Kasetsart J. (Nat. Sci) 32 : 126 - 141 (1998) ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) ปีที่ 32 : 126 - 141 (2541)

การตอบสนองของเนื้อเยื่อข้าวและแคลลัสต่อ culture filtrate ของเชื้อรา *Magnaporthe grisea (Pyricularia oryzae* Cav.) ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Response of Rice Tissue and Callus to Culture Filtrate of *Magnaporthe grisea (Pyricularia oryzae* Cav.) *In Vitro*

ณรงค์ สิงห์บุระอุดม[1] เพชรรัตน์ จันทรทิณ[2] วิจัย รักวิทยาศาสตร์[1]
และ ประภา ศรีพิจิตต์[3]

Narong Singburaudom, Petcharat Chuntharathin, Vijai Rukvidhayasartra, and Prapa Sripichitt.

ABSTRACT

The responses of rice tissue to culture filtrate of the fungus *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia oryzae* Cav.), the causal agent of rice blast were investigated *in vitro*. Shoots and calluses of rice variety KDML105 were cultured on medium containing culture filtrate at concentrations of 0:9,1:9, 2:9, 3:9, 4:9 and 5:9 by volume, respectively. The result indicated that rice shoots exhibited significant difference response to different culture filtrate concentrations. Where the concentrations of culture filtrate increased, the height, number and survival of shoots decreased. At the concentration of 2:9, the height and number of shoots were reduced to 50 percent. The increasing of culturing period had an influence on the increasing of height and the number of shoots while the survival of shoots were reduced. Some of brown tissue could reproduce newly emerged shoots after culturing for a longer period.

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ 10900
Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

[2] สถาบันวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ 10330
Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

[3] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ 10900
Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

The responses of calluses to culture filtrate were investigated. The results revealed that where the concentrations of culture filtrate were increased, the calluses color became brown, while the diameter of calluses, amount of green spot formations and the number of regenerated shoots were reduced. At the concentration of 2:9, callus diameter was reduced to 50 percent, the callus color was changed to brown 50 percent, the percentage of green spot formations and the regenerated shoots were the highest at 3.6 and 12.5 percent, respectively. The result suggested that culturing period had a significant influence on callus development. On induction medium, while the culturing period was increased, the size of calli, degree of yellowing and green spot formations were increased whereas the color of calli was changed to brown, the number of survival was reduced and the number of regenerated shoots were increased when they were cultured on a regeneration medium.

Key words: culture filtrate, rice blast, rice tissue culture, *Pyricularia oryzae, Magnaporthe grisea.*

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาการตอบสนองของเนื้อเยื่อข้าวต่อ culture filtrate ของเชื้อรา *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia oryzae* Cav.) สาเหตุโรคใบไหม้ของข้าว ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและแคลลัสข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ลงบนอาหารชักนำให้เกิดยอดหลายยอด อาหารชักนำให้เกิดแคลลัส และอาหารชักนำให้เกิดต้นที่ผสม culture filtrate ของเชื้อราที่อัตราส่วนความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 0:9, 1:9, 2:9, 3:9, 4:9 และ 5:9 โดยปริมาตร พบว่าเนื้อเยื่อข้าวมีการตอบสนองต่อ culture filtrate ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ แตกต่างกัน เมื่อระดับความเข้มข้นของ culture filtrate เพิ่มขึ้น เนื้อเยื่อข้าวจะมีความสูง จำนวนยอดที่แตกใหม่ และการมีชีวิตรอดลดลง ที่ระดับความเข้มข้น 2:9 ทำให้ความสูงและจำนวนยอดลดลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นระยะเวลานานทำให้เนื้อเยื่อข้าวมีความสูงและจำนวนยอดเพิ่มขึ้น แต่จะทำให้ความอยู่รอดของเนื้อเยื่อลดลงด้วยพบว่ามีเนื้อเยื่อที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแล้วยังสามารถแตกหรือพัฒนาเป็นยอดใหม่ได้

ผลการศึกษาการตอบสนองของแคลลัสต่อ culture filtrate บนอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงแคลลัส พบว่าเมื่อระดับความเข้มข้นของ culture filtrate เพิ่มขึ้น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัสจะลดลง สีของแคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลมากขึ้น ปริมาณการเกิดจุดสีเขียวลดลง และจำนวนต้นที่ได้จากแคลลัสลดลงด้วย พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 2:9 เส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัสลดลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ สีของแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีเขียวและจำนวนการเกิดต้นสูงที่สุดคือ 3.6 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่า ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลต่อการพัฒนาการของแคลลัส บนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส เมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงนานขึ้น ขนาดของแคลลัสจะโตขึ้น แคลลัสจะมีสีเหลือง และมีจุดสีเขียวเกิดมากขึ้น แต่เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารชักนำให้เกิดต้น พบว่าเมื่ออายุการเพาะเลี้ยงนานขึ้น แคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และมีชีวิตอยู่รอดลดลง แต่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นสูงขึ้น

คำนำ

Carlson (1973) เป็นบุคคลแรกที่รายงานเกี่ยวกับการใช้สารเคมีซึ่งคล้ายกับสารพิษที่ทำให้เกิดโรคใบไหม้ (wildfire disease) ในการคัดเลือกยาสูบให้ต้านทานต่อโรคในอาหารเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อ และสามารถชักนำให้เซลที่ต้านทานต่อสารพิษเจริญพัฒนาเป็นต้นพืชได้ จากความสำเร็จครั้งนี้ทำให้มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารพิษในการคัดพืชต้านทานต่อโรคชนิดอื่นๆ ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Sun and Zheng, 1990) Vidhyaseharan *et al.* (1984) ได้ทำการคัดเลือกแคลลัสของข้าวให้ต้านทานต่อโรคใบจุดสีน้ำตาลโดยใช้สารพิษที่เชื้อสร้างขึ้น พบว่าสารพิษสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเนื้อเยื่อทำให้ได้พันธุ์ที่ต้านทานต่อโรค Ling *et al.* (1985) ได้ทำการคัดเลือกพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคใบจุดสีน้ำตาลโดยเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวพันธุ์ IR8, IR36 และ IR 54 ซึ่งอ่อนแอต่อโรคใบจุดสีน้ำตาล ลงบนอาหารเพาะเลี้ยงที่มีสารพิษที่มีความเข้มข้นระดับต่างๆ พบว่าได้ต้นข้าวที่ต้านทานต่อโรคใบจุดสีน้ำตาล ทั้งจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารพิษและที่ไม่มีสารพิษ และความต้านทานต่อโรคนี้สามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานในชั่วต่อไปได้ Palit and Reddy (1990) ทำการคัดเลือกแคลลัสของข้าวพันธุ์ Tellahamsa ให้ต้านทานต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* โดยการนำส่วนของเมล็ดและรากมาเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำไปอาบรังสีแกมม่าแล้วจึงนำไปเลี้ยงบนอาหารที่มีสปอร์และเส้นใยของเชื้อราเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสที่ต้านทานจะไม่มีเส้นใยของเชื้อราเจริญขึ้นปกคลุม เมื่อนำแคลลัสที่ต้านทานไปชักนำให้เกิดต้นและทดสอบความต้านทานต่อเชื้อรา พบว่ามีจำนวนต้นที่ต้านทานต่อโรค 60.7-78.6 เปอร์เซ็นต์ มีรายงานเกี่ยวกับการคัดเลือกพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อ culture filtrate ของเชื้อรา *P.oryzae* โดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวที่ได้จากการชักนำของอับละอองเรณูและคัพภะในอาหารที่มี culture filtrate คัดเลือกแคลลัสที่ต้านทานไปชักนำให้เกิดต้น แล้วนำไปทดสอบความต้านทานต่อเชื้อรา *P. oryzae* พบว่ามีต้นข้าวต้านทาน 12 ต้น จากแคลลัสที่ต้านทานต่อ culture filtrate ทั้งหมด 810 แคลลัส จากพันธุ์ข้าวที่ใช้ทดลอง 10 พันธุ์ (Li *et al.*, 1986)

