ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 28:499-511(2537)

การปรับปรุงข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ไม่ไวต่อช่วงแสงโดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของลูกผสมชั่วที่ 1

Breeding of Aromatic Rice (Oryza sativa L.) Variety KDML 105 for Photoperiod Insensitivity through Anther Culture of F1 Hybrids

ประภา ศรีพิจิตต์ [1] ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ[2] และ อภิชาติ วรรณวิจิตร[1]

Prapa Sripichitt, Pradit Pongtongkam and Apichart Vanavichit

ABSTRACT

Breeding of aromatic rice (*Oryza sativa* L.) variety KDML 105 for photoperiod insensitivity was conducted using anther culture of F_1 hybrids. Two F_1 hybrids were made by crossing between aromatic rice variety KDML 105 which was photoperiod sensitive and the other two aromatic rice varieties, IR 841-85-1-2 and Basmati 370 which were photoperiod insensitive. Panicles of both hybrids were collected when the distance of the flag leaf auricle to that of the next leaf was between 5-12 cm. Anthers containing microspores at the mid-late uninucleate stage were cultured on modified N_6 medium supplemented with 1, 2, 3 and 4 mg/l 2,4-D and 3 and 5 % sucrose for callus induction. It was found that modified N_6 medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D and 5 % sucrose gave the highest frequency of callus induction, 6.2 and 5.8% for the hybrids of KDML 105/IR 841-85-1-2 and KDML 105/Basmati 370, respectively. Calli of the hybrid of KDML 105/IR 841-85-1-2 when transferred to MS medium supplemented with 1 mg/l NAA, 4 mg/l kinetin and 2 % sucrose could regenerate into green shoots at the frequency of 6.2 %. While calli of the hybrid of KDML 105/ Basmati 370 gave 1.0 % green shoot regeneration on the same medium. Shoots were rooted when transferred onto MS medium without growth regulator.

Among the 60 anther-derived plants (H_1) of the hybrid of KDML 105/IR 841-85-1-2 produced, 38 haploid plants (63.3 %) and 22 doubled haploid plants (36.7 %) were recovered. The H_1 plants showed high variation in morphology and agronomic characters. However,all of the H_1 plants were photoperiod sensitive similar to female parent KDML 105. The desirable photoperiod insensitive plants was not recovered due to the small number of H_1 plants.

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

1 ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dept. of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

2 ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dept. of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok-10900, Thailand.

บทคัดย่อ

ในการปรับปรุงข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ให้มีลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสงโดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของลูกผสมชั่วที่ 1 ได้ผสมพันธุ์ระหว่างข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่ไวต่อช่วงแสงกับพันธุ์ข้าวหอมที่ไม่ไวต่อช่วงแสง 2 พันธุ์ คือ IR 841-85-1-2 และ Basmati 370 ตัดช่อดอกของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ทั้งสองเมื่อต้นข้าวมีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ auricle ของใบธงกับใบที่อยู่รองลงมาห่างกันประมาณ 5 - 12 ซม. นำอับละอองเกสรที่มีละอองเกสรพัฒนาอยู่ในระยะ mid-late uninucleate มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 ดัดแปลงที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 มก./ล. และน้ำตาลซูโครส 3 และ 5 % พบว่าอาหารสูตร N_6 ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 2 มก./ล. และน้ำตาลซูโครส 5 % สามารถชักนำให้อับละอองเกสรของข้าวลูกผสมทั้งสองสร้างแคลลัสได้ในอัตราสูงสุด กล่าวคือ 6.2 และ 5.8 % ในลูกผสมขาวดอกมะลิ 105/IR 841-85-1-2 และขาวดอกมะลิ 105/Basmati 370 ตามลำดับ เมื่อย้ายแคลลัสที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มก./ล., kinetin 4 มก./ล. และน้ำตาลซูโครส 2 % พบว่าแคลลัสจากอับละอองเกสรของลูกผสมขาวดอกมะลิ 105/IR 841-85-1-2 สามารถพัฒนาเป็นยอดสีเขียวได้ 6.2 % ในขณะที่แคลลัสจากอับละอองเกสรของลูกผสมขาวดอกมะลิ 105/Basmati 370 พัฒนาเป็นยอดสีเขียวได้เพียง 1.0 % ยอดที่ได้เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถสร้างรากและเจริญเป็นต้นข้าว (H_1) ที่สมบูรณ์ได้

