

# การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวพันธุ์นางมอลเอส-4

## *In Vitro* Culture of Indica Rice

### (*Oryza sativa* L. cv. Nang Mol S 4)

สุรียันตร์ ฉะอุ่ม<sup>1</sup> ศรีสม สุรวัตนานนท์<sup>2</sup> กมลพรหม นามวงศ์พรหม<sup>2</sup> และ เฉลิมชัย วงศ์วัฒน์<sup>3</sup>

Suriyun Cha-um, Srisom Surawattananon, Kramolpun Namwongprom, and Chalermchai Wongwattana

#### ABSTRACT

Calli were induced from rice embryos (*Oryza sativa* L. cv. Nang Mol S 4) on Murashige and Skoog (MS) supplemented with 2.0 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in the dark condition. Proliferated calli were obtained on the MS supplemented with 2.0 mg/l 2,4-D in the same condition. Calli were regenerated on MS supplemented with 1.0 mg/l kinetin and 1.0 g/l casein hydrolysate under light condition. Roots were induced from shoots on the MS-free hormone or supplemented with indolebutyric acid (IBA) 0, 0.5, 1.0 or 2.0 mg/l. Survival of rice plants were 100 percentage after transplants under natural condition.

**Key words :** rice, *Oryza sativa* L., 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, kinetin, indolebutyric acid

#### บทคัดย่อ

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวพันธุ์นางมอลเอส 4 โดยการชักนำให้คัพเพาะสร้างแคลลัส ในอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมืด ทำการเพิ่มปริมาณแคลลัสในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในสภาพมืด และชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นข้าวบนอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ casein hydrolysate 1.0 กรัมต่อลิตร ในสภาพแสง 16 ชั่วโมง หลังจากได้ต้นข้าวแล้วชักนำให้เกิดรากในอาหารสูตร MS ที่เติม หรือไม่เติม indolebutyric acid (IBA; 0, 0.5, 1.0 หรือ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) เมื่อได้ต้นและรากอย่างสมบูรณ์ย้ายออกปลูกในกระถางที่มีดินอยู่ในสภาพน้ำขังมี

<sup>1</sup> ฝ่ายปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

Plant Tissue Culture Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok 10400, Thailand.

<sup>2</sup> ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Botany, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

<sup>3</sup> ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok 10100, Thailand.

เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์

## คำนำ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง ทุกส่วนของต้นข้าวสามารถนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้เช่น ราก ขั้ว ใบ ช่อดอก อับละอองเรณู และเมล็ด เป็นต้น (Oono, 1983; Henke *et al.*, 1978; Rout and Sarna, 1986; Nishi *et al.*, 1968) ส่วนของต้นข้าวสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962), LS (Linsmaier and Skoog, 1965) หรือ N<sub>6</sub> (Chu, 1978) ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช กลุ่มออกซิน เช่น 2,4-D (Oono, 1983) NAA (naphthaleneacetic acid) (เผด็จ และคณะ, 2536) และ 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) หรือร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช กลุ่มไซโตไคนิน เช่น 6-benzylaminopurine (BA), kinetin (Paul and Ghosh, 1984) และ 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) (Siriwadana and Narbors, 1983) หรือเติมสารสกัดจากธรรมชาติ และสารเคมีอื่นๆ เช่น น้ำมะพร้าว (สุรินทร์ และคณะ, 2537) caseinhydrolysate (Rout and Sarna, 1986) สารสกัดจากยีสต์ (Brar *et al.*, 1985) tryptophan (Henke *et al.*, 1978) และ p-fluorophenylalanine (PEP) (Rout and Sarna, 1986) เป็นต้น แต่ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่านขั้นตอนการชักนำให้เกิดแคลลัสจะประสบปัญหาการชักนำให้เกิดต้นใหม่ ซึ่งการชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นนั้นมีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น อายุของแคลลัส แคลลัสที่มีอายุนานจะมีความสามารถในการเจริญและพัฒนาไปเป็นยอดได้ดี (Henke *et al.*, 1978) การเปลี่ยนอาหาร และการตัดแบ่งชิ้นเนื้อเยื่อจะลดเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นได้เช่นเดียวกัน (Nishi *et al.*, 1968) แต่ถ้าคัดเลือกแคลลัสชนิด embryogenic ก็

