ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 28:27-37 (2537)

การพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสที่เจริญมาจากคัพภะของข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

Plant Regeneration from Embryo Derived Callus of Aromatic Rice (*Oryza sativa* L.) Variety Khao Dawk Mali 105

ประภา ศรีพิจิตต์[1] และพรทิพย์ ชีวะเศรษฐธรรม

Prapa Sripichitt and Porntip Cheewasestatham

ABSTRACT

Effects of growth regulators, organic substances and some factors on callus induction and plant regeneration from embryos of aromatic rice (*Oryza sativa* L.) variety Khao Dawk Mali 105 were studied. It was found that embryos cultured on Murashige and Skoog (MS) agar medium supplemented with 2 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 300 mg/l casein hydrolysate under light condition produced the high percentage of callus formation (96.3%). The average size of callus produced was largest (9.4 mm). The calli dehydrated by placing in petridishes with covers for 7 days before transferring to regenerating medium produced higher frequency of shoot regeneration than calli cultured on regenerating medium without dehydration. There were 2 kinds of the suitable media for plant regeneration. One medium was MS agar medium supplemented with 1 mgl indoleacetic acid (IAA) and 4 mg/l benzyladenine (BA) which induced the highest percentage of calli forming shoots (45.8%) and each callus produced shoots average 7.9 shoots. Another medium was MS agar medium supplemented with 1 mg/l IAA, 4 mg/l BA and 1 g/l yeast extract which induced the high percentage of calli forming shoots (45.5%) and each callus produced the highest number of shoots (average 8.7 shoots).

Key words : aromatic rice, regeneration, embryo culture, callus

บทคัดย่อ

ในการศึกษาถึงผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต สารอินทรีย์และปัจจัยบางอย่างที่มีผลต่อการชักนำให้คัพภะข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สร้างแคลลัสและพัฒนาไปเป็นต้น พบว่าคัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร Murashige และ Skoog (MS) ที่เติม 2,4-dichlorophenoxyacetic acid 2 มก./ล. ร่วมกับ casein hybrolysate 300 มก./ล. ในสภาพที่มีแสง สามารถสร้างแคลลัสได้ในอัตราที่สูง (96.3%) และแคลลัสมีขนาดเฉลี่ยใหญ่ที่สุด (9.4 มม.) แคลลัสเมื่อถูกทำให้แห้งโดยการพักไว้ในจานแก้วที่มีฝา

1 ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dept. of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

ปิดเป็นเวลา 7 วัน จึงย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น พบว่าแคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ในอัตราที่สูงกว่าแคลลัสที่ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นโดยทันทีโดยไม่ได้ทำให้แคลลัสแห้งก่อน สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นมี 2 สูตร คือ อาหารสูตร MS ที่เติม indoleacetic acid (IAA) 1 มก./ล. และ benzyladenine (BA) 4 มก./ล. ซึ่งสามารถชักนำให้ได้จำนวนแคลลัสที่พัฒนาไปเป็นยอดสูงสุด (45.8%) และแต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลี่ย 7.9 ยอด และสูตรอาหาร MS ที่เติม IAA 1 มก./ล., BA 4 มก./ล. และ yeast extract 1 ก./ล. ซึ่งสามารถชักนำให้ได้จำนวนแคลลัสที่พัฒนาไปเป็นยอด 45.5% และแต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด (8.7 ยอด)

คำนำ

ข้าวเป็นพืชหนึ่งที่ได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ เช่น การเพาะเลี้ยงคัพภะ อับละอองเกสร เซลล์แขวนลอย และโปรโตพลาสต์ มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์อย่างกว้างขวาง เช่น การสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรม (Sun *et al.*,1983) การคัดเลือก (Wakasa and Widholm, 1987) การสร้างพืชสายพันธุ์แท้ (Hu *et al.*, 1978) การผลิตลูกผสมระหว่างพืชต่างชนิดหรือสกุลกันโดยการรวมตัวกันของโปรโตพลาสต์ (Kyozuka *et al.*, 1989) และการถ่ายทอดยีนหรือดีเอนเอที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการให้กับเซลล์ข้าวโดยตรง (Peng *et al.*, 1990) เป็นต้น

เนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ที่มีชีวิตของต้นข้าว เช่น ราก (Abe and Futsuhara, 1984), ลำต้น (Wu and Li, 1971) ใบ (Henke *et al.*, 1978), ช่อดอกอ่อน (Ling *et al.*, 1983) อับละอองเกสร (Oono, 1978) คัพภะ (Nishi *et al.*,1973) และเมล็ด (Raina *et al.*, 1987) สามารถนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราห์ในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อชักนำให้เนื้อเยื่อสร้างแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นได้ แต่เมล็ดหรือคัพภะเป็นส่วนของเนื้อเยื่อที่นิยมใช้เพาะเลี้ยงมากที่สุด (Raina, 1989) เพราะเมล็ดทนทานต่อการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวได้ดี ง่ายและสะดวกต่อการเพาะเลี้ยง สามารถชักนำให้คัพภะเจริญเป็นแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นได้ในอัตราที่สูง และอัตราการเกิดต้นเผือก (albino) ต่ำ (Ogewa *et al.*, 1982)

