ว.เกษตรศาสตร์(วิทย.) 18 :72-75 (2527)

การศึกษาเบื้องต้นของการคัดเลือกข้าวทนเค็ม โดยวิธีเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

Preliminary Study on Salt Tolerant Selection by Anther Culture Method in Rice, *Oryza sativa* L.

สนธิชัย จันทร์เปรม[1/] ชัยฤกษ์ มณีพงษ์[1] และ อรดี สหวัชรินทร์[2/]

Sonthichai Chantprem, Chairerg Maneephong and Oradee Sahawacharin

ABSTRACT

Varietal response of rice anther culture was observed. Hohm Mali 105 showed best development of callus (13.27%), the second was Khoa Ta Hang 17 (12.63%), Leung Yai 14.8 was the third (9.80%), and the fourth IR 4595-4-1-13 (6.46%). The callus selection on differently selective media with salt solution showed no response on the tolerance. Some could grow in media with 1.5% NaCl but could not regenerate into plant.

บทคัดย่อ

ข้าวแต่ละพันธุ์มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรต่างกัน พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงสูงที่สุด (13.27%) รองลงมาคือ ขาวตาแห้ง 17 (12.63%) เหลืองใหญ่ 148 (9.80%) และ IR 4595-4-1-13 (6.46%) ส่วนการคัดเลือกแคลลัสที่ทนทานต่อเกลือแกงโดยใช้ selective media พบว่าพันธุ์ต่าง ๆ มีระดับความต้านทานไม่แตกต่างกันนัก และแคลลัสบางอันสามารถเจริญได้เล็กน้อยบนอาหารที่มีเกลือ 1.5% แต่ไม่มีแคลลัสก้อนใดเลยที่สามารถเลี้ยงให้เกิดเป็นต้นได้

คำนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอันดับหนึ่งของประเทศ แต่การผลิตข้าวในบางพื้นที่ให้ผลผลิตต่อไร่ต่ำมาก โดยเฉพาะในบริเวณที่มีปัญหาเกี่ยวกับดินที่มีคุณสมบัติไม่เหมาะสม เช่น พื้นที่ที่มีดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีพื้นที่เป็นดินเค็มจัด เค็มปานกลางและเค็มน้อย รวมกันถึง 17.8 ล้านไร่ หรือ 16.37% ของพื้นที่ทั้งภาค พื้นที่เหล่านี้ผลิตข้าวได้เฉลี่ยเพียง 15 ถังต่อไร่เท่านั้น (กรมพัฒนาที่ดิน, 2524) ฉะนั้นการหาพันธุ์ทนทานต่อดินเค็มจึงเป็นวิธีแก้ปัญหาได้ทางหนึ่ง โดยทั่วไปวิธีการคัดเลือกพันธุ์ทำได้โดยปลูกข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ลงบนพื้นที่ที่มีความเค็มในระดับต่าง ๆ อีกวิธีหนึ่งซึ่งเริ่มใช้กันมาก คือการคัดเลือกในระดับเซลล์ โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลงบนอาหารที่ใส่เกลือในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แล้วชักนำให้เกิดเป็นต้นในที่สุด

Oono (1977) กล่าวว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในระหว่างการเพาะเลี้ยง ถ้าความถี่ของการกลายพันธุ์ถูกชักนำให้เกิดมากขึ้นก็เป็นทางที่เป็นไปได้ที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของการทำ "test tube breeding" ร่วมกับการทำ "haploid breeding" โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรและถ้าความทนทานต่อเกลือสามารถเพิ่มขึ้นได้โดยการเกิดการกลายพันธุ์และมีการคัดเลือกในระดับเซลล์เป็นจำนวนล้าน ๆ

[1/] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[2/] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เซลล์แล้วก็สามารถคัดเลือกเซลล์ที่ทนทานต่อเกลือ แม้ว่าอัตราการเกิดการกลายพันธุ์จะเกิดเพียง 10^{-6} ต่อยีนเท่านั้น นั่นคือประสิทธิภาพของการคัดเลือกจะเกิดขึ้นและเป็นไปได้โดยการที่ culture ที่มีอยู่ได้รับ selection pressure ที่เพียงพอ (IRRI, 1975)

