Kasetsart J. (Nat. Sci.) 29 : 158-166 (1995) ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) ปีที่ 29 : 158-166 (2538)

การเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสม (ขาวดอกมะลิ 105/สไคบอนเนท)

Anther Culture of Hybrid Rice (Khao Dawk Mali 105/Skybonnet)

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ[1] รัตน์ดา เลิศวิชัย[1] สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช[1] สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล[1]
กาญจนา กล้าแข็ง[4] ประภา ศรีพิจิตต์[2] ณรงค์ สิงห์บุระอุดม[3] สุพจน์ เฟื่องฟูพงศ์[2]
และ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์[2]

P. Pongtongkam, R. Lertvichai, S. Apisitiwanich, S. Peyachoknagul,
K. Klakhaeng, P. Sripichit, N. Singburaudom, S.Fungfupong, and P. Srinives

ABSTRACT

The anthers of F_1 hybrid rice (Khao Dawk Mali 105/Skybonnet) were cultured on the various callus induction media. It was found that a suitable medium for callus induction was N_6 containing 2 mg/l 2,4-D,1 mg/l kinetin, 500 mg/l casein hydrolysate and 50 g/l sucrose. The plantlets could be produced from callus on the MS medium supplemented with 2 mg/l BAP, 1 mg/l kinetin, 0.2 mg/l NAA, 300 mg/l casein hydrolysate, 15% coconut water and 20 g/l sucrose. After transferring these plantlets onto the MS medium containing 1 g/l yeast extract, 15% coconut water, 3 mg/l BAP and 0.01% colchicine for 5 days, about 60% of the doubled haploid plants were recovered.

Key words : rice, anther culture

[1] ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

[2] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Department of Agrono;my, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900. Thailand.

[3] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok10900, Thailand.

[4] Pathummtani Reice Research Center, Klong Luang, Pathumtani Thailand.

บทคัดย่อ

จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสม ชั่วที่ 1 (F_1) (ขาวดอกมะลิ 105/สไคบอนเนท) บนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตรต่าง ๆ พบว่าอาหารสูตรที่เหมาะสมคือ อาหารสูตร N_6 ที่เติม 2,4-D 2 มก./ล. kinetin 1 มก./ล. เคซินไฮโดรไลเซท 500 มก./ล. และน้ำตาลซูโครส 50 ก./ล. และเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสที่เกิดขึ้นบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 2 มก./ล. kinetin 1 มก./ล. NAA 0.2 มก/ล เคซินไฮโดรไลเซท 300 มก/ล น้ำมะพร้าว 15% และน้ำตาลซูโครส 20 ก./ล. สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อน และเมื่อนำต้นอ่อนที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ 1 ก./ล. น้ำมะพร้าว 15% BAP 3 มก./ล. และสารโคลชิซิน 0.01% เป็นเวลา 5 วัน สามารถชักนำให้เกิดต้นที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด ที่เหมือนกันได้ถึง 60%

คำนำ

ปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีส่วนช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืช การเพาะเลี้ยงอับเรณูเป็นวิธีหนึ่งที่นำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช เพราะการเพาะเลี้ยงอับเรณูข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 สามารถจะผลิตต้นพืชที่มีโครโมโซม 1 ชุด (haploid) หรือมีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด ที่เหมือนกัน (homozygous diploid) ซึ่งช่วยย่นระยะเวลาการสร้างสายพันธุ์แท้โดยใช้เวลาเพียง 1-2 ชั่ว แต่การสร้างสายพันธุ์แท้โดยวิธีปกติจะต้องใช้วิธีผสมตัวเอง 6-8 ชั่ว สายพันธุ์แท้ที่ได้จะประกอบด้วยพันธุกรรมแบบต่าง ๆ ที่ได้รับการถ่ายทอดจากพ่อและแม่ และแสดงลักษณะต่างๆ ออกมาตามสภาพยีนที่มีอยู่ แม้ว่าลักษณะนั้นจะควบคุมด้วยยีนด้อยก็ตาม (Lynch *et al.*, 1991) ทำให้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์แท้ที่มีลักษณะที่ต้องการและทำให้ได้ข้าวพันธุ์ใหม่ที่จะเป็นประโยชน์ต่อไป

การเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวประสบความสำเร็จครั้งแรกในปี คศ. 1968 โดย Niizeki and Oono หลังจากนั้นได้มีการค้นคว้าวิจัยดัดแปลงสูตรอาหารและศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูทำให้ประสบความสำเร็จมากขึ้นและทำให้ทราบว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพวก japonica มีอัตราการพัฒนาไปเป็นต้นปกติประมาณ 10% สำหรับข้าวพวก indica มีการพัฒนาไปเป็นต้นปกติเพียง 1% (Hu *et al*,1978) นอกจากนี้พบว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวแอฟริกา (*O. glaberrima*) มีอัตราการเกิดแคลลัส 43% และจะลดเหลือ 3.5% เมื่อเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมระหว่าง *O. glaberrima* กับ *O. sativa* แต่อัตราการพัฒนาไปเป็นต้นปกติไม่เปลี่ยนแปลง คืออยู่ระหว่าง 16-72% (Woo and Huang, 1980) สำหรับอับเรณูที่นำมาเพาะเลี้ยงพบว่า อับเรณูที่มี microspore อยู่ในระยะ uninucleate สามารถเกิดแคลลัสได้ดีกว่า microspore ที่อยู่ในระยะ binucleate (Zapata *et al.*, 1983) ระยะที่ละอองเกสรอยู่ในช่วง mid-late uninucleate นั้น พบว่าในข้าวลูกผสมระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105/IR 841-85-1-2 และขาวดอกมะลิ 105/บาสมาติ 370 สังเกตได้จากระยะห่างระหว่างข้อใบธงกับข้อใบที่ถัดลงมา จะมีค่าประมาณ 5-12 ซม. ส่วนต้นข้าวที่มีระยะห่างระหว่างข้อใบธงกับข้อใบที่ถัดลงมาน้อยกว่า 5 ซม. ละอองเกสรจะอยู่ในช่วง early uninucleate ซึ่งเป็นระยะที่อ่อนเกินไปไม่เหมาะในการเพาะเลี้ยง ต้นข้าวที่มีระยะห่างของข้อใบธงมากกว่า 12 ซม. ละอองเกสรในช่วงนี้จะเข้าสู่ระยะ binucleate ซึ่งแก่เกินไปไม่เหมาะสมที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกัน (ประภา และคณะ, 2537) นอกจากปัจจัยต่าง ๆ ดังกล่าวแล้วยังพบอีกว่าอับเรณูที่ผ่านการ pretreatment ด้วยอุณหภูมิต่ำจะทำให้มีผลตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงได้ดี (Raina *et al.* 1987; Chung, 1988 Raina, 1993)

การทดลองนี้ทำการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสม ระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับสไค

บอนเนท (Skybonnet) ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวที่มีความหอม ไวต่อช่วงแสงและต้นสูง และข้าวพันธุ์สไคบอนเนท เป็นข้าวที่ปลูกในสหรัฐอเมริกาได้นำเข้ามาทดลองปลูกในประเทศไทย เป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง ต้นเตี้ย และไม่ไวต่อช่วงแสงโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงอับเรณูเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสหาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดต้น และผลิตข้าวลูกผสมที่มีโครโมโซม 2 ชุด ที่เหมือนกัน (doubled haploid plant)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ต้นข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และสไคบอนเนทเพื่อนำอับเรณูมาเพาะเลี้ยง

2. อาหารสังเคราะห์สูตรต่าง ๆ ที่ใช้เพาะเลี้ยงอับเรณูเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสโดยอาหารทุกสูตรใช้สูตร N_6 เป็นอาหารพื้นฐาน เติมเคซีนไฮโดรไลเซท 500 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 50 ก./ล. สำหรับสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารแต่ละสูตรใช้ดังนี้

C_1 เติม 2,4-D 1 มก./ล.

C_2 เติม 2,4-D 2 มก./ล.

C_3 เติม 2,4-D 2 มก./ล. และไคเนติน 1 มก./ล.

C_4 เติม NAA 2 มก./ล. และไคเนติน 1 มก./ล.