มีรายงานเกี่ยวกับสารพิษที่สร้างโดยเชื้อรา *P. oryzae* โดยพบว่าสารพิษก่อให้เกิดอาการจุดสีน้ำตาลคล้ายคลึงกับอาการของโรคใบไหม้ และยับยั้งการเจริญของต้นกล้าข้าว ยับยั้งการเจริญของยอดและราก (Umetsu *et al.*, 1972; Iwasaki *et al.*, 1972; Arase *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1989) Wang *et al.* (1988) ใช้ crude extract ที่ได้จากการกรองเอาเส้นใยหรือสปอร์ของเชื้อ *P. oryzae* ออกไป แล้วนำไปทดสอบกับส่วนต่างๆของข้าวโดยวิธีการจุ่มราก ใช้เข็มฉีดสารเข้าไปในเนื้อเยื่อชั้น mesophyll ของใบข้าว ฉีดเข้าที่กาบหุ้มช่อ และฉีดพ่นลงบนใบ พบว่า crude extract ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อส่วนต่างๆของข้าวได้ และการจุ่มรากลงไปในสารพิษจะทำให้ต้นกล้าเหี่ยวและปลายรากเน่าดำภายใน 6 วัน ส่วนการใส่สารพิษโดยวิธีอื่นก่อให้เกิดอาการแผลไหม้บนส่วนของพืชได้ และได้สรุปว่า crude extract สามารถใช้แทน เชื้อสาเหตุในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคใบไหม้ได้

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าใน culture filtrate ของเชื้อรา *P. oryzae* มีสารพิษ tenuazonic acid ซึ่งสามารถก่อให้เกิดอาการโรคคล้ายคลึงกับอาการของโรคใบไหม้ที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา culture filtrate ของเชื้อราที่ต่าง isolate กัน จะมีความสามารถในการก่อให้เกิดโรคแตกต่างกัน พันธุ์ข้าวมีการตอบสนองต่อสารพิษทั้งในรูปของ culture filtrate, crude extract และสารพิษบริสุทธิ์ tenuazonic acid

แตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารพิษที่เชื้อรา *P. oryzae* สร้างขึ้นมานั้นมีบทบาทที่สำคัญต่อการเกิดโรคใบไหม้ และสามารถที่จะนำไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อสารพิษและต่อเชื้อโรคได้ (Singburaudom *et al.*, 1995; Chaudhary *et al.*, 1995) สำหรับงานทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการตอบสนองของเนื้อเยื่อข้าวใน *in vitro* ต่อสารพิษของเชื้อรา *P. oryzae* เพื่อที่จะนำไปปรับใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคใบไหม้ โดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับสารพิษต่อไป

อุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียม culture filtrate

นำเชื้อรา *Pyricularia oryzae* Cav. ที่แยกได้จากต้นข้าวที่เป็นโรคที่เก็บมาจากนาข้าวในจังหวัดขอนแก่น มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ใช้เข็มเขี่ยตัดปลายเส้นใยของเชื้อราที่เจริญบนอาหารให้มีขนาดชิ้นวุ้น 3 × 3 มิลลิเมตร แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว modified Frie's medium (ซึ่งประกอบด้วยสูตรอาหาร Frie's medium จำนวน 150 มิลลิลิตร และเมล็ดข้าวเปลือก 1 กรัม) จำนวน 150 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อราไว้ที่อุณหภูมิ 27°C ในสภาพเขย่า โดยใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน นำของเหลวที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรามากรองเอาเส้นใยและอาหารส่วนที่เป็นเมล็ดข้าวออกโดยกรองผ่านผ้าขาวบาง 3 ชั้น หลังจากนั้นนำของเหลวที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 อีกครั้งหนึ่ง ของเหลวที่ได้เรียกว่า culture filtrate (CF) นำ CF ไปลดปริมาตรลงให้เหลือ 10 เปอร์เซ็นต์จากปริมาตรเริ่มต้น โดยใช้เครื่องกลั่นสารระเหยภายใต้ความดัน ก่อนนำไปใช้ทดสอบความเป็นพิษกับเนื้อเยื่อข้าวต่อไป

ผลของ culture filtrate ต่อการพัฒนาการเกิดยอดหลายๆ ยอดของเนื้อเยื่อข้าวในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่แกะเปลือกออกแล้วมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 2 นาที แล้วแช่ในสารละลายคลอร็อก 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 4 ครั้ง นำเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร Murashige และ Skoog (MS) ที่เติม benzyladenine (BA) ที่ระดับความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ pH 5.8 นำขวดเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวมาไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อเมล็ดงอกและเริ่มสร้างยอดแล้วจึงทำการย้ายลงอาหารใหม่ (subculture) เพื่อเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อรุ่นที่ 1 (subculture ครั้งที่ 1, S1) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

นำต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรุ่นที่ 1 อายุประมาณ 1 เดือน มาตัดยอดออกให้เหลือความยาวต้นประมาณ 1 เซนติเมตร แบ่งต้นข้าวออกเป็นกลุ่ม ๆ ละ 2 ยอด แล้วย้ายลงเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS เดิมที่ผสมกับ CF ของเชื้อราที่เตรียมไว้ โดยใช้อัตราความเข้มข้นของ CF ต่ออาหาร (ปริมาตรต่อปริมาตร) 6 ระดับ คือ 0:9, 1:9, 2:9, 3:9, 4:9 และ 5:9 ตามลำดับ นำขวดเพาะเลี้ยงไปไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ factorial ใน RCB จำนวน 20 ซ้ำ โดยใช้ 1 ขวด ต่อ 1 ซ้ำ ทำการบันทึกผล โดยนับจำนวนยอด ความสูงเฉลี่ย และวัดระดับการตอบสนองของเนื้อเยื่อข้าวต่อ CF โดยพิจารณาจากการมีชีวิตรอดและปริมาณ (%) การเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของต้นข้าวแต่ละต้น โดยแบ่งออกเป็น 5 ระดับ ดังนี้

