

การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าว

Anther Culture Of Rice (*Oryza sativa* L.)

อุดม นวพานิชย์¹ และ อรดี สหวัชรินทร์²

Udom Navapanich and Oradee Sahavacharin

ABSTRACT

Anther of rice *Oryza sativa* L. spp. *indica* cultivars RD₁, RD₃, RD₅, RD₇, RD₉, and RD₁₁ at mid uninucleate microspore stage were cultured *in vitro*. The results are as follows :

1. Callus formation. Callus was formed best in N₆ medium + 2 mg/ 1 2,4-D + 3% sucrose. Increasing sucrose up to 6% decreased percentage of callus formation. Addition of 15% coconut water could not increasing percentage of callus formation. It was also found that genotype of plant has a great effect on callus formation.

2. Plantlet formation from callus. Green and albino plantlets were formed from callus in MS medium + 1 mg/1 NAA + 4 mg/1 kinetin + 3% sucrose. Using medium with 6% sucrose, the callus produced more green plantlets but less albino than those with 1.5% sucrose.

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าว (*Oryza sativa* L.ssp. *indica*) พันธุ์ กข 1, กข 3, กข 5, กข 7, กข 9 และ กข 11 ในระยะ mid uninucleate microspore เพื่อทำให้เกิดแคลลัสและต้น ผลการทดลองมีดังนี้

1. การชักนำให้เกิดแคลลัส แคลลัสจะเกิดได้ดีที่สุดเมื่อใช้อาหารวิทยาศาสตร์สูตร N₆ + 2,4-D 2mg/1 + น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าน้ำตาลซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจะลดลง ในกรณีที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่มีผลต่อการเพิ่มเปอร์เซ็นต์

การเกิดแคลลัส นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสยังขึ้นอยู่กับพันธุกรรมด้วย

2. การชักนำให้เกิดขึ้นจากแคลลัส ต้นสีเขียวและต้นเผือกเกิดได้ดีเมื่อใช้อาหารสูตร Murashige และ Skoog + NAA 1 mg/1 + kinetin 4 mg/1 + น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าแคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ จะเจริญเติบโตเป็นต้นปกติได้สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเจริญเติบโตได้ต้นเผือกสูงสุด

1 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

2 ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำนำ

เทคนิคการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรได้เริ่มทำเป็นครั้งแรกเมื่อปี 1953 โดย Tulecke ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของ *Gymnosperm* (*Ginkgo biloba*) ให้เจริญเติบโตเป็น haploid callus ได้สำเร็จ ต่อมานักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของพืชอื่น ๆ ได้สำเร็จ เช่น Konar (1963), Guha and Maheshwari (1964), Nitch (1969) และ Harn (1971) เป็นต้น สำหรับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวนั้น Niizeki และ Oono สามารถเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวได้สำเร็จเป็นครั้งแรกเมื่อปี 1968 (Niizeki and Oono, 1968) และได้มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านสนใจศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าว เพื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และต้นข้าวแบบ pollen plant ตลอดจนได้นำเทคนิคนี้ไปประยุกต์เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว เพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวที่มีลักษณะดีตามต้องการ

อุปกรณ์และวิธีการ

นำช่อดอกข้าวพันธุ์ กข 1, กข 3, กข 5, กข 7, กข 9 และ กข 11 ซึ่งอยู่ในระยะก่อนที่ช่อดอกจะโผล่พ้นออกจากกาบใบธงประมาณ 3-5 วัน มาฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารละลายคลอรีน ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้ว คัดเลือกอับละอองเกสรของข้าวที่มีละอองเกสรอยู่ในระยะ mid uninucleate microspore (ดังภาพที่ 1) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารวิทยาศาสตร์เพื่อศึกษา

1. การชักนำให้เกิดแคลลัส (callus)

1.1 อิทธิพลของน้ำตาลซูโครสต่อการเกิดแคลลัส โดยเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวสายพันธุ์ดังกล่าวบนอาหารวิทยาศาสตร์สูตร $N_6 + 2,4-D \ 2mg/l$ ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสแตก

ต่างกันคือ 0%, 1.5%, 3% และ 7% ตามลำดับ

1.2 อิทธิพลของน้ำมะพร้าวต่อการเกิดแคลลัส โดยเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวสายพันธุ์ดังกล่าวบนอาหารวิทยาศาสตร์สูตร $N_6 + 2,4-D \ 2mg/l (C_8) N_6 +$ น้ำมะพร้าว 15% (CM) และ $N_6 + 2,4-D \ 2mg/l +$ น้ำมะพร้าว 15% ($C_8 + CM$) ตามลำดับ และอาหารวิทยาศาสตร์ทั้งสามชนิดนี้ใช้น้ำตาลซูโครส 3% เท่ากันหมด

เมื่อนำอับละอองเกสรเพาะเลี้ยงบนอาหารวิทยาศาสตร์ดังข้อ 1 และ ข้อ 2 แล้ว นำไปเก็บไว้ในห้องมืด อุณหภูมิ $26 \pm 1^\circ C$ ความชื้นสัมพัทธ์ 94.5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

