ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 28:193-199(2537)

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อน ร่วมกับการชักนำด้วยโคลชิซิน

Rice Improvement Through Immature Embryo Culture and Colchicine Treatment

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ[1] สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล[1] เผดิม ระติสุนทร[1]
เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา[1] กาญจนา กล้าแข็ง[2] นิตย์ศรี แสงเดือน[1] ชัยฤกษ์ มณีพงษ์[3]
สงกรานต์ จิตรากร[2]

Pradit Pongtongkam, Surin Peyachoknagul, Paderm Ratisoontorn,
Saowanee Suputtitada, Kanchana Klakhaeng, Nitsri Sangduen,
Chairerk Maneepongse and Songkran Jitrakorn

ABSTRACT

The F1 hybrids (IR 70/*O. minuta* and IR 72/*O. minuta*) were cultured on the modified MS media containing 15% coconut water, 1g/l yeast extract, 3 mg/l BAP and 0.01, 0.03 and 0.05% colchicine during 3, 5 and 7 days. The F1 hybrids could have most rapid growth and many tillers on the 0.01% colchicine supplemented medium. These F1 hybrids from such medium which were treated for 3, 5 and 7 days were transferred to pots in the greenhouse. Some tillers produced panicles and seeds, while some tillers produced panicles but no seed formation. F_2 seeds were planted, almost all of tillers produced panicles and seeds. The size of F_3 seeds were similar to cultivated varieties (IR 70 and IR 72).

Key words : rice improvement, immature embryo rescue

1 ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Dept. of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.
2 สถานีทดลองข้าวปทุมธานี คลองหลวง ปทุมธานี 12120
Pathumtani Rice Research Center, Amphcr Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand.
3 ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Dept. of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงข้าวลูกผสม 2 คู่ คือ IR70/*O. minuta* และ IR72/*O. minuta* บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ yeast extract 1 กรัม/ลิตร BAP 3 มิลลิกรัม/ลิตร และโคลชิซิน 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0.01, 0.03 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน ต้นข้าวลูกผสมทั้งสองคู่เจริญเติบโตและแตกกอได้ดีที่สุดในอาหารสูตรที่มีโคลชิซิน 0.01 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย้ายต้นข้าวลูกผสมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรนี้ในช่วงเวลา 3,5 และ 7 วัน ออกปลูกในสภาพธรรมชาติ พบว่าต้นข้าวบางต้นในแต่ละกอสามารถออกรวงและติดเมล็ดได้ บางต้นสามารถออกรวงแต่ไม่ติดเมล็ด เมื่อนำเมล็ด F_2 เหล่านี้ไปปลูก ต้นข้าวเกือบทุกต้นในแต่ละกอสามารถออกรวงและติดเมล็ด (F_3) ได้ เมล็ด F_3 นี้มีขนาดใกล้เคียงกับเมล็ดข้าวพันธุ์ปลูก

