การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวพื้นเมืองไทย พันธุ์เหลืองประทิว 123 และขาวตาแห้ง 17 เพื่อรองรับการปรับปรุงพันธุ์ด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ

Tissue Culture of Leuang Pratew 123 and Khao Tah Haeng 17 Native Thai Indica Rices for Biotechnological Breeding

จารุวรรณ จาติเสถียร[1/] มิ่งขวัญ มิ่งเมือง[2/]

Jaruwan Chatisathian[1/] Mingkwan Mingmuang[2/]

สุรินทร์ ปิยะโชคญากุล[2/] สงกรานต์ จิตรากร[1/]

Surin Piyachokyakul[2/] Songkran Chitrakon[1/]

ABSTRACT

The two native biotechnological Thai Indica rices, Leuang Pratew 123 and Khao Tah Haeng 17 were cultured from mature seeds in vitro biotechnological breeding. Embryogrnic calli were induced by culture on modified R 2 medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D. The proliferation of these calli (0.07909 g/seed/3 weeks) was cultured on MS modified medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D, 1g/l casein hydrolysate and 1g/l L-proline. The maximum regeneration (28.53 plantlets/treatment) was dehydrated for 4 days, then transferred to the plant regeneration medium (MS basal medium supplemented with 1 mg/l kinetin, 0.5 mg/l NAA, 0.5 mg/l BA , 3 mg/l BA, 0.5 g/l casein hydrolysate and 1g/l L-proline). The young plantlets were grown on MS basal medium and more than 90% survival, they were transplanted in the soil.

Key words : Leuang Pratew 123, Khao Tah Haeng 17, tissue culture

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอจากเมล็ดข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และขาวตาแห้ง 1 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสในอาการสูตรดัดแปลง R 2 โดยเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 2 มล./ล. และ

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900

[2/] คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Faculty of Science, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900

แคลลัสสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีที่สุด (0.0909 กรัม/เมล็ด/3 สัปดาห์) ในอาหารสูตรดัดแปลง MS ซึ่งเติม 2,4-D 2 มก./ล. Casein hydrolysate 1 ก./ล.และ L-proline 1ก./ล. แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุด (2.53 ต้น/กรรมวิธี) จำเป็นต้องทำแคลลัสให้แห้ง 4 วันและเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS เติม casein hydrolysate 0.5 ก./ล. L-proline 1 ก./ล. และสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin 1 มล./ล. และ BA 3 มล./ล. ต้นอ่อนสามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหาร MS ธรรมดา และเมื่อนำออกปลูกในดินสามารถมีชีวิตรอดมากกว่า 90%

คำหลัก : เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

คำนำ

ข้าวเป็นธัญพืชชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของโลก ประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรต 20% และโปรตีน 13% ในทวีปเอเชียใช้ข้าวเป็นแหล่งอาหารถึง 90% ของการผลิตข้าวทั่วโลก (Juliano, 1985) มีการปลูกกันทั่วโลก มีจำนวนถึง 917,992,000 ไร่ ส่วนใหญ่ปลูกในแถบเอเชีย 816,774,000 ไร่ (นิรนาม, 2537) ดังนั้นการปฏิวัติเขียวจึงให้ความสำคัญกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวและการจัดการด้านเกษตรกรรม ข้าวพันธุ์ IR 8 เป็นข้าวที่ให้ผลผลิตสูง พันธุ์แรกจากสถาบันข้าวนานาชาติ (International Rice Research Institue, IRRI) ที่ได้รับอิทธิพลจากการปฏิวัติเขียว และในช่วงระหว่าง พ.ศ. 2503-2531 ได้มีการตื่นตัวในการใช้เทคนิคของการปฏิวัติเขียว เพื่อการเพิ่มผลผลิตข้าว (Swaminathan, 1989) ในขณะเดียวกันการพัฒนาพันธุ์ข้าวโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพได้เริ่มมีการศึกษาค้นคว้า และเป็นที่รู้จักกันในส่วนที่เรียกว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สำหรับพัฒนาพันธุ์ข้าวในช่วงแรกเป็นการศึกษาการพาะเลี้ยงอับละออง (anther culture) เพื่อพัฒนาสายพันธุ์แท้ (homozygous plant) สำหรับใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว (Zhang, 1989) ต่อมาการศึกษามีความซับซ้อนมากขึ้นเมื่อมีการศึกษาการแยกเซลล์ไร้ผนัง (protoplast) และการพัฒนา (regeneration) เป็นต้น มีรายงานการเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังข้าวและประสบผลสำเร็จมากกว่า 20 สายพันธุ์ส่วนใหญ่เป็นข้าวกลุ่ม Japonica ในแถบอบอุ่นใน เช่น สายพันธุ์ TN 1 และบางสายพันธุ์ในกลุ่ม Indica เช่น พันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ข้าวบาสมาติ (Basmati) เป็นต้น