ต้นข้าว H_1 ที่พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของลูกผสมขาวดอกมะลิ 105/IR 841-85-1-2 จำนวน 60 ต้น พบต้นที่เป็น haploid ซึ่งเป็นหมันไม่สามารถผลิตเมล็ดได้จำนวน 38 ต้น (63.3 %) และต้นที่เป็น doubled haploid ซึ่งสามารถผลิตเมล็ดได้ 22 ต้น (36.7 %) ต้น H_1 ทั้งหมดแสดงลักษณะไวต่อช่วงแสงเช่นเดียวกับพันธุ์แม่ขาวดอกมะลิ 105 ไม่พบต้นที่ไม่ไวต่อช่วงแสงที่ต้องการเนื่องจากต้น H_1 มีจำนวนน้อยเกินไป

คำนำ

ภายหลังจากที่ Niizeki and Oono (1968) ประสพความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวพวก japonica ให้พัฒนาเป็นต้นข้าว haploid ได้ นักวิทยาศาสตร์จำนวนมากได้ให้ความสนใจศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวกันอย่างกว้างขวาง ปัจจุบันเทคนิคทางด้านนี้ได้รับการพัฒนาให้ก้าวหน้าขึ้นมาก จนสามารถผลิตต้น haploid หรือ doubled haploid เป็นจำนวนมากได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวทั้งพวก japonica (Alemanno and Guiderdoni, 1994) พวก indica (Rout and Sarma, 1987) และลูกผสมระหว่าง japonica กับ indica (Reiffers and Freire, 1990)

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเป็นเครื่องมือที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของพืชลูกผสมชั่วที่ 1 ช่วยทำให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถผลิตต้นพืช haploid หรือ doubled haploid ที่มีความคงตัวทางพันธุกรรม (homozygous diploid) ได้ภายในระยะเวลา 1-2 ชั่ว และต้น doubled haploid ที่ได้ยังประกอบด้วยพันธุกรรมในรูปแบบต่างๆ (genetic recombination) จากทั้งพ่อและแม่ ซึ่งจะไม่มีการกระจายตัวของลักษณะอีกต่อไป (fixed recombination) (Raina, 1989) ทำให้สามารถทดสอบและคัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้ทันที ในขณะที่ถ้าเป็นการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีปกติ (conventional breeding) ต้นพืชจะยังมีการกระจายตัวในลักษณะต่างๆ อยู่หลายชั่ว ตั้งแต่ชั่วที่ 2 ถึง 4 ดังนั้นจะต้องใช้เวลาในการผสมตัวเองหลายชั่วต้นพืชจึงจะมีความคงตัวทางพันธุกรรม นอกจากนี้การเพาะ

เลี้ยงอับละอองเกสรของลูกผสมชั่วที่ 1 ยังช่วยทำให้เราสามารถคัดเลือกต้นที่มีพันธุกรรมที่ต้องการจากประชากรพืชที่เป็น doubled haploid ซึ่งมีจำนวนต้นน้อยกว่าประชากรของลูกชั่วที่ 2 Shen *et al.* (1983) รายงานว่าต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของลูกผสมชั่วที่ 1 ที่เป็น doubled haploid จำนวนเพียง 140-150 ต้น ก็เพียงพอต่อการคัดเลือกให้ได้ต้นที่มีพันธุกรรมที่ต้องการ ในขณะที่ถ้าเป็นการคัดเลือกจากประชากรลูกชั่วที่ 2 จะต้องใช้จำนวนต้น 4,000-5,000 ต้น ดังนั้นการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของลูกผสมชั่วที่ 1 จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้

ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ซึ่งเกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่ไวต่อช่วงแสงกับพันธุ์ข้าวหอมที่ไม่ไวต่อช่วงแสง 2 พันธุ์ มาใช้ในการผลิตข้าวหอมสายพันธุ์แท้ที่มีลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสง ต้นเตี้ย โดยเมล็ดยังคงคุณภาพทางภายภาพ คุณภาพหุงต้มและรับประทานที่ดีตลอดจนความหอมของพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ไว้ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