ในการเพาะเลี้ยงคัพภะข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ประภา (2532) ประสพความสำเร็จในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากคัพภะโดยตรงซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA 25 มก./ล. วิชัยและคณะ (2527) สามารถชักนำให้คัพภะเจริญเป็นแคลลัสที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 4 มก./ล. และแคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ในอาหารสูตร MS ที่มีน้ำมะพร้าว 20% หรือที่มี naphthaleneacetic acid (NAA) 1 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 4 มก./ล. อย่างไรก็ตามรายงานดังกล่าวมิได้ประเมินค่าอัตราการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัส Vajarabhaya *et al.* (1986) พบว่าแคลลัสที่เจริญมาจากคัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล. กับ kinetin 0.3 มก./ล. เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลงของ White และเติม IAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ kinetin 0.4 มก./ล. แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ถึง 17%

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะค้นหาและปรับปรุงสูตรอาหารตลอดจนปัจจัยบางอย่างที่เหมาะสมต่อการชักนำให้คัพภะของข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สร้างแคลลัสและพัฒนาไปเป็นต้นในอัตราที่สูง ทั้งนี้เพื่อพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงคัพภะให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น สำหรับใช้เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ให้มีลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสง ต้นเตี้ย และให้ผลผลิตสูงต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การชักนำให้คัพภะสร้างแคลลัส

นำเมล็ดข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่แกะเปลือกออกแล้วมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยเอทธานอล 70% นาน 2 นาที แล้วแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ (chlorox) 10% นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 4 ครั้ง นำเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร Murashige and Skoog (1962) (MS) ที่เติม 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มก./ล. น้ำตาล 3% และวุ้น 0.7% เพื่อชักนำให้คัพภะสร้างแคลลัส (callus) เก็บรักษาขวดเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวไว้ในสภาพมืดอุณหภูมิ 25 ± 2°ซ หรือในสภาพที่มีแสง 2,000 ลักซ์ ให้ได้รับแสง 16 ชม./วัน อุณหภูมิ 25 ± 2°ซ เลี้ยงเป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ นับจำนวนคัพภะที่สร้างแคลลัส และวัดขนาดของแคลลัสที่เกิดขึ้นในแต่ละคัพภะ

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำให้คัพภะสร้างแคลลัสในอัตราและปริมาณที่สูง จึงนำเมล็ดข้าวหอมที่แกะเปลือกออกและฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 2 มก./ล. (จากผลการทดลองข้างต้น) แล้วเติม kinetin 0.3 และ 0.5 มก./ล., tryptophan 50 และ 100 มก./ล. casein hydrolysate 300 และ 500 มก./ล. หรือน้ำมะพร้าว (coconut water) 10 และ 15% น้ำตาล 3% และวุ้น 0.7% นำขวดเพาะเลี้ยงเมล็ดไปเก็บรักษาไว้ในสภาพที่มีแสง 2,000 ลักซ์ ให้ได้รับแสง 16 ชม./วัน อุณหภูมิ 25 ± 2°ซ (จากผลการทดลองข้างต้น) เลี้ยงเป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ นับจำนวนคัพภะที่สร้างแคลลัส และวัดขนาดของแคลลัส

การทำให้แคลลัสแห้ง

นำเมล็ดข้าวหอมมาเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการชักนำให้คัพภะสร้างแคลลัสในอัตราสูงสุด เมื่อได้แคลลัสแล้วแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นทันที กลุ่มที่ 2 ย้ายแคลลัสไปพักไว้ในจากแก้ว (petridish) ที่มีฝาปิด วางไว้ในสภาพที่มีแสง 2,000 ลักซ์ ให้ได้รับแสง 16 ชม./วัน อุณหภูมิ 25 ± 2°ซ เป็นเวลานาน 1 สัปดาห์ เพื่อทำให้แคลลัสแห้ง (dehydration) แล้วจึงย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น

การชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น

นำแคลลัสในกลุ่มที่ 1 และ 2 ซึ่งแบ่งเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 มม. มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม indoleacetic acid (IAA) ความเข้มข้น 1 มก./ล. และ kinetin (K) หรือ benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 มก./ล. น้ำตาล 3% และวุ้น 0.7% เพื่อชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น เก็บรักษาขวดเพาะเลี้ยงแคลลัสไว้ในสภาพที่มีแสง 2,000 ลักซ์ ให้ได้รับแสง 16 ชม./วัน อุณหภูมิ 25 ± 2°ซ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ นับจำนวนแคลลัสที่พัฒนาไปเป็นยอด รากและจุดสีเขียว และนับจำนวนยอดที่เกิดขึ้นในแต่ละแคลลัส

