

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยการเพาะเลี้ยงอับเรณูข้าวลูกผสม ระหว่าง เลมอนท์และขาวดอกมะลิ 105

Rice Improvement by Anther Culture of F₁ Hybrid between Lemont and Khao Dawk Mali 105

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ¹ รัตน์ดา เลิศวิชัย¹ เพลิม ระติสุนทร¹ เบญจมาศ ศิลาชัย²
สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช¹ สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล¹ เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา¹
เลิศลักษณ์ เงินศิริ¹ และกาญจนา กล้าแข็ง³

P. Pongtongkam, R. Lertvichai, P. Ratisoontorn, B. Silayoi,
S. Apisittivanich, S. Peyachoknagul, S. Suputtitada,
L. Ngernsiri, and K. Klakhaeng

ABSTRACT

The panicles of the F₁ hybrid rice (Lemont/Khao Dawk Mali 105) of which the distance between the auricles of the flag leaf and the subtending leaf was 6-12 cm were selected for anther culture. These spikelets had anthers bearing the mid-uninucleate microspores. High percentage of callus formation was obtained when anthers were cultured on the N₆ medium supplemented with 500mg/l casein hydrolysate, 2 mg/l NAA, 1 mg/l kinetin and 50 g/l maltose. The calli could regenerate into plantlets at high frequency when cultured on the MS medium containing 15% coconut water, 300 mg/l casein hydrolysate, 20 g/l sucrose, 2mg/l BAP and 0.2 mg/l NAA. About forty percent and forty-two percent of double haploid plants were obtained when the regenerants were transferred on the MS medium containing 1 g/l yeast extract, 15% coconut water, 3 mg/l BAP and 0.01% colchicine for 3 and 5 days, respectively.

Key words : rice, anther culture, *Oryza sativa* L.

¹ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

² ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

³ ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี คลองหลวง ปทุมธานี

Pathumtani Rice Research Center, Klong Luang, Pathumtani 12120, Thailand.

บทคัดย่อ

ช่อดอกของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (เลมอนท์/ข้าวดอกมะลิ 105) ที่มีระยะห่างระหว่างข้อใบตรงกับข้อที่ถัดลงมา 6-12 ซม. เป็นช่อดอกที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงอับเรณู เพราะประกอบด้วยอับเรณูที่มีไมโครสปอร์อยู่ในระยะที่มี 1 นิวเคลียส อับเรณูเหล่านี้สามารถเจริญไปเป็นแคลลัสได้ดินบนอาหารสูตร N₆ ที่เติมเคซีนไฮโดรไลเซต 500 มก./ล. NAA 2 มก./ล. โคเคนดิน 1 มก./ล. และน้ำตาลมอลโตส 50 ก./ล. และแคลลัสสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ดินบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% เคซีนไฮโดรไลเซต 300 มก./ล. ซูโครส 20 ก./ล. BAP 2 มก./ล. NAA 0.2 มก./ล. และต้นอ่อนที่ได้เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ 1 ก./ล. น้ำมะพร้าว 15% BAP 3 มก./ล. และโคลชิซิน 0.01% เป็นเวลา 3 และ 5 วัน จะเกิดต้นที่มีจำนวนชุดโครโมโซม 2 ชุดที่เหมือนกัน 40.00 และ 41.66% ตามลำดับ

คำนำ

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวอาจกระทำได้โดยการนำพันธุ์ข้าวจากท้องถิ่นต่าง ๆ ทั้งภายใน และภายนอกประเทศเข้ามาปลูก คัดเลือกพันธุ์ และผสมพันธุ์ ซึ่งพันธุ์ข้าวที่จะนำมาผสมพันธุ์กันถ้ามีลักษณะดีต่างกันเมื่อผสมพันธุ์กัน ลูกผสมที่เกิดขึ้นอาจจะได้ลักษณะดีของพันธุ์พ่อแม่รวมอยู่ในต้นเดียวกันได้ เนื่องจากข้าวเป็นพืชผสมตัวเองและเมื่อเกิดการผสมตัวเองลูก F₁ ลูก F₂ จะมีการกระจายตัวมาก และเมื่อคัดเลือกเอาเฉพาะต้นที่มีลักษณะที่ต้องการไว้ปลูกทุกชั่ว ก็จะได้สายพันธุ์แท้ในชั่วที่ 5 หรือชั่วที่ 6 (ประพาส, 2531) ปัจจุบันได้นำเอาเทคนิคการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมเข้ามารวมในโครงการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อย่น

