989) ซึ่งพบว่าเมื่อแช่หน่อข้าวในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ที่เติม DMSO 2 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลานานขึ้นจะมีผลทำให้อัตราการรอดชีวิตมีค่าลดลง แต่เมื่อนำต้นที่รอดชีวิตออกปลูกจะพบหน่อที่มีการเพิ่มจำนวน

โครโมโซมแบบทวีคูณได้มากขึ้น เช่นเดียวกับ Gupta and Grill (1985) ที่รายงานว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นกล้าของ *Chrysanthemum coronarium* L. ที่ได้รับสารโคลชิซินมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มเวลาในการให้สาร

Derman (1940) และ Morris (1983) อธิบายว่าสาเหตุที่ชิ้นส่วนของพืชตายไปภายหลังได้รับสารโคลชิซิน อาจเป็นเพราะเซลล์ที่ได้รับสารโคลชิซินความเข้มข้นสูงจะเกิดการเปลี่ยนแปลงความหนืดของไซโทพลาสซึมและกระบวนการเมทาบอลิซึมภายในเซลล์ซึ่งมีผลให้เซลล์ตายไปในที่สุด นอกจากนี้การได้รับสารเป็นเวลานานจะทำให้มีจำนวนเซลล์ที่ได้รับผลของสารมากขึ้นเพราะผ่านวัฏจักรการแบ่งเซลล์หลายครั้ง จนเนื้อเยื่อบริเวณนั้นไม่สามารถทนต่อความผิดปกติที่เกิดขึ้นได้ (Morais, 1991) ในการทดลองครั้งนี้สังเกตพบว่าบริเวณโคนหน่อที่ได้รับสารโคลชินนาน 5 วันส่วนใหญ่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลภายหลังนำหน่อไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเพิ่มจำนวนต้น จากนั้นบริเวณที่เป็นสีน้ำตาลจะขยายออกไปจนหน่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทั้งหน่อ ทั้งนี้การตายของเซลล์ในเนื่อเยื่อบริเวณโคนหน่อซึ่งเป็นส่วนที่สัมผัสกับสารอาจทำให้การดูดซึมธาตุอาหารเข้าสู่ลำต้นเกิดขึ้นได้ไม่ดี ส่งผลให้เนื้อเยื่อในบริเวณอื่นได้รับธาตุอาหารน้อยลงจนเนื้อเยื่อตายไปในที่สุดเนื่องจากพบว่าหน่อที่ตายไปนี้จะมีการยืดยาวของยอดขึ้นมาเพียงเล็กน้อยหรือไม่มีการยืดยาวขึ้นมาเลย จึงเป็นไปได้ว่าการตายของหน่อนอกจากจะมีสาเหตุมาจากการตายของเซลล์และการสะสมสารโคลชิซินโดยตรงแล้วยังอาจเป็นผลจากความเสียหายที่เกิดจากการสะสมสารประกอบฟีโนลิก (phenolic compound) ในเนื้อเยื่อบริเวณโคนหน่ออีกด้วย Morgan (1975) เสนอว่าหากลดการสะสมของสารบริเวณเนื้อเยื่อที่เจริญเป็นหน่อใหม่จะทำให้หน่อใหม่นั้นเจริญอยู่ได้ มีรายงานการทดลองที่แสดงว่าการลดอัตราการตายของหน่อข้าวที่ได้รับสารโคลชิซินสามารถทำได้โดยการปรับสภาพและวิธีการเพาะเลี้ยงหน่อที่ได้รับสารเพื่อลดความเสียหายจากการได้รับสารซึ่งเรียกว่า post-colchicine treatment (Taria, 1991) ดังตัวอย่างการทดลองของ Rose *et al.* (2000) ที่พบว่าเมื่อเพิ่มความถี่ของระยะเวลาในการเปลี่ยนอาหารให้กับข้อของลูกผสมข้ามชนิด (*Syringa vulgaris* X *S. pinnatifolia*) ซึ่งได้รับสารโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์จะสามารถช่วยให้ข้อเหล่านี้รอดชีวิตได้มากขึ้น เช่นเดียวกับรายงานการทดลองของ Arzari and Darvey (2001) ซึ่งพบว่าเมื่อนำหน่อที่เป็นแฮพลอยด์ของ triticale ที่แช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.06 เปอร์เซ็นต์ที่เติม DMSO 5 เปอร์เซ็นต์และ Tween 20 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตรนาน 5.5 ชั่วโมง ภายหลังล้างด้วยน้ำประปานาน 3 ชั่วโมงจึงนำไปเลี้ยงในระบบ hydroponic ปรากฏว่าหน่อทั้งหมดรอดชีวิตและสามารถติดเมล็ดได้ถึง 98 เปอร์เซ็นต์

สรุป

1. การคัดเลือกต้นข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 ที่มียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RG556 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1600 คู่เบสในพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 และพบแถบดีเอ็นเอขนาด 1000 คู่เบสและ 300 คู่เบสในพันธุ์ต้านทานภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpy* CH4 IV และสามารถคัดเลือกต้นต้านทานได้ 7 ต้น

2. การคัดเลือกต้น BC_1F_2 ที่ต้านทานโรคด้วยวีธีปลูกเชื้อปรากฏต้นที่มีระดับความต้านทานสูง 1 ต้นและระดับต้านทาน 12 ต้น และเมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RG556 พบว่าต้นต้านทานโรคทุกต้นมีจีโนไทป์ในตำแหน่งยีนต้านทานอยู่ในสภาพโฮโมไซกัส จากการศึกษาลาย-พิมพ์เอเอฟแอลพีของต้นต้านทาะโรคด้วยไพรเมอร์ 15 คู่ พบว่ามีพันธุกรรมจากพันธุ์ขาวดอกมะลิอยู่ระหว่าง 67.12-82.19 เปอร์เซ็นต์

3. อับเรณูของต้น BC_1F_1 ที่มียีนต้านทานโรคซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่เติมน้ำตาลมอลโตสมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงกว่าอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำตาลชนิดเดียวกันความเข้มข้น 40 หรือ 50 หรือ 60 กรัมต่อลิตรมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสไม่แตกต่างกันทางสถิติ

