

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



242963

การชักนำให้เกิดแคลลัสและเอ็มบริโอเจนซิสในข้าว พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

ดารุณี ศรีภูธร

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
(เกษตรศาสตร์)
สาขาวิชาพืชไร่

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
มีนาคม 2554



การชักนำให้เกิดแคลลัสและเอ็มบริโอเจเนซิสในข้าว พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

ดารุณี ศรีภูธร



วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัยเพื่อเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(เกษตรศาสตร์)
สาขาวิชาพืชไร่

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
มีนาคม 2554

การชักนำให้เกิดแคลลัสและเอ็มบริโอเจเนซิสในข้าว พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

คารุณี ศรีภูธร

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
สาขาวิชาพืชไร่

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
รองศาสตราจารย์ ประวิตร พุทธิยานนท์

.....กรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา เวียร์ศิลป์

.....กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สงวนศักดิ์ ธนาพรพูนพงษ์

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รองศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา เวียร์ศิลป์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สงวนศักดิ์ ธนาพรพูนพงษ์

23 มีนาคม 2554

© ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา เวียรศิลป์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ซึ่งกรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา และการตรวจแก้ไขจน วิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สงวนศักดิ์ ธนาพรพูนพงษ์ ที่กรุณาเป็น กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำและคำปรึกษาเป็นอย่างดีตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ประวิตร พุทธิานนท์ที่กรุณาเป็นประธาน กรรมการสอบวิทยานิพนธ์และให้คำแนะนำ ตรวจแก้ไขจนวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.แสงทิวา สุริยงค์ ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ เกี่ยวกับการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ การประมวลผลข้อมูล ตลอดจนการนำเสนอผลการทดลอง และคอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ปฏิบัติงานและศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการ อุดมศึกษา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณ คุณอดุลย์ ใจอินผล เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการเมล็ดพันธุ์ และเจ้าหน้าที่ ประจำสาขาวิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความร่วมมือและช่วยเหลือ ระหว่างปฏิบัติงาน ตลอดจนพี่ เพื่อน น้องสาขาวิชาพืชไร่ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือตลอดมา

ขอขอบพระคุณคุณพ่อทองมา-คุณแม่ประครอง พี่ๆ และเพื่อนผู้เป็นที่เคารพรัก ที่เห็นความสำคัญ ของการศึกษาให้โอกาสที่ดีในชีวิต ตลอดจนคอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้จนสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้ หากมีสิ่งขาดตกบกพร่องหรือผิดพลาดประการใด ผู้เขียนขออภัยเป็นอย่างสูงใน ข้อบกพร่องและความผิดพลาดนั้น และผู้เขียนหวังว่าวิทยานิพนธ์นี้คงมีประโยชน์บ้างไม่มากก็ น้อยสำหรับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง หรือผู้ที่สนใจศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว

คารุณี ศรีภูธร

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การชักนำให้เกิดแคลลัสและเอ็มบริโอเจนซิสในข้าว พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	
ผู้เขียน	นางสาวดารุณี ศรีภูธร	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) พืชไร่	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. สุชาดา เวียรศิลป์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ผศ. ดร. สงวนศักดิ์ ธนาพรพูนพงษ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

242963

การชักนำแคลลัสจากเมล็ดข้าว มักพบว่ามีแคลลัสเกิดน้อยและเนื้อเยื่อกลายเป็นสีน้ำตาล การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสโดยปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างของอาหารให้เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารสูตร LS (Linsmaier and Skoog) ที่ปรับให้มี pH แตกต่างกันจำนวน 9 ระดับ (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 5.8, 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5) ผลการทดลองพบว่า pH ระดับต่างๆ มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส น้ำหนักสดและเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสูตรอาหารที่มีระดับ pH 4.0-4.5 มีค่าความแข็งแรงของอาหารโดยใช้แรงกดน้อยที่สุด 0.088-0.359 นิวตัน มีผลต่อการเริ่มเกิดแคลลัสเพียง 15.7 และ 19.7% ตามลำดับ และมีค่าการนำไฟฟ้าสูงกว่าอาหารสูตรอื่น ส่วนอาหารที่มีระดับ pH 6.0 มีค่าความแข็งแรงของอาหารใช้แรงกด 11.183 นิวตัน สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 61.7% มีน้ำหนักสด 182.9 มิลลิกรัม และเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.58 มิลลิเมตร โดยแคลลัสที่ได้มีสีเหลืองปนขาวและมีลักษณะเกาะกันแบบหลวม

การชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอด้วยการกระตุ้นจากสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช ดำเนินการโดยนำแคลลัสที่ได้จากอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีระดับ pH 6.0 ซึ่งเป็น

242963

สภาพที่แคลลัสเจริญเติบโตได้ดีที่สุด มาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลวสูตร LS ที่มีการเติม 2,4-D และ NAA ในระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 2, 4, 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า ทุกระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช สามารถชักนำให้ embryogenic callus พัฒนารูปร่างต่อไปเป็นระยะ globular stage เท่านั้น โดยกรรมวิธีที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้แคลลัสพัฒนารูปร่างระยะ globular stage ได้มากถึง 49% และใช้ระยะเวลาในการพัฒนาเพียง 6 สัปดาห์ ซึ่งรวดเร็วกว่ากรรมวิธีที่เติม 2,4-D และ NAA ในระดับความเข้มข้นอื่นๆ