2. การพัฒนาของแคลลัสให้เกิดขึ้นและราก

นำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารวิทยาศาสตร์สูตรดัดแปลงของ Murashige และ Skoog (1962) + kinetin $4 mg/l + NAA \ 1mg/l$ เพื่อให้แคลลัสเติบโตและพัฒนาเป็นต้นข้าว และนำไปเก็บไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความเข้มแสงประมาณ 2,000 ลักซ์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง อุณหภูมิ $27 \pm 1^\circ C$ และมีช่วงมืดประมาณ 8 ชั่วโมง อุณหภูมิ $24 \pm 1^\circ C$ จนกระทั่งแคลลัสพัฒนาเป็นต้นข้าว (pollen plantlet)

ผล

1. การชักนำให้เกิดแคลลัส

เมื่อเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวพันธุ์ กข 1, กข 3, กข 5, กข 7, กข 9 และ กข 11 ซึ่งมีละอองเกสรของข้าวอยู่ในระยะ mid uninucleate microspore บนอาหารวิทยาศาสตร์สูตร $N_6 + 2,4-D \ 2mg/l$ ประมาณ 8-7 วัน จะพบว่าอับละอองเกสรของข้าว บางอันจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 2-8 สัปดาห์ (ภาพที่ 2) อับละอองเกสรบางอันจะแตกตามความ

ยาว ต่อมาจะเห็นกลุ่มเซลล์ก้อนเล็ก ๆ มีสีขาวหรือสีเหลืองอ่อนลักษณะค่อนข้างกลมซึ่งเรียกว่า แคลลัส (ภาพที่ 3,4) ติดอยู่กับผนังด้านในของอับละอองเกสร แต่อับละอองเกสรบางอันหลังจากเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือดำและตายไปในที่สุด

1.1 อิทธิพลของน้ำตาลซูโครสต่อการเกิดแคลลัส จะพบว่าในอาหารวิทยาศาสตร์ที่ปราศจากน้ำตาลซูโครส จะไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส แต่เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในอาหารสูตรเดียวกัน

และจะเพิ่มสูงสุดที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสสูงขึ้นอีกเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจะลดลง (ตารางที่ 1)

1.2 อิทธิพลของน้ำมะพร้าวต่อการเกิดแคลลัสพบว่าอับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์สูตร $N_6 + 2,4-D 2mg/l (C_3)$ จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด รองลงมาคืออับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์สูตร $N_6 + 2,4-D 2mg/l + CM 15 (C_3 + CM)$ และ $N_6 + CM 15\% (CM)$ ตามลำดับ (ดังตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ กข ต่าง ๆ ในอาหารสูตร N_6 ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลซูโครสต่าง ๆ กัน

ปริมาณน้ำตาล %	พันธุ์ข้าว	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส						เฉลี่ย
		กข 1	กข 3	กข 5	กข 7	กข 9	กข 11	
0		0	0	0	0	0	0	0
1.5		1.80	2	10.20	1.67	0.83	0.84	2.87
3		6.80	8.70	19.23	3.03	1.67	4.16	7.26
6		3.50	5.40	3.05	0.83	0.83	4.08	2.94
เฉลี่ย		4.03	5.37	10.83	1.84	1.11	3.03	

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ กข ต่าง ๆ ในอาหารที่มีน้ำมะพร้าว 15% หรือ / และ 2,4-D 2mg/l

อาหาร	พันธุ์ข้าว	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส						เฉลี่ย
		กข 1	กข 3	กข 5	กข 7	กข 9	กข 11	
C_3		6.80	8.70	19.23	3.03	1.67	4.16	7.26
$C_3 + CM$		2.75	2.90	8.46	0.90	1.67	3.05	3.28
CM		0	0.65	0.74	0	0	0	0.23
เฉลี่ย		3.18	4.08	9.44	1.31	1.11	2.40	

ในการชักนำให้เกิดแคลลัสนั้น นอกจากอิทธิพลของน้ำตาลซูโครสและน้ำมะพร้าวแล้วพบว่าพันธุกรรมมีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสด้วย ซึ่งจะเห็นว่าอับละองเกสรของข้าวพันธุ์ กข 5 จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด รองลงมาได้แก่อับละองเกสรของข้าวพันธุ์ กข 3, กข 1, กข 11, กข. 7 และ กข 9 ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และ 2)

2. การพัฒนาแคลลัสให้เกิดต้นและราก

เมื่อนำแคลลัสของข้าว กข. แต่ละพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์สูตรดัดแปลงของ MS + kinetin 4 mg/l + NAA 1 mg/l ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความเข้มแสง 2,000 ลักซ์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง อุณหภูมิ $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$. และมีช่วงมืด 3 ชั่วโมง อุณหภูมิ $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$. ความชื้นสัมพัทธ์ 34.5% พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 7-10 วัน แคลลัสบางอันจะเริ่มมีสีเขียวเกิดขึ้น (ภาพที่ 5) ต่อมาจะมีสีเขียวหมดทั้งแคลลัส แคลลัสบางอันจะมีสีเขียวเพียงบางส่วนและมีสีขาวบางส่วนในก้อนเดียวกัน