4. การเพาะเลี้ยงอับเรณูของต้น BC_1F_1 ที่มียีนต้านทานโรคเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหารสูตร N_6 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลมอลโตส 50 กรัมต่อลิตรมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุด 10.19 เปอร์เซ็นต์

5. แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตร N_6 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลมอลโตส 60 กรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นสีเขียวได้สูงที่สุด 1.29 เปอร์เซ็นต์เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำต้นสูตร MR1 ที่ประกอบด้วยอาหารสูตรพื้นฐาน MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrolysate 300 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

6. ผลการตรวจสอบยีนต้านทาน *xa5* ในต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูจำนวน 6 ต้น ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RG556 ไม่พบต้นที่มียีนต้านทานโรค และเมื่อศึกษาลายพิมพ์เอเอฟแอลพี พบว่ามีพันธุกรรมจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 อยู่ระหว่าง 57.53-67.12 เปอร์เซ็นต์

7. การได้รับสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์นาน 3 วันมีหน่อที่รอดชีวิตสูงสุด 81.9 เปอร์เซ็นต์

8. พบต้นดับเบิลแฮพลอยด์ที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยธรรมชาติ 2 ต้น (33.33 เปอร์เซ็นต์) จากจำนวนต้นสีเขียวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูจำนวน 6 ต้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547. **ยุทศาสตร์ข้าวปี 2547-2551**. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 64 น.

กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. 2543. **คู่มือโรคข้าวและการป้องกันกำจัด**. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ.

กาญจนา กล้าแข็ง. 2544. **การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้บ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคขอบใบแห้งของข้าวด้วยวิธีเอเอฟแอลพี (AFLP) ของพันธุ์ Near Isogenic Lines**. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

กาญจนา กล้าแข็ง, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เผดิม ระติสุนทร, สาธิต ทยาพัชร, พรรณี รอดแรงบุญ และกัมปนาท มุขดี. 2537. **การผลิตข้าว polyploid จากการผสมข้ามชนิด**. เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการเรื่อง การพัฒนางานวิจัยข้าวและธัญพืชเมืองหนาวประจำปี 2537 ระหว่างวันที่ 29-31 มีนาคม 2537 ณ โรงแรมไพลิน จังหวัดสุโขทัย. 15 น.

จันทร์วิภา บุญอินทร์. 2547. **การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) ลูกผสมชั่วที่1 และลูกชั่วที่2 เพื่อการผลิตต้น haploid ที่มีลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ธีรยุทธิ์ ตู้จินดา. 2544. **Genome Mapping**. เอกสารประกอบการสอน ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 19 น.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, กาญจนา กล้าแข็ง, เผดิม ระติสุนทร, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, นิตย์ศรี แสงเดือน, ชัยฤกษ์ มณีพงษ์ และ หทัยรัตน์ อุไรวงศ์. 2536. **การเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนของข้าวลูกผสม**. วิทยาสารเกษตรศาสตร์ 27(1): 15-19.

ประพาส วีระแพทย์. 2531. **ความรู้เรื่องข้าว**. พิมพ์ครั้งที่3, โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช, กรุงเทพฯ.

ประภา ศรีพิจิตต์, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และอภิชาติ วรรณวิจิตร. 2537. การปรับปรุงข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ไม่ไวต่อช่วงแสงโดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของลูกผสมชั่วที่1. **วิทยาสารเกษตรศาสตร์** 28(4): 499-511.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2536. **เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ภัทรพร ภักดีฉนวน. 2540. **การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวลูกผสมชั่วที่1(ขาวดอกมะลิ105/กข23) เพื่อใช้ในการศึกษาความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparta lugens*).** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ยี่โถ ทัพภะทัต. 2540. **การพัฒนาประชากร Doubled Haploid ที่เหมาะสมกับการทำแผนที่จีโนมของข้าวหอมไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

รัตน์ดา เลิศวิชัย. 2538. **การเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสม (เลมอนท์/ขาวดอกมะลิ 105)**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลาวัลย์ ชัยวิรัตน์นุกูล. 2543. **การถ่ายฝากยีน Chymotrypsin Inhibitor จากถั่วพูเข้าไปในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค**. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วาสนา วรมิศร์. 2538. **การปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมของไทย**. ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ศูนย์พันธุวิศวกรรม. 2542. **การศึกษาจีโนมในสิ่งมีชีวิต**. *ใน* เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง เทคนิคอณูพันธุศาสตร์ในการผลิตปศุสัตว์. ระหว่างวันที่ 26-30 กันยายน 2542 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม. 9 น.

สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย. 2548. **ปทานุกรมพันธุศาสตร์**. บริษัทเท็กซ์ แอน เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและดีเอ็นเอเครื่องหมาย : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 116 น.

เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา. 2536. **การเพาะเลี้ยงอับเรณู**, น. 32-33. *ใน* เอกสารการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขั้นสูงและพันธุวิศวกรรม. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อมรา ตั้งตระกูล. 2508. **การทำให้เกิด Mutation ในพันธุ์ข้าวด้วยการใช้ Colchicine และ รังสีแกมม่า**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Afza, R., M. Chen, F.J. Zapata, J. Xie, K.H. Fundi, K.S. Lee, E.B. Mucio and A. Kodym. 2000. Effect of spikelet position on rice anther culture efficiency. **Plant Sci**. 153(2): 155-159.

_____, D.S. Brar, S. Nandi, N. Huang and G.S. Khush. 1999. Phylogenetic relationships among Oryza species revealed by AFLP marker. **Theor. Appl. Genet**. 98: 1320-1328.

Agrawal, R.K., R.N. Pandey and V.P. Agrawal. 1992. Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris* leaves. **Biotech. Biodiv. Lett**. 2: 19-24.

Alejar, M.S., F.J. Zapata, D. Senadhira, G.S. Khush and S.K. Datta. 1995. Utilization of anther culture as a breeding tool in rice improvement. pp. 134-142. *In* M. Terzi,R.Cella and A.Falavigna, eds. **Current Issue in Plant Molecular and Cellular Biology**, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Alemanno, L. and E. Guiderdoni. 1994. Increased doubled haploid plant regeneration from rice (*Oryza sativa* L.) anthers cultured on colchicine-supplemented media. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 13: 432-436.