สามารถเพิ่มอัตราการเกิดต้นใหม่ได้ ซึ่งแคลลัสชนิด embryogenic สามารถชักนำให้เกิดต้นได้โดยการเติม tryptophan (Siriwadana and Narbors, 1983) หรือ IAA (Vajrabhaya *et al.*, 1986) หรือ kinetin ร่วมกับ BA หรือ สารสกัดจากยีสต์ หรือ น้ำมะพร้าว (Henke *et al.*, 1978) และการพักแคลลัสไว้ในจานแก้วระยะหนึ่งเพื่อให้แคลลัสขาดน้ำก่อนการย้ายลงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น จะช่วยให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดได้ดีขึ้น (ประภา และ พรทิพย์, 2537) รวมทั้งการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มออกซินความเข้มข้นต่ำๆ ร่วมกับไซโตไคนินก็สามารถชักนำให้เกิดต้นข้าวจากแคลลัสได้ นอกจากนี้ความแตกต่างของข้าวชนิด indica และ japonica หรือแม้แต่ในข้าวชนิด indica ด้วยกัน แต่ต่างพันธุ์ (cultivar) กัน ก็มีผลต่อการชักนำให้เกิดต้นเช่นเดียวกัน (Raina *et al.*, 1987) นอกจากนี้ยังมีโอกาสเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมได้ เช่น ต้นข้าวที่ได้ขาดคลอโรฟิลล์ ความสูงของต้นลดลง อัตราการแตกกอลดลง วันออกดอกยาวนานขึ้น และจำนวนเมล็ดต่อรวงต่ำ (Oono, 1983) เป็นต้น ซึ่งความแปรปรวนทางพันธุกรรมเหล่านี้สามารถนำไปใช้คัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้

การศึกษครั้งนี้ เพื่อเป็นเทคนิคขั้นพื้นฐานในการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส การเพิ่มปริมาณแคลลัส การชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัส และการชักนำให้ต้นข้าวเกิดราก เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การชักนำให้เกิดแคลลัส

นำเมล็ดข้าวพันธุ์นางมลอศ 4 แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกแล้วนำไปฟอกฆ่าเชื้อผิวเมล็ด โดยแช่ในสารละลาย เอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 3-5 นาที ย้ายลงฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอโรกซ์ 15

เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเติมสารเปียกไป Tween-20 ปริมาตร 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 30 นาที หลังจากนั้นล้างด้วย น้ำกลั่นที่หนึ่งมาเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำเมล็ดข้าวที่ผ่านการ ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งในสภาพมืด และสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยใช้ความเข้มแสง  $38 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  จากหลอด Grolux (Sylvania GTE F 36 w/Gro fluorescent, W. Germany) ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ split plot design โดยสภาพ ที่ได้รับแสงเป็น main plot และความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น subplot จำนวน 15 ข้ำ บันทึกเปอร์เซ็นต์การ เกิดแคลลัส น้ำหนักสด และระดับคะแนนการเกิด แคลลัส (Figure 1) ลักษณะและสีของแคลลัส (Figure 2) การเพิ่มปริมาณแคลลัส

นำแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกลุ่มกันแน่นสีเหลือง (YC) จากอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด มาเพิ่มปริมาณบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้ง ในสภาพมืด และสภาพที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยใช้ความเข้มแสง  $38 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  จากหลอด Grolux ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 6 สัปดาห์

วางแผนการทดลองแบบ factorial in randomized completely block design (RCB) จำนวน 15 ข้ำ บันทึก อัตราการเจริญเติบโตของแคลลัส

Calli Growth Rate (mg) = Calli Fresh Weight at 6 weeks - Calli Fresh Weight at initiation