แต่แคลลัสบางอันจะมีสีขาวเหมือนเดิม และหลังจากเพาะเลี้ยงได้ประมาณ 2-4 สัปดาห์ จะเริ่มมีรากและยอดเกิดขึ้น (ภาพที่ 6) และต่อมาจะเจริญเติบโตกลายเป็นต้นข้าว (pollen plantlets) (ภาพที่ 7) เหมือนต้นข้าวที่เพาะจากเมล็ด แต่บางแคลลัสมีเฉพาะรากหรือยอดเกิดขึ้นเท่านั้น

ต้นข้าวที่เกิดขึ้นนี้จะพบว่าแคลลัสของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ส่วนมากจะสามารถพัฒนาให้เป็นต้นข้าวได้ ซึ่งมีทั้งต้นปกติ (green pollen plantlets) หรือต้นเผือก (albino pollen plantlets) ในแต่ละแคลลัส (ภาพที่ 7) หรือมีทั้งต้นเผือกและต้นปกติในแคลลัสเดียวกัน (ภาพที่ 8) ยกเว้นแคลลัสของข้าวพันธุ์ กข 9 และมีแนวโน้มให้เห็นว่า แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละองเกสรในอาหารวิทยาศาสตร์ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสต่ำ (1.5%) จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเผือกสูงกว่าในอาหารวิทยาศาสตร์ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสูง (6%) (ตารางที่ 3)

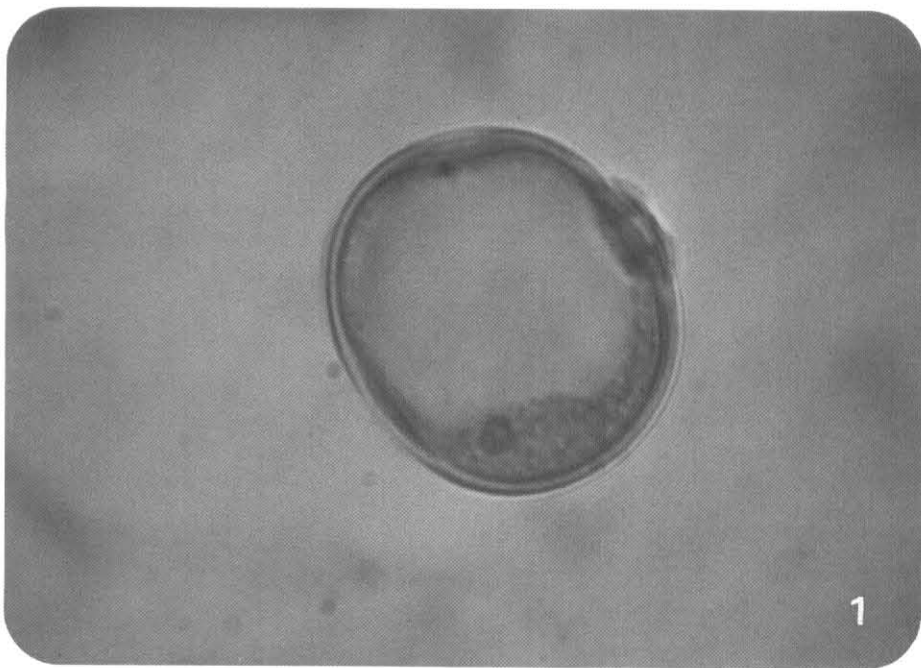
ตารางที่ 3 อิทธิพลของปริมาณน้ำตาลซูโครสต่อการเกิดต้นเผือกและต้นปกติ

พันธุ์ข้าว ปริมาณน้ำ ตาลซูโครส %	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น										เฉลี่ย				
	กข1		กข3		กข5		กข7		กข 9				กข11		
	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	
1.5	50	0	0	33.3	20	20	100	0	0	0	0	0	0	28.33	8.88
3	20	40	12.5	12.5	28	40	25	25	0	0	0	50	14.25	27.91	
6	25	50	0	100	25	50	0	100	0	0	50	50	16.66	58.33	