ระยะเวลาการสร้างสายพันธุ์แท้ ซึ่งใช้เวลาเพียง 1-2 ชั่ว สายพันธุ์แท้ที่ได้จะได้รับการถ่ายพันธุกรรมจากพ่อและแม่ และแสดงลักษณะต่างๆ ออกมาตามสภาพพันธุกรรมที่มีอยู่ แม้ว่าลักษณะนั้นควบคุมด้วยยีนด้อยก็ตาม (Lynch *et al.*, 1991) ทำให้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์แท้ที่มีลักษณะที่ต้องการ แต่ก็มีปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู เช่น พันธุกรรม พบว่าข้าวแต่ละพันธุ์ให้ผลตอบสนองการเพาะเลี้ยงต่างกัน และข้าวชนิดจาโปนิกา (*Oryza japonica*) ให้ผลการเพาะเลี้ยงดีกว่าข้าวชนิดอินดิกา (*O. indica*) หรือพันธุ์ลูกผสมระหว่างอินดิกากับจาโปนิกา สภาพแวดล้อมในการเพาะปลูกของต้นที่เป็นแหล่งให้อับเรณู ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู เช่น จากการทดลองของ Raina *et al.* (1987) ซึ่งได้ควบคุมสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการปลูกข้าวหอมพันธุ์บาสมาดิ 370 เพื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงอับเรณู พบว่าต้นข้าวที่อยู่ในระยะออกดอกได้รับอุณหภูมิสูงสุดและต่ำสุดอยู่ในช่วง 23.3-34.2°C. จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสดีกว่าที่อุณหภูมิ 16.4-29.1°C. ปัจจัยเกี่ยวกับการพัฒนาของไมโครสปอร์ก็มีผลเช่นเดียวกันโดยพบว่าอับเรณูที่มีไมโครสปอร์อยู่ในระยะที่มี 1 นิวเคลียส สามารถเกิดแคลลัสได้ดีกว่าอับเรณูที่มีไมโครสปอร์อยู่ในระยะที่มี 2 นิวเคลียส (Zapata *et al.*, 1983) นอกจากนี้การนำอับเรณูมาผ่านความเย็น (cold treatment) ก็เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญเช่นเดียวกัน Zapata *et al.* (1983) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงอับเรณูข้าวพันธุ์ Taipei 309 โดยทำการผ่านความเย็นที่อุณหภูมิ 8°C. นานเป็นเวลา 0,2,4,8,16 และ 18 วันตามลำดับ พบว่าการผ่านความเย็นนาน 8 วัน ให้ผลการเพาะเลี้ยงดีที่สุด แต่ถ้าใช้เวลานานมากกว่า 14 วัน ทำให้เกิดต้นฝ่อเพิ่มขึ้น

การทดลองนี้ทำการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพันธุ์เลมอนท์กับพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ซึ่งพันธุ์เลมอนท์เป็นข้าวชนิดอินดิกา

ปลูกในสหรัฐอเมริกาให้ผลผลิตค่อนข้างสูงเฉลี่ย 930.48 กก./ไร่ ดันเดียวและไม่ไถต่อช่วงแสง แต่ไม่ต้านทานต่อหนอนกอ แมลงบัว ก่อนข้างไม่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ไม่ต้านทานต่อโรครุ และโรคกาบใบเน่า(เนิรนาม ไม่ปรากฏปีพิมพ์) สำหรับพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวที่เมล็ดมีกลิ่นหอม ไวต่อช่วงแสง ดันสูง และผลผลิตค่อนข้างต่ำเฉลี่ย 350 กก./ไร่ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงอับเรณูเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส หาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อชักนำแคลลัสให้เกิดขึ้น และผลิตข้าวที่มีโครโมโซม 2 ชุดที่เหมือนกัน (doubled haploid rice)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาหาระยะที่เหมาะสมของช่อดอก

ตัดช่อดอกอ่อนจากต้นข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (เลมอนท์/ข้าวดอกมะลิ 105) ที่มีระยะห่างระหว่างข้อใบตรงกับข้อใบที่ถัดลงมาแตกต่างกันดังนี้ 3-6 ซม. 6-9 ซม. และ 12-15 ซม. นำมาผ่านความเย็นโดยแช่โคนช่อดอกในน้ำ และเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 12°C เป็นเวลา 8-10 วัน แล้วนำช่อดอกที่ผ่านความเย็นแล้วไปแช่ในน้ำยาคงสภาพ (แอลกอฮอล์ 95% 3 ส่วน และกรดอะซิติก 100% 1 ส่วน) นำอับเรณูจากดอกย่อยมาขย้อมด้วยสีอะซิโตคาร์มิน ศึกษาลักษณะไมโครสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อหาระยะที่เหมาะสม คือระยะที่ไม่โครสปอร์มี 1 นิวเคลียส พร้อมทั้งถ่ายภาพและบันทึกผล

2. การเพาะเลี้ยงอับเรณูให้เกิดแคลลัส

ตัดช่อดอกข้าวที่เหมาะสม คือ ช่อดอกที่มีไมโครสปอร์อยู่ในระยะที่มี 1 นิวเคลียส นำมาผ่านความเย็นที่อุณหภูมิ 12°C เป็นเวลา 8-10 วัน จากนั้นทำความสะอาดช่อดอกโดยใช้เอธิลแอลกอฮอล์ 70% ฉีดพ่นทั่วช่อดอก แล้วนำช่อดอกเข้าสู่ปลอดเชื้อลอกกาบใบที่หุ้มช่อดอกออกให้เหลือเพียงช่อดอก ตัด