ระดับ 0 : ต้นข้าวมีชีวิตรอดและไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

ระดับ 1 : ต้นข้าวมีชีวิตรอดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล 1-25%

ระดับ 2 : ต้นข้าวมีชีวิตรอด เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล 26-50%

ระดับ 3 : ต้นข้าวมีชีวิตรอด เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล 51-75%

ระดับ 4 : ต้นข้าวตายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล 76-100%

ผลของ culture filtrate ต่อการพัฒนาการของแคลลัส

นำเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่แกะเปลือกออกแล้วและผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวตามวิธีการที่กล่าวมาแล้ว มาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหาร วุ้นสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัม ต่อลิตร NAA 9.3 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 5.6 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยผสมกับ CF ของเชื้อรา *P. oryzae* ในอัตราส่วนความเข้มข้นระหว่าง CF กับอาหาร 6 ระดับ คือ 0:9, 1:9, 2:9, 3:9, 4:9 และ 5:9 โดยปริมาตร นำขวดเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวไปไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 11, 14, 21, 28 และ 35 วัน ภายใต้สภาพที่มีแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2°C วางแผนการทดลองแบบ factorial ใน RCB จำนวน 10 ซ้ำ ทำการบันทึกผลดังนี้

ขนาดของแคลลัส : ทำการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัส แล้วแบ่งระดับการตอบสนองออก เป็น 4 ระดับ ตามขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางคือ

ระดับ 1 : ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.0-0.25 เซนติเมตร

ระดับ 2 : ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.26-0.50 เซนติเมตร

ระดับ 3 : ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.51-0.75 เซนติเมตร

ระดับ 4 : ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 0.75 เซนติเมตร

สีของแคลลัส : บันทึกสีที่ปรากฏของแคลลัส ซึ่งแสดงถึงความมีชีวิตของแคลลัส แล้วแบ่งการตอบสนองตามสีที่เกิดขึ้น เป็น 5 ระดับ คือ

ระดับ 1 : สีน้ำตาล

ระดับ 2 : สีเหลืองปนน้ำตาล

ระดับ 3 : สีเหลือง

ระดับ 4 : สีเหลืองปนน้ำตาล มีจุดเขียว (green spot)

ระดับ 5 : สีเหลือง มีจุดเขียว

เปอร์เซ็นต์การตายของแคลลัส : ประเมินเปอร์เซ็นต์การตายของแคลลัสโดยพิจารณาจากปริมาณการเกิดสีน้ำตาลบนแคลลัสแล้วแบ่งออกเป็น 4 ระดับ ตามระดับการเกิดสีน้ำตาลบนแคลลัส คือ

ระดับ 1 : แคลลัสมีชีวิตและมีสีน้ำตาล 0-25 เปอร์เซ็นต์

ระดับ 2 : แคลลัสมีชีวิตและมีสีน้ำตาล 26-50 เปอร์เซ็นต์

ระดับ 3 : แคลลัสมีชีวิตและมีสีน้ำตาล 51-75 เปอร์เซ็นต์

ระดับ 4 : แคลลัสตาย และมีสีน้ำตาลมากกว่า 76 เปอร์เซ็นต์

เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดสีเขียว (green spot formation) : โดยประเมินเป็นเปอร์เซ็นต์ของปริมาณการเกิดจุดสีเขียวต่อก้อนแคลลัส

ผลของ culture filtrate ต่อการพัฒนาการเกิดยอดของแคลลัส

นำเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่แกะเปลือกออกแล้วและผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวตามวิธีการที่กล่าวมาแล้ว นำเมล็ดข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 9.3 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 5.6 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.8

เปอร์เซ็นต์ นำขวดมาไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส ย้ายแคลลัสที่มีอายุ 1 เดือนลงบนอาหารชักนำให้เกิดต้น สูตร MS ที่เติม IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตรต่อลิตร และวุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ โดยผสมกับ CF ของเชื้อรา *P. oryzae* ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ โดยปริมาตรเช่นเดียวกัน คือ 0:9, 1:9, 2:9, 3:9, 4:9 และ 5:9 ตามลำดับ นำขวดเพาะเลี้ยงไปไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ และความเข้มของแสงเช่นเดียวกับวิธีการที่ผ่านมา เป็นเวลา 4, 7, 12 และ 21 วัน โดยวางแผนการทดลองแบบ factorial ใน RCB จำนวน 20 ซ้ำ บันทึกการตอบสนองของแคลลัสต่อ CF โดยพิจารณาจากสีของแคลลัสและการตายของแคลลัส ตามวิธีการเช่นเดียวกันกับที่ผ่านมาแล้ว และเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นของแคลลัส โดยคิดจากจำนวนแคลลัสที่เกิดต้นต่อจำนวนแคลลัส20 แคลลัสที่ใช้ทดลอง

ผล

ผลของ culture filtrate ต่อพัฒนาการเกิดยอดหลายยอดของเนื้อเยื่อข้าวในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ผลการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวลงบนอาหารชักนำให้เกิดยอดหลายๆ ยอดที่ผสมกับ CF ของเชื้อรา *P. oryzae* โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของ CF ต่ออาหารโดยปริมาตรจำนวน 6 ระดับ (Table 1) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ CF เพิ่มขึ้น ทำให้ความสูงของยอดข้าว จำนวนยอดข้าวที่เกิดขึ้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งในทางสถิติ และความสูงของยอดข้าวไม่มีความแตกต่างกัน หรือมีความแตกต่างกันน้อยมากที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 2:9 ถึง 5:9 คือ มีความสูงของยอดข้าวระหว่าง 1.25-1.87 เซนติเมตร เมื่อ

Table 1 Height number and survival of rice shoots variety KDML105 after culturing on MS medium containing 6 concentrations of culture filtrate of *P. oryzae* for four different culturing periods.

