

การชักนำให้เกิดการกลายในข้าวโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ตอนที่ 1

Induced Mutation in Rice by Tissue Culture I

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ¹ เติม รัตติสุนทร¹ เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา¹
สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล¹ เลิศลักษณ์ เงินศิริ¹ เบญจมาศ ศิลาชัย²
พรรณณี รอดแรงบุญ¹ กาญจนา กล้าแข็ง³ และ รังสิต เส็งหะพันธุ์³

P. Pongtongkam¹, P. Ratisoontorn¹, S. Suputitada¹, S. Peyachoknagul¹,
L. Ngernsiri¹, B. Silayoi², P. Rodrangboon¹, K. Klakhaeng³ and R. Senghaphan³

ABSTRACT

Seeds of Basmati 370 rice variety were cultured on the modified MS medium supplemented with various concentrations of 2,4-D, NAA and kinetin. The suitable callus induction medium was the modified MS medium containing 1 mg/l 2,4-D, 2 mg/l NAA and 1 mg/l kinetin. Calli from this medium were divided into two groups, one was 3 week old calli (non subcultured calli) and the other was 6 week old calli (subcultured calli). Both groups seemed to grow and develop into plantlets quite well on the modified MS medium supplemented with 2 mg/l kinetin. However the percentage of plantlets induction from 3 week old calli was better.

Calli of both groups were irradiated with different doses of gamma radiation and were cultured on the regenerated medium. The 3 week old calli were better than 6 week old calli in regenerating into plantlets.

Key words : gamma radiation, mutation, rice

1.ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dept. of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart Univ., Bangkok 10900, Thailand.

2.ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart Univ., Bangkok 10900, Thailand.

3.ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี คลองหลวง ปทุมธานี 12120.

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

บทคัดย่อ

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 ในอาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติม 2,4-D, NAA และ kinetin ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่า อาหารสูตรที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส คือ อาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติม 2,4-D 1 มก./ล, NAA 2 มก./ล และ kinetin 1 มก./ล. แคลลัสที่ได้จากอาหารสูตรนี้ อายุ 3 สัปดาห์ (ไม่ผ่านการเปลี่ยนอาหาร) และ 6 สัปดาห์ (ผ่านการเปลี่ยนอาหาร 1 ครั้ง) สามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดีในอาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติม kinetin 2 มก./ล. อย่างไรก็ดีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่ของแคลลัสอายุ 3 สัปดาห์ จะสูงกว่าแคลลัสอายุ 6 สัปดาห์ เมื่อนำแคลลัสอายุ 3 สัปดาห์ และ 6 สัปดาห์ ไปอาบรังสีแกมมาในปริมาณต่างกัน แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดต้น พบว่า แคลลัสอายุ 3 สัปดาห์ สามารถเจริญไปเป็นต้นใหม่ได้ดีกว่าแคลลัสที่อายุ 6 สัปดาห์

คำนำ

ข้าวพันธุ์บาสมาติเป็นพันธุ์ข้าวของรัฐปัญจาบ เมื่อรัฐนี้ถูกแบ่งออกเป็นอินเดียและปากีสถานพันธุ์ข้าวนี้จึงเป็นของทั้งสองประเทศ ลักษณะโดยทั่วไปของข้าวพันธุ์บาสมาติมีลักษณะการแตกกอดีลำต้นค่อนข้างเล็ก ใบเล็ก ต้นสีขาว ใบสีเขียว ออกรวงโผล่พ้นใบธง เมล็ดค่อนข้างไม่มากนัก มีเมล็ดสีปนมาก เมล็ดข้าวเปลือกสีขาวเล็กน้อย เมล็ดปลายรวงจะมีหนวดข้าว เมล็ดข้าวกล้องขาวประมาณ 6.8-7 มิลลิเมตร เมล็ดข้าวเปลือกบาสมาตินี้มีน้ำหนักเบา มีคุณภาพการขัดสีต่ำ แต่มีคุณภาพการหุงต้มดี มีกลิ่นหอมถูกรสนิยมของผู้บริโภคในประเทศแถบตะวันออกกลาง โรคที่เป็นมากคือ โรคขอบใบแห้งแต่สามารถต้านทานต่อโรคใบไหม้และโรครากเน่าได้ดีพอใช้ ข้าวพันธุ์บาสมาติสามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศไทย แต่ผลผลิตค่อนข้างต่ำ (วรวิทย์, 2530) ดังนั้นจึง