#### การชักนำแคลลัสให้เกิดขึ้น

นำแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกลุ่มกันแน่นสี เหลืองขาว (YWC) จากอาหารสูตรเพิ่มปริมาณ แคลลัสที่มีการเจริญ เติบโตของแคลลัสดีที่สุด มาชัก นำให้เกิดต้นบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม casein hydrolysate 0, 1, 2 และ 3 กรัม ต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 0.2, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพที่ได้รับ แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง  $38 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  จากหลอด Grolux ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ factorial in RCB จำนวน 20 ข้ำ บันทึก เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น และ จำนวนต้นต่อแคลลัส

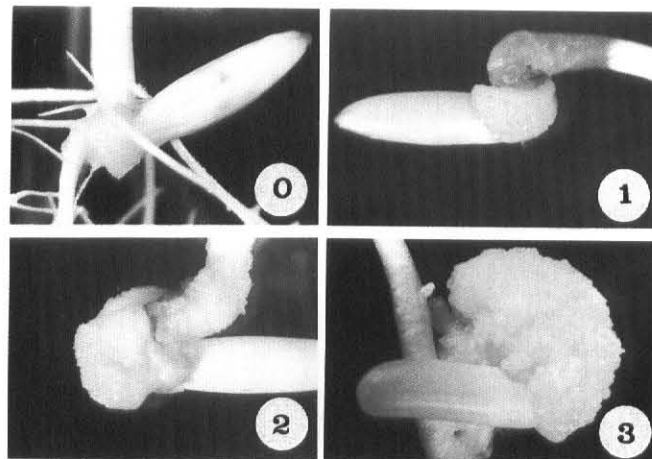
#### การชักนำต้นให้เกิดราก

นำยอดอายุ 1 เดือน มาตัดให้ต้นมีความสูง 2 เซนติเมตร เลี้ยงในอาหารสูตร MS และ  $1/2$  MS ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง  $38 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  จาก

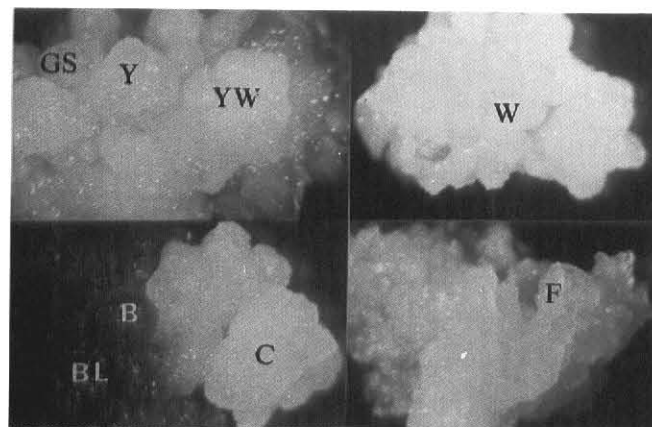
**Table 1** Effect of 2,4-D on calli induction from seeds of NMS 4.

| Conc. of<br>2,4-D<br>(mg/l) | Culture condition       |                      |        |                         |                      |         |
|-----------------------------|-------------------------|----------------------|--------|-------------------------|----------------------|---------|
|                             | Dark                    |                      |        | Light                   |                      |         |
|                             | Callus induction<br>(%) | Fresh weight<br>(mg) | Score  | Callus induction<br>(%) | Fresh weight<br>(mg) | Score   |
| 0                           | 0                       | 0 c <sup>1/</sup>    | 0.00 e | 0                       | 0 d                  | 0.00 e  |
| 1                           | 48                      | 98 ab                | 1.87 b | 48                      | 53 c                 | 1.27 cd |
| 2                           | 57                      | 133 a                | 2.20 a | 51                      | 66 c                 | 1.40 c  |
| 4                           | 51                      | 107 a                | 1.53 c | 44                      | 39 c                 | 1.07 d  |