Concentration ratio of CF : Medium (v/v)	Height (cm)	Number of shoot	Survival[1/] (0-4)
0 : 9	4.05 a[2/]	8.15 a	0.00 e
1 : 9	2.58 b	7.83 a	0.83 d
2 : 9	1.50 cd	5.13 b	2.63 c
3 : 9	1.87 c	3.26 cd	3.11 b
4 : 9	1.25 d	3.58 c	3.21 b
5 : 9	1.27 d	2.44 d	3.53 a
CV (%)	56.45	47.14	29.15
F-test	**	**	**

[1/] Rate of survival of shoots were rated by percent of brown color appearance;
0 = 0% brown , 1 = 1-25 % brown , 2 = 26-50 % brown
3 = 51-75% brown, 4 = 76-100 % brown

[2/] Any two mean in the same column having a common letter are not significantly different at 1% level of probability by DMRT

เปรียบเทียบกับความสูงของยอดข้าว ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่ใส่ CF ของเชื้อราที่มีความสูงของยอดข้าวสูงที่สุด คือ 4.05 เซนติเมตร รองลงมาคือ ที่ระดับความเข้มข้น 1:9 ซึ่งมีความสูงของยอดข้าว 2.58 เซนติเมตร

เมื่อความเข้มข้นของ CF ในอาหารเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นเป็นผลให้จำนวนยอดข้าวที่เกิดขึ้นลดลง และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งในทางสถิติ โดยพบว่าที่อัตราส่วนความเข้มข้น 5:9 มีจำนวนยอด 2.44 ยอด เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนยอดในอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่ใส่ CF มีจำนวนยอดข้าวสูงที่สุด คือ 8.15 ยอด ที่ระดับความเข้มข้น 2:9 ทำให้จำนวนยอดลดลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ คือ มีจำนวนยอดที่เกิดขึ้นเท่ากับ 5.13 ยอด

ผลการศึกษาอัตราการตายของยอดข้าว เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ผสม CF ของเชื้อรา *P. oryzae* พบว่าอัตราการตายของยอดข้าวจะเพิ่มสูงขึ้น ตามระดับความเข้มข้นของ CF ที่เพิ่มขึ้นในอาหารที่ไม่ใส่ CF พบว่าไม่มีการตายของยอดข้าวเกิดขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับที่ความเข้มข้นของ CF 5:9 จะมีอัตราการตายของยอดข้าวสูงที่สุดคือระดับ 3.53 ในขณะที่อัตราส่วนความเข้มข้น 2:9 ก่อให้เกิดการตายของข้าวในระดับ 2.63 ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์จากอาหารปกติที่ไม่ใส่ CF (Figure 1)

สำหรับผลของช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีต่อการพัฒนาการเกิดยอดข้าว (Table 2) พบว่าเมื่อระยะเวลาที่ใช้เพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ทำให้ความสูงของยอดข้าว จำนวนยอดข้าวที่เกิดขึ้น และอัตราการตายของยอดข้าว มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งในทางสถิติ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ จะทำให้ยอดข้าวมีความสูงและจำนวนยอดสูงสุด คือ 2.58 ซม. และ 7.12 ยอด แต่ทำให้มีอัตราการตายสูงสุดด้วยเช่นกัน คือ มีอัตราการตายอยู่ที่ระดับ 2.70 หรือมีเปอร์เซ็นต์เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามจากผลการทดลอง พบว่าที่อายุการเพาะเลี้ยง 3-4 สัปดาห์ อัตราการตายของเนื้อเยื่อ ซึ่งวัดโดยพิจารณาจากระดับการเกิดสีน้ำตาลของยอดข้าวไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ แต่แตกต่างจากอายุการเพาะเลี้ยง 1-2 สัปดาห์ พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงยอดข้าวเป็น

Table 2 Height number and survival of rice shoots variety KDML105 after culturing on MS medium containing 6 concentrations of culture filtrate of *P. oryzae* for four different culturing periods.

Culturing period (weeks)	Height of shoot (cm)	Number of shoot	Survival of shoot (0-4)
1	1.76 c[1/]	2.92 d	1.29 c
2	1.78 c	4.39 c	2.25 b
3	2.23 b	5.83 b	2.63 a
4	2.58 a	7.12 a	2.70 a
CV (%)	56.45	47.14	29.15
F-test	**	**	**

[1/] Any two mean in the same column having a common letter are not significantly different at 1% level of probability by DMRT

เวลานาน 3-4 สัปดาห์ ต้นข้าวที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลนั้น สามารถพัฒนาเกิดยอดใหม่ได้ มีลักษณะเป็นตุ่มเล็ก ๆ สีเขียวเกิดขึ้น (Figure 2)

ผลของ culture filtrate ต่อพัฒนาการของแคลลัสข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

ผลของ culture filtrate ต่อขนาดของแคลลัส : ผลการวิเคราะห์ทางสถิติค่าเฉลี่ยของขนาดแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าว พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสที่ผสม CF ของเชื้อรา *P. oryzae* ที่อัตราส่วนความเข้มข้น 6 ระดับ (Table 3 และ Figure 3) พบว่าขนาดของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ผสม CF ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อระดับความเข้มข้นของ CF เพิ่มขึ้น ทำให้ขนาดของแคลลัสมีแนวโน้มลดลง ที่อัตราส่วนความเข้มข้น 5:9 แคลลัสมีขนาดเล็กที่สุด คือมีขนาดอยู่ระดับ 2.06 เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ใส่ CF พบว่ามีขนาดแคลลัสอยู่ที่ระดับ 2.90 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่อัตราส่วนความเข้มข้น 2:9 3:9 และ 4:9 ขนาดของแคลลัสไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ โดยมีขนาด

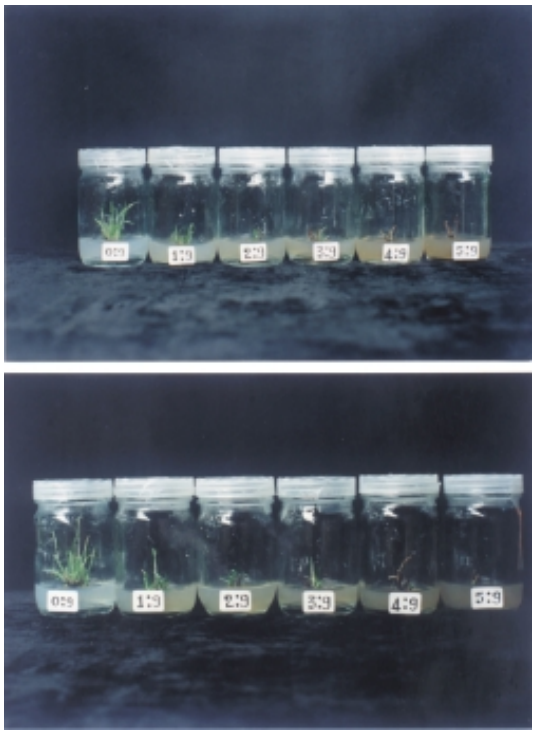

Figure 1 Response of rice shoots to 6 concentrations of culture filtrate of *P. oryzae* Khon Kaen isolate *in vitro.*
above. at 2 weeks after culturing
below. at 3 weeks after culturing