C_5 เติม 2,4-D 2 มก./ล. NAA 2 มก./ล. และไคเนติน 1 มก./ล.

อาหารทุกสูตรเตรียมทั้งที่เป็นอาหารเหลวและอาหารแข็ง และปรับ pH 5.8

3. อาหารสังเคราะห์สูตรต่าง ๆ ที่ใช้เพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อชักนำให้เกิดต้นอ่อน โดยอาหาร

ทุกสูตรใช้สูตร MS เป็นอาหารพื้นฐาน เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เคซีนไฮโดรไลเซท 300 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 20 ก./ล. สำหรับสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหาร แต่ละสูตรใช้ดังนี้

P_1 เติม BAP 2 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล.

P_2 เติม BAP 3 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล.

P_3 เติม BAP 3 มก./ล. และ NAA 0.5 มก./ล.

P_4 เติม BAP 2 มก./ล. ไคเนติน 1 มก./ล. และ NAA 0.2 มก./ล.

P_5 เติม BAP 3 มก./ล. ไคเนติน 1 มก./ล. และ NAA 0.5 มก./ล.

4. อาหารสังเคราะห์สูตร MS เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากยีสต์ 1 ก./ล. ผงถ่าน 3 ก./ล. น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. และ BAP 3 มก./ล. ที่ใช้เพาะเลี้ยงต้นอ่อนเพื่อเพิ่มจำนวนต้นให้มากขึ้น

5. อาหารสังเคราะห์สูตร MS เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากยีสต์ 1 ก./ล. ผงถ่าน 3 ก./ล. น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. BAP 3 มก./ล. และสารโคลซิซินความเข้มข้น 0.01 และ 003 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้เพาะเลี้ยงต้นอ่อนเพื่อชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม

วิธีการ

1. ตัดช่อดอกอ่อนจากต้นข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) (ขาวดอกมะลิ 105/สไคบอนเนท) ที่มีระยะห่างระหว่างข้อใบธงกับข้อใบที่ถัดลงมา 6-12 ซม. นำมาผ่านความเย็น (pretreatment) ที่อุณหภูมิ 12°C นานเป็นเวลา 8-10 วัน

2. นำช่อดอกอ่อนมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว โดยพ่นแอลกอฮอล์ 70% ให้ทั่วช่อดอกแล้วลอกกาบใบออก จากนั้นใช้กรรไกรตัดดอกย่อยโดยตัดที่โคนดอกให้อับเรณูอยู่ในส่วนของดอกที่ตัดออกไป ใช้ปากคีบคีบดอกเคาะบนปากขวดให้อับเรณูตกลงบนอาหารเพาะเลี้ยงที่ชักนำให้เกิดแคลลัส 5 สูตรดังกล่าว ทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็ง แล้วแบ่งขวดอาหารเพาะเลี้ยงไปไว้ในที่ได้รับแสง 16 ชม./วัน และในที่มืด บันทึกจำนวนอับเรณูที่เพาะเลี้ยงและจำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้น

3. นำแคลลัสที่เกิดขึ้นในอาหารแต่ละสูตรไปเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดต้นสูตรต่าง ๆ 5 สูตร บันทึกจำนวนแคลลัสที่นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารแต่ละสูตรและบันทึกจำนวนแคลลัสที่พัฒนาไปเป็นต้น

4. นำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% สารสกัดจากยีสต์ 1 ก./ล. ผงถ่าน 3 ก./ล. และ BAP 3 มก./ล. เพื่อเพิ่มจำนวนต้นให้มากขึ้น

5. นำต้นที่เจริญเติบโตและมีระบบรากดีบางส่วนออกปลูกในกระถาง และบางส่วนไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% สารสกัดจากยีสต์ 1 ก./ล. และสารโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.01 และ 0.03% เป็นเวลา 3 และ 5 วัน แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่ปราศจากสารโคลชิซินเป็นเวลา 6 สัปดาห์ แล้วนำออกปลูกในกระถาง บันทึกจำนวนต้นที่ติดเมล็ดและเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด

ผลและวิจารณ์

จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) (ขาวดอกมะลิ 105/สไคบอนเนท) ในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตรต่าง ๆ ทั้งในสภาพอาหารเหลวและอาหารแข็ง และในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และในที่มืด พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงอับเรณูประมาณ 2-3 สัปดาห์ อับเรณูจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำ และมีอับเรณูบางส่วนไม่เปลี่ยนแปลงและเมื่อเพาะเลี้ยงไปได้ 45-60 วัน จะมีแคลลัสเกิดขึ้นได้มากกว่า 1 ตำแหน่ง แคลลัสที่เกิดขึ้นจะเกิดจากอับเรณูที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล อับเรณูที่เปลี่ยนเป็นสีดำหรือที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงจะไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น (Figure 1) อับเรณูที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร C1 ทั้งในสภาพที่มีแสงและในที่มืดสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด คือ 10.17 และ 8.26% ตามลำดับ (Table 1) สำหรับสภาพอาหารแข็งอับเรณูที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร C3 สามารถเจริญไปเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดคือ 17.30 และ 15.70% ตามลำดับ (Table 2) จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าในสภาพอาหารแข็งชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าสภาพอาหารเหลว ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูในอาหารเหลว อับเรณูส่วนมากจะจมลงในอาหารเพาะเลี้ยงและเปลี่ยนเป็นสีดำและการเพาะเลี้ยงอับเรณูในสภาพที่มีแสงชักนำให้เกิดแคลลัสน้อยกว่าในสภาพที่มืด ซึ่งแตกต่างจากผลการทดลองของ Martin *et al.*, (1981) ซึ่งเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าว 4 พันธุ์ คือ Bahia, Girona, Balilla x Sollana และ Soquial และพบว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูในที่มืดจะชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าในที่มีแสง

เมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตรต่าง ๆ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดต้น 5 สูตร พบว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูในอาหารสูตร C3 และ C4 สามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นอ่อนปกติได้ดีในอาหารชักนำให้เกิดต้น สูตร P4, P5, และ P2 ตามลำดับ (Table 3,4; Figure 2) นอกจากนี้ยังพบลักษณะต้นเผือกเกิดขึ้นในอาหารแต่ละสูตร ยกเว้นสูตร P5 และจากการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงแคลลัสขนาดเล็กประมาณ 2-3 มม. จะชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Don Nguyen (1993) ซึ่งได้ย้ายแคลลัสขนาด 1-2 มม. ไปเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดต้น จะเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้ดีกว่าแคลลัสที่มีขนาดใหญ่

เมื่อนำต้นอ่อนที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% สารสกัดจากยีสต์ 1 ก./ล. BAP 3 มก./ล. และสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.01% และ 0.03% เป็นเวลา 3 และ 5 วัน และเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่ไม่เติมสารโคลชิซิน หลังจากเพาะเลี้ยงได้ประมาณ 6 สัปดาห์ แล้วทำการย้ายออกปลูกในกระถางและอยู่ในสภาพธรรมชาติ พบว่าต้นข้าว

Table 1 Callus formation from anthers of F_1 hybrid rice (Khao Dawk Mali 105/Skybonnet) on various liquid callus induction media.

Media	No. of anther cultured		No. of callus formation		% of callus formation	
	Light condition	Dark condition	Light condition	Dark condition	Light condition	Dark conditon
C_1	118	121	12	10	10.17	8.26
C_2	132	122	7	6	5.30	4.91
C_3	125	125	8	4	6.40	3.20
C_4	130	137	5	6	3.84	4.37
C_5	126	123	10	8	7.93	6.53

Each medium containing N_6 medium + 500 mg/l casein hydrolysate + 50g/l sucrose + various concentrations of growth regulators as follows:

C_1 = 1 mg/l 2,4-D
C_2 = 2 mg/l 2,4-D
C_3 = 2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin
C_4 = 2 mg/l NAA + 1 mg/l kinetin
C_5 = 2 mg/i 2,4-D + 2 mg/l NAA + 1 mg/l kinetin

Table 2 Callus formation from anthers of F_1 hybrid rice (Khao Dawk Mali 105/Skybonnet) on various solid callus induction media.