ดอกย่อยตามระแนงของช่อดอกโดยตัดส่วนโคนดอกให้อับเรณูอยู่ในช่อดอกส่วนที่ตัดออก ใช้ปากคีบคีบดอกที่ตัดออกเกาะบนปากขวดและจุ่มแก้วให้อับเรณูตกลงบนอาหารเพาะเลี้ยงที่ชักนำให้เกิดแคลลัสทั้งในสภาพอาหารเหลวและอาหารแข็ง 6 สูตร โดยอาหารทุกสูตรใช้อาหารสูตร N₆ ที่ดัดแปลงโดยเดิม เติมนิโคตินไฮโดรไลเซต 500 มก./ล. สารควบคุมการเจริญเติบโตในความเข้มข้นแตกต่างกันและน้ำตาลที่แตกต่างกัน 2 ชนิด ดังนี้

A1s คือ 2,4-D 2 มก./ล. ไคเนติน 1 มก./ล. และซูโครส 50 ก./ล.

A1m คือ 2,4-D 2 มก./ล. ไคเนติน 1 มก./ล. และมอลโตส 50 ก./ล.

A2s คือ NAA 2 มก./ล. ไคเนติน 1 มก./ล. และซูโครส 50 ก./ล.

A2m คือ NAA 2 มก./ล. ไคเนติน 1 มก./ล. และมอลโตส 50 ก./ล.

A3s คือ 2,4-D 2 มก./ล. NAA 2 มก./ล. ไคเนติน 1 มก./ล. และซูโครส 50 ก./ล.

A3m คือ 2,4-D 2 มก./ล. NAA 2 มก./ล. ไคเนติน 1 มก./ล. และมอลโตส 50 ก./ล.

บันทึกจำนวนอับเรณูที่เพาะเลี้ยงและจำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้นทั้งในสภาพที่ได้รับแสง 16 ชม./วัน และสภาพที่มีมืด

3. การชักนำแคลลัสให้เกิดขึ้นและการเพิ่มปริมาณต้น

นำแคลลัสที่เกิดขึ้นในอาหารแต่ละสูตรไปเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดขึ้นสูตรต่าง ๆ 6 สูตร โดยอาหารทุกสูตรใช้อาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) (MS) เติมน้ำมะพร้าว 15% เติมนิโคตินไฮโดรไลเซต 300 มก./ล. ซูโครส 20 ก./ล. แต่สารควบคุมการเจริญเติบโตใช้ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

R1 คือ BAP 2 มก./ล.

R2 คือ BAP 3 มก./ล.

R₃ คือ BAP 2 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล.

R₄ คือ BAP 2 มก./ล. NAA 0.2 มก./ล.
และไคเนติน 1 มก./ล.

R₅ คือ BAP 3 มก./ล. NAA 0.5 มก./ล.

R₆ คือ BAP 3 มก./ล. NAA 0.5 มก./ล.
และไคเนติน 1 มก./ล.

บันทึกจำนวนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงและจำนวน
แคลลัสที่พัฒนาไปเป็นต้น

นำต้นปกติที่ได้ย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร
MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% สารสกัดจากยีสต์ 1 ก./ล.
ถ่านกัมมันต์ 3 ก./ล. และ BAP 3 มก./ล. เพื่อเพิ่ม
จำนวนต้นให้มากขึ้น

4. การเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยโคลชิซิน

นำต้นที่ได้จากการเพิ่มจำนวนไปเพาะเลี้ยงใน
อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% สารสกัดจาก
ยีสต์ 1 ก./ล. BAP 3 ก./ล. และโคลชิซิน 0.01 และ
0.03% เป็นเวลา 3 และ 5 วัน แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยง
ในอาหารสูตรเดิมที่ปราศจากโคลชิซิน เป็นเวลา 6
สัปดาห์

5. การนำต้นออกปลูก

นำต้นที่ได้จากการผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหาร
ที่ใส่และไม่ใส่โคลชิซินออกปลูกในกระถาง บันทึก
จำนวนต้นที่ติดเมล็ด

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาหาระยะที่เหมาะสมของช่อดอก

จากการศึกษาหาระยะที่เหมาะสมของช่อดอก
ที่ดอกย่อยมีไมโครสปอร์อยู่ในระยะที่มี 1 นิวเคลียส
พบว่า ดอกย่อยจากส่วนโคน กลาง และปลายของ
ช่อดอกที่มีระยะห่างระหว่างข้อใบ ตรงกับข้อใบที่ถัด
ลงมา 3-6 ซม. มีไมโครสปอร์ที่ไม่เห็นนิวเคลียสดิด