ผล

การชักนำให้คัพภะสร้างแคลลัส

เมล็ดข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) คัพภะไม่สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ แต่จะงอกเป็นต้นอ่อนภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดไปนาน 2 วัน และต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตขึ้นเรื่อยๆ ส่วนเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1, 2, 3 , 4 และ 5 มก./ล. คัพภะจะงอกให้ยอดอ่อนภายหลังการเพาะเลี้ยงไปนาน 3 - 4 วัน ในขณะเดียวกันจะสังเกตุเห็นแคลลัสเริ่มเกิดขึ้นตรงบริเวณคัพภะใกล้กับส่วนโคนของยอดอ่อน ต่อมาแคลลัสจะเจริญมีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ยอดมีขนาดคงที่ ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดไปนาน 4 สัปดาห์ แคลลัสที่เกิดขึ้นมีขนาดค่อนข้างคงที่ จึงนับจำนวนคัพภะที่สร้างแคลลัสและวัดขนาดของแคลลัส พบว่า 2,4-D ที่ความเข้มข้น

Table 1 Callus formation of aromatic rice seeds of KDML 105 culturedon MS medium supplemented with various concentrations of 2,4-D under light and dark conditions. Each treatments comprises 20 replications.

2,4-D (mg/1)	Light		Dark	
	% Seed-forming callus	Size of callus (mm)[1]	% Seed-forming callus	Size of of callus (mm)[1]
0 (control)	0	0	0	0
1	94.7	6.2	100.0	6.0
2	100.0	6.9	94.4	5.6
3	100.0	6.7	93.8	5.3
4	100.0	4.6	94.4	4.6
5	100.0	5.5	100.0	4.6
Average[2]	98.9	6.0	96.5	5.2

1 Size of callus = (length + width)/2

2 Control is not included

Table 2 Callus formation of aromatic rice seeds of KDML 105 cultured on MS medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D and various kinds and concentrations of organic substances under light condition. Each treatment comprises 30 replications.

Supplement to 2 mg/l 2,4-D	% Seed-forming callus	Size of callus (mm)[1]
No supplement	100.0	7.8
Kinetin 0.3 mg/l	100.0	6.8
0.5 mg/l	93.3	8.2
Tryptophan 50 mg/l	100.0	8.5
100 mg/l	89.3	7.7
Casein hybrolysate 300 mg/l	96.3	9.4
500 mg/l	100.0	6.6
Coconut water 10%	96.6	8.5
15%	93.1	8.0

1 Size of callus = (length + width)/2

ทุกระดับที่ทดสอบสามารถชักนำให้คัพภะสร้างแคลลัสได้ทั้งในสภาพที่มีแสงและสภาพมืด (Table 1) เปอร์เซ็นต์คัพภะที่สร้างแคลลัสสูงมากโดยผันแปรอยู่ระหว่าง 94.4 ถึง 100% แต่คัพภะที่เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสงจะสร้างแคลลัสได้ในอัตราที่สูงกว่า (เฉลี่ย 98.9%) คัพภะที่เพาะเลี้ยงในสภาพมืด (เฉลี่ย 96.5%) นอกจากนั้นแคลลัสที่เจริญมาจากคัพภะที่เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสงมีขนาดใหญ่กว่า (เฉลี่ย 6.0 มม.) แคลลัสที่เจริญมาจากคัพภะที่เพาะเลี้ยงในสภาพมืด (เฉลี่ย 5.2 มม.)

ผลของ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่า 2,4-D ความเข้มข้น 2 มก./ล.สามารถชักนำให้คัพภะสร้างแคลลัสได้ในอัตราสูงสุด (100%) และแคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุด (6.9 มม.) เมื่อเพาะเลี้ยงคัพภะในสภาพที่มีแสง ถ้าเพาะเลี้ยงคัพภะในสภาพที่ไม่มีแสง พบว่า 2,4-D ความเข้มข้น 1 มก./ล. สามารถชักนำให้คัพภะสร้างแคลลัสในอัตราสูงสุด (100%) และแคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุด (6.0 มม.) ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นในแต่ละคัพภะมีสีเหลืองอ่อน บริเวณตรงกลางเซลล์เกาะตัวกันแน่น (compact) ส่วนบริเวณผิวเซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆ (friable) จากผลการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยงเมล็ดในสภาพที่มีแสงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2 มก./ล. จะสามารถชักนำให้คัพภะสร้างแคลลัสได้ในอัตราสูงสุดและมีขนาดใหญ่ที่สุด

ในการทดลองเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำให้คัพภะสร้างแคลลัสในอัตรา และปริมาณที่สูง ได้นำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2 มก./ล. ร่วมกับ kinetin, tryptophan, casein hydrolydate หรือน้ำมะพร้าว ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าคัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 2 มก./ล. ร่วมกับ casein hydrolysate 300 มก./ล.