ควรมีการปรับปรุงข้าวพันธุ์บาสมาติให้ผลผลิตสูงขึ้นแนวทางหนึ่งที่เป็นไปได้ คือ การนำเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเข้ามาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ ต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีความผันแปรทางพันธุกรรม ซึ่งจะพบในอัตราที่สูงกว่าที่พบจากการปลูกจากเมล็ด อัตราการเกิดความผันแปรนั้นจะแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิดแต่ละพันธุ์. (Maliga, 1984; Chu 1983) ความผันแปรที่เกิดขึ้นมีทั้งที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและที่ไม่ใช่พันธุกรรม (Carlson, 1975; Chaleff, 1980) แต่ส่วนใหญ่เป็นความผันแปรที่เกิดจากพันธุกรรมมากกว่าที่จะเป็นแบบไม่ใช่พันธุกรรม และความผันแปรนั้นจะเรียกว่า การกลายพันธุ์ (Malega, 1984; Malega, 1985) เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวได้รับการพัฒนาอย่างรวดเร็ว ชิ้นส่วนของต้นเกือบทุกส่วนสามารถนำมาใช้เพาะเลี้ยงเพื่อให้สร้างแคลลัสได้ เช่น ราก ใบ (Henke et al., 1978) เมล็ด (Maeda, 1980) เมื่อย้ายแคลลัสที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ (Nishi et al., 1968)

เผดิม และคณะ (2532) เพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์บาสมาติในอาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์พร้อมทั้งเติม 2,4-D 1.0, 2.0 มก./ล. NAA 1.0, 2.0 มก./ล. และ kinetin 0.5, 1.0 มก./ล. พบว่าอาหารสูตร MS คัดแปลงที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 2,4-D 2.0 มก./ล. NAA 2.0 มก./ล. และ kinetin 0.5 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 33.33 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายแคลลัสเหล่านี้เลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS คัดแปลงที่ปราศจากน้ำมะพร้าว และสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้สูงสุดประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Raina et al. (1987) ได้เพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 ในอาหารสูตร MS พบว่า การเติม 2,4-D หรือ 2, 4, 5-

T 1 หรือ 2 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และเมื่อนำแคลลัสเหล่านี้ไปเพาะเลี้ยงในอาหาร สูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมนแต่เติม tryptophan 50 หรือ 100 มก./ล. แคลลัสสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ และในปี ค.ศ. 1993 Gosal *et al.* ได้เพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์บาสมาติในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1.5–2.0 มก./ล. และ kinetin 0.5 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยแคลลัสจะเกิดในส่วนของ scutellum จากนั้นได้ชักนำแคลลัสพัฒนาเป็นต้นในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 0.5 มก./ล. จุดประสงค์ของการทดลองครั้งนี้ เพื่อปรับปรุงและพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 เพื่อชักนำให้สร้างแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นในอัตราที่สูงขึ้นและศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของแคลลัสในข้าวพันธุ์นี้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เมล็ดข้าวพันธุ์บาสมาติ (G.S.No. 46u7)
2. อาหารสังเคราะห์ที่ใช้เพาะเลี้ยงเมล็ด เพื่อ

ชักนำให้เกิดแคลลัสรวม 5 สูตร คือ

C_0 = อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์

และเคซินไฮโดรไลเซต 1 ก./ล.

C_1 = C_0 + 2, 4-D 1 มก./ล. + NAA 1 มก./ล. + kinetin 1 มก./ล.

C_2 = C_0 + 2, 4-D 2 มก./ล. + NAA 1 มก./ล. + kinetin 1 มก./ล.