ประเทศไทยเป็นแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จากพื้นที่ถือครองทางการเกษตรของประเทศทั้งหมด 132,479 ล้านไร่ เป็นพื้นที่ปลูกข้าวถึง 68,293 ล้านไร่ คิดเป็น 51.6% รวมผลผลิตข้าวทั้งปี ประมาณ 23 ล้านตัน จากผลผลิตข้าวที่ได้นี้ ใช้ประโยชน์ในประเทศถึง 13.39 ล้านตัน โดยส่วนใหญ่ประมาณ 10.3 ล้านตัน ใช้เพื่อการบริโภคของประชากรในประเทศ 0.9 ล้านตันใช้ทำพันธุ์ และ 2.189 ล้านตันใช้ในอุตสาหกรรมแปรรูป สำหรับส่วนที่เหลือจากการใช้ในประเทศประมาณ 10.093 ล้านตันข้าวเปลือกจะส่งเป็นสินค้าออกสู่ตลาดโลก ในปีพ.ศ. 2542 คิดเป็นมูลค่า 74,918 ล้านบาท (นิรนาม, 2544) ข้าวจึงมีความสำคัญต่อประเทศไทย มิใช่เฉพาะเพื่อการบริโภคหรือใช้ภายในประเทศเท่านั้น ยังมีส่วน

ช่วยในการนำเงินตรามูลค่ามหาศาลเข้าประเทศอีกด้วย ประเทศไทยจัดอยู่ในถิ่นกำเนิดของข้าว จึงมีความหลากหลายของแหล่งพันธุกรรม ดังนั้นข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย จึงเหมาะสำหรับการพัฒนาพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตข้าว และเป็นแหล่งอาหารของมนุษย์ต่อไปในอนาคต

เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว ซึ่งได้รับความสนใจไปทั่วโลก ตั้งแต่ช่วงเวลาของการปฏิวัติเขียว โดยกลุ่มนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นได้ประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2503 (ลาวัลย์, 2543) และมีการพัฒนาการเรื่อยมาจนถึงการชักนำให้เกิดโซมาติก เอ็มบริโอเจนิซีส (somatic embryo genesis) โดยศึกษาควบคู่ไปกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนัง ซึ่งส่วนใหญ่จะศึกษาจากข้าวในกลุ่ม "Japonica" และประสบผลสำเร็จเป็นอย่างมาก Jone และ Rost (1995) ได้รวบรวมการเกิดโซมาติก เอ็มบริโอเจนิซีส จากส่วนต่าง ๆ ของข้าว คือ เอ็มบริโอ เอ็มบริโออ่อน ราก ใบ ช่อดอกอับเรณู ไมโครสปอร์ และเซลล์ไร้ผนัง พร้อมทั้งสรุปสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดโซมาติก เอ็มบริโอเจนิซีส คือ สูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) LS (Linsmaier and Skoog, 1965) และ N 6 (Chu *et al.*, 1975) ซึ่งเป็นสูตรอาหารพื้นฐานที่นิยมใช้ในการชักนำและเพาะเลี้ยงโซมาติก เอ็มบริโอเจนิซีสของข้าว และเติม 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญที่ใช้ความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.3-3 มก./ล. เมื่อต้องการให้พัฒนาเป็นต้นจะไม่ใส่สารควบคุมการเจริญในสูตรอาหารพื้นฐาน และปริมาณสารควบคุมการเจริญขึ้นกับสายพันธุ์ข้าวเป็นส่วนใหญ่

แต่ในข้าวกลุ่ม "Indica" กระบวนการเกิดโซมาติก เอ็มบริโอเจนิซีส ยังมีปัญหาในการพัฒนาเป็นต้นอ่อนซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ข้าวเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นการที่จะพัฒนาพันธุ์ข้าวพื้นเมืองโดยเฉพาะพันธุ์ข้าวเหลืองประทิว 123 และข้าวตาแห้ง 17 ให้ทนทานต่อโรคและแมลง หรือพัฒนาให้มีคุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้น จำเป็นต้องศึกษาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นลำดับแรกก่อน เมื่อประสบผลสำเร็จแล้ว จึงศึกษาการพัฒนาพันธุ์ในลำดับต่อไป การศึกษาในครั้งนี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัย เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ให้ต้านทานต่อโรคไหม้ และไม่ไวต่อช่วงแสงโดยใช้เทคโนโลยีการถ่ายยีนรวม (co-transformation)

วัตถุประสงค์ เพื่อให้ได้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 พันธุ์ คือ ข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และขาวตาแห้ง 17 โดยผ่านกระบวนการเกิดโซมาติก เอ็มบริโอเจนิซีส สำหรับประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

กะเทาะเปลือกเมล็ดข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และขาวตาแห้ง 17 แล้วแช่ในแอลกอฮอล์ 70% นาน 1 นาที และฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาคลอล็อกซ์ 50% นาน 30 นาที ล้างน้ำกลั่นตามด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ทำการทดลองภายในตู้ถ่ายเชื้อ โดยนำมาเลี้ยงบนอาหาร R 2 และเก็บในที่มืด ภายในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 °ซ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และเลี้ยงเมล็ดที่ไม่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์บนอาหาร 3 สูตร คือ C, D และ F (รายละเอียดสูตรอาหาร) โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized block,