Antoine – Michard, S. and M. Beckert. 1997. Spontaneous versus colchicine-induced chromosome doubling in maize anther culture. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 48: 203-207.

Artvinli, S. 1987. Cytoskeleton , microtubules, tubulin and colchicine : a review. **Cytologia** (52): 189-198.

Arzari, A. and N.L. Darvey. 2001. The effect of colchicine on triticale anther–derived plants : Microspore pre-treatment and haploid-plant treatment using a hydroponic recovery system. **Euphytica** 122: 235-241.

Asaduzzaman, M., M.A. Bari, M.H. Rahman, N. Khatum, M.A. Islam and M. Rahman. 2003. *In vitro* plant regeneration through anther culture of five rice varieties. **J. Biol. Sci.** 3(2): 167-171.

Asano, Y., Y. Ilo, M. Ohara, K. Sugiura and A.Fujiie. 1994. Improved regeneration response of creeping bentgrass and japonica rice by maltose and lactose. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 39(1): 101-103.

Bajaj, Y.P.S. 1990. In vitro production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. pp. 1-44. *In* Y.P.S. Bajaj, ed. **Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.12:Haploid in Crop Improvement I**. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.

Ball, S.T., H.P. Zhou and C.F. Konzak. 1993. Influence of 2,4-D, IAA and duration of callus induction in anther culture of spring wheat. **Plant Sci**. 90: 195-200.

Barnabas, B., P.L. Pfabler and G. Kovacs. 1991. Direct effect of colchicine on the microspore embryogenesis to produce dihaploid plants in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theor Appl. Genet**. 81: 657-678.

Batty, N.J.P. and J.M. Dunwell. 1989. Effect of carbohydrate source on the response of potato anther in culture. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 18: 221-226.

Bhojwani, S., H. Pande and A. Raina. 2001. Factors affecting androgenesis in indica rice. Available Source : http://www.bibd.un.-giessen.de/gdoe. September 21, 2001.

Bishnoi, U.S., R.K. Jain, K.R. Gupta, V.K. Chowdhury and J.B. Chowdhury. 2000a. High frequency androgenesis in indica x basmati rice hybrids using liquid culture media. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 61: 153-159.

_____, _____, J.S. Rohilla, V.K. Chowdhury, K.R. Gupta and J.B. Chowdhury. 2000b Anther culture of recalcitrant Indica x Basmati rice hybrids. **Euphytica** 114: 93-101.

Blair, M.W. and S.R. McCouch. 1997. Microsatellite and sequence-tagged site markers diagnostic for the rice bacterial leaf blight resistance gene *xa5*. **Theor. Appl. Genet**. 95: 174-184.

Blanc, G., L. Lardet, A. Martin, J.L. Jacob and M.P. Carron. 2002. Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic callus of *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.). **J. Exp. Bot.** 53(373): 1453-1462.

_____, N. Michaux-Ferriere, C. Teisson, L. Lardet and M.P. Carron. 1999. Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult**. 59: 103-112.

Brewer, E.P., J.A. Saunders, J.S. Angle, R.L. Chaney and M.S. McIntosh. 1999. Somatic hybridization between the zinc accumulator *Thlaspi caerulescens* and *Brassica napus.* **Theor. Appl. Genet.** 99: 761-771.

Burikam, S., P. Tinjuangjun, R. Kuhapitaktum and S. Attathom. 1996. Regeneration and transformation of Khaw Dawk Mali 105, an aromatic Thai rice. pp. 465-471. *In* **Proceeding of the Third Asia-Pasific Conference on Agricultural Biotechnology : Issues and Choices**, Poster Session. 10-15 November. 1996. Hua Hin, Prachuapkhirikhan, Thailand.

Chang, T.T. 1976. The origin, evolution, cultivation, dissemination and diversification of Asian and African rice. **Euphytica** 25: 435-441.

Chen, C.C. 1978. Effect of sucrose concentration on plant production in anther culture of rice. **Crop Sci**.18: 905-906.

Chen, C.H. and C.G.K. Yvonne. 1978. In vitro induction of tetraploid plants from colchicine-treated diploid daylily callus. **Euphytica** 28: 705-709.

Chen, Q.F., C.L. Wang, Y.M. Lu, M. Shen, R. Afza, M.V. Duron and H. Brunner. 2001a. Anther culture in connection with induced mutation for rice improvement. **Euphytica** 120 : 401-408.

Chen, S., C.G. Xu, X.H. Lin and Q. Zhang. 2001b. Improving bacterial blight resistance of 6078, an elite restorer line of hybrid rice, by molecular markers-assisted selection. **Plant Breed.** 120: 133-137.

Ching, C.C. 1982. Anther culture of rice and its significance in distant hybridization. pp. 47-53. *In* IRRI. **Rice Tissue Culture Planning Conference**. IRRI, Manila, Philippines.

Cho, M.S. and F.J. Zapata. 1988. Callus formation and plant regeneration in isolated pollen culture of rice (*Oryza sativa* L. cv. Taipei 309). **Plant Sci**. 58: 239-244.

Chowdhury, B. and A.B. Mandal. 2001. Microspore embryogenesis and fertile plantlet regeneration in a salt susceptible x salt tolerant rice hybrid. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 65: 141-147.

Chu, C.C., C.C. Wang, C.S. Sun, C. Hsu, K.C. Yin, C.Y. Chu and F.Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Sci. Sin**. 18: 659-668.

Chu, Q.R., H.X. Cao and S.D. Linscombe. 2003. A novel medium for induction of embryogenic callus in rice anther culture of Southern US crosses. Available Source :http://www.agctr.lsu.edu./inst/research/stations/rice/giren/Pub21.html, May7,2003.

Cornejo-Matin, M.J. and E. Primo-Millo. 1981. Anther and pollen grain culture of rice (*Oryza sativa* L.). **Euphytica** 30: 541-546.

Croughan, T.P. and Q.R. Chen. 1991. Protoplast regeneration from anther calli of US x indica (*Oryza sativa* L.). pp. 192-215. *In* Y.P.S. Bajaj, ed. **Rice Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol.14.** Springer-Verlag, Berlin.