คำนำ

โครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในประเทศไทย มีจุดประสงค์หลักเพื่อผลิตพันธุ์ข้าวที่ให้ผลผลิตสูง คุณภาพในการหุงต้มดี ต้านทานต่อโรค แมลง ทนแล้ง ทนกรด ทนเค็มฯลฯ เพื่อให้เหมาะสมต่อการเพาะปลูกในสภาพพื้นที่ในภาคต่างๆ ของประเทศ พันธุ์ข้าวที่ใช้ปลูกอยู่ในปัจจุบันนั้น บางพันธุ์อาจให้ผลผลิตสูงแต่ไม่ต้านทานโรค หรือแมลงศัตรูข้าวบางชนิด เมื่อเกิดโรคหรือแมลงเหล่านี้ระบาดเข้าทำลายก็จะเกิดการสูญเสียผลผลิต เช่น กรณีการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ทำลายการเพาะปลูกข้าวสุพรรณบุรี 60 ในภาคกลาง หรือโรคไหม้คอรวงที่เข้าทำลายการเพาะปลูกข้าวในภาคเหนือ พันธุ์ข้าวที่ถูกทำลายเหล่านี้ไม่มียีนที่ต้านทานต่อโรคหรือแมลงที่เข้าทำลายนั้นๆ แต่ในข้าวพันธุ์ป่าหลายชนิดมีความสามารถต้านทานต่อโรคหรือแมลงเหล่านี้อยู่เป็นจำนวนมาก แต่การผสมพันธุ์ข้ามชนิดกันระหว่างข้าวพันธุ์ป่ากับข้าวพันธุ์ปลูกทำได้ค่อนข้างยากเพราะพันธุ์ข้าวป่ามีจำนวนโครโมโซมมากกว่าพันธุ์ข้าวปลูก นักวิจัยจึงพยายามแก้ไขปัญหานี้โดยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การใช้ฮอร์โมนพืชแก้ความเข้ากันไม่ได้ทางพันธุกรรม ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อพัฒนาคัพภะอ่อนที่อ่อนแอให้เจริญเป็นต้นกล้า (ประดิษฐ์ และคณะ, 2536) การเพาะเลี้ยงละอองเกสรข้าวป่าเพื่อลดจำนวนโครโมโซมลงให้เท่ากับข้าวปลูกเพื่อที่ข้าวทั้งสองชนิดจะได้ผสมกันได้ ซึ่งถ้าสามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ ก็จะสามารถถ่ายทอดลักษณะจากข้าวป่ามายังข้าวปลูก แล้วจึงใช้กระบวนการปรับปรุงพันธุ์แบบปกติ (conventional breeding) เพื่อสร้างพันธุ์ข้าวที่ทนโรค ทนแมลง และทนแล้งต่อไปได้ (ชัยฤกษ์, 2533)

ในกรณีของการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนที่เกิดจากการผสมพันธุ์ข้าวต่างชนิดหรือต่างสกุล เพื่อจุดประสงค์ที่จะให้ได้พันธุ์ข้าวที่ต้านทานโรคและแมลง หรือทนดินเค็มนั้น ได้มีนักวิจัยทำการทดลองเป็นจำนวนมาก ทั้งที่ประสบความสำเร็จและอยู่ในระหว่างการดำเนินการวิจัย (Han *et al.*, 1993; Mahapatra *et al.*, 1993, Faroog *et al.*, 1993; Amante-Bordaes, 1990.)

จุดประสงค์ของการทดลองนี้ เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการถ่ายทอดลักษณะพึงประสงค์บางลักษณะจากพันธุ์ข้าวป่ามาสู่พันธุ์ข้าวปลูกโดยอาศัยกระบวนการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนเข้าร่วม

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ต้นข้าวลูกผสม (F_1) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนของลูกผสมระหว่างข้าวพันธุ์ป่า (*Oryza minuta*) กับข้าวพันธุ์ปลูก 2 พันธุ์ คือ IR70 และ IR72 (*Oryza sativa*) ซึ่งอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ

2. อาหารสังเคราะห์สำหรับใช้เพาะเลี้ยงข้าวลูกผสมรวม 4 สูตร คือ

สูตร M0 = อาหารสูตร MS ดัดแปลง + น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ + yeast extract 1 กรัม/ลิตร + BAP 3 มิลลิกรัม/ลิตร