C_3 = C_0 + 2, 4-D 1 มก./ล. + NAA 2 มก./ล. + kinetin 1 มก./ล.

C_4 = C_0 + 2, 4-D 2 มก./ล. + NAA 2 มก./ล. + kinetin 1 มก./ล.

3. อาหารสังเคราะห์ที่ใช้เพาะเลี้ยงแคลลัส เพื่อชักนำให้เกิดต้นอ่อน คือ อาหาร สังเคราะห์สูตร MS ที่

เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เคซินไฮโดรไลเซต 1 ก./ล. และ kinetin ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 1, 2, 3 และ 4 มก./ล. รวมเป็นอาหาร 5 สูตร

วิธีการ

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เมล็ดข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 เจริญเป็นแคลลัส นำเมล็ดข้าวเปลือกพันธุ์บาสมาติ 370 มาแกะเอาเปลือกออก จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่เมล็ดข้าวในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วย้ายไปแช่ในสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และสารเปียกใบ 3–4 หยด เขย่าเป็นครั้งคราวนาน 30 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ชักนำให้เกิดแคลลัส 5 สูตรดังกล่าวเป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองโดยหาเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น ซึ่งแบ่งเป็น 3 ประเภทดังนี้

C หมายถึง แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่น (compact callus)

F หมายถึง แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันหลวมๆ (friable callus)

T หมายถึง แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์อยู่ระหว่างแบบ C และ F

การทดลองที่ 2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นอ่อน

การทดลองที่ 2.1 นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 อายุ 3 สัปดาห์ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ชักนำให้เกิดต้นอ่อน 5 สูตรดังกล่าว เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และบันทึกผลการทดลองดังนี้

G หมายถึง แคลลัสมีพื้นที่ที่มีจุดสีเขียวเกิดขึ้น

S หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอด

R หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นราก

P หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดและราก

N หมายถึง แคลลัสไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอดและราก

การทดลองที่ 2.2 นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 อายุ 3 สัปดาห์ ไปขยายเพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสในอาหารสูตรเดิม เป็นเวลาอีก 3 สัปดาห์ รวมเป็นแคลลัสอายุ 6 สัปดาห์ แล้วนำแคลลัสอายุ 6 สัปดาห์ นี้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ชักนำให้เกิดต้นอ่อน 5 สูตรดังกล่าวเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ ต่อการพัฒนาเป็นต้นอ่อน

นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 อายุ 3 สัปดาห์ และ 6 สัปดาห์ (ผ่านการเปลี่ยนอาหาร 1 ครั้ง) ไปอบรังสีแกมมาในปริมาณต่างๆ 6 ปริมาณ คือ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 กิโลเรด นำแคลลัสที่อบรังสีแล้วมาเลี้ยงในห้อยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้น (จากการทดลองที่ 2) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และบันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1

ผลและวิจารณ์

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์สามาติ 370 ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D, NAA และ kinetin ในระดับความเข้มข้นต่างๆ รวม 5 สูตร ในงานทดลองที่ 1 พบว่า อาหารทุกสูตรสามารถชักนำเมล็ดให้เจริญเป็นแคลลัสได้ โดยแคลลัสจะเกิดขึ้นในสัปดาห์แรกบริเวณส่วนฐาน ซึ่งเป็นบริเวณเดียวกับการออกของต้นกล้า แคลลัสที่เกิดขึ้นในระยะแรกจะมีสีเหลืองอ่อน ประกอบด้วยเซลล์ที่มีขนาดเล็กมีทั้งแบบที่เซลล์เกาะกันแน่น (compact callus) แบบที่เซลล์เกาะกันหลวมๆ (friable callus) เกิดแยกกันใน