Kucherenko (1979) ทดลองคัดเลือกเซลล์ที่ทนทานต่อเกลือจากแคลลัสของข้าว 2 พันธุ์ คือ Spalchik เป็นพันธุ์ทนเค็ม และพันธุ์ VNIIR 3819 เป็นพันธุ์ไม่ทนเค็ม ใน selective media ที่มีเกลือ 0.2, 0.4, 1.0 และ 3.0% พบว่าเมื่อ subculture ลงใน 1% และ 3% การเจริญของแคลลัสจะลดลง และเมื่อ subcalture ครั้งที่ 2 แคลลัสที่เลี้ยงใน 3% จะตาย และสรุปว่าการตอบสนองต่อเกลือของพันธุ์ที่อ่อนแอและทนทานจะไม่มีความสัมพันธ์กันในแง่ระดับของความต้านทานเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างสภาพทั้งต้นและสภาพ **in vitro** นอกจากนี้ได้มีการทดลองคัดเลือกแคลลัสของข้าวที่ทนทานต่อเกลือ โดยวิธีคล้ายคลึงกับ Kucherenko (1979) โดยใช้แคลลัสที่ได้จากการเพาะเมล็ด พบว่าโดยทั่วไปแคลลัสของข้าวสามารถทนทานและเจริญได้จนสามารถเกิด regeneration ขึ้นที่ความเค็ม 1.5% (Yasuda *et al.*, 1982) และบางครั้งเกิดการกลายพันธุ์ขึ้นในต้นชั่วที่ 1 (R_1 plant) และ R_2 plant เช่น ลักษณะเป็นหมัน ความสูง การเกิดต้นเผือก ความผิดปกติของโครโมโซม ฯลฯ (Suenaga *et al.*, 1982) นอกจากใช้เกลือใส่ลงในอาหารเมื่อคัดเลือกข้าวทนทานต่อความเค็มแล้ว Yano *et al.* (1982) ได้ทดลองใช้น้ำทะเลแทนเพื่อให้ได้ข้าวที่สามารถทนต่อเกลือชนิดอื่น ๆ นอกเหนือไปจาก NaCl อย่างเดียว และสามารถคัดเลือกแคลลัสที่ทนทานต่อน้ำทะเลที่ระดับ 37.5% (v/v) ได้ นอกจากข้าวก็ยังทำในพืชอื่น ๆ เช่น อ้อย (Liu and Yeh, 1982) และยาสูบ (Nabors *et al.*, 1975) เป็นต้น

การทดลองที่ได้มีผู้ศึกษาไปนั้นใช้แคลลัสที่ได้จากส่วนของเซลล์ร่างกายทั้งสิ้น ฉะนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาความเหมาะสมของวิธีการคัดข้าวทนเค็มโดยใช้แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร และเพื่อหาเปอร์เซ็นต์การตอบสนองของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเพื่อหาพันธุ์ที่เหมาะสมในการคัดเลือกต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พันธุ์ข้าว ได้แก่ 1) ขาวดอกมะลิ 105 2) เหลืองใหญ่ 145 3) ขาวตาแห้ง 17 4) เหลืองประทิว 123 5) กข. 23 6) IR 36 7) IR 4630-22-2-5-1 8) IR 4595-4-1-13 9) IR 4462-22-2-10 10) IR 4636-22-22-2-5-1-3 11) IR 4630-22-2-17

2. สารเคมีเพื่อใช้เตรียมอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส สูตร N_6 (Chu *et al.*, 1975) ผสมด้วย 2, 4-D 2 mg/l และอาหารสำหรับชักนำให้เกิดต้นสูตร Murashige and Skoog (Murashige and Skoog, 1962) ผสมด้วย NAA 1 mg/l และ kinetin 4 mg/l และ selective media ใช้สูตรเดียวกับสูตรชักนำให้เกิดต้นโดยผสมเกลือ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งความร้อนที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