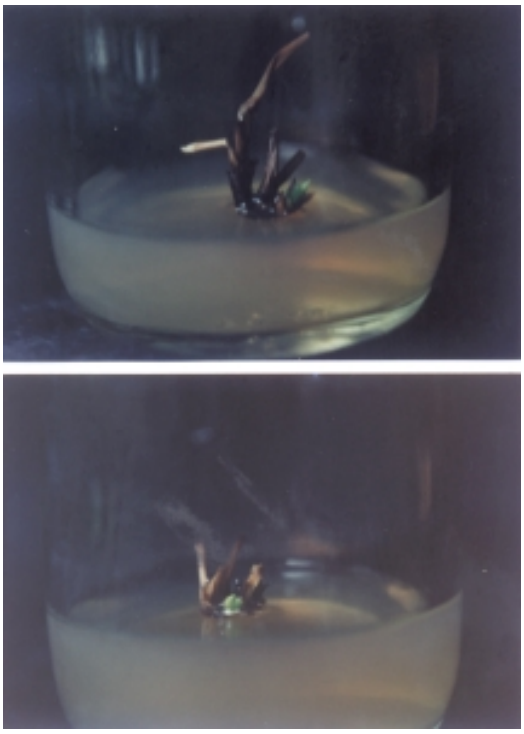

Figure 2 Rice shoots emerged from brown tissue after culturing in medium containing culture filtrate of *P. oryzae* Khon Kaen isolate for 3 weeks.
above. at concentration of CF 4 : 9
below. at concentration of CF 5 : 9

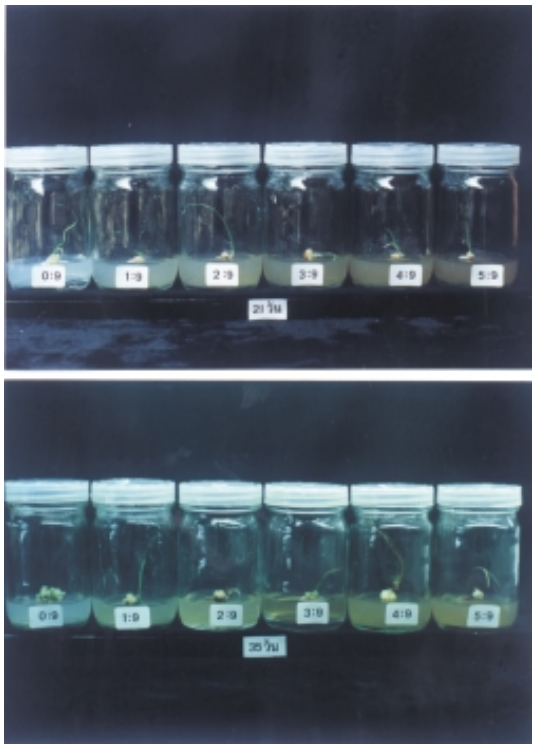

Figure 3 Response of rice callus variety KDML 105 after culturing on medium containing 6 concentrations of culture filtrate of *P. oryzae* Khon Kaen isolate.
above. at 21 days after culturing
below. at 35 days after culturing

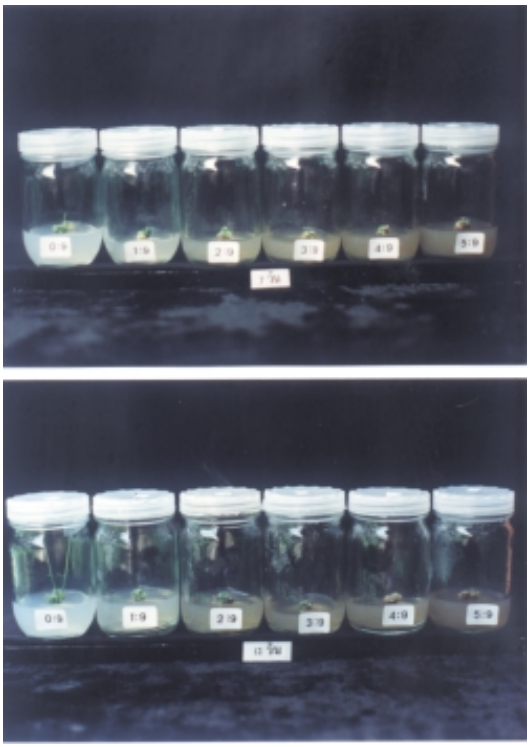

Figure 4 Regeneration of rice callus variety KDML 105 after culturing on regeneration medium containing 6 concentrations of culture filtrate of *P. oryzae* Khon Kaen isolate.
above. at 7 days after culturing
below. at 12 days after culturing

ของแคลลัสอยู่ที่ระดับ 2.66 2.62 และ 2.56 ตามลำดับ

ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่มีต่อขนาดของแคลลัส (Table 4) พบว่าเมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นแคลลัสมีขนาดโตขึ้นด้วย โดยที่การเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นระยะเวลา 35 วันจะมีขนาดแคลลัสโตที่สุด คือมีขนาดแคลลัสอยู่ที่ระดับ 3.65 รองลงมาคือระยะเวลาเพาะเลี้ยง 28 วัน ซึ่งแคลลัสจะมีขนาดโตอยู่ในระดับ 3.23 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งในทางสถิติ กับการเพาะเลี้ยงในระยะเวลา 11 วัน ซึ่งมีขนาดแคลลัสเล็กที่สุดอยู่ในระดับ 1.47

ผลของ culture filtrate ต่อการมีชีวิตของแคลลัสในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ :

ในการศึกษาความมีชีวิตรอดของแคลลัส พิจารณาจากสีของแคลลัส การเกิดสีน้ำตาลของแคลลัส และการเกิดจุดสีเขียว (green spot) บนก้อนแคลลัส ซึ่งจะปรากฏให้เห็นในช่วงระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง ซึ่งค่าเฉลี่ยของระดับการเกิดสีของแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดสีน้ำตาล และเกิดจุดสีเขียวของแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารที่มี CF ระดับความเข้มข้นต่างๆ (Table 3) พบว่าระดับการเกิดสีของแคลลัส

Table 3 Size, color and survival of rice calli variety KDML105 after culturing on callus induction medium containing 6 concentrations of culture filtrate of *P. oryzae* for five different culturing periods.

Concentration ratio of CF : Medium (v/v)	Size[1/] (1-4)	Color[2/] appearance (1-5)	Survival[3/] (1-4)	Green spot formation (%)
0 : 9	2.90 a[4/]	3.82 a	1.02 d	10.70 a
1 : 9	2.34 bc	2.78 b	1.70 c	3.30 b
2 : 9	2.66 ab	2.62 b	1.90 bc	3.60 b
3 : 9	2.62 ab	2.58 b	2.04 b	3.10 b
4 : 9	2.56 ab	2.66 b	2.18 ab	2.40 b
5 : 9	2.06 c	2.32 b	2.40 a	0.80 b
CV (%)	25.89	36.76	30.15	224.42
F-test	**	**	**	**

[1/] Size of cullus were divided into four scales by diameter as follows, 1 = 0-0.2 cm, 2 = 0.26-0.50 cm, 3 = 0.51-0.75 cm, 4 = <0.76 cm.

[2/] Color appearance of callus was divided into four scales by appearance of brown, yellow and green spot formation. 1 = brown, 2 = yellow and brown, 3 = yellow, 4 = yellow and brown and green spot formation 5 = yellow and greenspot formation.