สามารถสร้างแคลลัส (Figure 1) ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด (9.4 มม.) ถึงแม้ว่าเปอร์เซ็นต์คัพภะที่สร้างแคลลัสจะลดลงเล็กน้อย (96.3%) (Table 2) เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสที่เกิดจากคัพภะซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2 มก./ล. เพียงอย่างเดียว ซึ่งแคลลัสมีขนาดโดยเฉลี่ย 7.8 มม. และเปอร์เซ็นต์คัพภะที่สร้างแคลลัสสูงสุด 100% อย่างไรก็ตาม tryptophan 50 มก./ล. และน้ำมะพร้าว 10% ก็สามารถชักนำให้คัพภะสร้างแคลลัสได้ในอัตราและปริมาณที่ค่อนข้างสูงเช่นกัน

ในการชักนำให้คัพภะสร้างแคลลัสเพื่อใช้ในการทดลองอื่นๆ จะเพาะเลี้ยงเมล็ดในสภาพที่มีแสงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2 มก./ล. ร่วมกับ casein hydrolysate 300 มก./ล.

การชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้น

ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตรชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นนานประมาณ 1 สัปดาห์ จะสังเกตเห็นจุดสีเขียวเกิดขึ้นที่บริเวณแคลลัส ในขณะเดียวกันบางแคลลัสจะมีรากเกิดขึ้นประมาณสัปดาห์ที่ 2 จุดสีเขียวจะพัฒนาไปเป็นยอด แคลลัสบางก้อนพัฒนาไปเป็นทั้งยอดและรากแต่เกิดขึ้นคนละแห่งบนแคลลัส ต่อมายอดบางยอดที่เกิดขึ้นจะสร้างรากตรงบริเวณโคนยอด

แคลลัสที่ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นทันทีโดยไม่ผ่านการทำให้แห้ง (nondehydration) จะพัฒนาไปเป็นยอดในอัตราที่ต่ำมาก (Table 3) โดยมีอาหารเพียง 2 สูตร เท่านั้นที่สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดได้ คือ อาหารสูตร MS ที่เติม IAA 1 มก./ล. กับ BA 1 มก./ล. สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดได้เพียง 3.3% และมีจำนวนยอดเพียง 1 ยอดต่อแคลลัส และอาหารสูตร MS ที่เติม IAA 1 มก./ล. กับ kinetin 4 มก./ล. สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดได้ 2.9% และมีจำนวนยอดเพียง 1 ยอดต่อแคลลัสเช่นกัน ในขณะที่แคลลัสซึ่งผ่านการทำให้แห้งแล้ว (dehydration) (Figure 2) เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นทุกสูตรจะสามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ในอัตราที่สูงกว่ามาก (Table 4) โดยอาหารสูตร MS ที่เติม IAA 1 มม./ล. กับ BA 4

Table 3 Plant regeneration from non-dehydrated calli cultured on MS medium supplemented with 1 mg/l IAA and various concentrations of either K or BA.

Growth regulator (mg/l)	No. of calli cultured	No. of calli forming			No. of shoots/ callus
		green spots (%)	roots (%)	shoots (%)	
0 (control)	33	18.2	54.6	0	0
IAA : K					
1 : 1	35	25.7	57.1	0	0
1 : 2	40	7.5	42.5	0	0
1 : 3	41	4.9	31.7	0	0
1 : 4	35	22.9	40.0	2.9	1
IAA : BA					
1 : 1	30	13.4	33.3	3.3	1
1 : 2	30	10.0	30.0	0	0
1 : 3	32	6.3	9.4	0	0
1 : 4	32	12.5	3.1	0	0

มก./ล. สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอด (Figure 3) ในอัตราสูงสุด กล่าวคือ มีจำนวนแคลลัสที่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ถึง 24.5% และแต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลี่ย 11.4 ยอด ส่วนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดในเปอร์เซ็นต์ต่ำสุดเพียง 3.3% อย่างไรก็ตามแต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลี่ยคอนข้างสูงถึง 5 ยอด จากผลการทดลองนี้อาจสรุปได้ว่าการทำให้แคลลัสแห้งก่อนนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นจะช่วยทำให้อัตราการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัสสูงขึ้น และอาหารสูตร MS ที่เติม IAA 1 มก./ล. กับ BA 4 มก./ล. สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดในอัตราที่สูงกว่าอาหารสูตรอื่นๆ

ในการทดลองเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดในอัตราที่สูงได้นำแคลลัสที่ผ่านการทำให้แห้งแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี IAA 1 มก./ล. และBA 4 มก./ล. แล้วเติม adenine sulfate, tryptophan, casein hydrolysate, yeast extract หรือ น้ำมะพร้าวความเข้มข้นต่างๆ พบว่าสารเสริมที่เป็นสารอินทรีย์ทุกชนิดที่เติมลงไปในอาหารสูตร MS ที่มี IAA 1 มก./ล. และ BA 4 มก./ล. ไม่มีผลทำให้จำนวนแคลลัสที่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดเพิ่มขึ้น (Table 5) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรดังกล่าวที่ไม่เติมสารใดๆ อย่างไรก็ตามอาหารสูตร MS ที่มี IAA 1 มก./ล., BA 4 มก./ล. และเติม adenine sulfate 40 มก./ล., yeast extract 1,000 มก./ล. หรือน้ำมะพร้าว 10% สามารถชักนำให้ได้จำนวนยอดต่อแคลลัสสูงกว่าอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารใดๆ จากผลการทดลองนี้อาจสรุปได้ว่า อาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นมี 2 สูตร คืออาหารสูตร MS ที่เติม IAA 1 มก./ล. และ BA 4 มก./ล. สามารถชักนำให้ได้จำนวนแคลลัสที่พัฒนาเป็นยอดสูงสุด 45.8% และมีจำนวนยอดเฉลี่ย 7.9 ยอดต่อแคลลัส และอาหารสูตร MS ที่มี IAA 1 มก./ล., BA 4 มก./ล. และเติม yeast extract 1,000 มก./ล. สามารถชักนำให้ได้จำนวนแคลลัสที่พัฒนาไปเป็นยอด 45.5% และได้จำนวนยอดต่อแคลลัสเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 8.7 ยอด

Table 4 Plant regeneration from dehydrated calli cultured on MS medium supplemented with 1 mg/l IAA and various concentrations of either K or BA.

Growth regulator (mg/l)	No. of calli cultured	No. of calli forming			No. of shoots/ callus
		green spots (%)	roots (%)	shoots (%)	
0(control)	60	38.3	86.7	3.3	5.0
IAA:K					
1:1	60	20.0	76.7	5.0	3.0
1:2	60	38.3	78.3	11.7	2.4
1:3	48	14.6	68.8	6.3	4.7
1:4	55	27.3	67.3	14.6	4.1
IAA:BA					
1:1	55	21.8	56.4	9.1	2.8
1:2	53	17.0	56.6	11.3	2.8
1:3	53	17.0	41.5	20.8	5.4
1:4	61	19.7	60.7	24.5	11.4

การปลูกต้นข้าวที่พัฒนามาจากแคลลัส

นำยอดที่พัฒนามาจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อชักนำให้ยอดสร้างราก (Figure 4) เมื่อต้นข้าวมีรากสมบูรณ์แล้วย้ายไปปลูกลงดินในกระถางภายใต้สภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

วิจารณ์

ในการชักนำให้คัพภะข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สร้างแคลลัสโดยการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า แคลลัสจะเกิดขึ้นตรงบริเวณคัพภะใกล้กับส่วนโคนของยอดที่งอกออกมา ซึ่ง Maeda (1980) รายงานว่าแคลลัสที่เจริญมาจากคัพภะข้าวส่วนใหญ่จะเจริญมาจากเนื้อเยื่อส่วน scutellum และ mesocotyl ของคัพภะโดยเซลล์ของเนื้อเยื่อทั้งสองมีการขยายขนาดและแบ่งตัวอย่างรวดเร็วจนกลายเป็นแคลลัส

โดยทั่วไป 2,4-D เป็นออกซิน (auxin) ที่เหมาะสมที่สุดต่อการชักนำให้เนื้อเยื่อข้าวเจริญเป็นแคลลัส แต่ความเข้มข้นที่ใช้จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อและพันธุ์ (Raina, 1989) สำหรับการเพาะเลี้ยงเมล็ดมีรายงานจำจำนวนมากพบว่า 2,4-D ความเข้มข้น 1 หรือ 2 มก./ล. เหมาะสมต่อการชักนำให้คัพภะสร้างแคลลัส (Wu and Li, 1972; Vajrabhaya *et al.*, 1986; Rainaet *al.*, 1987) การทดลองนี้พบว่า 2,4-D 2 มก./ล. สามารถชักนำให้คัพภะเจริญเป็นแคลลัสได้ในอัตราสูงสุด (100%) และแคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุด (6.9 มม.) และเมื่อเติม kinetin, tryptophan, casein hydrolysate และน้ำมะพร้าวลงในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 2 มก./ล. พบว่า casein hydrolysate 300 มก./ล. เป็นสารที่ช่วยทำให้คัพภะสร้างแคลลัสได้ในปริมาณที่สูงกว่าสารชนิดอื่นๆ ถึงแม้ว่า 2,4-D เพียงอย่างเดียวจะเพียงพอสำหรับการชักนำให้เนื้อเยื่อข้าวสร้างแคลลัส (Wu and Li, 1971; Raina *et al.*, 1987) แต่การเติมสารบางชนิดเช่นออกซิน

Table 5 Plant regeneration from dehydrated calli cultured on MS medium supplemented with 1 mg/l IAA, 4 mg/l BA and various kinds and concentrations of organic substances.