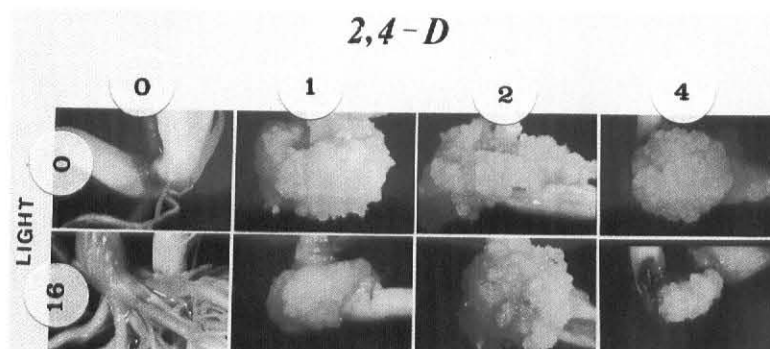
<sup>1/</sup> Values followed by same letters are not different (P<0.01)



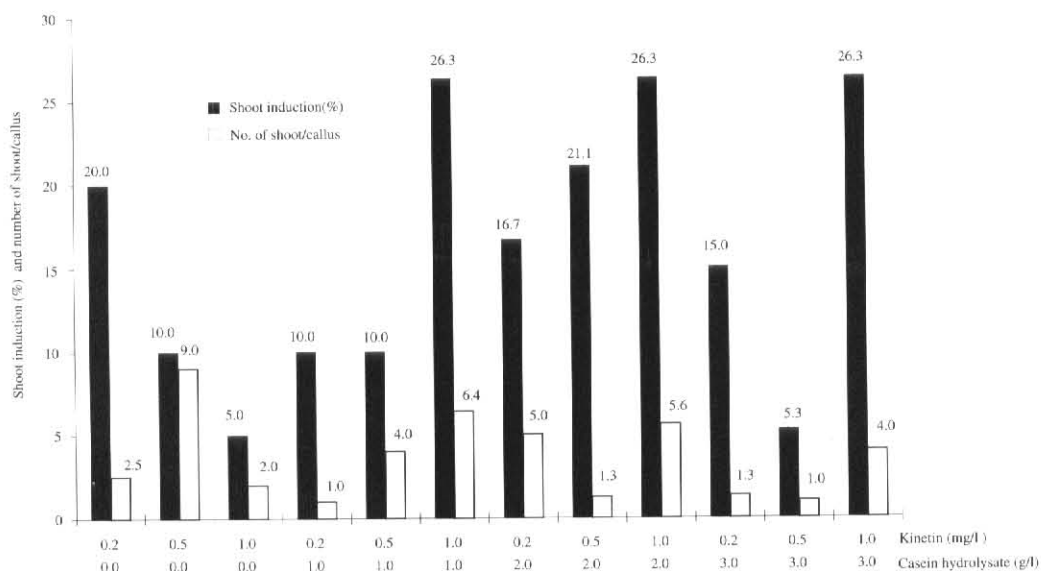
**Figure 1** Score of calli induction. (0 = no calli induction, 1 = calli diameter <0.5 cm, 2 = calli diameter 0.5-1.0 cm and 3 = calli diameter >1.0 cm)



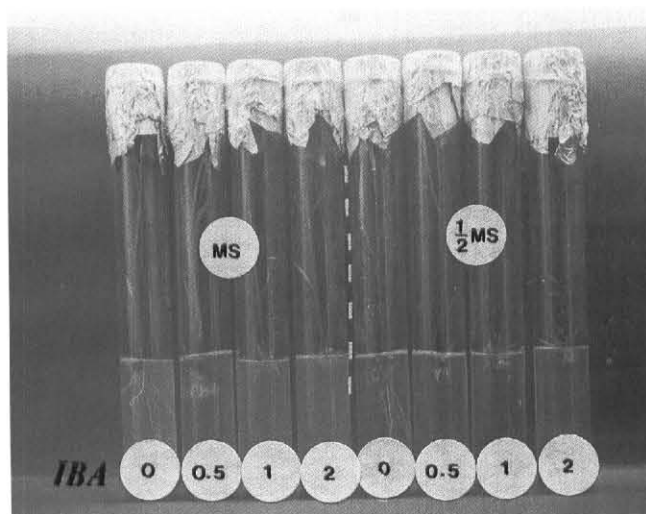
**Figure 2** Character and colour of the calli. (Y = yellow calli, B = brown calli, YW = yellow white calli, W = white calli, BL = black calli, GS = green spot, C = compact calli and F = friable calli)