สีเข้มเป็นจุดกลาง แต่จะเห็น เป็นกลุ่มที่มีสีเข้มกว่า
บริเวณอื่น (Figure 1A) สำหรับดอกย่อยจากส่วนโคน
กลาง และปลาย ของช่อดอกที่มีระยะห่างระหว่างข้อ
ใบตรงกับข้อใบที่ถัดลงมา 6-9 ซม. และ 9-12 ซม.
ส่วนมาก มีไมโครสปอร์ที่อยู่ในระยะที่มี 1 นิวเคลียส
โดยเห็นนิวเคลียสดิดสีเข้มเป็นจุดกลม (Figure 1B)
แต่ในส่วนปลายของช่อดอกมีดอกย่อยบางส่วนที่มีไม
โครสปอร์อยู่ในระยะที่มี 2 นิวเคลียส และ กรณีของ
ดอกย่อยจากส่วนโคน กลาง และปลายของช่อดอกที่
มีระยะห่างระหว่างข้อใบตรงกับข้อใบที่ถัดลงมา 12-15 ซม.
มีไมโครสปอร์อยู่ในระยะที่มี 2 นิวเคลียส ซึ่งดิดสี
เข้มเป็นจุดกลมทั้ง 2 นิวเคลียส (Figure 1C) สรุปได้
ว่าช่อดอกที่เหมาะสมที่จะนำอับเรณูมาเพาะเลี้ยงคือ
ช่อดอกที่มี ระยะห่างระหว่างข้อใบตรงกับข้อใบที่ถัด
ลงมา 6-12 ซม. นอกจากนี้ควรเลือกดอกที่มีความ
เหมาะสม ด้วย คือ ควรใช้ดอกที่มีกลีบดอกเป็นสีขาว
ปนเขียวจาง ๆ ส่วนโคนดอกและปลายดอกเป็นสีเขียว
อ่อน (Figure 1E) เพราะดอกลักษณะนี้จะมีไมโคร
สปอร์อยู่ในระยะที่มี 1 นิวเคลียส ดอกที่ไม่ ควร
เลือกใช้คือมีสีขาวทั้งดอก โคนและปลายดอกมีสีเขียว
จาง ๆ ยังไม่เห็นเป็นสีเขียวชัดเจน (Figure 1D)
เพราะดอกลักษณะนี้จะมีไมโครสปอร์อยู่ในช่วงแรก
ของระยะที่มี 1 นิวเคลียส และ ดอกที่มีสีเขียวเข้ม
ชัดเจนทั้งดอก (Figure 1F) เพราะมีไมโครสปอร์อยู่
ในระยะที่มี 2 นิวเคลียส

2. การเพาะเลี้ยงอับเรณูให้เกิดแคลลัส

เมื่อนำอับเรณูจากช่อดอกที่มีระยะห่างระหว่าง
ข้อใบตรงกับข้อใบที่ถัดลงมา 6-12 ซม. ซึ่งได้เก็บไว้ที่
อุณหภูมิ 12° ซ.เป็นเวลา 8-10 วัน มาเพาะเลี้ยงบน
อาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส 6 สูตร ทั้งในสภาพ
อาหารแข็งและอาหารเหลวและทั้งในสภาพที่ได้รับแสง
16 ชม./วัน และ สภาพที่มีมืดพบว่าการเพาะเลี้ยงอับ
เรณูบนอาหารแข็งทุกสูตรทั้งในสภาพที่ได้รับแสง

และที่มีคสามารถ ชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และอาหารสูตร A2m สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดในทั้งสองสภาพ โดยในสภาพที่ได้รับแสงเกิดแคลลัส 8.60% และในสภาพที่มีคเกิดแคลลัส 11.97% (Table 1) สำหรับบนอาหารเหลวในสภาพที่มีคสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ทุกสูตร และอาหารสูตร A2m สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงสุดคือ 4.57% สำหรับในสภาพที่ได้รับแสง อาหารสูตร A3m สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงสุดคือ 5.26% แต่อาหารสูตร AIS และ A2S ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เลย (Table 2) แคลลัสที่เกิดขึ้นจะเกิดจากอับเรณูที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเท่านั้น ส่วนอับเรณูที่เปลี่ยนเป็นสีดำและที่สีไม่เปลี่ยนแปลงจะไม่มีแคลลัสเกิดขึ้นเลย (Figure 2) นอกจากนี้พบว่าสูตรอาหารที่ใส่มอลโตสมีอัตราการเกิดแคลลัสสูงกว่าสูตรอาหารที่ใส่ซูโครส ซึ่ง สอดคล้องกับรายงานของ Xie *et al.* (1994) ซึ่งเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวชนิดจาโปนิกา 3

สายพันธุ์ พบว่า สูตรอาหารที่ใส่มอลโตสชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าสูตรอาหารที่ใส่ซูโครสการที่มอลโตสสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าซูโครสนั้นอาจเป็นเพราะมอลโตสสามารถรักษาความคั่นออสโมซิสในอาหารเพาะเลี้ยงได้ดีกว่าซูโครส เนื่องจากมอลโตสสลายไปเป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยว ได้ช้ากว่าซูโครส จึงทำให้มีแหล่งพลังงานที่ใช้สำหรับกระบวนการเมตาบอลิซึมได้นานกว่าน้ำตาล ซูโครส (Orshinsky *et al.*, 1990) และจากการทดลองพบว่าในสภาพอาหารแข็งให้ เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงกว่าในสภาพอาหารเหลวเนื่องจากในขณะเพาะเลี้ยงอับเรณูในอาหารเหลว อับเรณูส่วนมากจมลงในอาหารเพาะเลี้ยงและเปลี่ยนเป็นสีดำมากกว่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง อับเรณูที่เปลี่ยนเป็นสีดำเหล่านี้ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้นเลย

เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงอับเรณูให้เกิดแคลลัสในสภาพที่ได้รับแสง 16 ชม./ วัน และใน

Table 1 Callus formation from anthers of the F₁ hybrid rice (Lemont/Khao Dawk Mali 105) on various solid callus induction media.