วิธีการ

1. **การชักนำให้เกิดแคลลัส** นำช่อดอกข้าวที่ละอองเกสรอยู่ในระยะ uninucleate แช่ใน ethylalcohol 70% นาน 5 วินาที แล้วแยกเอาอับละอองเกสรออกจากแต่ละดอก นำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 แล้วเพาะในที่มืดสนิท อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 4–8 สัปดาห์ จึงจะเกิดแคลลัสขึ้น

2. **การคัดเลือกแคลลัสทนทานเกลือ** subculture callus ที่มีขนาดประมาณ 0.5–0.8 เซนติเมตรลงใน selective media ที่มีเกลือ 5 ระดับ คือ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% เพาะในที่มีแสง 2,000 lux 16 ชั่วโมงต่อวัน และ subculture อีกครั้งลงในอาหารที่มีเกลือในระดับเดิมหลังจากครั้งแรก 1 เดือน หลังจากนั้นอีก 2 เดือนจึง subculture ลงสู่อาหารไร้เกลือเพื่อชักนำให้เกิดต้น

ผล

การตอบสนองของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ต่อการเพาะเลี้ยง

พันธุ์	จำนวนอับละอองเกสร	จำนวนแคลลัสที่ได้	%การเกิดแคลลัส
ขาวดอกมะลิ 105	324	43	13.27
เหลืองใหญ่ 148	102	10	9.80
ขาวตาแห้ง 17	198	25	12.63
เหลืองประทิว 123	216	2	0.93
กข. 23	496	2	0.42
IR 36	282	1	0.36
IR 4630-22-2-5-1	378	15	3.97
IR 4630-22-2-17	198	5	2.53
IR 4630-22-22-2-5-1-3	156	6	3.85
IR 4595-4-1-13	356	23	6.46
IR 4462-22-2-10	234	11	4.70

การคัดเลือกแคลลัสที่ทนทานต่อเกลือนั้นได้ตัดข้าวพันธุ์อื่น ๆ ที่ให้จำนวนแคลลัสน้อย ๆ ออกไป คงเหลือเพียงที่ได้จากพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เหลืองใหญ่ 148 และขาวตาแห้ง 17 เท่านั้น เมื่อ subculture ลง selective media แคลลัสทุกพันธุ์มีการเจริญลดลง เมื่อปริมาณเกลือเพิ่มขึ้น แต่การเจริญของแคลลัสบนอาหารที่มีเกลือ 0% และ 0.5% ไม่แตกต่างกันมากนัก และเมื่อ subculture อีกครั้งในเวลา 1 เดือนต่อมา แคลลัสที่เลี้ยงบนเกลือ 2% ตายหมด ส่วนที่ 1.5% พบว่ามีบางแคลลัสของพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่เจริญได้เล็กน้อย แต่เมื่อย้ายแคลลัสทั้งหมดไปยังอาหารที่ไม่มีเกลือเพื่อชักนำให้เกิดต้น ไม่มีแคลลัสใดเลยที่เกิด regeneration เป็นต้นได้

วิจารณ์และสรุป

ข้าวพันธุ์ต่าง ๆ มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรต่างกัน Guha (1973) กล่าวว่า ยีโนไทพ์เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส การศึกษาในครั้งนี้ยืนยันได้ว่ายีโนไทพ์มีผลจริงในการเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีส่วนกำหนดความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงละอองเกสรของข้าว ในการทดลองครั้งนี้ข้าวพันธุ์พื้นเมืองของไทยมีการตอบสนองดีกว่าข้าวพันธุ์ กข. 23 และพันธุ์หรือสายพันธุ์จาก IRRI โดยที่พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ตอบสนองมากที่สุด คือ 13.27% รองลงมาคือ ขาวตาแห้ง (12.63%) และเหลืองใหญ่ 148 (9.80%)