**Figure 3** Effect of 2,4-D and light condition on calli induction from seeds of NMS 4.



**Figure 4** Effects of kinetin and casein hydrolysate on shoot induction of calli.



**Figure 5** Effects of culture media and IBA on root formation of regenerated shoots.

หลอด Grolux ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ factorial in RCB จำนวน 30 ซ้ำบันทึก จำนวนราก และความยาวราก การย้ายต้นข้าวออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

นำดินอ่อนที่ได้จากการชักนำยอดให้เกิดราก

ย้ายออกจากขวดล้งวันออกให้หมด แช่ในสารละลาย ป้องกันกำจัดเชื้อราเบนเลท (ดูปองด์; benomyl 40% ai) นาน 2-3 นาที ปลูกลงในกระถางที่มีดินอยู่ใน สภาพขังน้ำเป็นเวลา 1 เดือน บันทึก เปอร์เซ็นต์การ รอดชีวิต

## ผล

## การชักนำเมล็ดให้เกิดแคลลัส

เมล็ดข้าวพันธุ์นางมลอศ 4 สร้างแคลลัสได้ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ทุกระดับความเข้มข้นทั้งในสภาพมืด และสภาพที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ส่วนในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม 2,4-D จะไม่สร้างแคลลัส นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงในสภาพมืด มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสได้สูงกว่า ในสภาพที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน (Figure 3) และ แคลลัสเกิดได้ดีขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส จะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 133 มิลลิกรัมและมีระดับคะแนนการเกิดแคลลัส 2.2 คะแนนในสภาพมืด (Table 1) แคลลัสที่เกิดขึ้นในอาหารที่มี 2,4-D จะมีลักษณะเกาะกลุ่มกันแน่น (C) และมีสีเหลืองขาว (YW) (Figure 3)

## การเพิ่มปริมาณแคลลัส

แคลลัสที่ได้จากการชักนำให้เกิดแคลลัสอายุ 2 สัปดาห์ ย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ ทั้งในสภาพมืด และสภาพที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน แคลลัสสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารทุกๆ สูตร และหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์ แคลลัสมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดมีน้ำหนักสด 528 มิลลิกรัม ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมืด (Table 2) ซึ่งแคลลัสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณแคลลัสจะมีความแปรปรวนของลักษณะ โดยพบแคลลัสทั้งชนิดเกาะกันแน่น (compact callus) และชนิดเกาะกันหลวมๆ น้ำน้ำ (friable callus) และแคลลัสแต่ละก้อนจะมีสีแตกต่างกัน (Figure 3)

## การชักนำแคลลัสให้เกิดยอด

แคลลัสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ สามารถชัก

**Table 2** Effect of 2,4-D and kinetin on calli proliferation.

| Conc. of 2,4-D (mg/l) | Conc. of kinetin (mg/l) | Calli growth (mg) |       |
|-----------------------|-------------------------|-------------------|-------|
|                       |                         | Dark              | Light |
| 0.0                   | 0.0                     | 338               | 258   |
|                       | 0.5                     | 261               | 215   |
|                       | 1.0                     | 261               | 374   |
| 0.5                   | 0.0                     | 350               | 357   |
|                       | 0.5                     | 337               | 348   |
|                       | 1.0                     | 313               | 364   |
| 2.0                   | 0.0                     | 528               | 455   |
|                       | 0.5                     | 368               | 355   |
|                       | 1.0                     | 336               | 278   |