แต่ละก้อน แต่พบว่ามีแคลลัสบางก้อนที่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ 2 ชนิด (Figure 1) ในสัปดาห์ต่อมาแคลลัสจะมีขนาดใหญ่ขึ้นแคลลัสบางส่วนมีสีเข้มขึ้น เซลล์ก่อนข้างร่วมเกาะกันอย่างหลวมๆ เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 3 สัปดาห์พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของอาหารแต่ละสูตรจะมีค่าอยู่ระหว่าง 35-76 เปอร์เซ็นต์ โดยอาหารสูตรที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด คือ อาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม 2,4-D, NAA และ kinetin ความเข้มข้น 1, 2 และ 1 มก./ล. ตามลำดับ โดยชักนำให้เกิดแคลลัส 75.86 เปอร์เซ็นต์ (Table 1)

เมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D, NAA และ kinetin ความเข้มข้น 1, 2 และ 1 มก./ล. อายุ 3 สัปดาห์ และอายุ 6 สัปดาห์ (ผ่านการเปลี่ยนอาหาร 1 ครั้ง) ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม kinetin ในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน รวม 5 สูตร พบว่า อาหารทุกสูตรสามารถชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

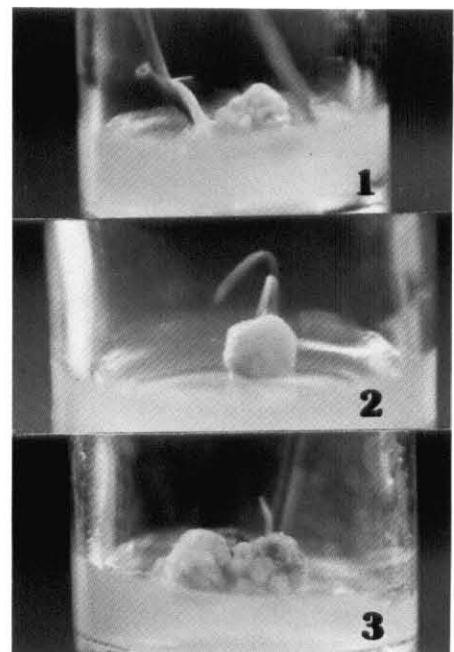


Figure 1 Types of callus
1. compact callus
2. friable callus
3. compact and friable callus

Table 1 Type and percent of calli derived from the seed of rice variety Basmati 370 cultured on modified MS media for 3 weeks.

Media	No. of cultured seeds	Type of callus			Number of calli	Callus formation (%)
		C	F	T		
C ₀	210	—	—	—	—	—
C ₁	202	23	20	54	97	48.01
C ₂	195	18	32	24	74	37.94
C ₃	203	50	61	43	154	75.80
C ₄	198	18	25	27	70	35.35

C = compact callus
 F = friable callus
 T = compact and friable callus

โดยสัปดาห์แรกจะเกิดบริเวณพื้นที่ที่มีจุดสีเขียวบนผิวของแคลลัส จากนั้นบริเวณพื้นที่ที่มีจุดสีเขียวจะมีการเจริญไปเป็นยอดอ่อน โดยแคลลัสแต่ละก้อนจะเกิดยอดอ่อนจำนวนไม่เท่ากัน ซึ่งพบว่าจะเกิดยอดอ่อนตั้งแต่ 1-6 ยอดต่อแคลลัสและจะมีการเกิดรากในเวลาต่อมา ทำให้ได้ต้นที่สมบูรณ์โดยไม่ต้องนำยอดไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดราก หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แคลลัสอายุ 3 สัปดาห์ และ 6 สัปดาห์ สามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้ดีที่สุดในอาหารสูตรเดียวกัน คือ อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม kinetin 2 มก./ล. โดยสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 50 และ 33.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 2 and 3) แสดงว่าแคลลัสที่มีอายุน้อยมีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นได้ดีกว่าแคลลัสที่มีอายุมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Henkeet al. (1978) ที่ว่าเมื่ออายุของแคลลัสเพิ่มขึ้นความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นจะลดลง หรือเปอร์เซ็นต์ในการเกิดต้นจะลดลง เมื่อมีการเปลี่ยนอาหารหลายครั้ง (Wang et al., 1987; Boissot, 1990).

เมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D, NAA และ kinetin ความเข้มข้น 1, 2 และ 1 มก./ล. อายุ 3 สัปดาห์ และ 6 สัปดาห์ ไปอบรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ ปริมาณ

คือ 0, 1, 2, 3, 4, และ 5 กิโลแรด แล้วนำแคลลัสที่อบรังสีแล้วมาเลี้ยงในหึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้รังสีมีผลต่อเซลล์อย่างเต็มที่ จากนั้นย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม kinetin 2 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสอายุ 3 สัปดาห์ ของทุกปริมาณสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ โดยมีอัตราการเกิดต้นอ่อนอยู่ระหว่าง 10.00 - 33.33 เปอร์เซ็นต์ โดยแคลลัสที่ไม่ได้รับการอบรังสีสามารถจะพัฒนาไปเป็นต้นได้สูงสุด คือ เกิดต้นอ่อนเท่ากับ 33.33 เปอร์เซ็นต์ (Table 4) และจากการเพาะเลี้ยงแคลลัส พบว่าในสัปดาห์แรกมีพื้นที่ที่มีจุดสีเขียวเกิดขึ้นบนผิวแคลลัส จากนั้นมีการเจริญของยอดอ่อน โดยยอดอ่อนที่เจริญขึ้นจะมีลักษณะต่างๆ กัน คือ แคลลัสที่ไม่ได้รับการอบรังสี จะมียอดอ่อนสีเขียวขนาดเล็ก แต่แคลลัสที่ได้รับการอบรังสีปริมาณ 13 กิโลแรด จะเกิดยอดอ่อนสีเขียวเข้มขนาดใหญ่กว่า และบางยอดมีลักษณะแคระแกรน นอกจากนี้ยังพบแคลลัสบางส่วนที่เกิดพื้นที่ที่มีจุดสีเขียว แต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นยอดอ่อนได้ จะเกิดเฉพาะรากเท่านั้น สำหรับแคลลัสที่ได้รับรังสีปริมาณ 4 และ 5 กิโลแรด สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ แต่การเจริญของลำต้นจะช้ากว่าแคลลัสที่ได้รับรังสี 0-3 กิโลแรด และยังพบต้นที่มีลักษณะบิดงออยู่

Table 2 Plantlet regeneration of 3 week old calli cultured on modified MS media supplemented with various concentration of kinetin for 4 weeks.

Kinetin Concentration (mg/l)	No. of calli cultured	Callus differentiation					Plantlet formation (%)
		G	S	R	P	N	
0	30	10	1	1	9	19	30.00
1	30	8	–	2	5	23	16.67
2	30	11	–	1	15	14	50.00
3	30	10	–	1	7	22	23.00
4	30	7	1	–	6	23	20.33

G = green spot on calli

S = shoot formation

R = root formation

P = whole plantlet

N = non regeneration

Table 3 Plantlet regeneration of 6 week old calli cultured on modified MS media supplemented with various concentration of kinetin for 4 weeks.

Kinetin Concentration (mg/l)	No. of calli cultured	Callus differentiation					Plantlet formation (%)
		G	S	R	P	N	
0	30	7	–	7	5	18	16.67
1	30	10	1	3	2	24	6.67
2	30	8	1	1	10	18	33.33
3	30	11	–	1	6	23	20.00
4	30	8	3	–	4	23	13.33

G = green spot on calli

S = shoot formation

R = root formation

P = whole plantlet

N = non regeneration

Table 4 Effect of gamma radiation on plantlet regeneration of 3 week old calli cultured on modified MS medium supplemented with 2 mg/l kinetin for 4 weeks.

Dose of gamma radiation (Krad)	No. of calli cultured	Callus differentiation					Plantlet formation (%)
		G	S	R	P	N	
0	30	13	4	3	10	13	33.33
1	30	18	2	3	7	18	23.33
2	30	22	—	4	8	18	26.67
3	30	9	—	—	3	27	10.00
4	30	5	—	—	8	22	26.67
5	30	3	—	—	5	25	16.67

G = green spot on calli

S = shoot formation

R = root formation

P = whole plantlet

N = non regeneration

Table 5 Effect of gamma radiation on plantlet regeneration of 6 week old calli cultured on modified MS medium supplemented with 2 mg/l kinetin for 4 weeks.