สูตร M1 = อาหารสูตร M0 + โคลชิซิน 0.01%

สูตร M2 = อาหารสูตร M0 + โคลชิซิน 0.03%

สูตร M3 = อาหารสูตร M0 + โคลชิซิน 0.05%

วิธีการ

เพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนอายุ 9-14 วัน ซึ่งได้จากการผสมเกสรข้าวข้ามชนิดระหว่างพันธุ์ป่า กับพันธุ์ปลูกสองพันธุ์คือ IR70 และ IR72 ในอาหารสูตร M0 เมื่อคัพภะอ่อนเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นต้นกล้าแล้ว ทำการขยายพันธุ์โดยเพิ่มจำนวนต้นในอาหารสูตรเดิม จากนั้นจึงนำต้นข้าวลูกผสมของทั้งสองคู่ผสมไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร M1, M2 และ M3 ในสามช่วงเวลาคือ 3, 5 และ 7 วัน ในแต่ละขวดอาหารจะมีต้นข้าวลูกผสมเพียง 1 ต้น เมื่อครบช่วงเวลาที่กำหนดแล้ว ย้ายต้นข้าวออกไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร M0 เป็นเวลาอีก 6 สัปดาห์ บันทึกผลของโคลชิซินต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวลูกผสมเหล่านั้นแล้วจึงย้ายต้นข้าวแต่ละกอออกปลูกในสภาพธรรมชาติ ติดตามการออกรวงและติดเมล็ดในแต่ละการทดลองต่อไป

ผลและวิจารณ์

จากการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนอายุ 9-14 วัน ของข้าวลูกผสม (F_1) ที่ได้จากการผสมข้ามชนิดระหว่างข้าวพันธุ์ป่ากับข้าวพันธุ์ปลูกสองพันธุ์คือ IR70 และ IR72 ในอาหารสูตร M0 จนได้ต้นข้าวลูกผสม แล้วทำการขยายเพิ่มจำนวนต้นในอาหารสูตรเดิม เมื่อได้จำนวนต้นมากพอได้แบ่งส่วนหนึ่งออกปลูกในสภาพธรรมชาติ พบว่าลูกผสมที่ได้จะมีลักษณะรูปทรงของลำต้นคล้ายคลึงกับพันธุ์ IR70 และ IR72 ลักษณะของรวงข้าวและรูปร่างของเมล็ดจะเหมือนข้าวพันธุ์ป่า แต่เมล็ดทุกเมล็ดจะลีบ หรือบางรวงก็ไม่ติดเมล็ด

ดังนั้นจึงนำต้นข้าวลูกผสมของทั้งสองคู่ผสมอีกส่วนหนึ่งมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร M1, M2 และ M3 เป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน โดยเพาะเลี้ยง 1 ต้นต่อ 1 ขวดอาหาร เมื่อครบกำหนดช่วงเวลาแล้ว ย้ายต้นข้าวลูกผสมจากแต่ละสูตรอาหารเหล่านี้ กลับไปเลี้ยงบนอาหารสูตร M0 ตามเดิม พบว่าลูกผสม IR70/*O. minuta* เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร M1 เป็นเวลา ๆ วัน จะมีการแตกกอดี จำนวนขวดอาหารที่มีการแตกกอจะมากกว่าที่เพาะเลี้ยงในเวลา 5 และ 7 วัน การแตกกอลดอัตราลงและจำนวนขวดอาหารที่มีต้นข้าวที่รอดตายลดลงเมื่อปริมาณโคลชิซินในอาหารสูงขึ้นและไม่มีต้นข้าวรอดตายในอาหารสูตร M3 ซึ่งมีปริมาณโคลชิซินถึง 0.05 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) สำหรับลูกผสม IR72/*O. minuta* พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร M1 มีการแตกกอน้อย และจำนวนขวดที่มีการแตกกอก็น้อยเช่นเดียวกัน กับการปนเปื้อนค่อนข้างสูงในอาหารสูตร M3 (Table 1)