[3/] Rate of survival of calli was rated by percent of brown color appearance, 1 = 0-25% brown, 2 = 26-50% brown, 3 = 51-75% brown, 4 = <75% brown.

[4/] Any two mean in the same column having a common letter are not significantly different at 1% level of probability by DMRT

ที่ความเข้มข้นของ CF ระดับต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ แต่มีความแตกต่างจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ใส่ CF อย่างมีนัยสำคัญยิ่งในทางสถิติ โดยที่แคลลัสในทุกๆ ระดับความเข้มข้นของ CF จะแสดงสีเหลืองปนน้ำตาลปรากฏออกมาให้เห็นประมาณ 25-50 เปอร์เซ็นต์ของก้อนแคลลัส เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ใส่CF จะมีสีเหลืองและมีจุดสีเขียวเกิดขึ้น

จากการทดลองพบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการพัฒนาของแคลลัส ที่อายุการเพาะเลี้ยง 28 วันและ 35 วัน ทำให้ระดับการเกิดสีของแคลลัสมีค่าสูง คือ 3.07 และ 3.22 ตามลำดับ หมายความว่าได้แคลลัสที่มีสีเหลืองและมีจุดสีเขียวเกิดขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะของแคลลัสที่มีคุณภาพ พร้อมที่จะพัฒนาเป็นต้นได้ต่อไป

ผลของ CF ที่มีต่อการมีชีวิตรอดของแคลลัส แสดงอยู่ใน Table 3 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ CF เพิ่มขึ้น จะทำให้อัตราการตายของแคลลัสสูงขึ้นด้วย และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ ที่ระดับความเข้มข้น 1:9 และ 2:9 มีอัตราการตายของแคลลัสอยู่ที่ระดับ 1.07 และ 1.90 กล่าวคือ มีเปอร์เซ็นต์การตายของเนื้อเยื่อแคลลัสประมาณ 20-50

Table 4 Size, color and survival of rice calli variety KDML105 after culturing on callus induction media containing 6 concentrations of culture filtrate of *P. oryzae* for five different culturing periods.

Culturing period (days)	Size (1-4)	Color appearance (1-5)	Survival (1-4)	Green Spot formation (%)
11	1.47 e[1/]	2.62 b	1.35 d	0.0 b
14	1.78 d	2.53 b	1.60 c	0.58 b
21	2.48 c	2.55 b	1.92 b	3.67 b
28	3.23 b	3.07 a	2.15 a	4.25 b
35	3.65 a	3.22 a	2.35 a	11.42 a
CV (%)	25.89	36.76	30.15	224.42
F-test	**	**	**	**

[1/] Any two mean in the same column having a common letter are not significantly different at 1% level of probability by DMRT.

เปอร์เซ็นต์ของก้อนแคลลัส และเมื่ออายุการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นจะทำให้เปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มขึ้นด้วย โดยพบว่าที่อายุการเพาะเลี้ยง 28 วัน และ 35 วันจะมีอัตราการตายอยู่ที่ระดับ 2.15 และ 2.35 ตามลำดับ ซึ่งหมายความว่ามีเปอร์เซ็นต์เนื้อเยื่อของแคลลัสที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ประมาณ 50-70% ของก้อนแคลลัส

สำหรับการเกิดจุดสีเขียวบนแคลลัส พบว่าที่อัตราส่วนความเข้มข้นของ CF ระดับต่างๆ เปอร์เซ็นต์ของการเกิดจุดสีเขียวบนก้อนแคลลัส ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ แต่มีความแตกต่างระหว่างจุดสีเขียวที่เกิดขึ้นบนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ใส่ CF กับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ใส่ CF โดยที่แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ใส่ CF มีจุดสีเขียวเกิดขึ้น 10.70 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี CF จะมีจุดสีเขียวเกิดขึ้น ตั้งแต่ 0.80-3.60 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ใส่CF พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ CF 2:9 จะทำให้แคลลัสเกิดจุดสีเขียวสูงที่สุด คือ 3.6% ผลการทดลองพบว่าเมื่ออายุการเพาะเลี้ยงนานขึ้น จะมีปริมาณการเกิดจุดสีเขียวเพิ่มขึ้นโดยที่อายุการเพาะเลี้ยง 35 วันจะเกิดจุดสีเขียวสูงที่สุดคือ 11.42 เปอร์เซ็นต์

ผลของ culture filtrate ต่อการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัสข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

ผลของ culture filtrate ต่อคุณภาพของแคลลัส : ในการศึกษาผลของ CF ที่มีต่อคุณภาพของแคลลัสได้พิจารณาจากสีของแคลลัสที่ปรากฏให้เห็นในช่วงระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง ซึ่งค่าเฉลี่ยของระดับการเกิดสีของแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี CF (Table 5) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ CF ในอาหารเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ระดับการเกิดสีของแคลลัสจะลดลง และระดับการเกิดสีของแคลลัสที่ความเข้มข้นของ CF ระดับต่างๆมีความแตกต่างกันอย่างมีนัย

Table 5 Color appearance and survival of calli and number of shoot regenerated after culturing rice calli variety KDML105 on regeneration medium containing 6 concentrations of culture filtrate of *P. oryzae* for four different culturing periods.

Concentration ratio of CF : media (v/v)	Color appearance (1-4)	Survival (1-4)	Percent of shoot regenerated
0 : 9	4.26 a[1/]	1.18 e	40.0
1 : 9	3.36 b	1.71 d	8.75
2 : 9	3.35 b	2.11 c	12.50
3 : 9	2.95 c	2.45 b	5.00
4 : 9	2.53 d	2.63 ab	3.75
5 : 9	2.58 d	2.78 a	5.00
CV (%)	25.68	29.95	-
F-test	**	**	-

[1/] Any two mean in the same column having a common letter are not significantly different at 1% level of probability by DMRT.

สำคัญในทางสถิติแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ใส่ CF จะมีค่าระดับการเกิดสีสูงสุดคือระดับ 4.26 ซึ่งแคลลัสที่ได้จะมีสีเหลืองและมีสีเขียวเกิดขึ้นบนก้อนแคลลัส เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ใส่ CF ที่ระดับความเข้มข้น 5:9 แคลลัสที่ได้จะมีค่าระดับการเกิดสีต่ำสุด คือ ระดับ 2.58 ซึ่งแคลลัสที่ได้จะมีสีน้ำตาลปนเหลือง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ 21 วันจะทำให้ได้แคลลัสที่มีคุณภาพต่ำที่สุด คือ มีระดับการเกิดสีของแคลลัสที่ระดับ 2.86 แคลลัสที่ได้จะเริ่มมีสีน้ำตาล เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสที่ใช้เวลาเพาะเลี้ยง 4 วัน จะมีสีเหลืองและมีจุดสีเขียว (Figure 4)