CRD ซ้ำ ๆ ละ 10 เมล็ด เลี้ยงในที่มืดต่อไปอีก 2 สัปดาห์ นำออกมาเก็บผล การเกิดแคลลัส โดยหาเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในแต่ละซ้ำ และวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IRRISTAT

ศึกษาการเพิ่มปริมาณแคลลัสโดยวางแผนการทดลองแบบ 2x3 factorial in CRD ทำ 7 ซ้ำ ประกอบด้วย ปัจจัยที่ 1 คือ ข้าว 2 พันธุ์ ได้แก่ เหลืองประทิว 123 และข้าวตาแห้ง 17 และปัจจัยที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ 3 สูตร ได้แก่ C, D และ F ดำเนินการทดลอง โดยกะเทาะเมล็ดข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 ฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 0% นาน 1 นาที และน้ำยาคลอล็อกซ์ 50 % นาน 30 นาที ล้างน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำมาเลี้ยงบนอาหาร R 2 ในที่มืดเช่นเดียวกับการชักนำให้เกิดแคลลัส เป็นเวลา 10 วัน ตั้งแต่เริ่มเพาะ นำเมล็ดที่มีแคลลัสเท่า ๆ กัน มาตัดเฉพาะแคลลัสออกและเลี้ยงบนอาหาร 3 สูตร คือ C, D และ F โดยใส่แคลลัสที่ตัดจากเมล็ด 10 เมล็ด/ซ้ำ เลี้ยงในที่มืดต่ออีก 3 สัปดาห์ ชั่งน้ำหนักแคลลัสในแต่ละเมล็ด แล้วหาค่าเฉลี่ยต่อเมล็ดในแต่ละซ้ำ นำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IRRISTAT

ศึกษาการชักนำให้เกิดต้น จากเมล็ดข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวตาแห้ง 17 มาชักนำให้เกิดแคลลัสและเพิ่มปริมาณ โดยวิธีดังกล่าวมาแล้วคือเลี้ยงบนอาหาร R 2 ในที่มืด เป็นเวลา 10 วัน ย้ายแคลลัสลงบนอาหาร F เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสเป็นเวลา 6 สัปดาห์ในที่มืด นำแคลลัสที่ได้ไปใช้ในการทดลองดังนี้

ก. ทำแคลลัสให้แห้ง ชั่งแคลลัสข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และขาวตาแห้ง 17 ให้มีปริมาณ 0.50-0.51 กรัม/ซ้ำ มาวางบนกระดาษกรอง 2 ชั้นในจานเลี้ยงแคลลัส เส้นผ่าศูนย์กลางยาว 9 ซม. นำแคลลัสไปไว้ในที่มีแสงประมาณ 1,500 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชม./วัน นาน 4 วัน ถ่ายแคลลัสจากกระดาษกรองไปเลี้ยงบนอาหารสูตร คือ M 1, M 2, M 3, M 4, M 5 และ M 6 โดยวางเป็น 10 จุดบนจานเลี้ยงแคลลัส นำแคลลัสไปเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25-30 °ซ ที่มีแสงประมาณ 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชม./วัน จำนวน 3 ซ้ำ บันทึกผลการทดลองเมื่อเลี้ยงแคลลัสนาน 5 สัปดาห์

ข. ไม่ทำแคลลัสให้แห้ง ชั่งแคลลัสข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และขาวตาแห้ง 17 ให้มีปริมาณ 0.50-0.51 กรัม/ซ้ำ เลี้ยงบนอาหาร 6 ชนิด คือ M 1, M 2, M 3, M 4, M 5 และ M 6 โดยวางเป็น 10 จุดบนจานเลี้ยงแคลลัสเส้นผ่าศูนย์กลางยาว 9 ซม. นำแคลลัสไปเลี้ยงในที่มีแสงประมาณ 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชม./วัน จำนวน 3 ซ้ำ บันทึกผลการทดลองหลังจากเลี้ยงแคลลัสนาน 3 สัปดาห์ และการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสนับจำนวนต้นในแต่ละซ้ำ นำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IRRISTAT การชักนำให้เกิดราก โดยการเลี้ยงต้นข้าวเหลืองประทิว 123 และขาวตาแห้ง 1 บนอาหาร MS ที่ไม่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต ต้นข้าวสามารถเกิดรากได้ในเวลา 4 สัปดาห์ และสามารถปลูกในสภาพธรรมชาติได้โดยใช้ดินจากนาข้าวและดินผสมที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อนานครึ่งชั่วโมงก่อนปลูก นำดินใส่แก้วพลาสติก และปักดำต้นข้าวลงในดิน แล้วเติมน้ำพอปริ่มดิน เมื่อต้นข้าวโตตั้งตัวได้ถ่ายใส่กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 ซม. ปลูกจนข้าวออกรวง การทดลองทั้งหมดใช้ห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพของกรมวิชาการเกษตร การทดลองครั้งนี้เริ่มตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2543 สิ้นสุดเดือนเมษายน พ.ศ. 2544

รายละเอียดสารเคมีของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตรต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง

(มก./ล.)