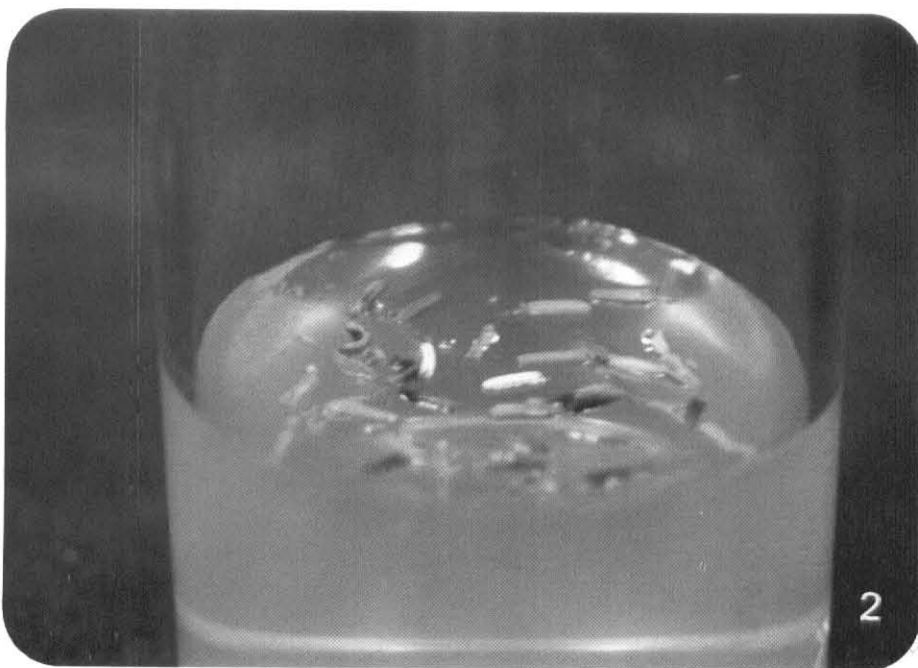
A = ต้นเผือก

G = ต้นสีเขียว

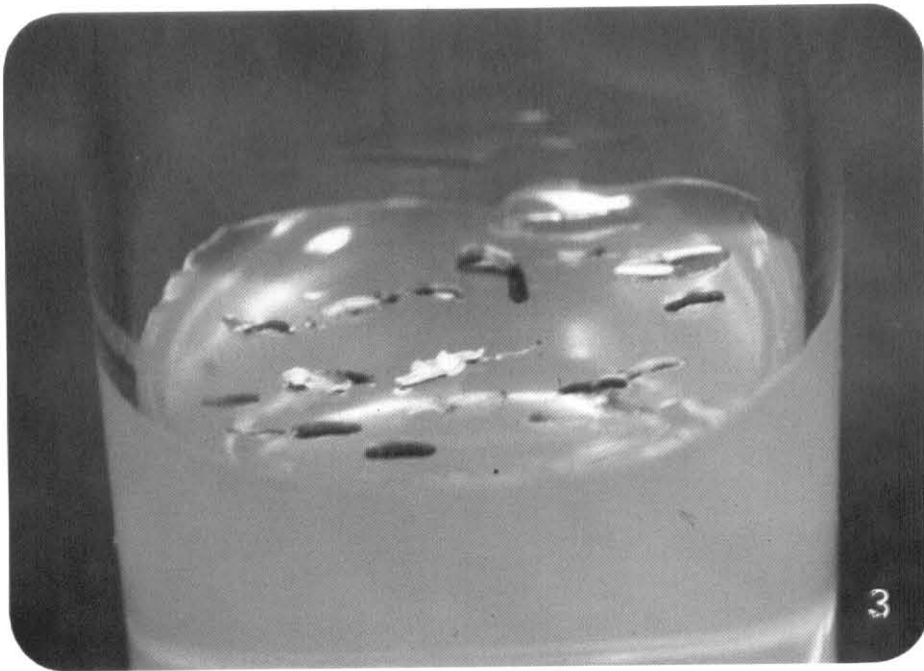
ในการพัฒนาให้เกิดเป็นต้นข้าว นั้น พบว่าแคลลัสของข้าวพันธุ์ กข1 จะสามารถพัฒนาให้เกิดเป็นต้นข้าวได้สูงสุด รองลงมาได้แก่แคลลัสของข้าวพันธุ์ กข5, กข11, กข7 และ กข3 แต่ กข9 จะไม่สามารถพัฒนาให้เป็นต้นข้าวได้ในอาหารสูตรเดียวกัน นอกจากนี้พบว่า แคลลัสของข้าวพันธุ์ กข5 จะพัฒนาให้เกิดเป็นต้นข้าวปกติและต้นเผือกได้สูงสุด



ภาพที่ 1. ละอองเกสรในระยะ mid uninucleate ซึ่งเหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าว (1500 x)



ภาพที่ 2. การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวอายุ 5 วัน ในอาหารวิทยาศาสตร์สูตร $N_6 + 2,4-D$ 2mg/l (4 x)



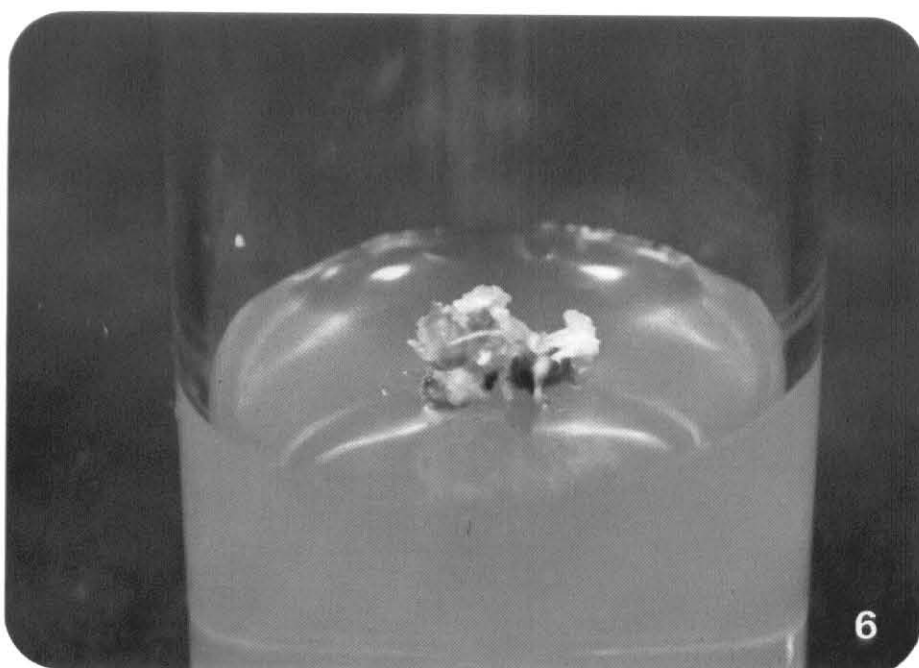
ภาพที่ 3. อับละองเกสรเริ่มแตกตามความยาวและเกิดแคลลัสบริเวณผนังด้านในของอับละองเกสร