การผลิตลูกผสมชั่วที่ 1

ผสมพันธุ์ระหว่างข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML 105) ซึ่งมีลักษณะไวต่อช่วงแสง ต้นสูง และอ่อนแอต่อโรคไหม้ (blast) กับข้าวหอมพันธุ์ IR 841-85-1-2 (IR 841) ซึ่งมีลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสง ต้นเตี้ย และพันธุ์ Basmati 370 (BAS 370) ซึ่งมีลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสงและต้านทานต่อโรคไหม้ เมื่อได้เมล็ดลูกผสมของทั้ง 2 คู่ผสมแล้ว นำไปปลูกในกระถางภายใต้สภาพเรือนปลูกพืชทดลอง ดูแลรักษาจนต้นข้าวเจริญเติบโตอยู่ในระยะตั้งท้อง (booting stage) เนื่องจากลูกผสมชั่วที่ 1 ของทั้งสองคู่ผสมแสดงลักษณะไวต่อช่วงแสง ในการออกดอกต้องอาศัยการชักนำโดยให้ได้รับช่วงแสงสั้นตามธรรมชาติ หรือโดยการนำเข้าห้องมืดที่ควบคุมให้ได้รับแสง 10 ชม./วัน เป็นเวลาประมาณ 4 สัปดาห์

การศึกษาระยะการพัฒนาของละอองเกสร

เมื่อต้นข้าวลูกผสมเจริญเติบโตอยู่ในระยะตั้งท้อง ตัดต้นข้าวที่มีระยะห่างระหว่าง auricle ของใบธงกับใบที่อยู่รองลงมา ตั้งแต่ 3, 5, 8, 10, 12 และ 15 ซม. ตามลำดับ จากนั้นนำช่อดอกที่ได้ทั้งหมดมาผ่านการทำ pretreatment โดยเก็บไว้ในที่มืดอุณหภูมิ 8-10°ซ เป็นเวลา 8-10 วัน ภายหลังจากการทำ pretreatment นำอับละอองเกสรมาศึกษาระยะการพัฒนาของละอองเกสร (microsporogenesis) โดยการแช่ช่อดอกข้าวในสารละลายที่มีเอทธานอล (ethanol) และกรดอะเซติค (acetic acid) ในอัตราส่วน 3 : 1 และเติม $FeCl_3$ 1.9 % ลงไปด้วย วางทิ้งไว้ในที่ซึ่งมีอุณหภูมิ 5-10°ซ เป็นเวลา 1 คืน แล้วสุ่มดอกข้าว (spikelet) จากบริเวณกลางช่อดอก ดึงอับละอองเกสรออกจากดอกแล้วย้อมด้วยสี acetocarmine 1 % (Zapata, 1992) นำไปตรวจดูระยะการพัฒนาของละอองเกสรจากกล้องจุลทรรศน์ เพื่อหาระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าวเมื่อช่อดอกมีละอองเกสรพัฒนาอยู่ในระยะ mid-late uninucleate

การชักนำให้อับละอองเกสรสร้างแคลลัส

ตัดช่อดอกข้าวจากต้นที่มีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะที่ auricle ของใบธงกับใบที่อยู่รองลงมามีระยะห่าง 5-12 ซม. ซึ่งช่อดอกในช่วงนี้จะมีละอองเกสรพัฒนาอยู่ในระยะ mid-late uninucleate (จากผลการทดลองข้างต้น) นำช่อดอกมาผ่านการทำ pretreatment จากนั้นทำความสะอาดช่อดอกโดยฉีกกาบใบออก ฉีดพ่นช่อดอกด้วยเอทธานอล 70 % จนชุ่ม คัดเลือกดอกข้าวที่กลีบดอกมีสีเขียวจางๆ และอับละอองเกสรมีความสูงไม่เกินครึ่งหนึ่งของความยาวดอก ดึงอับละอองเกสรออกจากดอก แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6 (Chu

et *al.*, 1975) ดัดแปลง (Lentini and Martinez, 1991) ซึ่งเติม 2, 4 – dichlorophenoxyacetic acid (2,4–D) ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 มก./ล น้ำตาลซูโครส (sucrose) 3 และ 5 % และวุ้น 0.7 % เก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 25 ± 2°ซ เป็นเวลา 2 เดือน นับจำนวนอับละอองเกสรที่สร้างแคลลัส

การชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น

นำแคลลัสที่เจริญมาจากอับละอองเกสรซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 มม. มาเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) (MS) ที่เติม naphthaleneacetic acid (NAA) 0.5 มก./ล. และ kinetin 2 มก./ล., NAA 1 มก./ล. และ kinetin 4 มก./ล., indoleacetic acid (IAA) 0.5 มก./ล. และ benzyladenine (BA) 2 มก./ล. และ IAA 1 มก./ล. และ BA 4 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 2 % และวุ้น 0.7 % เก็บไว้ในที่มีแสง 2,000 ลักซ์ ให้ได้รับแสง 16 ชม./วัน อุณหภูมิ 25 ± 2°ซ เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ นับจำนวนแคลลัสที่พัฒนาไปเป็นยอดและจำนวนยอดที่เกิดขึ้นในแต่ละแคลลัส

การปลูกต้นข้าว H_1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

ย้ายยอดที่พัฒนามาจากแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลานานประมาณ 2–3 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้ยอดสร้างราก (ประภา, 2532) เมื่อได้ต้นข้าว H_1 ที่สมบูรณ์แล้ว นำออกปลูกลงดินในกระถางขนาดเล็กเป็นเวลาประมาณ 3–4 สัปดาห์ เพื่อให้ข้าวตั้งตัวและแตกรากจำนวนมาก ตัดปลายรากไปตรวจนับจำนวนโครโมโซม จากนั้นย้ายต้นข้าวไปปลูกลงดินในกระถางขนาด 12 นิ้ว ดูแลรักษาจนกระทั่งข้าวออกดอกและเก็บเกี่ยวเมล็ด

การศึกษาความแปรปรวนในลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นข้าว H_1

ตรวจดูรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของต้นข้าว H_1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร ซึ่งได้แก่ ทรงต้น ลำต้น ใบ การแตกกอ รวง และเมล็ด แล้วเปรียบเทียบกับพันธุ์แม่และพ่อ

การศึกษาความแปรปรวนในลักษณะทางการเกษตรของต้นข้าว H_1

บันทึกลักษณะทางการเกษตรต่างๆ ของต้นข้าว H_1 ซึ่งได้แก่ ความสูงจากโคนกอถึงปลายรวงที่สูงที่สุด วันออกดอก คือ วันที่จำนวนรวงในกอโผล่พ้นใบธง 75 % จำนวนต้นต่อกอ จำนวนรวงต่อกอ เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด และน้ำหนัก 1,000 เมล็ด ตรวจสอบความแปรปรวนในลักษณะทางการเกษตรดังกล่าวของต้นข้าว H_1

การตรวจสอบความไวต่อช่วงแสงของต้นข้าว H_1

ภายหลังจากการย้ายแคลลัสที่เจริญมาจากอับละอองเกสรไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นในราวกลางเดือนเมษายน 2536 (วันที่ 15 และ 21 เมษายน 2536) ซึ่งเป็นระยะที่เริ่มมีช่วงแสงยาวกว่า 12 ชั่วโมง แคลลัสพัฒนาเป็นต้นในอีก 2 สัปดาห์ต่อมา จึงอาจกล่าวได้ว่า ต้นข้าว H_1 ที่ได้มีการเจริญเติบโตอยู่ในสภาพที่มีช่วงแสงยาว ทำให้สามารถตรวจสอบความไวต่อช่วงแสงได้ทันทีตั้งแต่ในชั่วแรก (H_1) ถ้าข้าวต้นใดออกดอกก่อนวันที่ 1 กันยายน ก็จัดว่าเป็นข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง (photoperiod insensitive) เนื่องจากว่าโดยปกติพันธุ์ข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสงจะมีอายุตั้งแต่ปลูกจนกระทั่งออกดอกไม่นานเกินกว่า 150 วัน (Vergara *et al.*, 1976) ส่วนข้าวที่ออกดอกหลังวันที่ 1 กันยายน จัดว่าเป็นข้าวที่มีลักษณะไวต่อช่วงแสง

การนับจำนวนโครโมโซมของต้นข้าว H_1

ตัดปลายรากต้นข้าว H_1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร ยาวประมาณ 1–2 ซม. แช่ปลายราก (pretreatment) ในสารละลาย 8–hydroxyquinoline ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ นาน 1.5 ชม. แล้วตรึงปลายราก