ผลของ culture filtrate ต่อการมีชีวิตรอดของแคลลัส : ผลของ CF ที่มีต่อการมีชีวิตรอดของแคลลัสพิจารณาจากการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของแคลลัส และการพัฒนาไปเป็นยอด (regeneration) ที่ปรากฏให้เห็นในช่วงระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ CF เพิ่มขึ้น อัตราการตายของแคลลัสจะเพิ่มขึ้นและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 5) ที่ความเข้มข้นของ CF 5:9 ค่าอัตราการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลมีค่าสูงที่สุด คือ 2.78 หรือแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลประมาณ 50-75 เปอร์เซ็นต์ของก้อนแคลลัส เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ใส่ CF พบว่าค่าอัตราการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล มีค่าต่ำสุด คือ 1:18 คือมีส่วนของแคลลัสที่เป็นสีน้ำตาล อยู่ระหว่าง 0.25 เปอร์เซ็นต์ของก้อนแคลลัส ผลการทดลองพบว่า เมื่ออายุการเพาะเลี้ยงนานขึ้น จะทำให้อัตราการตายของแคลลัสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่อายุการเพาะเลี้ยง 21 วัน จะมีอัตราการตายของแคลลัสที่ระดับสูงที่สุด คือ 2.70 หรือมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยน

Table 6 Color appearance and survival of calli and number of shoot regenerated after culturing rice calli variety KDML105 on regeneration medium containing 6 concentrations of culture filtrate of *P. oryzae* for four different culturing periods.

Culturing periods (days)	Color appearance (1-4)	Survival (1-4)	Percent of shoot regenerated
4	3.37 a[1/]	1.55 d	1.6
7	3.29 a	2.01 c	5.0
12	3.16 a	2.31 b	20.8
21	2.86 b	2.70 a	22.5
CV (%)	25.68	29.95	-
F-test	**	**	-

[1/] Any two mean in the same column having a common letter are not significantly different at 1% level of probability by DMRT.

เป็นสีน้ำตาล ประมาณ 50-75 เปอร์เซ็นต์ (Table 6) สำหรับการพัฒนาการเกิดยอดของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี CF ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าไม่มีความแตกต่างในทางสถิติ แต่มีความแตกต่างจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี CF ที่ระดับความเข้มข้นของ CF 2:9 จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นที่สูงที่สุด คือ 12.50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ใส่ CF มีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นสูงที่สุด คือ 40.0 เปอร์เซ็นต์ การเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 21 วัน จะทำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นสูงที่สุด คือ 22.5 เปอร์เซ็นต์

วิจารณ์ และสรุป

มีรายงานเกี่ยวกับบทบาทของสารพิษที่สร้างโดยเชื้อรา *P. oryzae* ที่มีต่อการเกิดโรคใบไหม้ไว้ดังนี้ 1) สารพิษโดยเฉพาะ tenuazonic acid สามารถก่อให้เกิดอาการแผลสีน้ำตาลที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับอาการของแผลโรคใบไหม้ ที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ และสามารถกล่าวได้ว่าสารพิษชนิดนี้มีบทบาทที่สำคัญต่อการเกิดโรคใบไหม้ (Umetsu *et al.*, 1972 ; Singburaudom *et al.*, 1995) 2) สารพิษสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของส่วนต่างๆ ของต้นข้าวได้ ซึ่งมีรายงานไว้เป็นจำนวนมากได้แก่ สารพิษ tenuazonic acid ที่ความเข้มข้น 50 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของต้นกล้าข้าวได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (Umetsu *et al.*, 1972) สารพิษ tenuazonic acid ที่ความเข้มข้น 200 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของยอดและรากได้ 72.5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความเข้มข้นที่ 5 ppm และ 40 ppm จะกระตุ้นการยืดตัวของราก (Iwasaki *et al.*, 1972) มีรายงานว่า culture filtrate (CF) ของเชื้อรา *P. oryzae* จำนวน 20 isolate สามารถยับยั้งการเจริญของต้นกล้าข้าวได้ (Chen *et al.*, 1989) และ Arase *et al.*, (1990) ได้รายงานไว้ว่าสารพิษที่แยกได้จาก CF ของเชื้อรา *P. oryzae* สามารถไปยับยั้งการเจริญของรากข้าวได้เช่นเดียวกัน ซึ่งจากรายงานทั้งหมดนี้เป็นการศึกษาผลของสารพิษที่มีต่อเนื้อเยื่อข้าวใน *in vivo* จากการศึกษาผลของ CF ของเชื้อรา

P. oryzae ที่มีต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อข้าวใน *in vitro* ครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า การตอบสนองของเนื้อเยื่อข้าวต่อสารพิษใน *in vitro* มีความสอดคล้องกับการตอบสนองต่อสารพิษใน *in vivo* โดยพบว่าสารพิษที่อยู่ใน CF สามารถยับยั้งการเจริญของต้นข้าวได้

เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวลงในอาหารชักนำให้เกิดยอดหลายยอด ที่มีสารพิษในรูปของ CF ใส่ลงไปในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ทำให้ความสูงของยอดข้าวและจำนวนการแตกยอดของต้นข้าวลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญเติบโตของต้นข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ใส่สารพิษของเชื้อรา ระดับการตอบสนองของเนื้อเยื่อข้าวต่อสารพิษจะเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสารพิษที่เพิ่มขึ้น โดยที่ระดับความเข้มข้นสูง ๆ จะก่อให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อข้าว ซึ่งสังเกตได้จากเนื้อเยื่อข้าวจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตายไปในที่สุด ผลของสารพิษที่มีต่อการยับยั้งการเจริญของต้นข้าว ได้มีผู้ศึกษาและอธิบายไว้ดังนี้ Kozaka *et al.* (1985) ได้สะกัดสารพิษบริสุทธิ์จาก CF ของเชื้อรา *P.oryzae* พบว่าเป็นสารพวก glycopeptide ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 15 ชนิด เมื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษกับต้นข้าวแล้วพบว่า สารพิษนี้ไปขัดขวางทางเดินของน้ำโดยเฉพาะตรงบริเวณข้อของต้นข้าว Lebrun *et al.* (1988) รายงานไว้ว่า tenuazonic acid สามารถยับยั้งการเจริญของพืชโดยไปรบกวนขบวนการสังเคราะห์โปรตีนที่ระดับไรโบโซม

จากผลการทดลองนี้และจากผลการศึกษาที่ผ่านมา สามารถกล่าวได้ว่าอาการที่เกิดจากสารพิษเมื่อใส่สารพิษลงบนใบข้าว จะแตกต่างไปจากอาการที่เกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อข้าวในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อาการที่เกิดบนใบข้าวเมื่อหยดสารพิษโดยใช้ไมโครปิเป็ต จะก่อให้เกิดอาการแผลโรคคล้ายอาการแผลโรคใบไหม้ และอาการที่เกิดจากการฉีดพ่นสารพิษลงบนใบข้าวจะเกิดอาการเป็นจุดเซลล์ตายสีน้ำตาล (Singburaudom *et al.*, 1995; Chaudhary *et al.*, 1995) ในขณะที่อาการที่เกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อข้าวในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะแสดงออกในลักษณะของการยับยั้งการเจริญเติบโต การเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของเนื้อเยื่อ ซึ่งอาจอธิบายได้ว่าตำแหน่งที่สารพิษเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชนั้น แตกต่างกัน ทำให้การตอบสนองต่อสารพิษแตกต่างกันด้วย