สารเคมี	ชื่อสูตรอาหาร									
	R 2	C	D	F	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6
KH_2PO_4	335	170	170	170	170	170	170	170	170	170
KNO_3	-	1,900	1,900	1,900	1,900	1,900	1,900	1,900	1 900	1900
NH_4NO_3	4,000	1,650	1,650	1,650	1,650	1,650	1,650	1,650	1 650	1650
$CaCl_2.2H_2O$	150	440	440	440	440	440	440	440	440	440
$MgSO_4.4H_2O$	250	370	370	370	370	370	370	370	370	370
FeNaEDTA	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$FeSO_4.7H_2O$	-	27.85	27.85	27.85	27.85	27.85	27.85	27.85	27.85	27.85
$NaEDTA.2H_2O$	-	37.25	37.25	37.25	37.25	37.25	37.25	37.25	37.25	37.25
$NaH_2PO_4.H_2O$	273	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$MnSO_4.4H_2O$	1.6	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3
H_3BO_3	3	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2
$ZnSo_4.H_2O$	2.2	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6
KI	-	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83
$CoCl_2.6H_2O$		0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
$CuSO_4.4H_2O$	125	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
$Na_2MoO_4.2H_2O$	125	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Thiamine HCl	5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Nicotinic acid	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Pyridoxine HCl	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Glycine	25.43	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Myo-inositol	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2,4-D	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-
Kinetin	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1
NAA	-	-	-	-	-	0.5	-	0.5	-	0.5
BA	-	-	-	-	-	3	-	3	-	3

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การชักนำให้เกิดแคลลัส

หลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าว 1 สัปดาห์ บนอาหาร R 2 เมล็ดข้าวยังไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง เมื่อย้ายเมล็ดข้าวใส่บนอาหารทั้ง 3 สูตรคือ C, D และ F เป็นเวลา 4 วัน พบแคลลัสพัฒนาขึ้นบนเมล็ดข้าว ลักษณะการเกิดแคลลัส จะเกิดในส่วนของปลอกหุ้มยอดอ่อนส่วนโคนติดกับราก (coleoptiles) (Figure 1a) เมื่อเลี้ยงต่อไปนาน 2 สัปดาห์ แคลลัสที่ถูกชักนำจะพัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส (embryogenic callus) ในข้าวทั้ง 2 พันธุ์ (Figure 1 y and w) เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของข้าวทั้ง 2 พันธุ์ เมื่อเลี้ยงบนอาหารทั้ง 3 สูตร คือ C, D และ F มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1) เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 (86.1%) ซึ่งสูงกว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในข้าวพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 (73.8%) เพียงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่า 2,4-D 2 มก./ล. มีส่วนสำคัญในการชักนำให้เกิดแคลลัสมากกว่า casein hydrolysate (500 มล./ล.) และ L-proline (500 มก./ล.) แต่เมื่อนำอาหารสูตร R 2 และ C เปรียบเทียบกันโดยเลี้ยงในระยะชักนำให้แคลลัสระยะเริ่มแรกของการเพาะเมล็ด เป็นเวลา 7-10 วัน ก่อนนำมาศึกษาการเพิ่มปริมาณพบว่า การใช้อาหาร R 2 จะชักนำแคลลัสได้เร็วกว่าและแคลลัสจะมากกว่า การใช้อาหาร C เล็กน้อย (ไม่แสดงข้อมูล) ซึ่งอาหารทั้ง 2 ชนิด มีปริมาณ 2,4-D 2 มก./ล. เท่ากัน ต่างกันที่ปริมาณสารเคมีที่ใช้เป็นธาตุอาหารหลักและอาหารรองเท่านั้น ซึ่งอาหาร R 2 เป็นอาหารสูตรดัดแปลงมาจากอาหาร N 6 (Jone and Rost, 1995) และนิยมใช้เป็นส่วนผสมในการเลี้ยง suspension cell ของข้าว (Datta *et al.*, 1997) ซึ่งการใช้ 2,4-D 2 มก./ล. ในการชักนำให้เกิดแคลลัสนั้นเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำเอ็มบริโอข้าวให้เกิดแคลลัสเช่นเดียวกับการศึกษาของ (Datta *et al.*, 1997 และ Sivamani *et al.*, 1996) จะใช้ความเข้มข้น 2,4-D มก./ล. ในการชักนำเอ็มบริโอข้าวอย่างเดียวกัน ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ใช้อาการ R 2 ในการชักนำข้าวทั้งสองพันธุ์ให้เกิดแคลลัสโดยใช้ 2,4-D 2 มล./ล. ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Datta และคณะ (1997)

Table 1. Percent of calli (Khao Tah Haeng 17 and Leuang Pratew 123) from total after 2 weeks culture on 3 different medias