**Table 3** Effect of culture media and IBA on root formation of regenerated shoots.

| Media | Conc. of IBA (Mg./l) | No. of root/shoot   | Root lenght (cm) |
|-------|----------------------|---------------------|------------------|
| MS    | 0.0                  | 13 bc <sup>1/</sup> | 3 a              |
|       | 0.5                  | 15 b                | 2 b              |
|       | 1.0                  | 21 a                | 2 b              |
|       | 2.0                  | 23 a                | 2 b              |
|       | 0.0                  | 8 c                 | 2 b              |
| 1/2MS | 0.5                  | 11 bc               | 1 c              |
|       | 1.0                  | 11 bc               | 1 c              |
|       | 2.0                  | 10 bc               | 1 c              |

<sup>1/</sup> Values followed by same letters are not different ( $P < 0.01$ )

นำให้เกิดยอดได้ในอาหารทุกๆ สูตร และเกิดยอดได้ดีในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ casein hydrolysate 1, 2 และ 3 กรัมต่อลิตร และสามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุด 9 ยอดต่อแคลลัส 1 ก้อน ในอาหารสูตร MS ที่มี kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นได้น้อยกว่าในอาหารสูตร MS ที่เติม casein hydrolysate

1 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเกิดยอดได้ 6 ยอดต่อแคลลัส 1 ก้อน (Figure 4)

#### การชักนำให้เกิดราก

ต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสสามารถชักนำให้เกิดรากได้ในอาหารทั้ง 2 สูตร คือ MS และ  $\frac{1}{2}$  MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.05 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ในอาหารสูตร MS มีความสมบูรณ์ของยอดและรากมากกว่าในอาหารสูตร  $\frac{1}{2}$  MS โดยเกิดรากได้สูงสุด 23.29 ราก ในอาหารสูตร MS ที่เติม IBA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และรากมีความยาวสูงสุด 3 เซนติเมตร ในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม IBA และยอดจะมีจำนวนรากเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ IBA แต่จะมีความยาวรากลดลง (Table 3 และ Figure 5)

#### การย้ายต้นข้าวออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

ต้นข้าวที่ชักนำให้เกิดรากสามารถย้ายออกปลูกในกระถางที่มีดินอยู่ในสภาพน้ำขัง มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์

## วิจารณ์

เมล็ดข้าวพันธุ์นางมลอธ 4 เกิดแคลลัสได้ดีในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมืด เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Henke *et al.* (1978) และ Brar *et al.* (1985) เนื่องจาก 2,4-D ขั้วยังการเกิดยอดทำให้เซลล์ขยายขนาดและเกิดการแบ่งเซลล์จำนวนมากกลายเป็นก้อนแคลลัส (Pierik, 1987) แคลลัสที่เกิดขึ้นมาจากส่วนของ scutellum ซึ่งเกิดขึ้นพร้อมกับการงอกของต้นกล้า (Rueb *et al.*, 1994) แคลลัสที่เกิดขึ้นมีสีเหลืองและ เกาะกันแน่น (YC) มีการเจริญเติบโตดีและเป็น embryogenic callus (E) สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดี (Siriwardana and Narbos, 1983) แต่ในคัพภะที่มีความผิดปกติจะไม่เกิดแคลลัสหรือถ้าเกิดแคลลัสก็จะมีขนาดเล็ก สีเหลือง เซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆ น้ำนํ้า (YF) ซึ่งเป็น

ลักษณะของ non-embryogenic callus (NE) มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว แต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ (Wang *et al.*, 1987) ซึ่งระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิด แคลลัสขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม สารควบคุมการเจริญเติบโตที่พืชสร้างขึ้นหรือสารประกอบอื่นๆ ลักษณะทางพันธุกรรมของพืช อายุของพืช และองค์ประกอบของสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง (Pierik, 1987)