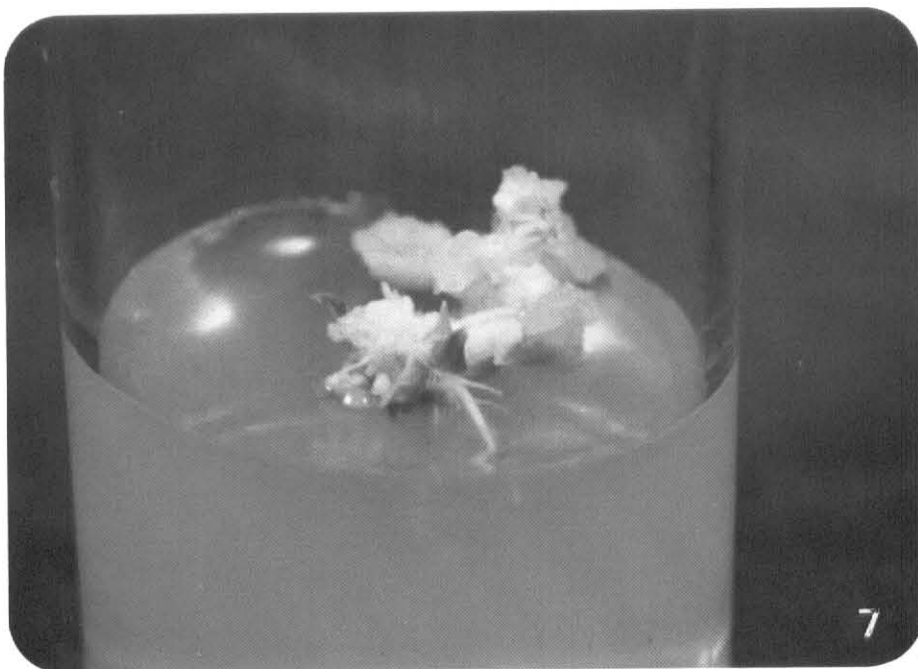
ภาพที่ 4. แคลลัสเจริญเติบโตและมีขนาดใหญ่ขึ้น (4 ×)



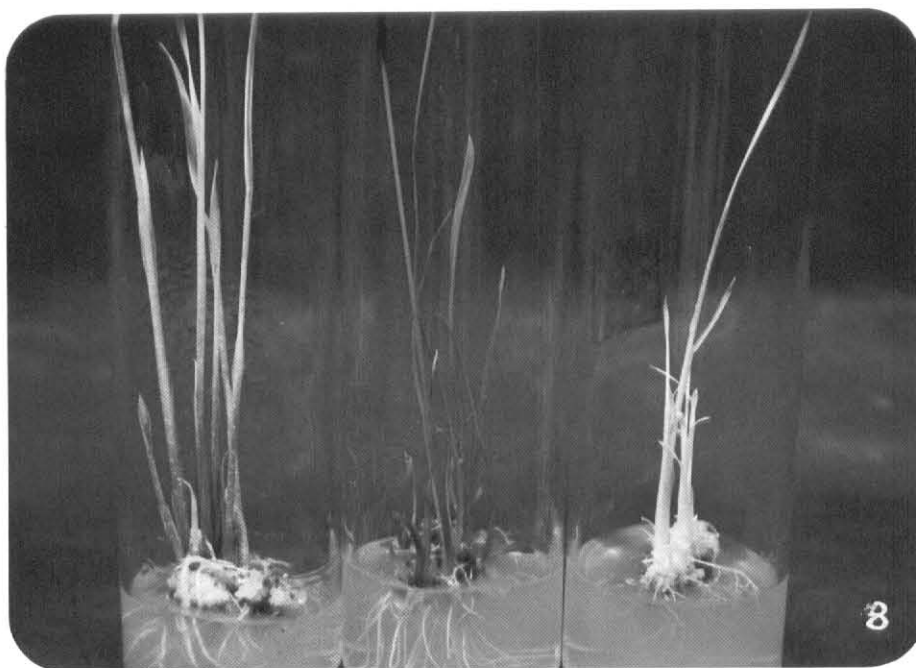
ภาพที่ 5. ระยะเริ่มเกิดคลอโรฟิลบางแห่ง หลังจากย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์ สูตรดัดแปลงของ MS + kinetin 4 mg/l + NAA 1 mg/l (4 ×)



ภาพที่ 6. ระยะเริ่มเกิดยอดสีเขียวและราก (4 ×)