Currah, L. and D.J. Ockendon. 1987. Chromosome doubling of mature haploid Brussels sprout plants by colchicine treatment. **Euphytica** 36(1): 167-173.

Davierwala, A.P., A.P.K. Reddy, M.D. Lagu, P.K. Ranjekar and V.S. Gupta. 2001. Marker assisted selection of bacterial blight resistance gene in rice. **Biochem. Genet.** 39 (7/8): 261-278.

Derman, H. 1940. Colchicine polyploid and technique. **Bot.Rev**. 6: 599-635.

Edward, M.D., C.W. Stuber and J.F. Wendel. 1987. Molecular facilitated investigation of quantitative trait loci in maize. I. Number, genomic distribution and type of gene action. **Genetics** 116: 113-125.

Eigsti, O.J. and P. Dustin, Jr. 1954. **Colchicine in Agriculture, Medicine, Biology and Chemistry**. Iowa State College Press, Iowa. 470 p.

Farfuque, M.O., T. Farzana, Z.I. Seraj, R.H. Sarker and A.A. Khatun. 1998. Variations in green plant regeneration response from anthers of indica rice and their hybrids with japonica cv.Taipei 309. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 54: 191-195.

FAO. 2005. Genetic diversity in rice. Available Source:http://www.FAO Document Repository1_file\y4751eob.htm. June 15, 2005.

Filloux, D., L. Alemano, A. Amari and E. Guiderdoi. 1995. Efficient production of double haploid plant through colchicine and cold treatment of rice (*Oryza sativa* L.) anther, p. 107. *In* **3rd International Rice Genetic Symp. (Abstract).** October 16-20 , 1995. EDSA Plage Hotel Manila , Philippines.

Foroughi-Wehr, B. and G. Wenzel. 1993. Andro-and Parthenogenesis. pp. 439-448 *In* M.D.Hayward, N.O. Bosemark and I. Romagosa, eds. **Plant Breeding : Principle and Prospects.** Chapman&Hall, London.

Fuentes, J.L., F. Escobar, A. Alvares, G. Gallego, M.C. Duque., M. Ferrer, J.E. Deus and J.M. Tohme. 1999. Analyses of genetic diversity in Cuban rice varieties using isozyme, RAPD and AFLP markers. **Euphytica**109: 107-115.

Genovesi, A.D. and C.W. Magill. 1979. Improved rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock. **Crop Sci**.19: 662-664.

Genovesi, A.D. and C.W. Magill. 1982. Embryogenesis in callus derived from rice microspores. **Plant Cell Rep**. 1: 257-260.

Gregorio, G.B. 1997. **Tagging salinity tolerance genes in rice using amplified fragment length polymorphism (AFLP).** Ph.D. Thesis, University of the Philippines at Los Banos Philippines.

Guha-Mukherjee, S. 1973. Genotypic difference in the *in vitro* formation of embryoids from rice pollen. **J. Exp. Bot**. 24: 139-144.

Guiderdoni, E., E. Galinato, J. Luistro and G. Vergara. 1992. Anther culture of tropical japonica x indica hybrids of rice (*Oryza sativa* L.). **Euphytica** 62: 219-224.

Gupta, R.C. and B.S. Grill. 1985. Induced autotetraploidy in *Chrysanthemum coronarium* L. **Cytologia** 50: 117-123.

Guzman, M. and F.J. Zapata-Arias. 2000. Increasing anther culture efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) using anthers from ratooned plants. **Plant Sci**. 151: 107-114.

He, P., L. Shen, C. Lu, Y. Chen and L. Zhu. 1998. Analysis of quantitative trait loci which contribute to anther culturability in rice (*Oryza sativa* L.). **Mol. Breed.** 4: 165-172.

Henry, V., P. Vain and J. De Buyser. 1994. Genetics analysis on *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. **Euphytica** 79: 45-58.

Hirabayashi, T., S. Misoo, O. Kamijima and M. Sawano. 1992. Effects of various amino acids and casein hydrolysate on anther culture of rice (*Oryza sativa* L.). **Sci. Rep. Fac. Agr., Kobe University.** 20(1): 23-29.

Hu, C.H., C. Huang, C.P. Ho, H.C. Liang, C.C. Chuang and L.P. Peng. 1978. On the inductive conditions of rice pollen plantlets in anther culture. pp. 87-96. *In* **Proc. Symp. Pl. Tiss. Cult**. Science Press. *Cited* H., Nizeki. 1997. Anther (pollen) culture. pp. 691-705. *In* I.Matsuo, Y.Futsuhara, F.Kikuchi and H.Yamaguchi, eds. **Science of the Rice Plant, vol.3:Genetics**. Food and Agriculture Policy Research Center, Tokyo.

Huang, C.R., Y. Wu and C.C. Chen. 1986. Effect of plant growth substances on callus formation and plant regeneration, pp. 763-771. *In* **Proceeding of the Second International Rice Genetics Symposium**, May 14-18, 1990. The International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

Huang, N., E.R. Angles, J. Domingo, G. Magpantay, S. Singh, G. Zhang, K. Kumaravadiel, J. Bennett and G.S. Khush. 1997. Pyramiding of bacterial blight resistance gene in rice:marker-assisted selection using RFLP and PCR. **Theor. Appl. Genet**. 95: 313-320.

Huang, W.L. and L.F. Liu. 2002. Carbohydrate metabolism in rice during callus induction and shoot regeneration induced by osmotic stress. **Bot. Bull. Acad. Sin**. 43: 107-113.

Hussein, F.T. and M.A.A. Narsa. 1974. A chromatographic method of colchicine alkaloid. **Planta Medica** 25: 396-400.

IRRI. 1996. **Standard Evaluation System for Rice.** The International Rice Research Institute, Manila, Philippines. 44 p.

Iyer, R.D. and S.K. Raina. 1972. The early ontogeny of embryoids and callus from pollen and subsequent organogenesis in anther cultures of *Datura metal* and rice. **Planta** 104(2): 146-156.

Jain, R.K., M.R. Davey, E.C. Cocking and R. Wu. 1997. Carbohydrate and osmotic requirements for high-frequency plant regeneration from protoplast-derived colonies of indica and japonica rice varieties. **J. Exp. Bot**. 48: 751-758.