แคลลัสสามารถเจริญเติบโตได้ดี ในอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของ 2,4-D และเติม kinetin เช่นเดียวกับงานทดลองของ Brar *et al.* (1985) และ Rout and Sarna (1986) การเติม BA kinetin และน้ำมะพร้าวซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโต กลุ่มไซโตไคนินสามารถชักนำให้แคลลัสมีการเจริญเติบโต เพราะไซโตไคนินมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการแบ่งเซลล์ในระยะ S-G<sub>2</sub> ของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (Fosket, 1994) นอกจากนี้สารอื่นๆ เช่น tryptophan IAA และ สารสกัดจากยีสต์ มีผลต่อการเกิดแคลลัส ชนิด embryogenic (Siriwardana and Nabors, 1983; Vajrabahya *et al.*, 1986) เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสไปนานๆ จะทำให้แคลลัสมีลักษณะเกาะกันหลวมๆ น้ำนํ้า (F) มีสีเหลืองอมน้ำตาล (YB) ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดและรากได้ ซึ่งสามารถเพิ่มศักยภาพการชักนำให้เกิดต้นได้โดยการเปลี่ยนจากน้ำตาลซูโครสเป็นซอร์บิตอลหรือแมนนิทอล (Kishor and Reddy, 1986) โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของแคลลัสได้แก่ ความเข้มข้นของวุ้นในอาหาร อุณหภูมิ ความเป็นกรดหรือด่างของอาหาร แหล่งของไนโตรเจน ชนิดของน้ำตาล และชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งความเหมาะสมสำหรับพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป (Hendre *et al.*, 1975)

แคลลัสสามารถชักนำให้เกิดต้นโดยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สารอินทรีย์ และสารอินทรีย์ลงในอาหารเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน

ทำให้การพัฒนาแคลลัสไปเป็นต้นเพิ่มขึ้นกว่าการที่ไม่เติมสารใดๆ เลย เช่นเดียวกับงานทดลองที่เติม adenine sulfate สารสกัดจากยีสต์ น้ำมะพร้าว 2iP (isopentenyl adenine) IAA และ casein hydrolysate (Siriwardana and Nabors, 1983; Vajrabhaya et al., 1986; ประภา และ พรทิพย์, 2537) ในการทดลองครั้งนี้ใช้ kinetin ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการแบ่งเซลล์ในระยะ S-G<sub>2</sub> ของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส และการเติม casein hydrolysate ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดทำให้ในโตรเจนกับแคลลัสและพืชสามารถนำไปสร้างโปรตีนได้ช่วยในการเพิ่มจำนวนเซลล์ และทำให้ แคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นยอดได้ดีขึ้น (Dougall, 1980)

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มออกซินความเข้มข้นต่ำๆ สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อ หรือชิ้นส่วนของพืชสร้างรากได้ แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นสูงสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เช่น 2,4-D, NAA และ dicamba เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้ อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS และ  $\frac{1}{2}$  MS ที่เติม IBA (0 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถชักนำให้ยอดเกิดรากได้ และถ้าเพิ่มความเข้มข้นของ IBA จำนวนรากจะเพิ่มขึ้น แต่ความยาวรากจะลดลง เช่นเดียวกับงานทดลองอื่นๆ ในข้าว (ประภา และ พรทิพย์, 2537)

## สรุป

การเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ นางมลอศ 4 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมืด และเพิ่มปริมาณแคลลัสในอาหารและสภาพการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกัน แคลลัสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณแคลลัสสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีในอาหารสูตร MS ที่เติม casein hydrolysate 1 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 1.0

มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และสามารถชักนำให้ยอดเกิดรากในอาหารสูตร MS ที่เติม IBA 0 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วย้ายต้นข้าวออกปลูกในกระถางที่มีดินอยู่ในน้ำจาง

## คำขอบคุณ

ขอขอบคุณคณะอาจารย์ที่ปรึกษาห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาแนะนำแผนการวิจัยและ ดร.เฉลิมพล เกติมณี นักวิจัยประจำศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่กรุณาตรวจแก้เอกสาร