ภาพที่ 7. การเกิดต้นข้าวปกติสีเขียวและต้นเหือกในแคลลัสก้อนเดียวกัน (4 x)



ภาพที่ 8. ลักษณะของต้นข้าว (pollen plantlets) เหือก (albino plantlets) และต้นปกติที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร (1 x)

ตารางที่ 4 เปอร์เซนต์การเกิดต้นและรากจากแคลลัสของข้าวพันธุ์ กข ต่าง ๆ

พันธุ์ข้าว	เปอร์เซนต์การเกิดราก	เปอร์เซนต์การเกิดต้น		
		ต้นผือก	ต้นสีเขียว	รวม
กข1	35.7	35.7	35.7	64.3*
กข3	58.8	17.6	29.4	41.2*
กข5	45.1	50.0	57.1	54.9*
กข7	50	30	20	50
กข9	100	0	0	0
กข11	45.5	9.1	45.5	54.6

* หมายถึงการเกิดต้นผือกและต้นสีเขียวในแคลลัสก้อนเดียวกัน

วิจารณ์

ในธรรมชาติเมื่ออับละอองเกสรเจริญเติบโตเต็มที่จะเริ่มแตกออก ละอองเกสรซึ่งอยู่ภายในจะสามารถแพร่กระจายออกไปโดยพาหนะต่าง ๆ เช่น น้ำ, ลม, แมลงและสัตว์ ละอองเกสรในระยะนี้จะประกอบด้วย vegetative nuclei เมื่อแพร่กระจายไปตกลงบนยอดเกสรตัวเมีย (stigma) vegetative nuclei จะเจริญเติบโตกลายเป็น pollen tube งอกออกไปในก้านชูยอดเกสรตัวเมีย (style) จนกระทั่งถึงรังไข่ (ovary) ในขณะเดียวกัน generative nuclei จะแบ่งตัวได้เป็น 2 male gametes gamete หนึ่งจะผสมกับไข่ (egg) กลายเป็น zygote ซึ่งจะเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อน (embryo) ต่อไป gamete ที่เหลือจะผสมกับ polar nuclei กลายเป็น endosperm สำหรับเลี้ยงต้นอ่อน (ประพาส, 2517) แต่เมื่อนำอับละอองเกสรมาเพาะเลี้ยงแบบ in vitro ในอาหารวิทยาศาสตร์ จะพบว่าขบวนการเจริญเติบโตและพัฒนาของละอองเกสรจะเปลี่ยนไปจากธรรมชาติอย่างชัดเจน และได้เป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่าแคลลัส (callus) ซึ่งสามารถพัฒนาให้เป็นต้นข้าวต่อไป

1. การชักนำให้เกิดแคลลัส อับละอองที่เพาะเลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์นั้นสามารถเจริญ

เติบโตและกลายเป็นแคลลัสได้ 2 กรณี กรณีแรก-nucleus ภายในละอองเกสรจะแบ่งตัวแบบ mitosis ได้เป็น vegetative nuclei มีขนาดใหญ่ซึ่งจะเจริญเติบโตกลายเป็นแคลลัสหรือต้นข้าวต่อไป และ generative nuclei มีขนาดเล็กซึ่งจะสลายตัวไปในเวลาต่อมา (Chen, 1977) กรณีที่สอง nucleus ภายในละอองเกสรจะแบ่งเซลล์แบบ mitosis ได้ 2 daughter nuclei ขนาดเท่ากัน ซึ่งจะเจริญเติบโตกลายเป็นแคลลัสและต้นข้าวต่อไป (Chang et al, 1978) แต่การเกิดแคลลัสทั้งสองกรณีนี้ จะพบว่ามีจุดกำเนิดมาจากละอองเกสรเพียงชนิดเดียวเท่านั้น และไม่มีแคลลัสที่เกิดจากส่วนอื่นของอับละอองเกสร (Chen, 1976, Guha-Mukherjee 1973, Harn, 1969, Niizeke and Oono, 1971.)

1.1 อิทธิพลของน้ำตาลซูโครสต่อการเกิดแคลลัส พบว่าน้ำตาลซูโครสเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยไปลดอิทธิพลของสารบางอย่างที่เรียกว่า wall factor ซึ่งสารนี้ถูกสร้างจากผนังอับละอองเกสร และมีผลไปยังการเจริญเติบโตและการพัฒนาของละอองเกสร (Hu et al, 1978)

1.2 อิทธิพลของน้ำมะพร้าวต่อการเกิดแคลลัส

พบว่า น้ำมะพร้าวไม่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส ซึ่งขัดแย้งกับรายงานของ Iyer and Raina (1972) ขัดแย้งนี้อาจเกิดจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าวที่ใช้ในการทดลอง

ในการชักนำให้เกิดแคลลัสนั้น นอกจากปริมาณน้ำตาลซูโครสและน้ำมะพร้าวยังพบว่ามีปัจจัยทางด้านสรีรวิทยาอื่น ๆ เช่น ความเข้มแสง, อุณหภูมิ, สารเคมีบางชนิด (Hu et al, 1978) นอกจากนี้ยังพบว่าพันธุกรรมมีผลต่อการเกิดแคลลัส ดังผลการทดลองในตารางที่ 1 และ 2 ซึ่งจะพบว่าข้าวสายพันธุ์ต่างกันจะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสต่างกันด้วย