Media	No. of anther cultured		No. of callus formation		% of callus formation	
	Light condition	Dark condition	Light condition	Dark condition	Light condition	Dark conditon
C_1	142	163	5	4	3.52	2.45
C_2	108	206	7	17	6.48	8.25
C_3	185	140	32	22	17.29	15.71
C_4	114	225	13	20	11.40	8.88
C_5	172	215	19	24	11.04	11.16

Each medium containing N_6 medium + 500 mg/l casein hydrolysate + 50g/l sucrose + various concentrations of growth regulators as follows:

C_1 = 1 mg/l 2,4-D
C_2 = 2 mg/l 2,4-D
C_3 = 2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin
C_4 = 2 mg/l NAA + 1 mg/l kinetin
C_5 = 2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l NAA + 1 mg/l kinetin

Table 3 Plantlet formation from callus on various regeneration media.

Callus from medium†	Regeneration medium	No. of callus† cultured	No. of †normal plantlets	No. of albino plantlets	% Plantlet formation
C_1	P_1	14	0	3	0
	P_2	5	0	1	0
	P_3	5	0	0	0
	P_4	6	0	0	0
	P_5	4	0	0	0
C_2	P_1	10	1	0	10
	P_2	3	0	0	0
	P_3	8	0	0	0
	P_4	2	0	0	0
	P_5	9	0	0	0
C_3	P_1	19	0	0	0
	P_2	13	1	0	7.69
	P_3	8	0	0	0
	P_4	5	1	0	20
	P_5	16	2	0	12.50
C_4	P_1	16	1	1	6.25
	P_2	5	1	0	20
	P_3	10	0	2	0
	P_4	3	1	0	33.33
	P_5	10	1	0	10
C_5	P_1	22	1	1	4.54
	P_2	9	0	1	0
	P3	15	0	3	0
	P4	6	0	1	0
	P5	8	1	0	12.53

Each medium containing MS medium + 15% coconut water + 300 mg/l casein hydrolysate + 20 g/l sucrose + various concentrations of growth regulators as follows:

P_1 = 2 mg/l BAP + 0.2 mg/l NAA
P_2 = 3 mg/l BAP + 0.2 mg/l NAA
P_3 = 3 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA
P_4 = 2 mg/l BAP + 1 mg/l kinetin + 0.2 mg/l NAA
P_5 = 3 mg/l BAP + 1 mg/l kinetin + 0.5 mg/l NAA

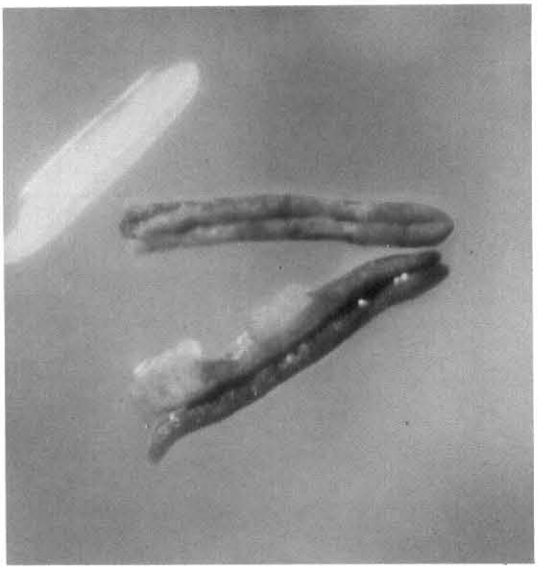


Figure I Callus induction from brown anther.

บางส่วนจะตาย ส่วนที่เหลือบางส่วนจะไม่ติดเมล็ด เพราะต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู ส่วนมากจะมีโครโมโซม 1 ชุด เมื่อมีการชักนำให้มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็น 2 ชุด ซึ่งอาจจะเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรือชักนำด้วยสารโคลชิซินนั้น ต้นข้าวก็สามารถจะติดเมล็ดได้ ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าอาหารที่ใส่สารโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.03% เป็นเวลา 5 วัน สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นที่มีจำนวนชุดโครโมโซม 2 ชุด ที่เหมือนกัน (doubled haploid plant) 66.66% แต่พบว่ามีต้นที่รอดตายน้อยมาก ดังนั้น อาหารที่ใส่สารโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้น 0.01% เป็นเวลา 5 วัน น่าจะเป็นอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดของ

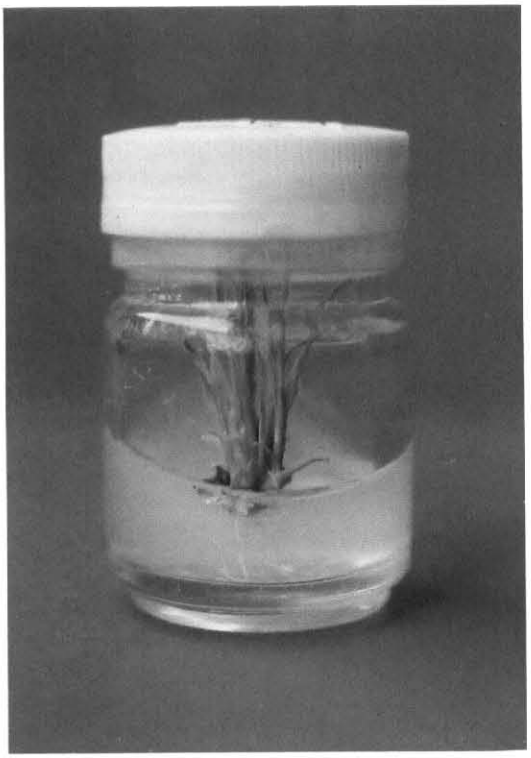


Figure 2 Plantlets on the regeneration medium.

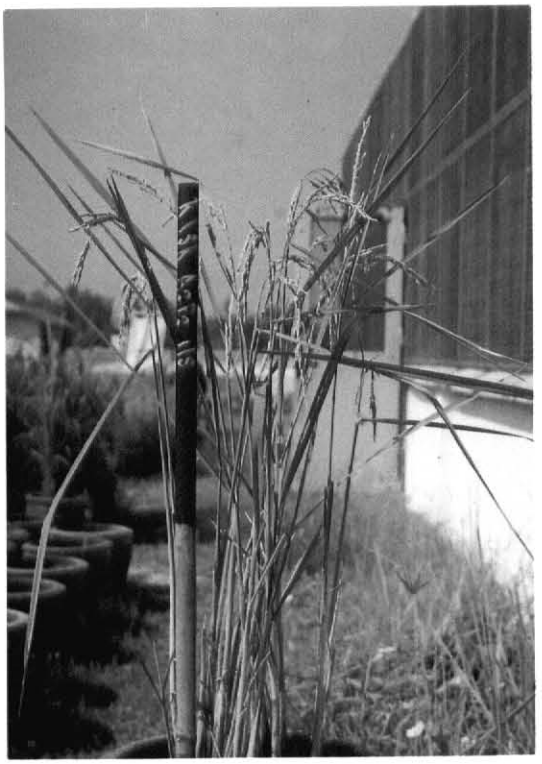


Figure 3 The doubled haploid plants from anther culture.

Table 4 Percentage of plantlet regeneration on various regereration media.

Regeneration medium	No of calli cultured	% of normal plantlets	% of albino plantlets
P_1	81	3.70	6.17
P_2	35	5.71	5.71
P_3	46	0.00	6.17
P_4	22	9.90	4.54
P_5	47	8.51	0.00

Each medium containing MS medium + 15% coconut water + 300 mg/l casein hudrolysate + 20 g/l sucrose + various concentrations of growth regulators as follows:

P1 = 2 mg/l BAP + 0.2 mg/l NAA
P2 = 3 mg/l BAP + 0.2 mg/l NAA
P3 = 3 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA
P4 = 2 mg/l BAP + 1 mg/l kinetin + 0.2 mg/l NAA
P5 = 3 mg/l BAP + 1 mg/l kinetin + 0.5 mg/l NAA

Table 5 Percentage of doubled haploid plants from anther culture.