_____, S. Jain, M.R. Davey, E.C. Cocking and R. Wu. 1996a Effects of amino acids, carbohydrates and protopast cultures of indica and japonica rice varieties. pp. 519-524. *In* **Proceeding of the Third International Rice Genetics Symposium**, 16-20 October, 1996. The International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

_____, _____and R. Wu. 1996 b Stimulatory effect of water stress on plant regeneration in aromatic indica rice varieties. **Plant Cell Rep**.15: 449-454.

Joseph, M., S. Gopalakrisknan, R.K. Sharma, V.P. Singh, A.K. Singh, N.K. Singh and T. Mohapatra. 2004. Combining bacterial blight resistance and Basmati quality characteristics by phenotype and molecular marker-assisted selection in rice. **Mol. Breed**. 13: 377-387.

Kameswara, R., M. Lakshminarasu and K.K. Jena. 2002. DNA markers and marker-assisted breeding for durable resistance to bacterial blight disease in rice. **Biotechnol. Adv.** 20: 33-47.

Kauffman, H.E., A.P.K. Reddy, S.P.Y. Hsieh and S.D. Merca. 1973. An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. **Plant Dis. Rep**. 57: 537-541.

Kennard, W.C., K. Poetter, A. Dijkhuizen, V. Meglic, J. Staub and M. Havey. 1994. Linkages among RFLP , RAPD , isozymes , disease resistance and morphological marker in narrow and wide crosses of cucumber. **Theor. Appl. Genet**. 89: 42-48.

Khanna, H.K. and K. Raina. 1998. Genotype x culture medium interaction effects on regeneration response of three indica rice cultivars. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 52: 145-153.

Khush, G.S., J. Bennet, S.K. Datta, D.S. Brar and Z. Li. 2005. Advances in rice genetics and biotechnology. International Rice Commission Newsletter 48. Available source:http://www.fao.org/DOCREP/003/X2243T/X2243t04.htm. March3 , 2005.

_____and D.S. Brar. 2005. Biotechnology for rice breeding:progress and impact. Progress in rice genetics improvement for food security. Available Source http://www.fao.org/ DOCREP/006/Y4751E/Y4751E04htm. March3, 2005.

Kihupi, A.V., E.R. Angels and G.S. Khush. 2001. Genetic analysis of resistance to bacterial blight, *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, *Oryza sativa* L. **Euphytica** 117: 39-46.

Kim, H.S., T.L. Yong, T.S. Kim and S.Y. Lee. 1989. Effects of rice and potato extracts and activated charcoal on callus formation and plant regeneration in rice anther culture. **Res. Rep. Rur. Dev. Adm. Biotech.** 31(1): 1-5.

Kiviharju, E. and E. Peha. 1998. The effect of cold and heat pretreatments on anther culture response of *Avana sativa* and *A.Sterillis*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 54: 97-104.

Kwon, Y.S., K.M. Kim, M.Y. Eun and J.K. Sohn. 2002. QTL mapping and associated marker selection for the efficiency of green plant regeneration in anther culture of rice. **Plant Breed.** 121: 10-16.

Kwon, Y.S., M.Y. Eun and J.K. Sohn. 2001. Marker-assisted selection for identification of plant regeneration ability of seed-derived calli in rice (*Oryza sativa* L.). **Mol. Cell.** 12(1): 103-106.

Kuhlmann, V. and B. Foroughi-Wehr. 1989. Production of doubled haploid lines in frequencies sufficient for barley breeding programs. **Plant Cell Rep**. 8: 78-81.

Lande, R. and R. Thompson. 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. **Genetics** 124: 743-756.

Last, D.I. and R.I.S. Brettell. 1990. Embryo yield in wheat anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium. **Plant Cell Rep**. 9: 14-16.

Lee, S.Y., J.L. Cheong and T.S. Kim. 2003. Production of doubled haploids through anther culture of M1 rice plants derived from mutagenized fertilized egg cells. **Plant Cell Rep**. 22: 218-223.

_____, H.S. Kim and T.O. Kwon. 2004. Variation in anther culture response and fertility of backcrossed hybrids between indica and japonica rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 79: 25-30.

Lentini, Z., P. Reyes, C.P. Martinez and W.M. Roca. 1995. Androgenesis in highly recalcitrant rice genotype with maltose and silver nitrate. **Plant Sci**. 110: 127-138.

Lin, T.F. 1990. Influence of bacterial blight on the yield and quality of rice and the breeding of resistant lines. **Bull. of Taichung Dist. Agr. Impr. Sta.** 29: 29-38.

Lotfi, M., A.R. Alan, M.J. Henning, M.M. Jahn and E.D. Earle. 2003. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. **Plant Cell Rep**. 21: 1121-1128.

Lu, Z.X., K. Sossey-Alaoui, G.L. Reighard, W. V. Baird and A.G. Abbott. 1999. Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot nematode resistance and its application to peach rootstock breeding. **Theor. Appl. Genet.** 99: 115-122.

Lynch, P.T., R.P. Fich, M.R. Davey and E.C. Cocking. 1991. Rice tissue culture and its application, pp. 135-155. *In* G.S. Khush and G.H. Toenniessen, eds. **Rice Biotechnology**. IRRI, Philippines.

Mackill, D.J., Z. Zhang, E.D. Redona and P.M. Colowit. 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. **Genome** 39: 969-977.

Maheswaran, M., P.K. Subudhi, S. Nandi, J.C. Xu, A. Parco, D.C. Yang and N. Huang. 1997. Polymorphism, distribution, and segregation of AFLP markers in a doubled haploid rice population. **Theor. Appl. Genet**. 94: 39-45.

Mandal, N. and S. Gupta. 1997. Anther culture of an interspecific rice hybrid and selection of fine grain type with submergence tolerance. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 51:79-82.

Marassi, M.A. 2000. Petei and Mocoi: two rice cultivars developed through anther culture in Argentina. **IRRN** 25/1: 11-12.

_____, O.A. Bovo, G.L. Lavia and L.A. Mroginski. 1993. Regeneration of rice double haploids using a one–step culture procedure. **J. Plant Physiol.** 141: 610-614.

Mendoza, M.G. and H.F. Kaeppler. 2002. Auxin and sugar effects on callus induction and plantlet regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.).