Media	Percentage of 2 varieties rice calli [1/]	
	Khao Tah Haeng 17	Leuang Patew 123
C	75.7 a	6.3 a
D	74.3 a	88.0 a
F	71.4 a	94.3 a
Mean	73.8	86.1
F	Ns	Ns
CV (%)	18.7	19.5

[1/] Means followed by a common letter in the same column are not significantly different at the 5% level by DMRT

Ns = no significant

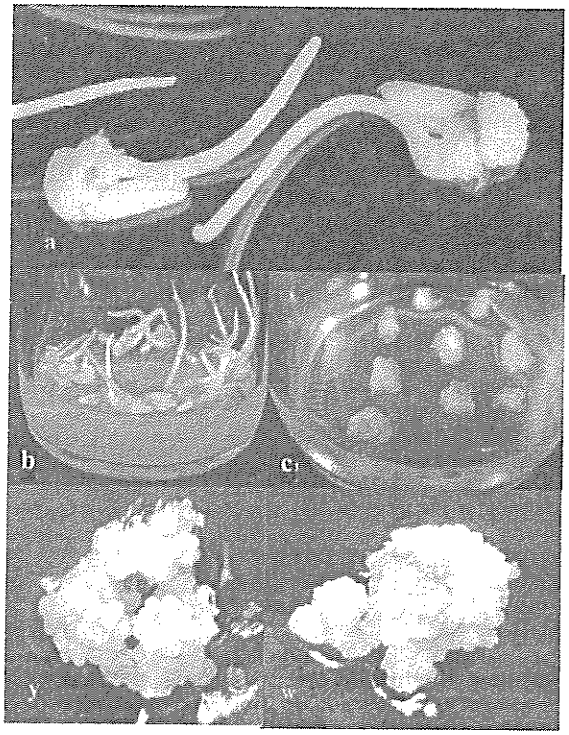

Figure 1. Calli were induced by 7-10 days culturing on R 2 medium, (a, b). Calli were cut and cultured on proliferation media (c) and after 3 weeks of culturing on F media, developing of embryogenic call : Leuang Pratew 123 (y) and Khao Tah Haeng 17 (w) were obtained

2. การเพิ่มปริมาณแคลลัส

เมื่อเลี้ยงแคลลัสข้าวในอาหารทั้ง 3 สูตร นาน 3 สัปดาห์ เมล็ดข้าวจะพัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิกแคลลัส และเกิดในข้าวทั้ง 2 พันธุ์ (Figure 1y และ w) เมื่อนำแคลลัส มาชั่งน้ำหนักสดและนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าแคลลัสของข้าวทั้ง 2 พันธุ์ ไม่มีปฏิสัมพันธ์กันจึงพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของทั้ง 2 พันธุ์ พบว่า แคลลัสสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีที่สุดบนอาหารสูตร F ซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุดถึง 0.0709 ก./เมล็ด และแตกต่างไม่ชัดเจนจากน้ำหนักสดของแคลลัสข้าวบนอาหารสูตร D ที่มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.0621 ก./เมล็ด แต่จะแตกต่างจากน้ำหนักสดของแคลลัสข้าวบนอาหารสูตร C ที่มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.0587 กรัม/เมล็ดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 2) ดังนั้นอาหารสูตร F สามารถเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนนิกแคลลัสได้ดีที่สุด แสดงให้เห็นว่า casein hydrolysate และ L-proline มีความสำคัญต่อการพัฒนาของเอ็มบริโอเจนนิกแคลลัส และสอดคล้องกับการทดลองของลาวัลย์ (2543) ซึ่งศึกษาในข้าวขาวดอกมะลิ 105 แต่การทดลองของลาวัลย์ใส่น้ำมะพร้าว 15% ส่วนการทดลองในครั้งนี้ได้ตัดน้ำมะพร้าวออกจากการทดลองด้วยเหตุผล 2 ประการ คือประการแรก น้ำมะพร้าวแต่ละลูกไม่มีมาตรฐานของสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบ ประการที่สองได้ทำการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหาร F ที่ใส่น้ำมะพร้าวและไม่ใส่ พบว่าการเกิดเอ็มบริโอเจนิก แคลลัสไม่ต่างกัน (ไม่ได้แสดงข้อมูล) สรุปอาหารสูตร F และ D เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสในที่มืดในข้าวทั้ง 2 พันธุ์ คือพันธุ์ขาวตาแห้ง 1 และเหลืองประทิว 123