Thesis Title Induction of Callus Formation and Embryogenesis in Rice cv. KDML 105

Author Miss Darunee Sriputorn

Degree Master of Science (Agriculture) Agronomy

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Suchada Vearasilp

Advisor

Asst. Prof. Dr. Sa-nguansak Thanapornpoonpong

Co-advisor

ABSTRACT

242963

Low amount of calli and browning tissue always present during caulogenesis of rice induction. This in vitro study aimed to determine the optimal pH of a culture medium for increasing the amount of rice callus. The completely randomized design (CRD) was used. Mature seeds of indica rice var. Khao Dawk Mali 105 (KDML 105) were cultured in modified Linsmaier and Skoog (LS) medium with pH adjusted to nine different levels (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 5.8, 6.0, 6.5, 7.0 and 7.5). The results showed that different pH levels had significant effects on callus induction, fresh weight and callus diameter. The hardness of the medium having pH levels 4.0-4.5 were 0.088-0.359 N affecting callus initiation of which 15.7 and 19.7 percent were presented, respectively. Electrical conductivity of these media showed significantly higher value than the others. The hardness of the pH medium 6.0 was 11.183 N and increased callus induction (61.7%), fresh weight (182.9 mg) and callus diameter (6.58 mm). The yellow white and friable embryonic calli were found.

The induction and development of callus to somatic embryogenesis stimulated by plant growth regulator was conducted. The derived callus from best condition of the tissue culture medium at pH 6.0 was continuously culture in LS liquid medium which contained the different 4

242963

levels of 2,4-D and NAA 2, 4, 6 and 8 mg/l, respectively. The results showed that all concentrations of plant supplemental growth regulator were able to induce embryogenic callus and simultaneously developed to globular stage only. LS medium supplemented with 2.0 mg/l of 2,4-D treatment was the best to globular shape callus developed 49% within only 6 weeks which faster than other concentrations of 2,4-D and NAA.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	17
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	25
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	45
เอกสารอ้างอิง	46
ภาคผนวก	55
ประวัติผู้เขียน	60

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 การดูดซึมของไอออนและผลต่ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	7
2.2 การเปลี่ยนแปลงระดับ pH ของอาหารสูตร MS ที่เติมวุ้นและไม่เติมวุ้น	10
3.1 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร LS (1965)	19
3.2 ชนิดและปริมาณของสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร LS (1965)	20
3.3 ชนิดและปริมาณของสารละลายเข้มข้นของวิตามินและอินทรีย์สาร	20
4.1 ผลของระดับ pH ของอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสต่อการเกิดสีของแคลลัส หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน	28
4.2 ผลของระดับ pH ของอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยของเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน	31
4.3 ผลของระดับ pH ของอาหารเพาะเลี้ยงต่อน้ำหนักสดของแคลลัสจากเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน	33
4.4 ผลของระดับ pH ของอาหารต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัสหลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน	34
4.5 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ของอาหารเพาะเลี้ยงก่อนและหลังเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าว	37
4.6 ผลของระดับ pH ที่มีผลต่อความแข็งและค่าการนำไฟฟ้าของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	39
4.7 ผลของความเข้มข้นของ 2, 4-D และ NAA ต่อจำนวนระยะเวลาที่เกิดการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์และเปอร์เซ็นต์การพัฒนาของเซลล์แขวนลอย"	43

สารบัญภาพ

รูป		หน้า
4.1	ลักษณะการเกิดของแคลลัสบริเวณส่วนฐานของต้นกล้า หลังทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำแคลลัสเป็นเวลา 30 วัน	25
4.2	ลักษณะของแคลลัสหลังทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำแคลลัสเป็นเวลา 30 วัน แคลลัสที่มีลักษณะเกาะตัวกันแน่น (C = compact callus) และแคลลัสที่เกาะตัวกันหลวม (F = friable callus)	26
4.3	ลักษณะสีของแคลลัสหลังทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสเป็นเวลา 30 วัน มีทั้งหมด 6 สี คือ สีขาว (W = white) สีเหลือง (Y = yellow) สีเหลืองปนขาว (YW = yellow white) แคลลัสมีจุดสีเขียว (GS = green spot) สีน้ำตาล (B = brown) และ สีดำ (BL = black)	27
4.4	แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสหลังทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี pH แตกต่างกัน เป็นเวลา 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 วัน	30
4.5	แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ของอาหารเพาะเลี้ยงก่อนและหลังเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าว 1 = อาหารที่มี pH เริ่มต้น 5.8 2 = อาหารที่มี pH เริ่มต้น 4.0 3 = อาหารที่มี pH เริ่มต้น 4.5 4 = อาหารที่มี pH เริ่มต้น 5.0 5 = อาหารที่มี pH เริ่มต้น 5.5 6 = อาหารที่มี pH เริ่มต้น 6.0 7 = อาหารที่มี pH เริ่มต้น 6.5 8 = อาหารที่มี pH เริ่มต้น 7.0 9 = อาหารที่มี pH เริ่มต้น 7.5	36
4.6	การเปลี่ยนแปลงของอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนซิสขณะเพาะเลี้ยงและหลังการเพาะเลี้ยง	42