Media ^{1/}	No. of		No. of		% callus formation	
	cultured	anther	callus	formation	Light	Dark
	Light	Dark	Light	Dark	Light	Dark
A1s	180	224	4	4	2.22	1.78
A1m	250	167	12	4	4.80	2.39
A2s	140	240	11	19	7.85	7.91
A2m	151	192	13	23	8.60	11.97
A3s	290	230	9	16	3.10	6.95
A3m	189	180	15	14	7.93	7.77

1 Each medium containing N6 minerals+500mg/l casein hydrolysate and follows:

- A1s = 2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin + 50 g/l sucrose
- A1m = 2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin + 50 g/l maltose
- A2s = 2 mg/l NAA + 1 mg/l kinetin + 50 g/l sucrose
- A2m = 2 mg/l NAA + 1 mg/l kinetin + 50 g/l maltose
- A3s = 2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l NAA + 1 mg/l kinetin+ 50 g/l sucrose
- A3m = 2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l NAA + 1 mg/l kinetin+ 50 g/l maltose

Table 2 Callus formation from anthers of F₁ hybrid rice (Lemont/Khao Dawk Mali 105) on various liquid callus induction media.

Media ^{1/}	No. of		No. of		% callus formation	
	cultured	anther	callus	formation	Light	Dark
	Light	Dark	Light	Dark		
A1s	280	201	0	3	0.00	1.49
A1m	269	174	12	3	4.46	1.72
A2s	135	231	0	4	0.00	1.73
A2m	138	175	6	8	4.34	4.57
A3s	142	217	5	3	3.52	1.38
A3m	133	225	7	10	5.26	4.44

¹ Each medium containing N6 minerals+500mg/l casein hydrolysate and follows:

A1s = 2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin + 50 g/l sucrose

A1m = 2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin + 50 g/l maltose

A2s = 2 mg/l NAA + 1 mg/l kinetin + 50 g/l sucrose

A2m = 2 mg/l NAA + 1 mg/l kinetin + 50 g/l maltose

A3s = 2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l NAA + 1 mg/l kinetin + 50 g/l sucrose

A3m = 2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l NAA + 1 mg/l kinetin + 50 g/l maltose

Table 3 Plantlet formation from callus on various regeneration media.

Callus induction media	Regeneration media ^{1/}	Cultured callus	Normal plantlets	Albino plantlets	% normal plantlet
A1s	R1	1	0	0	0.00
	R2	1	0	0	0.00
	R3	2	0	0	0.00
	R4	1	0	0	0.00
	R5	1	0	0	0.00
	R6	1	0	0	0.00
A1m	R1	6	0	0	0.00
	R2	5	0	0	0.00
	R3	5	0	0	0.00
	R4	4	0	0	0.00
	R5	5	0	1	0.00
	R6	4	0	0	0.00

Table 3 (Continued)

Callus induction media	Regeneration media ^{1/}	Cultured callus	Normal plantlets	Albino plantlets	% normal plantlet
A2s	R1	4	0	0	0.00
	R2	5	0	0	0.00
	R3	5	1	2	20.00
	R4	5	0	2	0.00
	R5	4	0	0	0.00
	R ₆	5	1	0	20.00
A2m	R1	8	0	0	0.00
	R2	8	0	0	0.00
	R ₃	8	1	1	12.25
	R4	6	0	0	0.00
	R5	7	1	3	14.28
	R ₆	7	0	2	0.00
A3s	R1	4	0	0	0.00
	R2	4	0	0	0.00
	R3	5	1	0	20.00
	R4	5	0	1	0.00
	R5	5	0	0	0.00
	R6	6	0	1	0.00
A3m	R1	6	0	0	0.00
	R ₂	6	0	0	0.00
	R3	9	0	3	0.00
	R4	7	0	1	0.00
	R ₅	7	0	1	0.00
	R6	8	0	0	0.00

^{1/} Each medium containing MS minerals + 15% coconut water + 300 mg/l casein hydrolysate + 20 g/l sucrose and follows:

- R₁ = 2 mg/l BAP
- R₂ = 3 mg/l BAP
- R₃ = 2 mg/l BAP + 0.2 mg/l NAA
- R₄ = 2 mg/l BAP + 0.2 mg/l NAA + 1 mg/l kinetin
- R₅ = 3 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA
- R₆ = 3 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA + 1 mg/l kinetin

Table 4 Percent of doubled haploid plants from anther culture.