In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 38: 39-45.

Mercy, C.T. and F.J. Zapata. 1986. Chromosomal behavior of anther culture derived plants of rice. **Plant Cell Rep**. 3: 215-218.

Miah, M.A.A., E.D. Earle and G.S. Khush. 1985. Inheritance of callus formation ability in culture of rice, *Oryza sativa* L.. **Theor. Appl. Genet**. 70(2): 113-116.

Mohan, M., S. Nair, A. Bhagwat, T.G. Krishna, M. Yano, C.R. Bhatia and T. Sasaki. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. Mol. Breed. 3: 78-103

Morais, L., A. Queiroz and W. Viegas. 1991. Differential effect of colchicine in genotypes with one more haploid set. **Cytologia** 56: 157-164.

Morgan, W.G. 1976. A technique for the production of polyploids in grasses. **Euphytica** 25: 443-446.

Mori, K. 1997. Tissue culture.pp.685-689. *In* I. Matsou,Y.Futsuhara, F.Kikuchi and H.Yamaguchi, eds. **Science of the Rice Plant, vol.3** : Genetics. Food and Agriculture Policy Research Center, Tokyo.

Morris, R. 1983. Remodeling crops chromosome. pp. 109-129. *In* D.R.Wood, ed. **Crop Breeding**. American Society of Agronomy and the Crop Science Society of America, Wisconsin, USA.

Mosojc, P. 2002. The application of molecular markers in the process of selection. **Cell. Mol. Biol. Lett.** 7: 499-509.

Narayanan, N.N., N. Baisakh, C.M. Vera Cruz, S.S. Gnanamanickam, K. Datta and S.K. Datta. Molecular breeding for the development of blast and bacterial blight resistance.

Crop Sci. 42: 2072-2079.

Nelson, R.J., E. Ardales, M. Baraoidan, I. Yap, M.L.C. George, D.H. Chen, M. Finckh, A. Bordeos, C.M. Vera Cruz, T. Adhikari, C.C. Mundt, M. Bustaman, W. Cruz, H. Leung, N. Huang, A. Yoshimura, S. McCouch, T.W. Mew and J.E. Leach. 1996. Exploring the application of molecular markers for improving resistance to bacterial blight. pp. 267-277. *In* **Proceeding of the Third International Rice Genetics Symposium,** Oct 16-20, 1995. The International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

Nizeki, H. 1997. Anther (pollen) culture. pp. 691-705. *In* I. Matsuo , Y. Futsuhara , F. Kikuchi and H.Yamaguchi , eds. **Science of the Rice Plant**, vol. 3 : Genetics. Food and Agriculture Policy Research Center, Toyko.

_____and K.Oono. 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. **Proc. Jpn. Acad.** 44: 554-557. *Cited* Y.S. Kwon, K.M.Kim, M.Y.Eun and J.K.Sohn. 2002. QTL mapping and associated marker selection for the efficiency of green plant regeneration in anther culture of rice. **Plant Breed.** 121: 10-16.

Ogawa, T. 2003. Improvement of cell culture conditions for rice. Available Source http://www.ss.jircas.affrc.go.jp/engpage/jarq/34-4/ogawa/ogawa.html, July 11,2003.

_____, R.E. Tabien, T. Yamamoto, G.A. Busto, Jr. and R. Ikeda. 1991. Breeding of near-isogenic lines for resistance to bacterial blight. pp. 742-748. *In* **Proceeding of the Second International Rice Genetics Symposium**, May 14-18, 1990. The International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

_____ and T. Yamamoto. 1987. Selection of recurrent parents to develop near isogenic lines resistant to bacterial leaf blight of rice. **JARQ** 21: 65-69.

Pande, H. and S.S. Bhojwani. 1999. Production of androgenesis in rice anther cultures by substitution of sucrose with maltose and mannitol. **Biol. Plant.** 42(1):125-128.

Pauquet, J., A. Bouquet, P. This and A.F. Adam-Blodon. 2001. Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene *Run1* in grapevine and assessment of their usefulness for marker-assisted selection. **Theor. Appl. Genet**. 103: 1201-1210.

Petpisit, V., G.S. Khush and H.E. Kauffman. 1977. Inheritance of resistance to bacterial blight in rice. **Crop Sci.** 17: 551-554.

Pha, N.T. and N.T. Lang. 2005. Marker assisted selection in rice breeding for bacterial leaf blight. Available Source:http://www.clrri.org/en/pub/omonrice12/12-3.html, March 29, 2005.

Poehlman, J.M. and D.A. Sleper. 1995. **Breeding Field Crops**. 4th edition. Iowa State University Press/Ames.

Powell, W. 1990. Environmental and genetical aspects of pollen embryogenesis. pp. 45-46. *In* Y.P.S. Bajaj, ed. **Biotechnology in Agriculture and Forestry** , vol.12:Haploids in Crops Improvement I. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.

Quimo, C.A. and F.J. Zapata. 1990. Diallel analysis of callus induction and green-plant regeneration in rice anther culture. **Crop Sci**. 30: 188-192.

Rahman, M.M., M.H. Khan and M. Nasiruddin. 1991. Kresek in mature rice plant. **IRRN** 16: 21-22.

Raina, S.K. 1997. Double haploid breeding in cereal. pp. 141-186. *In* J.Janick, ed. **Plant Breeding Review**, vol.15. John Wiley&Sons Inc. USA.

_____, M. Balachandran, S.S. Virmani and F.J. Zapata. 1989. Improved medium for efficient anther culture of some indica rice hybrid. **IRRN** 14(3): 4.

_____and S.T. Irfan, 1998. High-frequency embryogenesis and plantlet regeneration from isolated microspores in indica rice. **Plant Cell Rep**.17:957-962.

_____, P. Sathish and K.S. Sarrna. 1987. Plant regeneration from in vitro cultures of anther and mature seeds of rice (*Oryza sativa* L.) cv.Basmati-370. **Plant Cell Rep**. 6: 43-45.

Ramalingam, J., H.S. Basharat and G. Zhang. 2001. Polymorphism of DNA markers linked to bacterial blight resistance gene in useful rice germplasm. **IRRN** 26(2): 23-24.