เมื่อนำต้นข้าวแต่ละกอจากแต่ละขวดอาหารออกปลูกในสภาพธรรมชาติพบว่าต้นข้าวบางต้นออกรวงและติดเมล็ดได้ บางต้นออกรวงแต่ไม่ติดเมล็ด โดยต้นข้าวลูกผสมทั้งสองคู่ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร M1 ทั้ง 3 ช่วงเวลา คือ 3, 5 และ 7 วัน จะมีบางต้นในกอเดียวกันออกรวง และติดเมล็ด บางต้นออกรวงแต่ไม่ติดเมล็ด ที่เป็นดังนี้เป็นผลที่โคลชิซินสามารถแก้ความเป็นหมันของต้นข้าวบางต้นในแต่ละกอได้ เพราะถ้าเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร M0 ซึ่งปราศจากโคลชิซินแล้วเมล็ดลีบทั้งหมด เมล็ดที่ได้นี้ (F_2) ยังคงมีขนาดเล็กแต่ใหญ่กว่าพันธุ์ข้าวป่า รูปร่างของเมล็ดยังเหมือนกับพันธุ์ข้าวป่าและมีหนวดข้าวเช่นเดียวกัน

สำหรับเมล็ด (F_2) ที่ได้จากต้นลูกผสม (F_1) ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ใส่โคลชิซิน มีขนาดเล็กกว่าพันธุ์ปลูกเล็กน้อย และไม่มีหนวดข้าว เมื่อนำเมล็ดที่ได้เหล่านี้ไปปลูกทุกต้นมีการแตกกอดี สามารถออกรวง

และติดเมล็ดได้เกือบทุกต้น เมล็ดที่ได้รุ่นใหม่นี้ (F_3) จะมีขนาดใหญ่ขึ้น ลักษณะเมล็ดคล้ายคลึงกับพันธุ์ปลูก เพียงแต่ขนาดของเมล็ดโดยเฉลี่ยเล็กกว่าของพันธุ์ปลูกเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Figure 1,2)

ผลการทดลองที่ได้นี้จะเป็นประโยชน์ต่อโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะการสร้างพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรคหรือแมลงบางอย่างโดยการผสมข้ามชนิดระหว่างข้าวพันธุ์ปลูกที่ไม่ต้านทาน กับข้าวพันธุ์ป่าที่ต้านทานโรค แมลงชนิดนั้นๆ ซึ่งโดยปกติเมื่อทำการผสมข้ามชนิดแล้ว ลูกผสมที่เกิดขึ้น (F_1) มักจะไม่สามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์ได้ โดยมักจะร่วงหลุดจากรวงเสียก่อนที่เมล็ดจะแก่ การได้

Table 1 Effect of colchicine on the growth of hybrids.

Media Hybrids	Period of (% colchicine)	Number of treatment (days)	Number of plantlets cultured	Number of uncontaminated bottles	Type of survived plantlets	tiller formation
	M1	3	15	8	7	+++
	(0.01)	5	15	9	3	++
		7	15	5	2	+
IR70/						
O.minuta	M2	3	15	12	3	+
	(0.03)	5	15	10	1	+
		7	15	4	0	–
	M3	3	15	12	0	–
	(0.05)	5	15	4	0	–
		7	15	5	0	–
	M1	3	15	3	1	+
	(0.01)	5	15	4	1	+
		7	15	9	1	+
IR72/						
O.minuta	M2	3	15	9	0	–
	(0.03)	5	15	11	0	–
	7	15	0	0	–	
	M3	3	15	0	0	–
	(0.05)	5	15	0	0	–
		7	15	1	0	–