Supplement to 1 mg/l IAA + 4 mg/l BA	No. of calli cultured green	No. of calli forming spots(%)	roots(%)	shoots (%)	No. of shoots/ callus
No supplement	24	50.0	75.0	45.8	7.9
Adenine sulfate 20 mg/l	26	26.9	34.6	26.9	5.1
40 mg/l	25	44.0	52.0	32.0	9.1
Tryptophan 50 mg/l	24	25.0	50.0	29.1	5.9
100 mg/l	25	24.0	48.0	40.0	6.2
Casein hybrolysate 500 mg/l	23	34.8	52.2	30.4	6.9
800 mg/l	25	32.0	44.0	20.0	5.8
Yeast extract 1,000 mg/l	22	31.8	50.0	45.5	8.7
2,000 mg/l	23	39.1	47.8	34.8	5.1
Coconut water 10%	22	36.4	59.1	31.8	8.1
20%	23	26.1	52.2	39.1	4.2

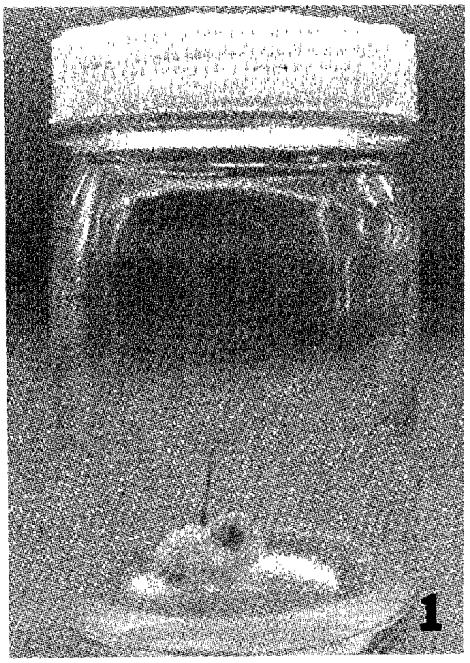

Figure 1 Callus formation of embryo cultured on MS medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D and 300 mg/l casein hydrolysate at 4 weeks after culture initiation.

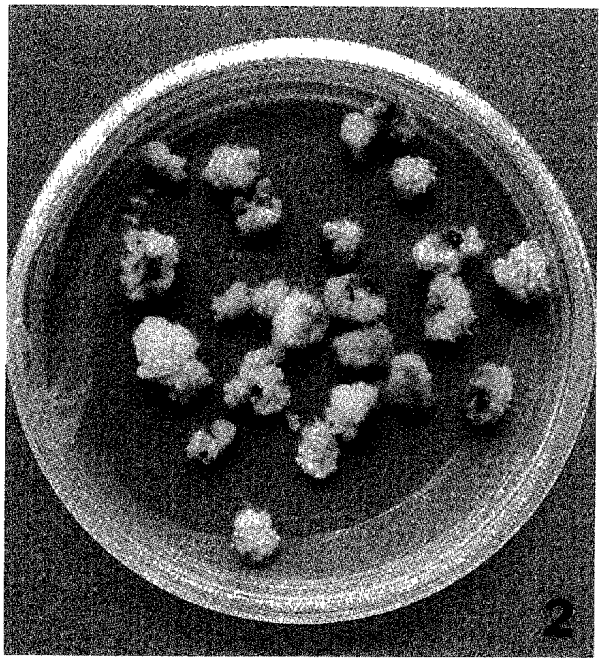

Figure 2 Dehydration of calli by placing in petridish with cover for 7 days before transferring to regenerating medium.

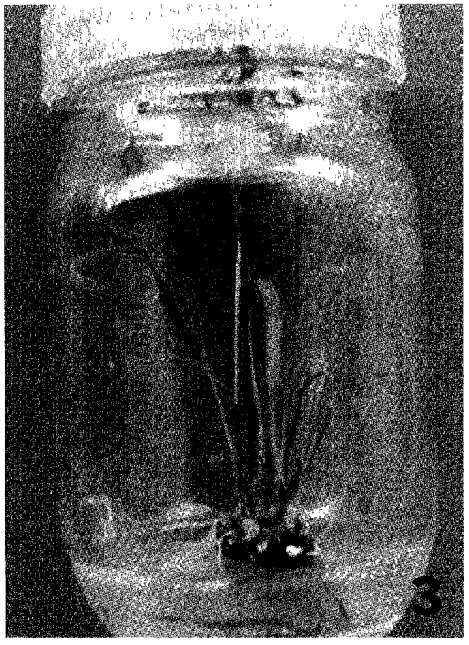

Figure 3 Shoot regeneration from embryo-derived callus cultured on MS medium supplemented with 1 mg/l IAA and 4 mg/l BA.