2. การพัฒนาแคลลัสให้เกิดขึ้นและราก การเกิดขึ้นและรากของแคลลัสนั้นพบว่ารากเกิดจากเซลล์ชั้น parenchyma ที่อยู่รอบ ๆ tracheary element เปลี่ยนแปลงเป็นเนื้อเยื่อเจริญ และต่อมากลายเป็น root primordia ซึ่งจะเจริญกลายเป็นรากต่อไป ส่วนของยอดจะเกิดจากเซลล์ parenchyma ที่ล้อมรอบอยู่บริเวณผิวของแคลลัสประมาณ 1-2 ชั้น เปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อเจริญ ต่อมากลายเป็น bud primordia และ shoot apex ซึ่งจะทำหน้าที่สร้าง leaf primordia ต่อไป หลังจากเกิดรากและยอดแล้วก็จะเจริญเติบโตกลายเป็นต้นอ่อนเหมือนต้นข้าวที่เพาะจากเมล็ดต่อไป

ต้นข้าวที่เกิดขึ้นพบว่ามีทั้งต้นเผือกหรือต้นสีเขียวเพียงอย่างเดียวหนึ่งในแต่ละแคลลัส ซึ่งแสดงว่ามีจุดกำเนิดมาจากละอองเกสรเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบต้นเผือกและต้นสีเขียวในแคลลัสก้อนเดียวกัน ซึ่งแสดงว่าน่าจะมีจุดกำเนิดมาจากละอองเกสรมากกว่าหนึ่งละอองเกสร สาเหตุของการเกิดต้นเผือกนั้นพบว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสในอาหารวิทยาศาสตร์ที่ชักนำให้เกิดแคลลัสมีผลต่อการเกิดต้นเผือกดังตารางที่ 3 นอกจากข้าวแล้ว ในยาสูบและข้าวบาร์เลย์ก็พบว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสมีผลต่อการเกิดต้นเผือกเช่นเดียวกัน (Clapham, 1971, Sharp et al, 1971) แต่ Wang et al (1978) ได้คัดค้านผลการทดลองนี้และกล่าวว่าละอองเกสรที่มี homozygosity สูงจะสามารถชักนำให้

เกิดต้นเผือกได้ง่ายกว่าละอองเกสรที่มี homozygosity ต่ำ นอกจากนี้ยังกล่าวว่าสาเหตุของการเกิดต้นเผือกนั้นไม่ได้มีผลมาจาก recessive albino gene แต่เกิดจากการขาด RNA และเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการสร้างคลอโรฟิล (Wang et al, 1978) แสดงว่าพันธุกรรมมีผลต่อการเกิดต้นเผือก และการเกิดต้นเผือกนั้นไม่ได้มีผลมาจากการขาด gene ที่มีหน้าที่สร้าง RNA และเอนไซม์ดังกล่าว แต่อาจจะเป็นเพราะว่าในกระบวนการสร้าง RNA หรือเอนไซม์ดังกล่าวถูกยับยั้งซึ่งมีผลต่อการสร้างคลอโรฟิล ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าความสัมพันธ์ระหว่าง physiological factor และ genetic factor มีผลต่อการเกิดต้นเผือกโดย physiological factor เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่มีผลทำให้ genetic factor คือ gene ซึ่งทำหน้าที่ในการเร่ง (regulate) ขบวนการสร้าง RNA ทำงานแตกต่างกันในบางกรณี physiological factor มีผลทำให้ gene ทำงานได้ตามปกติ ก็จะได้ต้นข้าวที่มีสีเขียว แต่บางกรณี physiological factor มีผลไปยับยั้งการทำงานของ gene ขบวนการสร้าง RNA และเอนไซม์ก็จะถูกยับยั้งด้วย จึงไม่มีการสร้างคลอโรฟิล ดังนั้นจึงได้ต้นข้าวเผือกเกิดขึ้น.

สรุป

ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น อายุของอับเรณู พันธุกรรม ปริมาณน้ำตาลในอาหารที่เพาะเลี้ยงอับเรณู อุณหภูมิ เป็นต้น จากการทดลองนี้จะสรุปได้ว่า อับเรณูจากข้าวพันธุ์ กข 5 ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร $N_6 + 2,4-D 1mg/l$ จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด แคลลัสที่ได้จากข้าวพันธุ์ กข 1 จะสามารถเพาะเลี้ยงบน $MS + NAA 1 mg/l + kinetin 4 mg/l$ ได้เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นและรากสูงสุด แต่แคลลัสที่ได้จากข้าวพันธุ์ กข 5 จะให้เปอร์เซ็นต์ต้นปกติสีเขียวและต้นเผือกสูงสุด

เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของอับเรณูจากข้าวพันธุ์ กข — ที่ใช้ในการทดลองจะสูงขึ้นตามปริมาณของน้ำตาล และเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