Colchicine (%)	Days of treatment	Cultured plants	Survival plants	Doubled haploid plants	Percent of doubled haploid plants
0.00	0	16	14	4	25.00
0.01	3	15	15	6	40.00
0.01	5	12	10	5	41.66
0.03	3	2	2	1	50.00
0.03	5	6	6	1	16.66

สภาพที่มีด พบว่าในอาหารแต่ละสูตรให้ผลที่แตกต่างกัน บางสูตรอาหารในสภาพที่ได้รับแสงให้ผลดีกว่าในสภาพที่มีด บางสูตรอาหารในสภาพที่มีดให้ผลดีกว่าในสภาพที่ได้รับแสง และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงอับเรณู ให้เกิดแคลลัสคือสูตรอาหาร N6 ที่เติมเคซินไฮโดรไลเซต 500 มก./ล. NAA 2 มก./ล. ไคเนติน 1 มก./ล. และมอลโตส 50 ก./ล. ในสภาพที่มีด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Martin and Millo (1981) ที่ได้เพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าว 4 สายพันธุ์ คือ Bahia, Girona, Balilia x Sollana และ Sequial พบว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูในที่มีดจะชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าในที่มีแสง

3. การชักนำแคลลัสให้เกิดขึ้นและการเพิ่มปริมาณต้น

เมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตรต่างๆ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดขึ้น 6 สูตร โดยใช้แคลลัสหนึ่งก้อนต่ออาหารเพาะเลี้ยง 1 ขวด หลังจากย้ายแคลลัสลงในอาหารชักนำให้เกิดขึ้น 2-3 สัปดาห์ แคลลัสที่สามารถเจริญเป็นต้นปกติได้เกิดจุดสีเขียว จากนั้นเจริญเป็นยอดและต้นอ่อนต่อไป แต่แคลลัสส่วนมากไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ และจากการทดลองพบว่าแคลลัสจากอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตร A1s, A1m และ A3m ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ในอาหารชัก

นำให้เกิดขึ้นทุกสูตร แต่แคลลัสจากอาหารสูตร A2s สามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นปกติได้ในอาหารชักนำให้เกิดขึ้นสูตร R₃ และ R₆ ในอัตราที่เท่ากัน คือ 20% แคลลัสจากอาหารสูตร A2m สามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นปกติได้ในอาหารชักนำให้เกิดขึ้นสูตร R₃ และ R₅ เท่ากับ 12.25 และ 14.28% ตามลำดับ และแคลลัสจากอาหารสูตร A3s สามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นปกติได้ในอาหารชักนำให้เกิดขึ้นสูตร R₃ เท่ากับ 20% (Table 3) นอกจากนั้นยังมีแคลลัสจำนวนหนึ่งเจริญเป็นต้นที่มีลักษณะผิดปกติ (Figure 3)

จากการศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในอาหารสูตรชักนำให้เกิดขึ้นคือ BAP, NAA และไคเนติน พบว่าในอาหารสูตร R₃, R₅ และ R₆ ที่ใช้ BAP ร่วมกับ NAA สามารถชักนำให้เกิดขึ้นได้ แต่อาหารสูตร R₁ และ R₂ ใช้ BAP เพียงชนิดเดียวไม่สามารถชักนำให้เกิดขึ้นได้เลย ดังนั้น NAA จึงอาจมีส่วนในการช่วยชักนำให้เกิดขึ้นได้ด้วย

4. การเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยใช้โคลชิซิน

เมื่อนำต้นอ่อนที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% สารสกัด จากยีสต์ 1 ก./ล. BAP 3 มก./ล. และโคลชิซินความเข้มข้น 0.01 และ 0.03% เป็นเวลา 3 และ 5 วัน และย้ายมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่ไม่เติมสารโคลชิซิน หลังจากเพาะ

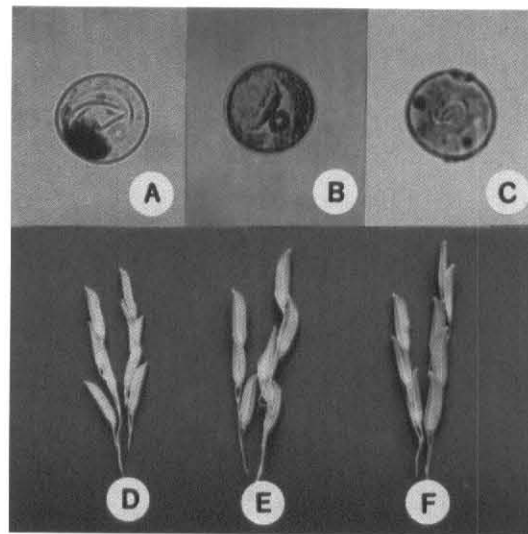


Figure 1 The microspore and spikelet rice.

- A = Early uninucleate microspore
- B = Mid-uninucleate microspore
- C = Binucleate microspore
- D = The spikelet with white bottom and light green top
- E = The spikelet with light green top and bottom
- F = The spikelet with green bottom and dark green top

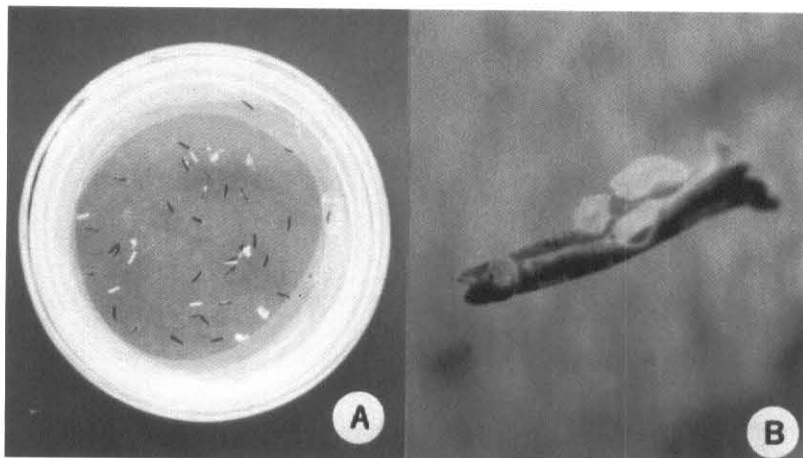


Figure 2 Callus formation from anther culture in rice.