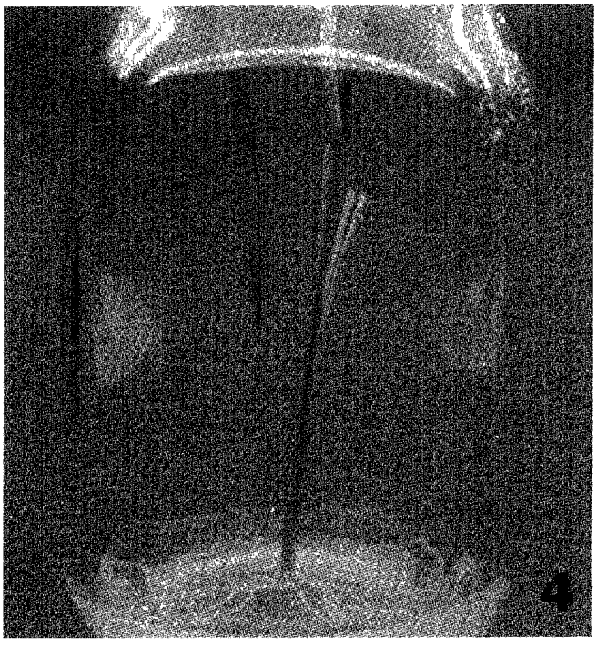

Figure 4 Shoot was rooted when transferred to MS medium without growth regulator.

(IAA, NAA), kinetin, casein hydrolysate และ trytophan ลงไปในอาหารที่มี 2,4-D จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างแคลลัสของเนื้อเยื่อข้าวได้ (Chou *et al.*, 1983; Siriwarnada and Nabors, 1983; Vajrabhaya *et al.*, 1986)

การเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในสภาพที่มีแสง คัพภะสามารถสร้างแคลลัสได้ในอัตราและปริมาณที่สูงกว่าเมล็ดที่เพาะเลี้ยงในสภาพมืด การเพาะเลี้ยงคัพภะในสภาพที่มีแสงและสภาพมืดจะมีผลทำให้อัตราและปริมาณการสร้างแคลลัสของคัพภะแตกต่างกันไปทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ เช่น พันธุ์ Giza 159 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวพวก japonica จะสร้างแคลลัสได้ดีในสภาพมืด ส่วนพันธุ์ IR 36 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวพวก indica จะสร้างแคลลัสได้ดีในสภาพที่มีแสง (Ketchum *et al.*, 1987)

การทำให้แคลลัสแห้งโดยการพักแคลลัสไว้ในจากแก้วที่มีฝาปิดเป็นเวลา 7 วันก่อนที่จะย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น จะทำให้อัตราการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสที่ไม่ได้ผ่านการทำให้แห้ง ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากการพักแคลลัสในจานแก้วซึ่งมีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำกว่าความชื้นภายในเซลล์ของแคลลัส จะทำให้เซลล์มีการคายน้ำ ปริมาณน้ำภายในเซลล์จึงลดลง และพร้อมที่จะรับน้ำหรือสารอื่นๆ จากภายนอกเข้าไปในเซลล์ได้อีกครั้งหนึ่งเมื่อย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น แคลลัสจึงพัฒนาไปเป็นต้นได้มากขึ้น (Gray, 1987).

อาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นมี 2 สูตร คือ อาหารสูตร MS ที่เติม IAA 1 มก./ล. และ BA 4 มก./ล. และอาหารสูตร MS ที่เติม IAA 1 มก./ล., BA 4 มก./ล. และ yeast extract 1,000 มก./ล. โดยอาหารสูตรทั้งสองสามารถชักนำให้ได้เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่พัฒนาไปเป็นต้นใกล้เคียงกัน (ประมาณ 46%) แต่อาหารสูตรที่เติม yeast extract สามารถชักนำให้ได้จำนวนต้นต่อแคลลัส (8.4 ต้นต่อแคลลัส) สูงกว่าอาหารสูตรที่ไม่เติมสารใดๆ (7.9 ต้นต่อแคลลัส) เล็กน้อย ในการชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้น จะต้องย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจาก 2,4-D แต่ใส่ออกซินที่อ่อนกว่า เช่น IAA หรือ NAA ร่วมกับไซโตไคนิน เช่น kinetin หรือ BA (Cornejo-Martin *et al.*, 1979; Ling *et al.*, 1983; Vajrabhaya *et al.*, 1986; วิชัยและคณะ, 2527) นอกจากนี้การเติมสารอินทรีย์บางชนิด เช่น yeast extract, casein hydrolysate และ tryptophan อาจช่วยทำให้อัตราการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสสูงขึ้นได้ (Ling *et al.*, 1983; Raina *et al.*, 1987)

ในการทดลองนี้การพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสเกิดจากขบวนการ organogenesis เนื่องจากการพัฒนาไปเป็นยอดและรากไม่ได้เกิดขึ้นพร้อมกันจากเซลล์ต้นกำเนิดเดียวกัน ส่วนใหญ่เซลล์จะพัฒนาเป็นยอดเพียงอย่างเดียว หรือบางยอดอาจมีรากเกิดขึ้นตรงส่วนโคนยอดในภายหลัง ในข้าวขบวนการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสมี 2 แบบ คือ แบบ organogenesis (Abe and Futsuhara, 1989) และแบบ embryogenesis (Ling *et al.*, 1983) ซึ่งแคลลัสจะพัฒนาไปเป็นต้นที่มีทั้งยอดและรากเกิดขึ้นพร้อมกันโดยมีกำเนิดมาจากเซลล์ๆ เดียว

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ประภา ศรีพิจิตต์. 2532. การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวหอมในสภาพปลอดเชื้อ. ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 23:324-330.