+++ = good, over 9 tillers formation

++ = fair, 5–8 tillers formation

+ = poor, 1–4 tillers formation

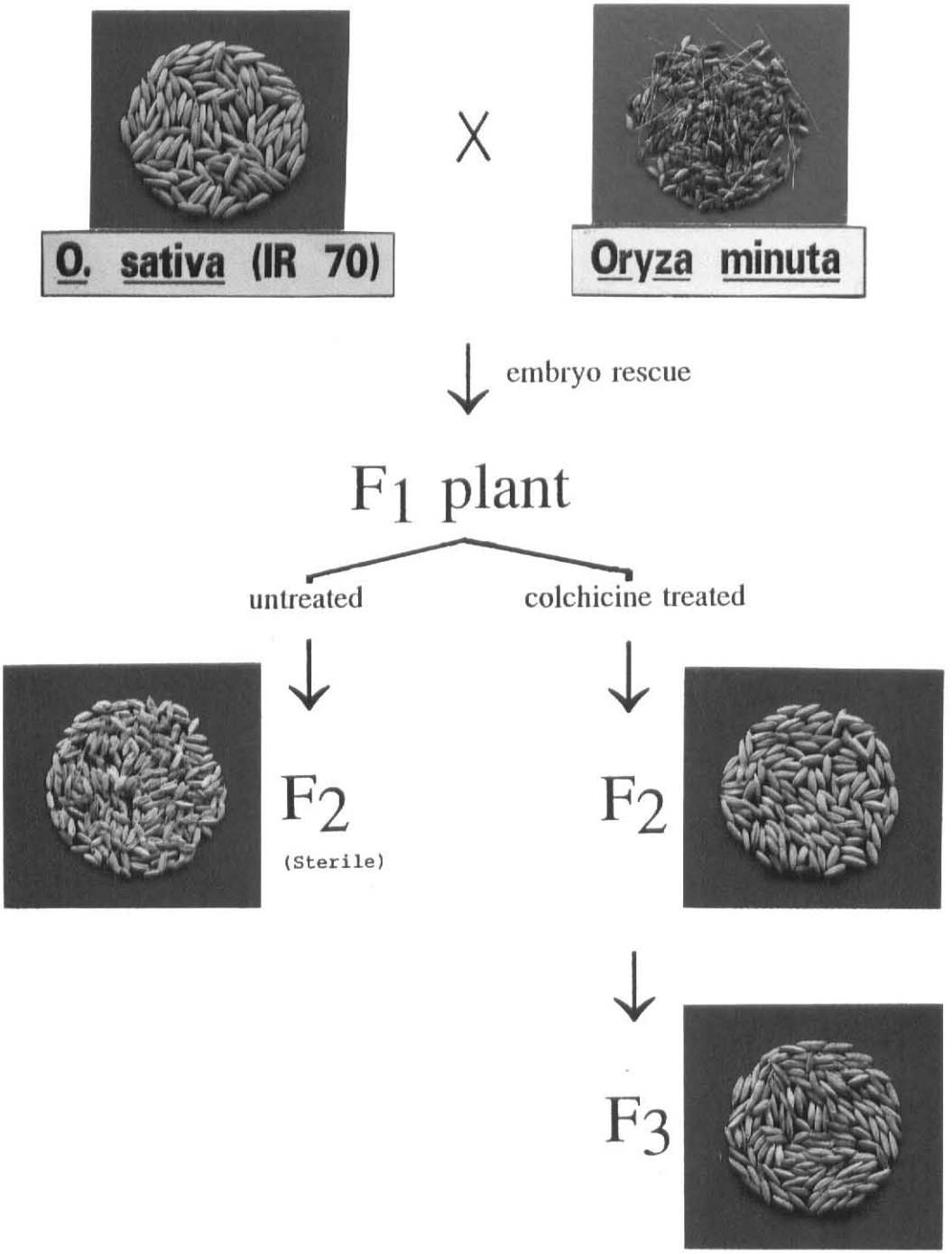


Figure 1 Diagram of *O. sativa* (IR 70) x *O. minuta* and seed performance of IR 70, *O. minuta*, F_2 and F_3.