- A = Anthers cultured on a solid medium (N6 medium+ 500 mg/l casein hydrolysate + 2 mg/l NAA +1 mg/l kinetin + 50 g/l maltose.)
- B = Anther with callus

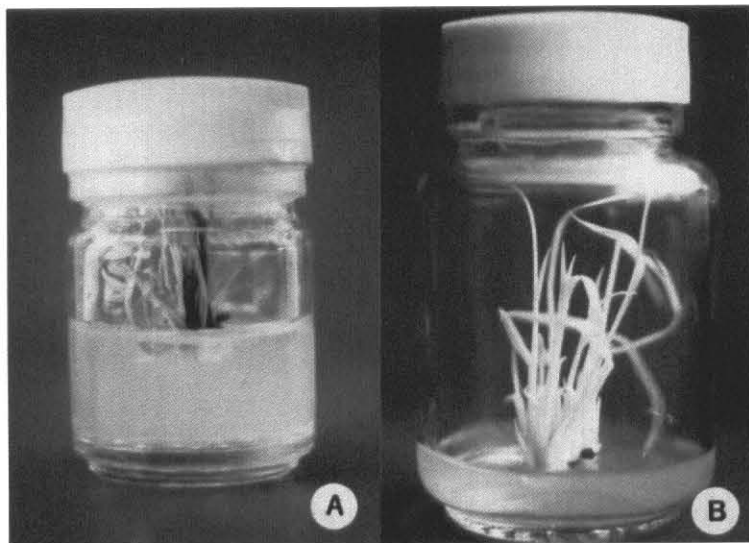


Figure 3 The haploid plantlets on the regeneration medium.

- A = The normal green plantlets
- B = The albino plantlets

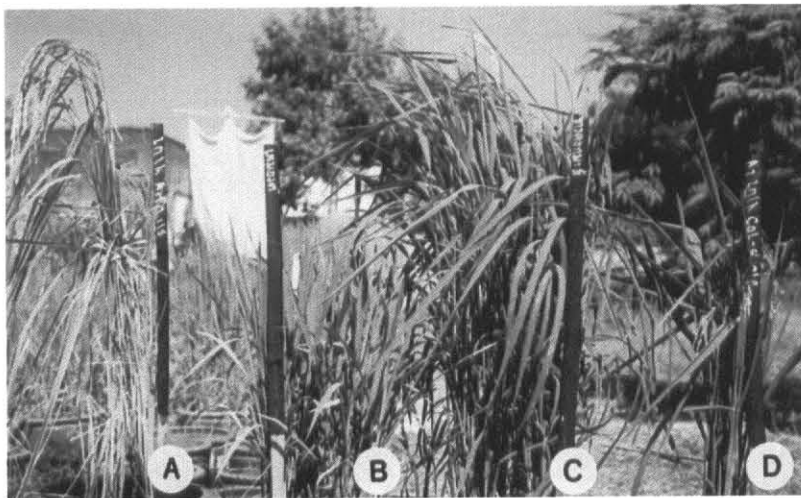


Figure 4 The doubled haploid plants from anther culture and the parent plants.

- A = The doubled haploid plant
- B = Lemont variety (parent plant)
- C = Khao Dawk Mali 105 variety (parent plant)
- D = The doubled haploid plant

เลี้ยงได้ ประมาณ 6 สัปดาห์ ทำการย้ายออกปลูกในกระถางและนำไปไว้ในเรือนปลูกพืชทดลอง พบว่าต้นข้าวบางต้นตาย ส่วนที่เหลือบางต้นมีการติดเมล็ด บางต้นไม่มีการติดเมล็ด เพราะต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูส่วนมากมีโครโมโซม 1 ชุด เมื่อมีการชักนำให้มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซม เป็น 2 ชุด ที่เหมือนกัน (doubled haploid) ซึ่งอาจจะเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติหรือชักนำ ด้วยโคลชิซิน ต้นข้าวสามารถติดเมล็ดได้ จากการทดลองพบว่า อาหารที่ใส่โคลชิซินความเข้มข้น 0.01 เป็นเวลา 3 และ 5 วัน สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมใกล้เคียงกัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด 40.00 และ 41.66% และอาหารที่ใส่โคลชิซินความเข้มข้น 0.03 เป็นเวลา 3 วัน มีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดสูงสุดคือ 50.00% แต่เนื่องจากจำนวนต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงมีเพียง 3 ต้นเท่านั้น สำหรับต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ใส่โคลชิซินมีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดได้ 25% อาจเกิดจากการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมเองตามธรรมชาติ หรืออาจเจริญมาจากผนังของอับเรณูที่นำมาเพาะเลี้ยงก็ได้ (Table 4) สอดคล้องกับ งานทดลองของ Hu (1983) ได้ใส่โคลชิซินความเข้มข้น 0.05-0.25% ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวด้วย พบว่าสามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมได้ 75% แต่ถ้าไม่ใส่สารโคลชิซินจะมีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม 50% และจากรายงานของ Rout and Sarma (1991) พบว่าในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของ เพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมเองตาม ธรรมชาติได้ถึง 60%