Ramulu, K.S., H.A. Verhoeven and P. Dijkhuis. 1991. Mitotic blocking, micronucleation and chromosome doubling by oryzalin, aminoprophos-methyl, and colchicine in potato. **Protoplasma** 160(2-3): 65-71.

Rao, P.S. and P. Suprasanna. 1996. Methods to double haploid chromosome numbers. pp. 317-339. *In* S.M. Jain, S.K. Sopory and R.E Veilleux , eds. **In Vitro Haploid Production in Higher Plants**, vol.1. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Raquin, C. 1983. Utilization of different sugars of carbon sources for *in vitro* anther culture of *Petunia*. **Z. Pflanzen-Physiol**. 111: 453-457.

Redha, A., T. Attia, B. Buter, S. Saisingtong, P. Stamp and J.E. Schmid. 1998. Improved production of double haploids by colchicine application to wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. **Plant Cell Rep**. 17: 974-979.

Redona, E.D. and D.J. Mackill. 1996. Molecular mapping of regions controlling some reproductive and seed traits in rice using three types of DNA-based markers**. Philippine J. Crop Sci**. 21: 49.

Reiffers, I. and A.B. Freire. 1989. Production of double –haploid rice plant through anther culture. **IRRN** 14(3): 7

Rose, J.B., J. Hubba and K.R. Tobutt. 2000. Chromosome doubling in sterile *Syringa vulgaris* x *S. pinnatifolia* hybrids by *in vitro* culture of nodal explants. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 63: 127-132.

Rout, J.R. and N.P. Sarma. 1986. High frequency plantlet regeneration in rice anther callus culture. **Rice Genet. Newslt.** 3: 47.

Rout, J.R. and N.P. Sarma. 1991. Anther callus induction and green plant regeneration at high frequencies from interspecific rice hybrid *Oryza sativa* Linn. X *O. rufipogon* Grift.. **Euphytica** 54:155-159.

Roy,B. and A.B. Mandal. 2005. Anther culture response in indica rice and variations in major agronomic charaters among the androclones of a scented cultivar , Karnal local. **African J. Biotech.** 4(3): 235-240.

Saini, N., N. Jain, S. Jain and R.K. Jain. 2004. Assessment of genetic diversity within and among Basmati and non-Basmati rice varieties using AFLP, ISSR and SSR markers. **Euphytica** 140: 133-146.

Saisingtong, S., J.E. Schmid, P. Stamp and B. Buter. 1996. Colchicine –mediated chromosome doubling during anther culture of maize (*Zea mays* L.). **Theor. Appl. Genet**. 92(8): 1017-1023.

Sanchez, A.C., D.S. Brar, N. Huang, Z. Li and G.S. Khush. 2000. Sequence tagged site marker-assisted selection for three bacterial blight resistance gene in rice. **Crop Sci.** 40: 792-797.

Scott, P. and R.L. Lyne. 1994. The effect of different carbohydrate sources upon the initiation of embryogenesis from barley microspores. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 36: 129-133.

Scott, P., R.L. Lyne and T.A. Rees. 1995. Metabolism of maltose and sucrose by microspores isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.). **Planta** 197: 435-441.

Shahjahan, A.K.M., N.H. Karim, M.A. Nahar, M.Z. Hoque and S.M. Miah. 1992. Studies on the callus induction efficiency of rice (*Oryza sativa* L.) anther. **Bangladesh J. Bot.** 21: 239-246.

Shen, J.H., M.F. Li, Y.Q. Chen and Z.H. Zhang. 1982. Breeding by anther culture in rice varieties improvement. **Sci. Agricult. Sin**. 2: 15-19. *Cited* J. Yan, Q. Xue and J. Zhu. 1996. Genetics studies of anther culture ability in rice. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 45: 253-258.

Shen, L., B.Courtois, K.L. McNally, S. Robin and Z. Li. 2001. Evaluation of near-isogenic lines of rice introgressed with QTLs for root depth through marker-aided selection. **Theor. Appl. Genet**. 103: 75-83.

Shoeb, F., J.S. Yadav, S. Bajaj and M.V. Rajan. 2001. Polyamines as biomarkers for regeneration capacity : improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. **Plant Sci**. 160: 1229-1235.

Sidhu, G.S., M.R. Gagneja, G.L. Raina and R.K. Saini. 1986. Genetics of bacterial blight resistance in rice. pp. 481-489. *In* **Proceeding of International Rice Genetics Symposium,** May 27-31, 1985. The International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

Singh, S., J.S. Sidhu, N. Huang, Y. Vikal, Z. Li, D.S. Brar, H.S. Dhaliwal and G.S. Khush. 2001. Pyramiding three bacterial blight resistance gene (*xa5, xa13, xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. **Theor. Appl. Genet**. 102: 1011-1015.

Sopory, S.K. and M. Munshi. 1996. Anther culture. pp. 145-176. *In* S.M. Jain, S.K. Sopory and R.E. Veilleux, eds. **In Vitro Haploid Production in Higher Plants**, vol.1. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Staub, J.E., F.C. Serquen and M. Gupta. 1996. Genetics markers, map construction and their application in plant breeding. **Hortscience** 13(5): 729-741.

Sugimoto, K. and Y.Takeoka. 1998. Genetics analysis of plant regeneration ability in anther culture of rice (*Oryza sativa* L.) **Breed. Sci**. 48: 115-121.

Sun, Y., S.Q. Cheng and G.H. Liang. 1994. Induction of autotetraploids plant of *Sorghum versicolor.* **Cytologia** 59: 109-114.

Taira, T., Z.Z. Shao, H. Hamawaki and E.N. Larter. 1991. The effect of colchicine as a doubling agent for wheat-rye hybrids as influence by pH, method of application and post-treatment environment. **Plant Breed.** 106: 329-333.

Tapia, G.T., U.M. Amaya, G.S. Morales, A.D.J. Sanchez, B.M. Bofil, M.R. Monroy and A.J. Aparicio. 2002. The effect of cold-pretreatment , auxins and carbon source on anther culture of rice. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 71: 41-46.

Testillano, P., S. Georgiev, H.L. Morgnsen, M.J. Coronado, C. Dumas, M.C. Risueno and E. Matthys-Rochon. 2004. Spontaneous chromosome doubling results from nuclear fusion during *in vitro* maize induced microspore embryogenesis. **Chromosoma** 112: 342-349.