จะสูงสุดเมื่อใช้น้ำตาลปริมาณ 3% แต่ถ้าใช้ปริมาณ น้ำตาลสูงกว่านี้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจะลดลง ส่วนน้ำมะพร้าวไม่มีผลต่อการเกิดแคลลัส ทั้งในกรณีที่ใช้เพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับ 2,4-D 2 mg/1 นอกจากนี้ยังพบว่า แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู ในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาล ซูโครส 6% จะสามารถทำให้เป็นต้นและรากได้มากกว่าอับเรณูที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่น้ำตาลปริมาณ 1.5% และ 3%

เทคนิคของการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าว มีประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ เพื่อใช้ในการ ปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยนำไปเพาะเลี้ยงบน selective medium ซึ่งอาจจะใช้ mutagen, antibiotic, analogue amino acid, heavy metal, toxin ของรา herbicide หรือการ เพิ่ม osmotic pressure เพื่อทำการเลือก haploid mutant ที่ต้องการและสามารถสร้าง mutant เหล่านี้ให้กลายเป็น homozygous diploid โดยการใช้ colchicine

นอกจากนี้จะพบว่าระยะเวลาในการปรับ ประปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ได้ homozygous diploid ที่มีลักษณะ ตามต้องการนั้นจะเร็วกว่าการปรับปรุงพันธุ์ พืชโดยวิธีผสมตัวเอง ซึ่งต้องใช้เวลาประมาณ 5-7ชั่วอายุและต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูนี้ สามารถนำมาคัดเลือกต้นที่มีลักษณะที่ต้องการได้ ง่ายขึ้น

จากผลการทดลองครั้งนี้ควรจะศึกษาการ เพาะเลี้ยงอับเรณูจากพันธุ์ข้าวของไทยในต้นต่าง ๆ ให้มากขึ้น เพื่อนำไปใช้ประยุกต์ในการปรับ ประปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป และควรเพาะเลี้ยงอับเรณูจาก พันธุ์ข้าวลูกผสมของไทย โดยใช้ข้าวพันธุ์ กข 5 หรือ กข 1 เป็นแม่พันธุ์หรือพ่อพันธุ์ คาดว่าจะได้ เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสหรือต้นปกติสูงกว่าการ ใช้ข้าวพันธุ์ กข 11, กข 3, กข 7 และ กข 9 เป็น พ่อพันธุ์หรือแม่พันธุ์

เอกสารอ้างอิง

ประพาส วีระแพทย์ 2517. ความรู้เรื่องข้าว, งาน เผยแพร่และบริการทางวิทยาการ กอง วิทยาการ กรมวิชาการเกษตร.

Chang, H.Y., T.M.Liu, and Y.L.Wang. 1978.

A preliminary observation on histogene sis and organogenesis of the *in vitro* development from rice microspore into plantlets. *Science press* : 125-132.

Chen, C.C. 1977. *In vitro* development of plants from microspore of rice. *In vitro.*- 13 : 484-489.

Chen, C.C., and M.H.Lin. 1976. Induction of rice plantlets from anther culture. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 17 : 18-24.

Chu, C.C., C.C.Wang, and C.S.Sun. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through compa rative on the nitrogen source. *Scientia Sinica.* 18: 659-668.

Clapham, D. 1971. *In vitro* development of callus from the pollen of *Lolium* and *Hordeum*. *Z.Pflzucht.* 65: 285-292.

Guha-Mukherjee, S. 1973. Genotypic differen- ces in the *in vitro* formation of emb ryoids from rice pollen. *J. Exp. Bot.* 24 : 139-144.

Guha, S., and S.C.Maheshwari. 1964. *In vitro* production of embryos from anther of *Datura*. *Nature.* 204 : 497.

Harn, C. 1969. Studies on the anther culture of rice. *Korean J. Breed.* 1-11.

Hu, C., S.C. Huang, C.P.Ho, H.C.Liang, C.C.Chuang, and L.P.Peng. 1978. On the inductive conditions of rice pollen plantlets in anther culture. *Science. Volume No.* 87-95.

Konar, R.N. 1963. *A haploid tissue from pollen of Ephedra foliata* (Boiss). *Phyto morphology*, 13: 170-174.

Iyer, R.D. and S.K.Raina. 1972. The early ontogeny of embryoids and callus from pollen and subsequent organogenesis

- in anther culture of **Datura metel** and rice. *Planta* 104 : 146-156.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15 : 473-497.
- Niizeki, H., and K. Oono. 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proc. Japan Acad.* 44 : 554-557.
- Niizeki, H., and K. Oono. 1971. Rice plants obtained by anther culture. In : *Les Cultures de Tissue de plants*. Colloques Internationaux du C.N.R.S. (Paris) 193 : 251-257.
- Nitsch, J.P. 1969. Experimental And regeneration in **Nicotiana**. *Phytomorphology*. 19 : 389-404.
- Sharp, W.R., D.K. Dougall, and E.F. Paddock. 1971. Plantlets and callus from immature pollen grains of **Nicotiana** and **Lycopersicon**. *Bull. Torrey Bot. Club.* 98 : 219-222.
- Wang, CC., CS. Sun, C.C., Chu, and S.C. Wo. 1978. Studies on the albino pollen plantlets of rice *Scientia Sinica* 21 : 149-160
-