Colchicine concentration(%)	Days of treatment plants	No.of plants cultured	No. of survival plants	No. of double haploid	% doubled haploid
0	0	-	11	5	45.45
0.01	3	15	7	2	28.57
	5	15	5	3	60.00
0.03	3	15	4	0	0
	5	15	3	2	66.66

โครโมโซม เพราะมีต้นที่รอดตายสูงกว่าและมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นที่มีจำนวนชุดโครโมโซม 2 ชุด ที่เหมือนกันสูงถึง 60% สำหรับในกลุ่มควบคุมหรือต้นข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ใส่สารโคลชิซิน สามารถเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมเองตามธรรมชาติ และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นที่มีชุดโครโมโซมที่เหมือนกัน 2 ชุด 45.45% (Table 5 and Figure 3) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Rout and Sarma (1991) ซึ่งพบว่าข้าวสามารถเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมเองตามธรรมชาติได้ถึง 60.00%

สรุป

จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) (ขาวดอกมะลิ 105/สไคบอนเนท) ได้ผลดังนี้

1. อาหารสูตรที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง

อับเรณูเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส คืออาหารสูตร N_6 ที่เติม 2,4-D 2 มก./ล. kinetin 1 มก./ล. เคซินไฮโดรไลเซท 500 มก./ล. และน้ำตาลซูโครส 50 ก./ล.

2. อาหารสูตรที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อชักนำให้เกิดต้น คือ อาหารสูตร MS ที่เติม BAP 2 มก./ล. kinetin 1 มก./ล. NAA 0.2 มก./ล. เคซินไฮโดรไลเซท 300 มก./ล. น้ำมะพร้าว 15% และน้ำตาลซูโครส 20 ก./ล.

3. สามารถผลิตข้าวลูกผสมที่มีโครโมโซม 2 ชุด ที่เหมือนกันได้จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนที่ได้ในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% สารสกัดจากยีสต์ 1 ก./ล. BAP 3 มก./ล. และที่เติมสารโคลชิซินและไม่เติมสารโคลชิซิน

เอกสารอ้างอิง

ประภา ศรีพิจิตต์, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, และอภิชาติ วรรณวิจิตร. 2537. การปรับปรุงข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ไม่ไวต่อช่วงแสง โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของลูกผสมชั่วที่ 1. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 28: 499-511.

Chung, G.S.1988. Rice (*Oryza sativa* L.) anther culture. pp. 94-107. *In* Cell and Tissue Culture in Field Crop Improvement. Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region, Taipei, Taiwan.

Don Nguyen, M. 1993. Effect of interaction between genotype and culture medium on callus induction and plant regeneration of anther culture Vietnamese indica rice. (*Oryza sativa* L.). IRRN 3:10-11.

Hu, Z., S.C. Huang, C.P. Ho, H.C. Liang, C.C.Chuang, and L.P. Peng.1978. On the inductive condition of rice pollen plantlets in anther culture. pp. 87-96. *In* Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture. 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* Rice Biotecnology IRRI, Los Banos.

Martin, M., J. Cornejo and E. Primo-Millo. 1981. Anther and pollen grain culture of rice (*Oryza sativa* L.). Euphytica 30:541-546.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-492.

Niizeki, H. and K. Oono. 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. Proc. Jpn. Acad. Sci. 44:554-557.

Raina, S.K. 1993. Double Haploid form Indica Rices Through Anther Culture Techniques. Biotecnology Centre, I.A.R.I., New Delhi, 19 p.

Raina, S.K., P. Sathish, and K.S. Sharma. 1987. Plant regenerate from *in vitro* culture of anther and mature seed of rice (*Oryza sativa* L.) cv. Basmati-370. Plant Cell Rep. 6:43-45.

Rout, J.R. and N.P. Sarma. 1991. Anther callus induction and green plant regeneration at high frequencies from and interspecific rice hybrid *O. sativa* Linn. x *O. rufipogon* Griff. Euphytica 54:155-159.

Woo, S.C. and C.Y. Huang. 1980. Anther culture of *O. glaberrima* Steud and its hybrids with *O. sativa* L. Bot. Bull. Acad. Sinica 21:75-79.

Zapata, F.J., G.S. Khush, J.P. Crill, M.H. Nou, R.O. Romero, L.B. Torrizo, and M. Alejar. 1983. Rice anther culture at IRRI, pp.27-46. *In* Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. Science Press, Beijing.