Tsay, H.S., L.J. Chen, T.H. Tseng and D.C. Lai. 1982. The culture of rice anther of japonica x indica cross, pp. 561-562. *In* **Proceeding of the Fifth International Congress Plant Tissue and Cell Culture**. Tokyo, Japan.

Von-Malek, V.B., W.E. Weber and T. Debener. 2000. Identification of molecular markers linked to *Rdr1*, a gene covering resistance to blackspot in roses. **Theor. Appl. Genet**. 101: 977- 983.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucl. Acids Res.** 23: 4407-4414.

Wang, C.C., C.S. Sun, C.C. Chu and S.C. Wu. 1978. Studies on the albino pollen plantlets of rice. pp. 149-160 *In* : H.Hu , ed. **Proceeding Symposium Plant Tissue Culture**. Science Press, Peking. *Cited* T.P. Croughan and Q.R. Chu. 1991. Rice (*Oryza sativa* L.) : Establishment of callus cultures and regeneration of plants. pp. 19-37. *In* Y.P.S. Bajaj , ed. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, vol.14 : Rice. Springer-Verlag Berlin , Heidelberg.

Wei, L.S. and X.Z. Hong. 1991. Anther culture for rice improvement in China. pp. 151-179. *In* Y.P.S. Bajaj, ed. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, vol.14. Springer-Verlag Berlin , Heidelberg.

Welz, H.G. and H.H. Geigerb. 2002. Principle of marker-assisted selection : I. Qualitative traits. Available Source http://nbpgr.delhi,nic.in/mmarker/s2_1Welze.htm, Jan 20, 2002.

Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingery. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acids Res.** 18: 6531-6535.

Wong, C.K. 1989. A new approach to chromosome doubling for haploid rice plants. **Theor. Appl. Genet.** 77(1) : 149-151.

Xie, J., M. Gao, Q. Cai, X. Cheng , Y. Shen and Z. Liang. 1995. Improved isolated microspore culture efficiency in medium with maltose and optimized growth regulator combination in japonica rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 42: 245-250.

Yadav, N.R., D.R. Shama and J.B. Chowdhury. 1991. Regeneration of plants from cultured anthers of salt tolerant CSR-1 rice. pp. 695-696. *In* **Proceeding of the Second**

International Rice Genetics Symposium, May 14-18, 1990. The International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

Yamagishi, M. 2002. Heterogeneous plastid genome in anther culture-derived albino rice plants. **Euphytica** 123: 67-74.

Yan, J., Q. Xue and J. Zhu. 1996. Genetic studies of anther ability in rice (*Oryza sativa*). **Plant Cell Tiss. Org. Cult**. 45: 253-258.

Yang, D., A. Sanchez, G.S. Khush, Y. Zhu and N. Huang. 1998. Construction of a BAC contig containing the *xa-5* locus in rice . **Theor. Appl. Genet.** 97: 1120-1124.

Yoshida, T. 1995. Relationship between callus size and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.) anther culture. **JARQ** 29 : 143-147.

Yoshimura, S., A. Yoshimura, N. Iwata. S.R. McCouch, M.L. Abenes, M.R. Baraoidan, T.W. Mew and R.J. Nelson. 1995. Tagging and combining bacterial blight resistance genes in rice using RAPD and RFLP marker. **Mol. Breed.** 1: 375-387.

Zapata, F.J., R.R. Aldemita, E.S. Ella and M.S. Cho. 1991a. Isolated microspore culture of rice at the International Rice Research Institute. pp. 311-319. *In* **Proceeding of the Second International Rice Genetics Symposium**, May 14-18 , 1990. The International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

_____, M.S. Alejar, L.B. Torrizo, A.U. Novero, V.P. Singh and D. Senadhira. 1991b. Field performance of anther-culture-derive lines from F1 crosses of indica rice under saline and nonsaline condition. **Theor. Appl. Genet.** 83: 6-11.

Zhang, C. and C. Qifeng. 1993. Genetic studies of rice (*Oryza sativa* L.) anther culture response. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 34: 177-182.

Zhang, S. 1995. Efficient plant regeneration from indica (groupI) rice protoplast of one advanced breeding line and three varieties. **Plant Cell Rep.** 15: 68-71.

Zhao, J., C. Zhou and H.Y. Yang. 1999. *In vitro* development of early proembryos and plant regeneration via microculture in *Oryza sativa* . **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 55: 167-174.

Zhou, H. 1996. Genetics of green plant regeneration from anther culture in cereals. pp. 169-187. *In* S.M. Jain, S.K. Sopory and R.E Veilleux , eds. ***In Vitro*** **Haploid Production in Higher Plants,** vol.2. Kluwer Academic Publishers , Netherlands.

Zhuo, L.S., H.M. Si , S.H. Cheng and Z.X. Sun. 1996. Phenylacetic acid stimulation of direct shoot formation in anther and somatic tissue culture of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Breed.** 115(6): 295-300.

Zhou, P.H., H.Z. Fan and J.J. Hu. 1983. Effect of DL-alanine on the efficiency on rice callus induction from rice pollens. pp. 81-87. *In* Y. Chen, ed. **Studies on Rice Breeding through Flower Culture**. Agri.Publ.House, Beijing.

Zhu, J., M.D. Gale, S. Quarrie, M.T. Jackson and M. Bryan. 1998. AFLP markers for the study of rice biodiversity. **Theor. Appl. Genet.** 96: 602-611.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งใกล้ชิดกับยีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง

ยีนต้านทาน	ชนิดของเครื่องหมาย	ชื่อเครื่องหมาย	ตำแหน่งบนโครโมโซม	ระยะห่างจากยีน (cM)
Xa1	RFLP	XNbp235	4	0.9
Xa3	RFLP	XNbp186	11	-
Xa4	RFLP	XNbp181	11	1.7
xa5	RFLP	RG556	5	-
	SSR	RZ390		0.4
		RM122		0.7
		RM390		0.4
xa13	RAPD	RG103	8	5.3
	RFLP	RG136		
		R2027		
Xa21	RFLP	RG103	11	1.2
	RAPD	RAPD248		
		OPAB09		
		OPAE03		

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kameswara *et al.* (2002)