วิชัย ลิ้มกาญจนะพงศ์, ชัยฤกษ์ มณีพงษ์ และอรดี สหวัชรินทร์. 2527. การชักนำให้เกิดแคลลัสและต้น

จากคัพภะที่เลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์, น. 91-98. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการ ภาคโปสเตอร์ วันที่ 30 ม.ค. - 3 ก.พ. 2527. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร, กรุงเทพฯ.

Abe, T. and Y. Futsuhara. 1984. Varietal difference of plantregeneration from root callus tissues in rice. Japan. J. Breed. 34:147-155.

Abe, T. and Y. Fustuhara. 1989. Selection of higher regenerative callus and change in isozyme pattern in rice (*Oryza sativa* L.) Theor. Appl. Genet. 78:648-652.

Chou, K.T., K.L. Ge, I.S. Tsai, C.S. Yang and H.W. Yang. 1983. Callus induction and redifferentiation of different hybrid rice plant parts, pp. 207-213. *In* F.J. Zapata (ed.). Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. Science Press, Beijing.

Cornejo-Martin, M.J., A.M. Mingo-Castel and E. Primo-Millo. 1979. Organ redifferentiation in rice callus : Effects of C_2H_4, CO_2 and cytokinins. Z. Pflanzenphysiol. 94:117-123.

Gray, D.J. 1987. Quiescence in monocotyledonous and dicotyladonous somatic embryos induced by dehydration. Hortscience 22:810-814.

Henke, R.R., M.A. Mansar and M.J. Constantin. 1978. Organogenesis and plantlet formation from organ and seedling-derived calli of rice (*Oryza sativa*). Physiol. Plant. 44:11-13.

Hu, H., T.Y. Hsi, C.C. Tseng, T.W. Ouyang and C.K. Ching. 1978. Application of anther culture to crop plants, pp. 123-130. *In* T.A. Thorpe (ed.). Frontiers of Plant Tissue Culture 1978. University of Calgary, Calgary.

Ketchum, J.L.F., O.L. Gamborg, G.E. Hanning and M.W. Nabors. 1987. Tissue Culture for Crop Project Progress Report 1987. Cororado State University, Colorado. 87 p.

Kyozuka, J., T. Kaneda and K. Shimamoto. 1989. Production of cytoplasmic male sterile rice (*Oryza sativa* L.) by cell fusion. Bio/Technology 7:1171-1174.

Ling, D.H., W.Y. Chen, M.F. Chen and Z.R. Ma. 1983. Somatic embryogenesis and plant regeneration in an interspecific hybrid of *Oryza*. Plant Cell Rep. 2:169-171.

Maeda, E. 1980. Organogenesis and cell culture in rice plants under sterile condition (part I). JARQ 14:4-8.

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

Nishi, T., Y. Yamada and E. Takahashi. 1973. The role of auxins in differentiation of rice tissue culture *in vitro*. Bot. Mag. Tokyo 86:183-184.

Ogewa, M.S., S. Yoshida, G.S. Cabuslay, Y.H. Chun and K. Suenaga. 1982. Induction and selection of sale tolerant mutant rices by tissue culture. IRRI Saturday Seminar. December 4, 1982.

Oono, K 1978. Test tube breeding of rice by tissue culture. Trop. Agri. Res. Ser. 11:109-124.

Peng, J., L.A: Lyznik, L. Lee and T.K. Hodges. 1990. Co-transformation of indica rice protoplasts with gus A and neo Gene. Plant Cell Rep. 9:168-172.

Raina, S.K. 1989. Tissue culture in rice improvement status and potential. Adv. Agron. 42:339-398.

Raina, S.K., P. Sathish and K.S. Sarma. 1987. Plant

regeneration from *in vitro* cultures of anthers and mature seeds of rice (*Oryza sativa* L.) cv. Basmati-370. Plant Cell Rep. 6:43-45.

Siriwarnada, S. and M.W. Nabors. 1983. Tryptophan enhancement of somatic embryogenesis in rice. Plant Physiol. 73:142-146.

Sun, Z.X., C.Z. Zhao, K.L. Zheng, X.F. Gi and Y.P. Fu. 1983. Somaclonal genetics of rice, *Oryza sativa* L. Theor. Appl. Genet. 67:67-73.

Vajrabhaya, M., O. Tunvachkul and T. Vajrabhaya. 1986. Effects of auxin and cytokinin on plant regeneration from rice callus. Sci. Res. Chula. Univ. 11:113-115.

Wakasa, K and J.M. Widholm. 1987. A 5-methyl-tryptophan resistant rice mutant, MTR1, selected in tissue culture. Theor. Appl. Genet. 74:49-54.

Wu, L. and H.W. Li. 1971. Induction of callus tissue initiation fromdifferent somatic organs of rice plant by various concentration of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid. Cytologia. 36: 411-416.