3. การชักนำให้เกิดต้น

3.1 อิทธิพลการทำให้แคลลัสแห้ง

หลังจากทำให้แคลลัสแห้งในที่มีแสงประมาณ 1,500 ลักซ์ นาน 4 วัน แคลลัสมีลักษณะแห้งและร่วนแต่เมื่อย้ายลงบนอาหาร 6 ชนิด คือ M 1, M 2, M 3, M 4 ,M 5 และ M 6 และเลี้ยงในที่มีแสงประมาณ 1,500 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชม./วัน พบว่าแคลลัส ที่ทำให้แห้งส่วนใหญ่จะพัฒนาเป็นตุ่มสีเขียวและพัฒนาต่อเป็นต้นในระยะเวลา 3 สัปดาห์สามารถบันทึกผลได้ 3 ลักษณะคือ พัฒนาเป็นต้นอ่อน พัฒนาเป็นตุ่มเขียว และพัฒนาเป็นราก (Table 3) ซึ่งการพัฒนาเป็นรากมีทั้งรากที่เกิดจากต้น และรากที่เกิดจากแคลลัสอย่างเดียว (Figure 3) การพัฒนาเหล่านี้เกิดขึ้นเฉพาะแคลลัสที่ทำให้แห้งเท่านั้น และเกิดในอาหารทุกสูตรส่วนแคลลัสที่ไม่ได้ทำให้แห้งไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นหรือเกิดสีเขียวในทุกอาหารที่ทดลอง (Figure 2) แสดงว่าการทำแคลลัสให้แห้งมีความสำคัญต่อการพัฒนาเป็นต้นอ่อนมากกว่าชนิดของอาหาร ปัจจัยที่สำคัญต่อการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจนิซีส คือทำให้พืชเกิดความเครียดเนื่องจากการขาดน้ำจะมีผลต่อโปรตีนรีเซพเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งเซลล์ มีผลต่อการเกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งทำการทดลองในแครอทพิสูจน์ได้ว่าถ้านำเอ็มบริโอเจนนิก แคลลัสมาทำให้แห้ง 16-18 ชม. พบว่าปริมาณ globular embryo มีมากกว่าแคลลัสที่ไม่ได้ทำให้แห้ง ดังนั้นการทำแคลลัสให้แห้งในข้าวอาจเป็นปัจจัยที่สำคัญปัจจัยแรกที่กระตุ้นให้แคลลัสข้าวพัฒนาเป็นเอ็มบริโอต่อไป

3.2 อิทธิพลของอาหารต่อการชักนำให้เกิดต้น

นำแคลลัสมาทำให้แห้ง 4 วัน และเลี้ยง

บนอาหารสูตรต่าง ๆ หลังจากเลี้ยงแคลลัส 3 สัปดาห์ แคลลัสจะพัฒนาเป็นต้นในบางส่วนจะพัฒนาเป็นตุ่มสีเขียว จากการสังเกต พบว่าแคลลัสบางจุดเท่านั้นที่พัฒนาและแคลลัสที่พัฒนาจะตอบสนองต่ออาหารต่างกัน ซึ่งไม่สามารถสังเกตความแตกต่างของแคลลัสที่ตอบสนอง และไม่ตอบสนองต่อการทำให้แคลลัสแห้งได้ แต่หลังจากการทำให้แห้งแล้วแคลลัสส่วนใหญ่แห้ง เมื่อเลี้ยงบนอาหารแคลลัสส่วนใหญ่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลมีบางจุดจะพัฒนาไปเป็นตุ่มสีเขียวและเจริญต่อไปเป็นต้นหลังจากเลี้ยงได้ 5 สัปดาห์ (Figure 3) แคลลัสที่สามารถพัฒนาจะเจริญเป็นต้นสามารถนับจำนวนซึ่งไม่พบค่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์กับชนิดอาหาร (Table 4) จึงพิจารณาที่ค่าเฉลี่ยของสองพันธุ์ พบว่า อาหารสูตร M 4 สามารถให้จำนวนต้นรองลงมาคือ 21.68, 11.05, 6.23 และ 8.18 ต้น/กรรมวิธี ตามลำดับ สูตรอาหาร M 1 ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนต้นน้อยที่สุดคือ 4.68 ต้น/กรรมวิธี ซึ่งแตกต่างจากจำนวนต้นบนอาหารสูตร M 4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามเมื่อนำมา สูตรอาหาร M 4 สามารถชักนำให้เกิดต้นดีที่สุด

Table 2. Fresh weight (g/seed) of Khao Tah Haeng 17 and Leuang Pratew 123 calli after 3 weeks cultuered on 3 kind of medias C, D, F

	Fresh weight of rice calli (g/seed)		
Media	**Khao Tah Haeng 17**	**Leuang Pratew 123**	**Mean**[1/]
C	0.0621	0.0552	0.0587 b
D	0.0638	0.0603	0.0621 ab
F	0.048	0.067	0.0709 a
Mean	0.0669 a	0.0609 a	0.0639
CV = 23.2%			

[1/] Means followed by a common letter in the same column and row are not significantly different at the 5 % level by DMRT

Table 3. Number of plantlets, embryoids and roots that were developed from dehydrated and normal embryogenic calli after 3 weeks culturing on 6 kinds of different medias, M 1, M 2, M 3, M 4, M 5, M 6 under 16 hrs/day light

Condition	Media	Number of one characteristic developing calli					
		Khao Tah Haeng 17			Leuang Pratew 123		
		Plantlets	Embryoid	Root	Plantlets	Embryoid	Roots
Dehydrated calli	M 1	6	10	10	4	13	9
	M 2	20	8	1	0	2	0
	M 3	20	12	9	3	8	4
	M 4	5	9	0	6	8	1
	M 5	-	2	-	-	5	1
	M 6	3	9	0	8	5	1
Normal calli	M 1	0	0	0	0	0	0
	M 2	0	0	0	0	0	0
	M 3	0	0	0	0	0	0
	M 4	0	0	0	0	0	0
	M 5	0	0	0	0	0	0
	M 6	0	0	0	0	0	0