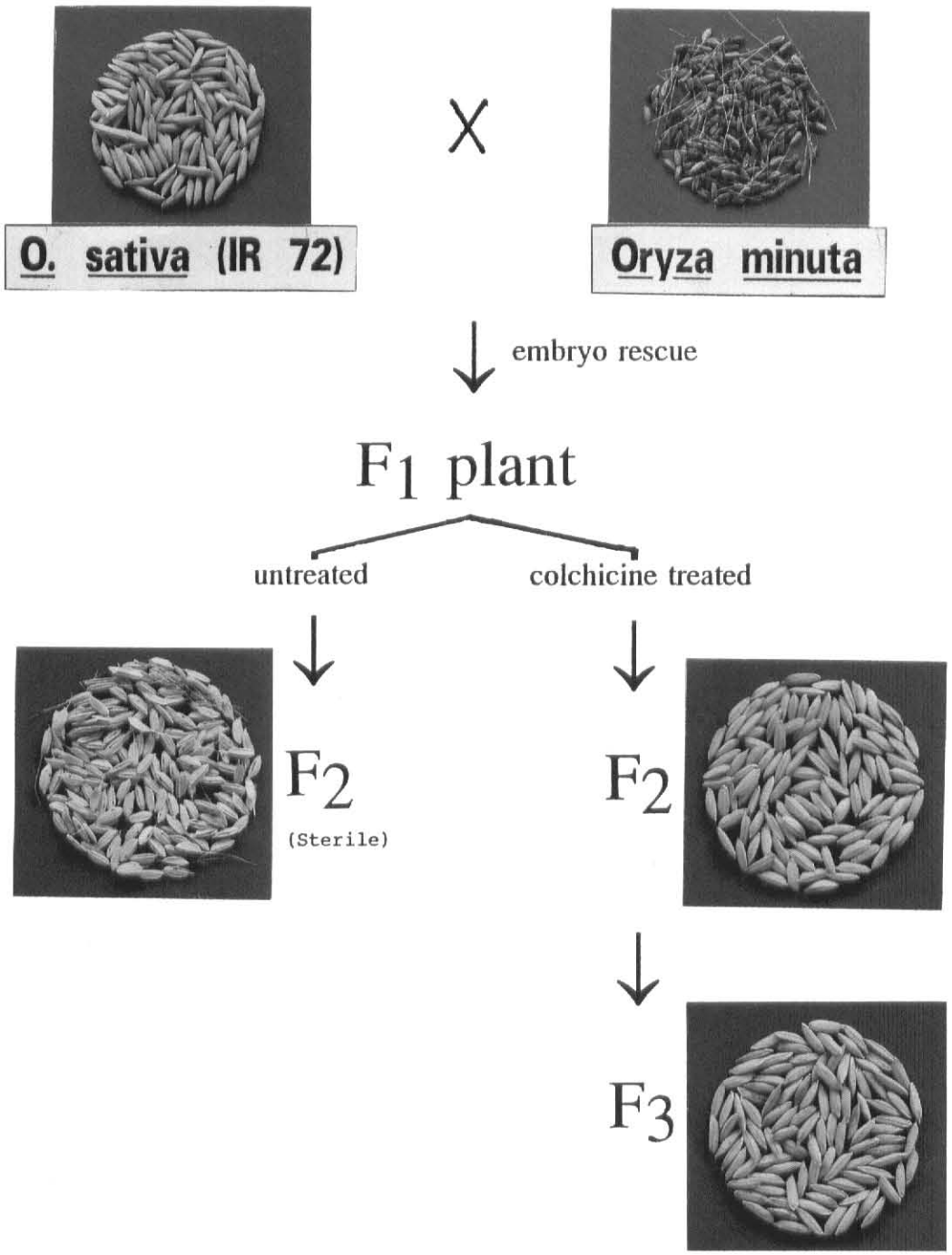


Figure 2 Diagram of *O. sativa* (IR 72) x *O. minuta* and seed performance of IR 72, *O. minuta*, F_2 and F_3.