5. การนำต้นออกปลูก

จากการทดลองเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (เลมอนท์/ขาวดอกมะลิ 105) ครั้งนี้ได้ต้นข้าวลูกผสมที่ติดเมล็ดและมีลักษณะแตกต่างกัน และแตกต่างไปจากต้นพ่อและแม่ (Figure 4) เมื่อนำ

เมล็ดที่ติดของแต่ละต้นออกปลูกเพื่อเพิ่มจำนวนเมล็ด พบว่ามีความแปรปรวน เกิดขึ้นภายในแต่ละกลุ่มน้อยมาก ซึ่งให้เห็นว่า เมล็ดที่ติดของแต่ละต้นมีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด ที่เหมือนกัน (double haploid)

สรุป

จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (เลมอนท์/ขาวดอกมะลิ 105) ได้ผลดังนี้

1. ช่อดอกที่มีระยะห่างข้อใบตรงกับข้อใบที่ถัดลงมา 6-12 ซม. เป็นช่อดอกที่มีไมโครสปอร์อยู่ในระยะที่เหมาะสม
2. อาหารสูตรที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงอับเรณูเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสคืออาหารแข็งสูตร N6 ที่เติมเคซินไฮโดรไลเซต 500 มก./ล. NAA 2 มก./ล. โคนดิน 1 มก./ล. และมอลโตส 50 ก./ล. โดยต้องเพาะเลี้ยงในที่มืด
3. อาหารสูตรที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เกิดขึ้น คืออาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% ซูโครส 20 ก./ล. เคซินไฮโดรไลเซต 300 มก./ล. BAP 2 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล.
4. สามารถผลิตข้าวลูกผสมที่มีโครโมโซม 2 ชุด ที่เหมือนกันได้จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% สารสกัดจากยีสต์ 1 ก./ล. ถ่านกัมมันต์ 3 ก./ล. BAP 3 มก./ล. โดยอาจเติมโคลชิซินและไม่เติมโคลชิซินไม่เกิน 0.03%

เอกสารอ้างอิง

- นรินาม. ไม่ปรากฏปีพิมพ์. ความสามารถในการให้ผลผลิตของข้าวอเมริกันบางพันธุ์ในประเทศไทย. ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี, ปทุมธานี. 67 น.
- ประพาส วีระแพทย์. 2531. ความรู้เรื่องข้าว. พิมพ์ครั้งที่ 3, โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช, กรุงเทพฯ. 108 น.

- Hu, C. 1983. Stimulation pollen haploid culture mutation in *O. sativa* subsp. Keng (japonica), pp. 291-301. In Y.P.S. Bajaj (ed.). Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. Science Press, Beijing.
- Lynch, P.T., R.P. Ficch, M.R. Davey, and E.C. Cocking. 1991. Rice tissue culture and its application, pp. 135-155. In S. Khush and G.H. Toenniessen (eds.). Rice Biotechnology. IRRI, Philippines.
- Martin, M.J. Cornejo, and E. Primo-Millo. 1981. Anther and pollen grain culture of rice (*Oryza sativa* L.). Euphytica 30: 541-546.
- Orshinsky, B.R., L.J. McGregor, G.I.E. Johnson, P. Hucl, and K.K. Kartha. 1990. Improved embryoid induction and green shoot regeneration from wheat anther culture in medium with maltose. Plant Cell Rep. 9: 365-369.
- Raina, S.K., P. Sathish, and K.S. Sharma. 1987. Plant regeneration from in vitro culture of anther and mature seed of rice (*O. sativa* L.)cv. Basmati-370. Plant Cell Rep. 6: 43-45.
- Rout, J.R. and N.P. Sarma. 1991. Anther callus induction and greenplant regeneration at high frequencies from an interspecific rice hybrid *O. sativa* Linn. x *O. rufipogon* Griff. Euphytica. 45: 155-159.
- Xie J.,G. Mingwei, C. Qihua, C. Xiongying, S. Yuwei, and L. Zhuqing. 1994. Effect of maltose and hormones on callus formation and plant regeneration in isolated microspore culture of japonica rice (*O. sativa* L.). IRRN. 19 : 7-8.
- Zapata, F.J., G.S. Khush, J.P. Crill, M.H. Neu, R.O. Romero, L.B. Torrizo, and M. Alejar. 1983. Rice anther culture at IRRI, pp. 27-46. In Y.P.S. Bajaj (ed.) Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Cropimprovement. Science Press, Beijing.