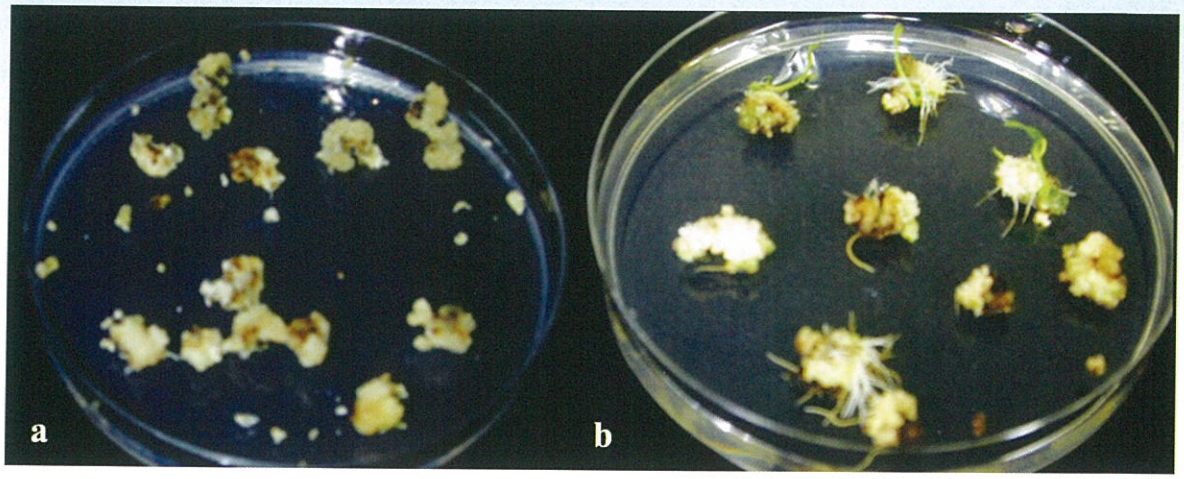

Figure 2. Different conditions for regeneration to plantlet, normal calli were not regenerated to plantlets (a) but 4 days dehydrated calli were regenerated to plantlets (b) after being cultured for 4 weeks

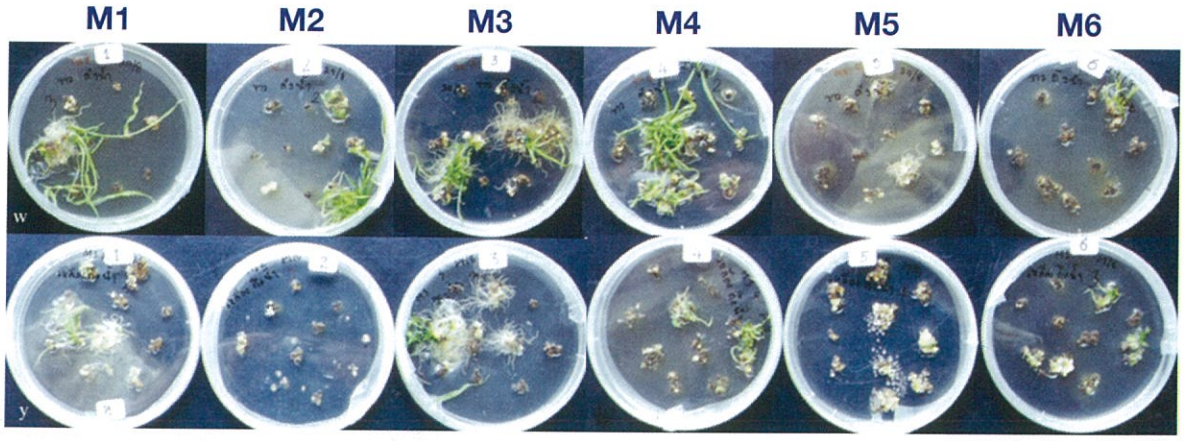

Figure 3. Plantlets regeneration after 5 weeks cultured of 4 days dehydrated embryogenic calli on 6 different kinds of media, M 1, M 2, M 3, M 5 and M 6 (w), show different responsive to each media

การชักนำให้เกิดราก หลังจากถ่ายต้นข้าวทั้งที่เกิดรากและไม่เกิดรากลงในอาหาร MS ไม่เติมสารเร่งการเจริญ ต้นข้าวทั้งสองพันธุ์สามารถพัฒนารากได้ดี (Figure 4) เมื่อนำออกปลูกในโรงเรือน ต้นข้าวสามารถปรับตัวเข้าสู่สภาพแวดล้อมภายนอกได้ดีและรวดเร็วมีชีวิตรอดมากกว่า 90% และสามารถเจริญเติบโตจนออกรวงได้ (Figure 5)