จากสมมุติฐานเดียวกันตามที่กล่าวมาแล้วว่าบทบาทของสารพิษประการหนึ่ง คือ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อข้าวส่วนต่างๆ ได้ ดังนั้นสารพิษน่าจะต้องสามารถยับยั้งการพัฒนาของแคลลัสได้เช่นเดียวกัน จากผลการศึกษาได้ชี้ให้เห็นว่าแคลลัสข้าวมีการตอบสนองต่อสารพิษที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ แตกต่างกัน ระดับการตอบสนองต่อสารพิษสามารถพิจารณาได้จากขนาดของแคลลัสซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัส สีของแคลลัสซึ่งแสดงให้เห็นถึงความมีชีวิตของแคลลัส ผลการศึกษาได้แสดงให้เห็นถึงความสอดคล้องในแนวทางเดียวกัน กับการศึกษาการตอบสนองของเนื้อเยื่อข้าวกล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของสารพิษเพิ่มขึ้น ขนาดของแคลลัส สีของแคลลัสและความมีชีวิตของแคลลัสจะลดลง นอกจากนี้สารพิษยังไปมีผลต่อการยับยั้งการเกิดเป็นยอดของแคลลัสสทำให้จำนวนการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัสลดลงด้วย

จากผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อข้าวทั้งในระดับเนื้อเยื่อและแคลลัส มีการตอบสนองต่อสารพิษของเชื้อรา *P. oryzae* เมื่อเพาะเลี้ยงลงไปในอาหารที่ใส่สารพิษลงไปด้วย ระดับการตอบสนองขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของสารพิษและชนิดของเนื้อเยื่อ ซึ่งจะมีการตอบสนองต่อสารพิษแตกต่างกัน ลักษณะที่ใช้วัดระดับการตอบสนองอาจจะใช้หลายๆ ลักษณะคือ 1) อัตราการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ 2) จำนวนการเพิ่มปริมาณ หรือการแตกยอดใหม่ และ 3) การเปลี่ยนแปลงสีของเนื้อเยื่อและแคลลัส ซึ่งเป็นตัว

ชี้ถึงความมีชีวิตของเนื้อเยื่อและแคลลัสข้าวในระหว่างที่มีการเพาะเลี้ยง

เอกสารอ้างอิง

Arase, S., S. Konoshita, M. Kono, M. Nozu, E. Tanaka, and S. Nishimura. 1990. Studies on host selective infection mechanisms of *Pyricularia oryzae* Cav. (2). Production of susceptibility inducing factor (s) from germinating spores and their phytotoxicity. Annual of the Phytopathological Society of Japan 56 : 322-330.

Carlson, P.S. 1973. Methionine sulfoximine-resistance mutants of tobacco. Science 180 : 1366-1368.

Chaudhary, R.N., N. Singburaudom, T.Sommartya and E.Sarobol. 1995. Pathogenicity determination of crude extract toxin produced by the fungus *Pyricularia oryzae* Cav. the causal agent of rice blast. Kasetsart J.(Nat.Sci.) 29 : 498-507.

Chen, Q.G., F.Q. Zhang, and L.G.Yin. 1989. The differences in toxicity of culture filtrates among the isolates of *Pyricularia oryzae*. Review of Plant Pathology 71 : 491.

Iwasaki, S. H.Muro, S. Nozoe and S. Okuda. 1972. Isolation of 3, 4-dihydro-3, 4, 8-Tryhydroxy-1 (2H)-napthalenone and tenuazonic acid from *Pyricularia oryzae* Cav. Tetrahedron Letter No. 1 : 13-16.

Kozaka, T.,M. Tsuchizawa, M. Hanauf, and M. Watanabe. 1985. Phytotoxic glycopeptide inducing white head of rice plant produced by *Pyricularia oryzae*. Annuals of the Phytopathological Society of Japan 51 : 199-205.

Lebrun, M.H., L. Nicolas, M. Boutar, F.Gaudemer, S. Ranomenjanahary and A. Gaudemer. 1988. Relationships between the structure and the phytotoxicity of the fungal toxin tenuazonic acid. Phytochemistry 27 : 77-84.

Li, C.C., D. Gan and J.Xu. 1986. New progress on screening resistant mutant of rice *in vitro*. *Cited by* Z.X.Sun and K.L. Zheng. Somaclonal variation in rice, pp. 288-315. *In* Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol II. Springer-verlag, Berlin.

Ling, D.H., P.Vidhyaseharan, E.S.Borromeo, F.J.Zapata and T.W. Mew. 1985. *In vitro* screening of rice germplasm for resistance to brown spot disease using phytotoxin. Theor. Appl. Genet. 71 : 133-135.

Palit, R. and G.M.Reddy. 1990. Selection of callus resistance to *Pyricularia oryzae* and regeneration of plant in rice (*Oryza sativa*). Indian J.Exp. Biol. (abstract) 28 : 928-931.

Singburaudom, N., P. Chuntarathin and V. Rakvid-yasastra, 1995. Pathogenicity of culture filtrates produced by *Pyricularia oryzae* Cav. the causal agent of rice blast. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 29 : 16-27.

Singburaudom, N., Y. Ratapa and P. Chuntarathin. 1995. Pathotoxin Tenuazonic Acid of *Pyricularia oryzae* Cav. and its Role on Rice Blast. A paper presented at the 33rd Kasetsart University Annual conference 30 Jan.-1 Feb. 1995, Kasetsart University, Bangkok. 16 p.

Sun, Z.X. and K.L. Zheng. 1990. Somaclonal variation in rice, pp. 288-315. *In* Y.P.S. Bajaj(ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol.

II. Springer-verlag, Berlin.

Umetsu, N., J. Kaji, and K. Tamari. 1972. Investigation on the toxin produced by several blast fungus strains and isolation of tenuazonic acid as novel toxin. Agril. Biol. Chem. 36 : 859-866.

Vidhyaseharan, P., E.S. Borromeo, D.H.Ling, and T.M. Mew. 1984. Use of phytotoxin and tissue culture in evolving disease resistant rice germplasm, pp. 133-135. *In* Proc. Symp. Genet. Manipulation in crop. Beijing, China.

Wang, J.L., W.Y. Wu, and Y.Y. Wang. 1988. Preparation of crude extract of *Pyricularia oryzae* Cav. and determination of their toxicity to rice. Rice Abstract 14 : 82.

วันรับเรื่อง : 17 มี.ค. 40
วันรับตีพิมพ์ : 20 ต.ค. 40