ปัญหาที่ประสบคือ การไม่สามารถบังคับให้เกิด regeneration ได้ อาจเกิดขึ้นเพราะแคลลัสมีอายุมากเกินไป สาเหตุเนื่องจากทำการศึกษาพร้อม ๆ กันหลายพันธุ์ ทำให้ไม่สามารถเพาะเลี้ยงละอองเกสรของแต่ละพันธุ์ให้ได้จำนวนมาก ๆ ได้ ผลคือแคลลัสที่ได้น้อยเกินไป จึงใช้วิธี subculture ของปริมาณแคลลัสให้มากขึ้น จนพอแก่ความต้องการ จึงเริ่มทำการคัดเลือก ซึ่งการขยายแคลลัสใช้เวลาประมาณ 2 เดือน และการคัดเลือกใช้เวลาอีก 2 เดือน ฉะนั้นประมาณได้ว่าแคลลัสที่รอดชีวิตมาจะมีอายุอย่างน้อย 4 เดือน ซึ่งทำให้ศักยภาพในการเจริญเป็นต้นหมดไป ตามปกติแคลลัสที่มีอายุเกิน 50 วัน เกือบจะไม่สามารถให้ต้นได้เลย (Wang *et al.*, 1974 อ้างโดย Chu, 1980) การเสื่อมความสามารถในการให้ต้นอย่างรวดเร็วของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวนี้ทำให้ไม่สามารถคัดเลือกบน selective media ได้นาน วิธีแก้ไขที่อาจทำได้จึงลดจำนวนพันธุ์ที่ศึกษาให้น้อยลงแต่เพิ่มจำนวนอับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงให้มากที่สุดที่จะทำได้ เพื่อให้ได้แคลลัสเพียงพอโดยไม่ต้องขยายจำนวนในภายหลัง อีกประการหนึ่งคือ การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเมื่อไม่สามารถให้ selection pressure ได้ในระยะเวลานาน ๆ และเพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในลักษณะที่ต้องการได้ การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีน่าจะช่วยให้การคัดเลือกได้ผลดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. 2524. รายงานประจำปี 2524. กรมพัฒนาที่ดิน, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์การเกษตร, กรุงเทพฯ.

Chu, C.C. 1980. Anther culture of rice and its significance in distant hybridization, pp. 47-54. *In* Rice Tissue Culture Planning Conference. International Rice Research Institute. Los Banos, Philippines.

Chu, C.C., Wang and C.S. Sun. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative on the nitrogen source. Sci. Sin. 18:659-668.

Guha, S. 1973. Genotypic differences in the *in vitro* formation of embryoids from rice pollen. J. of Exp. Bot. 24(78) : 139-144.

IRRI. 1975. Tolerance to salinity, pp. 164-166. *In* Annual Report (1975). International Rice Research Institute. Los Banos, Philippines.

Kucherenko, L.A. 1980. Tissue culture in rice improvement: experience in the USSR, pp. 93-102. *In* Innovative approaches to rice breeding. Selected papers from the 1979. International Research Conference. International Rice Research Institute. Los Banos, Philippines.

Liu, M.C. and H.-S. Yeh. 1982. Selection of a NaCl tolerant line through stepwise salinized sugarcane cell culture, pp. 477-478. *In* proc 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Culture.

Murashige, T. and F. Skoog. 1982. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. plant. 15:473-497.

Nobors, M.W., A. Daniels, L. Nakolny and C. Brown. 1975. Sodium chloride tolerant lines of tobacco cell. Plant Science Letters. 4:155-159.

Oono, K. 1977. Test tube breeding of rice by tissue culture, pp. 109-124. *In* Tropical Agriculture Research Series No. 11. Symposium on Methods of Crop Breeding. Oct. 1977.

Suenaga, K., E.M. Abiryo and S. Yoshida. 1982. Seed-derived callus culture for selecting salt-tolerant rice. Part I. Callus induction, plant regeneration and variations in visible traits. IRRI Research Paper Series 79. International Rice Research Institute. Los Banos, Philippines. 11 p.

Yano, S., M. Ogawa and Y. Yamada. 1982. Plant formation from selected rice cells resistant to salts. pp. 495-496. *In* Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Culture.

Yasuda, T., H Maegawa and T. Yamaguchi. 1982. The selection for the tolerance of mineral stress in tropical plant tissue culture, pp. 491-492. *In* Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Culture.