Dose of gamma radiation (Krad)	No. of calli cultured	Callus differentiation					Plantlet formation (%)
		G	S	R	P	N	
0	30	9	2	1	2	25	6.67
1	30	5	—	1	2	27	6.67
2	30	3	3	1	1	25	3.33
3	30	2	2	—	1	27	3.33
4	30	2	1	—	—	29	0.00
5	30	3	1	—	—	30	0.00

G = green spot on calli

S = shoot formation

R = root formation

P = whole plantlet

N = non regeneration

ในขวด

สำหรับแคลลัสอายุ 6 สัปดาห์ (ผ่านการเปลี่ยนอาหาร 1 ครั้ง) ที่ไม่ได้รับการอาบรังสีและที่ได้รับการอาบรังสีปริมาณ 1-3 กิโลแตร สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ โดยมีค่าการเกิดต้นอ่อนอยู่ระหว่าง 3.33-6.67 เปอร์เซ็นต์ โดยแคลลัสที่ไม่ได้รับการอาบรังสี และแคลลัสที่ได้รับการอาบรังสี 1 กิโลแตร สามารถจะพัฒนาเป็นต้นได้สูงสุด คือ เกิดต้นอ่อน 6.67 เปอร์เซ็นต์ (Table 5) การเปลี่ยนแปลงของแคลลัสจะคล้ายคลึงกับการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสอายุ 3 สัปดาห์ ยกเว้นกรณีของแคลลัสที่ได้รับรังสีปริมาณ 4-5 กิโลแตร โดยแคลลัสที่ได้รับรังสี 4 กิโลแตร พบว่าพื้นที่ที่มีจุดสีเขียวพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ แต่เมื่อผ่านไป 1 สัปดาห์ ยอดอ่อนไม่สามารถเจริญเติบโตได้ แต่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตายไปในที่สุด ส่วนแคลลัสที่ได้รับรังสีปริมาณ 5 กิโลแตร พบว่าพื้นที่ที่มีจุดสีเขียวไม่มีการพัฒนาเป็นยอดหรือราก และในเวลาต่อมาแคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตายในที่สุด

ผลจากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าแคลลัสอายุ 3 สัปดาห์ ที่ได้รับรังสีในปริมาณต่างๆ มีความสามารถในการพัฒนาและเจริญเป็นต้นอ่อนได้ดีกว่าแคลลัสอายุ 6 สัปดาห์ และแคลลัสที่ได้รับรังสีปริมาณสูงๆ มีโอกาสพัฒนา และเจริญเป็นต้นอ่อนได้น้อยกว่าแคลลัสที่ได้รับรังสีในปริมาณที่ต่ำ ซึ่งอาจจะเนื่องจากรังสีแกมมาไปมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ โดยไปยับยั้งการสร้างคลอโรฟิลล์ หรือทำให้แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเนื้อเยื่อเกิดการตาย ซึ่งพบว่าแคลลัสที่ได้รับรังสีในปริมาณที่สูงเซลล์จะหยุดการเจริญเติบโต สีของแคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและต่อมาเปลี่ยนเป็นสีดำทำให้ความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นของแคลลัสลดลง นอกจากนี้ผลการทดลองยังสอดคล้องกับรายงานของ George and Rao (1980) ที่รายงานว่าปริมาณรังสีที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้การสร้างยอดหรือต้นของเนื้อเยื่อลดลงหรือรังสีปริมาณสูงๆ อาจไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มีผลทำให้เนื้อเยื่อหยุดการเจริญเติบโตได้ (Puntarulo et al., 1988)