Table 4. Number of Khao Tah Haeng 17 and Leaung Pretew 123 plantlets regeneration after 5 weeks of culture on 6 kinds of media, M 1, M 2, M 3, M 4, M 5 and M 6 under 1 hrs/day light

	Number of plants/replication	
Media	**Khao Tah Haeng 17**	**Leuang Pratew 123**
M 1	6.8 b	0.0 a[1/]
M 2	9.3 ab	6.0 a
M 3	7.1 b	5. a
M 4	39.0 a	12.7 a
M 5	4.5 b	1.7 a
M 6	4.3 b	1.7 a
Mean	11.8	5.5
CV %	184.40	

[1/] Means followed by common letter in the same column are not significantly different at the 5% level by DMRT

Figure 4. Root were induced by transferring of rice shoots to root induction media (left) : above picture was Khao Tah Haeng 17 rice plantlets and below picture was Leuang Pratew 123 rice plantlet

Figure 5. Plantlets were transferred to greenhouse with higer than 90% viability Khao Tah Haeng 17 plantlet. (a) Khao Tah Haeng 17 plantlets had grown to mature plants (b) as well as Leuang Pratew 123 (c)

สรุปผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว พันธุ์เหลืองประทิว 123 และข้าวตาแห้ง 17 มีขั้นตอนดังนี้

1. การชักนำให้เกิดแคลลัส โดยเพาะเมล็ดข้าวที่สะอาดบนอาหาร R 2 เป็นเวลา 10 วัน จะเกิดแคลลัสขึ้นบริเวณโคนปลอกหุ้มใบอ่อน ตัดเฉพาะส่วนแคลลัสไปเพิ่มปริมาณ

2. การเพิ่มปริมาณแคลลัส โดยเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร D หรือ F แคลลัสจะพัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิกแคลลัส และเพิ่มปริมาณตามต้องการ

3. การชักนำให้เกิดต้นอ่อน โดยนำแคลลัสไปทำให้แห้ง 4 วัน เพื่อกระตุ้นระยะแรกก่อนจึงนำไปเลี้ยงบนอาหาร M 4 เพื่อชักนำให้เกิดต้นประมาณ 3-4 สัปดาห์ แคลลัสจะพัฒนาเป็นต้นอ่อน

เมื่อต้องการเร่งราก นำต้นไปเลี้ยงบนอาหาร โดยไม่ใส่สารควบคุมการเจริญ ต้นจะพัฒนารากจนแข็งแรงพร้อมปลูกในโรงเรือนได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยข้าวที่ให้ความอนุเคราะห์พันธุ์ข้าว ในการศึกษาครั้งนี้ และขอขอบคุณพุฒนา รุ่งระวี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์สถิติ

เอกสารอ้างอิง

นิรนาม. 2537. มูลค่าสินค้าส่งออกภาคเกษตรกรรมและสินค้าออกทั้งหมดของประเทศ พ.ศ. 2532-2536. สถิติการเกษตรของไทยปีเพาะปลูก 2536/2537. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 309 หน้า.

นิรนาม. 2544. ผลงานประจำปี 2543 : เอกสารประกอบการประชุมวิชาการประจำปี 2544 เล่ม 1. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. หน้า.

ลาวัลย์ ชัยวิรัตน์นุกุล. 2543. การถ่ายฝากยีน chymotrypsin Inhibitor จากถั่วพูเข้าไปในข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 65 หน้า.

Chu, C., C.Wang, C.S.Sun, C. Hau. 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. *Scientia Sinic.* 18 : 659-668.

Datta, S.K., L.B.Torrizo, J. Tu, N.P.Oliva and K. Datta. 1997. Production and Molecular Evaluation of Transgenic Rice Plants. IRRI, Philippines. 41 p.

Jones. T. T. and T. L. Rost. 1995. Somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* L.). Pages 14-23. *In* : Y.P.S.Bajaj, (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry 31 : Sopmatic Embryogenesis and Synthetic Seed II. Springer-Varlag Berlin Heidelberg.

Juliano, B.O. 195. Rice. *J. Plant Foods* 6 : 129-145.

Linsmaier, E.M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18 : 100-127.

Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.

Sivamani, E., P. Shen, N. Opalka, R. N. Beachy and C. M. Fauquet. 1996. Selection of large quantities of embryogenic calli from indica rice seeds for production of fertile transgnic plants using the biolistic method. *Plant Cell Reports.* 15 : 322-327.

Swaminathan. 1989. Gene Manipulation in Crops Scientific, Social, Economic and Ethical Implications. Pages 1-8. *In* : Review of Advances in Plants Biotechnology, 1985-1988. Mujeeb Kazial L.A. Sitch (eds.) International Maize and Wheat Improvement Centre, International Rive Research Institute, Manila, Philippines.

Zhang, Z.H. 1989. The Practicability of Anther Cultre Breeding in Rice. Pages 31-42. *In* : Review of Advance in Plants Biotechnology, 1985-1988. Mujeeb Kazial L.A. Sitch (eds.) International Maize and Wheat Improvement, International Rice Research Institute, Manila, Philippines.