มาของต้นข้าวลูกผสมจึงต้องใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อน เมื่อได้ต้นข้าวลูกผสมแล้ว ต้นข้าวเหล่านี้ก็จะเป็นหมันไม่สามารถให้เมล็ดที่สมบูรณ์ได้ เพราะเชื้อพันธุกรรมของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ต่างชนิดกัน จึงต้องแก้ความเป็นหมันด้วยการใช้โคลชิซินในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ก็จะได้เมล็ด F_2 เมื่อนำไปเพาะปลูกในชั่วต่อไปก็จะได้เมล็ด F_3 ซึ่งลักษณะของเมล็ดค่อนไปทางบรรพบุรุษที่เป็นพันธุ์ปลูกต้นข้าว F_3 นี้จะมีบางส่วนที่ได้รับการถ่ายทอดลักษณะต้านทานโรค หรือแมลงตามที่ประสงค์นำไปดำเนินการคัดเลือกต่อไป

สรุป

การเพาะเลี้ยงข้าวลูกผสมสองคู่ผสม คือ IR70/*O. minuta* และ IR72/*O. minuta* ในอาหารสูตรที่เติมโคลชิซินเพื่อแก้ความเป็นหมัน รวม 3 สูตร ซึ่งมีโคลชิซินในอัตรา 0.01, 0.03 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการเพาะเลี้ยงแต่ละสูตรในสามช่วงเวลา คือ 3, 5 และ 7 วัน พบว่าอาหารสูตรที่เติมโคลชิซิน 0.01 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้ต้นข้าวลูกผสมแตกกอดีที่สุด เมื่อนำต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรนี้ออกปลูกในสภาพธรรมชาติ ต้นข้าวบางต้นในแต่ละกอสามารถออกรวงและติดเมล็ดได้ บางต้นออกรวงแต่ไม่ติดเมล็ด เมล็ดที่ได้มีขนาดเล็กและคล้ายคลึงกับข้าวพันธุ์ป่า เมื่อนำเมล็ดเหล่านี้ไปปลูก ต้นข้าวเกือบทุกต้นในแต่ละกอสามารถออกรวง และเมล็ดรุ่นใหม่ที่ได้นี้มีขนาดและความคล้ายคลึงกับข้าวพันธุ์ปลูก

เอกสารอ้างอิง

ชัยฤกษ์ มณีพงษ์. 2533. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยการผสมข้ามชนิด. วารสารข่าวธุรกิจเทคโนโลยีชีวภาพ, ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 5(5):หน้า 1.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, กาญจนา กล้าแข็ง, เผดิม ระติสุนทร, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, นิตย์ศรี แสงเดือน, ชัยฤกษ์ มณีพงศ์ และหทัยรัตน์ อุไรวงศ์. 2536. การเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนของข้าวลูกผสม. วิทยาสารเกษตรศาสตร์ (วิทย.). 27(1):15-19.

Amante-Bordaes, A..D., R.J. Nelson, N.P. Oliva, R.D. Dalmacio, H. Leung and L.A. Sitch. 1990. Transfer of blast and bacterial blight resistance from *Oryza minuta* to *O. sativa*. *In* Rice Genetic II, Proceedings of the Second International Rice Genetics Symposium, May 14-18, 1990. IRRI, Philippines. pp 234-246.

Faroog, S., N. Igbal, M. Asghar and T.M. Shah. 1993. Wide hybridization for improvement of salt tolerance in rice. *In* Abstracts of Sixth Annual Meeting of the International Program on Rice Biotechnology, February 1-5, 1993, Chiang Mai, Thailand. p. 141.

Han, H., Z. Qing, W. Xian-ping, M. Long and Z. Li huang. 1993. Hybridization between wild rice O. alta and *O. sativa*. *In* Abstracts of Sixth Annual Meeting of the International Program on Rice Biotechnology, February 1-5,1993, Chiang Mai, Thailand. p. 139.

Mahapatra, D., I.C. Mohanty, L.K. Bose and R.N. Mishra. 1993. Wide hybridization for rice improvement. *In* Abstracts of Sixth Annual Meeting of the International Program on Rice Biotechnology, February 15, 1993, Chiang Mai, Thailand. p. 140.