สรุป

1. อาหารสูตรที่เหมาะสมสำหรับชักนำเมล็ดให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด คือ อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D, NAA และ kinetin ความเข้มข้น 1, 2 และ 1 มก./ล. ตามลำดับโดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส 75.86 เปอร์เซ็นต์
2. อาหารสูตรที่เหมาะสมสำหรับชักนำแคลลัสอายุ 3 และ 6 สัปดาห์ ให้พัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุด คือ อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม kinetin 2 มก./ล. โดยแคลลัสอายุ 3 สัปดาห์ จะพัฒนาเป็นต้นได้มากกว่า คือ 50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แคลลัสอายุ 6 สัปดาห์จะเกิดต้นได้ 33.33 เปอร์เซ็นต์
3. รังสีแกมมามีผลทำให้ความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นของแคลลัสลดลง แคลลัสที่ได้รับรังสีปริมาณสูงความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นจะต่ำกว่า แคลลัสที่ได้รับรังสีในปริมาณต่ำ และแคลลัสที่มีอายุ 3 สัปดาห์ เมื่อได้รับรังสีมีความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นได้สูงกว่าแคลลัสที่มีอายุ 6 สัปดาห์

เอกสารอ้างอิง

- เผด็จ ระติสุนทร, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา และ สุพรรณิ แก่นสาร.2532. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวพันธุ์ บาสมาติ 370 วิทยาศาสตร์ (วิทย.) 23(3) : 205-210.
- วรวิทย์ พานิชพัฒน์, 2530. ข้าวหอม ข้าวดอกมะลิ 105 บาสมาติ และอื่นๆ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 45 น.
- Boissat, N.M. Valdez and E. Guiderdomi. 1990. Plant regeneration from leaf and seed derived calli and suspension cultures of the African-perennial wild rice, *Oryza longistaminata*. Plant Cell Rep. 9 : 447-450
- Carlson, P.S. 1975. Crop improvement through technique of plant cell and tissue culture. Bioscience

25 : 747-749.

- Chaleff, R.S. 1980. Tissue culture in rice improvement and overview, pp. 81-91. *In Innovative Approaches to Rice Breeding*, International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.
- Chu, I.Y.E. 1983. Use of tissue culture for breeding herbicide tolerant varieties, pp. 303-314. *In Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement*. Science Press, Beijing.
- George, L. and P.S. Rao. 1980. *In vitro* regeneration of mustard plants (*Brassica juncea* var. RAI-5) on cotyledon explants from non-irradiated, irradiated and mutagen-treated seed. *Ann. Bot.* 45 : 107-112.
- Gosal, S.S., H.S. Dhaliwal, J.S. Sandhu, M.S. Khinda and P.K. Agrawal. 1993. Somatic cell, anther and protoplast culture in indica rice. Paper presented at the 6th International Rice Biotchnology. February 1-5 1993. Chiang Mai, Thailand. 242 p.
- Henke, R.R., M.A. Mansur and M.J. Constantin. 1978. Organogenesis and plantlet formation from organ and seedling derived calli of rice (*Oryza sativa*). *Plant Physiol.* 44 : 11-14.
- Maeda, E. 1980. Organogenesis and cell culture in rice plants under sterile condition (part I). *J. Agris .Res. Quart.* 14(1):4-8.
- Maliga, P. 1984. Isolation and characterization of mutants in plant cell culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35 : 519-542.
- Maliga, P. 1985. Cell culture isolation and characterization of agronomically useful mutants of higher plants, pp. 111-120. *In Biotechnology in International Agriculture Research*. International Rice Research Insstitute, Manila.
- Nishi, I., Y. Yamada and E. Takahashi. 1968. Organ differentiation and plant restoration in rice callus. *Nature* 219 : 508-509.
- Puntarulo, S., R.A. Sanchee and A. Boveris. 1988. Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. *Plant Physiol.* 86 : 626-630
- Raina, S.K., P. Sathish and K.S. Sarmma. 1987. Plant regeneration from in vitro cultures of anthers and mature seeds of rice (*Oryza sativa* L) CV. Basmati-370. *Plant Cell Rep.* 6.43-45.
- Wang, M.S., F.J. Zapata and D.C. De Castro. 1987. Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature seed and young inflorescence of wild rice (*Oryza perennis* Moench). *Plant Cell Rep.* 6 : 294-296.