## เอกสารอ้างอิง

- ประภา ศรีพิจิตต์ และพรทิพย์ ชิวเศรษฐธรรม. 2537. การพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสที่เจริญมาจากคัพภะของข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105. ว. เกษตรศาสตร์ (วทย.) 28: 27 - 37.
- เผติม รติสุนทร, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล และ เลิศลักษณ์ เงินศิริ. 2536. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวพันธุ์ต่างๆ. ว. เกษตรศาสตร์ (วทย.) 27: 278-285.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เผติม รติสุนทร, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, เลิศลักษณ์ เงินศิริ และ พรณี รอดแรงบุญ. 2537. การเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในสภาพปลอดเชื้อ. ว. เกษตรศาสตร์ (วทย.) 28: 92-98.
- Brar, D.S. , D.H. Ling, and S. Yoshida. 1985. Plant regeneration from somatic cell cultures of some IR varieties of rice, pp. 169-177. In M.S. Swaminathan (ed.). Biotechnology in International

- Agricultural Research. IRRI Manila, Philippines.
- Chu, C.C. 1978. The N<sub>6</sub> medium and its application to anther culture of cereal crop, pp.43 - 50. *In* Proceeding of Symposium on Plant Tissue Culture. Science Press, Peking.
- Dougall, D.K. 1980. Nutrition and metabolism, pp. 21-50. *In* E.J. Staba (ed). Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Fosket, D.E. 1994. Plant Growth and Development: A Molecular Approach. Academic Press., San Diego, California. 580 p.
- Hendre, R.R., A.F. Mascarenhas, M. Pathak, and V. Jagannathan. 1975. Tissue cultures of maize, wheat, rice and sorghum path II growth and nutrition of callus cultures. *Indian J. Exp. Biol.* 13: 108-111.
- Henke, R.R., M.A. Mansur, and M.J. Constantin. 1978. Organogenesis and plantlet formation from organ and seedling-derived calli of rice (*Oryza sativa* L.). *Physiol. Plant.* 44: 11-14.
- Kishor, P.B.K. and G.M. Reddy. 1986. Regeneration of plants from long-term cultures of *Oryza sativa* L. *Plant Cell Rep.* 5: 391-393.
- Linsmaier, E.M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirement of tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 18: 100-127.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18: 100-127.
- Nishi, T., Y. Yamada, and E. Takahashi. 1968. Organ redifferentiation and plant restoration in rice callus. *Nature* 219: 508-509.
- Oono, K. 1983. Genetic variability in rice plants regenerated from cell culture, pp. 95-107. *In* Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. Proceeding of a Workshop Cosponsored. Science Press, Beijing, China.
- Paul, N.K. and P.D. Ghosh. 1984. Callus induction and plant regeneration from embryo tissue of rice. *International Rice. Res. Newslett.* 9: 13.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In Vitro* Culture of Higher Plant. Martinus Nijhoff Publisher, Boston. 344 p.
- Raina, S.K., P. Sathish, and K.S. Sharma. 1987. Plant regeneration from *in vitro* culture of anther and mature seeds of rice (*Oryza sativa* L.) cv. Basmati-370. *Plant Cell Rep.* 6: 43-45.
- Rout, J.R. and N.P. Sarna. 1986. High frequency plantlet regeneration in rice anther callus culture. *Rice. Genet. Newslett.* 3: 105.
- Rueb, S., M. Leneman, R.A. Schilperoort, and L.A.M. Hensgens. 1994. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 36: 259-264.
- Siriwardana, S. and M.W. Nabors. 1983. Tryptophan enhancement of somatic embryogenesis in rice. *Plant Physiol.* 73: 142-146.
- Vajrabhaya, M., O. Tunmvachkul, and T. Vajrabhaya. 1986. Effect of auxin and cytokinin on plant regeneration from rice callus. *J. Science Research Chulalongkorn University* 11: 113-115.
- Wang, M.S., F.J. Zapata, and D.C. Castro. 1987. Plant regeneration through somatic embryogenesis for mature seed and young inflorescence of wild rice (*Oryza perennis* L. Moench.). *Plant Cell Rep.* 6: 294-296.