(fixation) โดยใช้สารละลายที่มีเอทธานอล และกรดอะเซติคในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 ซึ่งเติม $FeCl_3$ 0.1 % ลงไปด้วย เป็นเวลา 3-15 วัน (Khan, 1975) ย้อมสีโครโมโซมด้วยสี acetocarmine 1 % ตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากกล้องจุลทรรศน์

ผลและวิจารณ์

ระยะการพัฒนาของละอองเกสร

เมื่อตัดต้นข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ของคู่ผสมขาวดอกมะลิ 105/IR 841 และขาวดอกมะลิ 105/BAS 370 ซึ่งมีระยะห่างระหว่าง auricle ของใบธงกับใบที่อยู่รองลงมาตั้งแต่ 3, 5, 8, 10, 12 และ 15 ซม. ตามลำดับ แล้วสุ่มดอกข้าวจากบริเวณกลางช่อดอกมาศึกษาระยะการพัฒนาของละอองเกสร พบว่าต้นข้าวที่มีระยะห่างระหว่าง auricle ของใบธงกับใบที่อยู่รองลงมาน้อยกว่า 5 ซม. ละอองเกสรพัฒนาอยู่ในระยะ early uninucleate ซึ่งสังเกตดูได้จากเซลล์จะไม่มีแวคูโอล (vacuole) นิวเคลียส (nucleus) อยู่ตรงกลางเซลล์ซึ่งมีไซโตพลาสซึม (cytoplasm) อยู่หนาแน่น เมื่อระยะห่างเพิ่มขึ้นเป็น 5-8 ซม. ละอองเกสรจะพัฒนาอยู่ในระยะ mid uninucleate ซึ่งเซลล์จะมีแวคูโอลขนาดใหญ่จนดันนิวเคลียสไปอยู่ทางด้านข้างเซลล์ (Figure 1 A) เมื่อระยะห่างเพิ่มขึ้นอีกเป็น 8-12 ซม. ละอองเกสรจะพัฒนาอยู่ในระยะ late uninucleate ซึ่งแวคูโอลจะหายไป และนิวเคลียสเคลื่อนที่มาอยู่ตรงกลางเซลล์ (Figure 1 B) ถ้าระยะห่างมากกว่า 12 ซม. ละอองเกสรจะเริ่มการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิสครั้งแรก (first mitosis) (Figure 1 C) แล้วเข้าสู่ระยะ binucleate ซึ่งเซลล์มีนิวเคลียส 2 อัน (Figure 1 D)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำอับละอองเกสรที่มีละอองเกสรพัฒนาอยู่ในระยะ mid-late uninucleate มาเพาะเลี้ยง เนื่องจากที่ระยะนี้อับละอองเกสรจะตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงได้ดีที่สุด ทั้งในด้านการเจริญไปเป็นแคลลัสและการพัฒนาไปเป็นต้น (Raina, 1989) ยิ่งกว่านั้นแคลลัสที่เจริญมาจากละอองเกสรที่มีการพัฒนาเลยระยะ late uninucleate ไปแล้ว จะมีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นต่ำกว่า และต้นที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นต้นเผือก (Chen, 1977) ช่อดอกข้าวที่มีละอองเกสรพัฒนาอยู่ในระยะดังกล่าว สามารถตรวจดูได้โดยการย้อมสีละอองเกสรแล้วดูจากกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งค่อนข้างยุ่งยากและเสียเวลา จึงอาจตรวจดูได้ง่ายๆ จากระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นของข้าวลูกผสมทั้งสองซึ่งมีระยะห่างระหว่าง auricle ของใบธงกับใบที่อยู่รองลงมาประมาณ 5-12 ซม. การเลือกช่อดอกข้าวโดยดูจากระยะห่างระหว่าง auricle ของใบธงกับใบที่อยู่รองลงมาจะแตกต่างกันในแต่ละการทดลอง เช่น Reiffers and Freire (1990) แนะนำให้ ใช้ระยะห่างประมาณ 3-6 ซม. ส่วน Mercy and Zapata (1987) ใช้ระยะห่าง 5-10 ซม. ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของลูกผสมหรือพันธุ์ข้าวที่ใช้ นอกจากนี้อาจตรวจดูได้อีกวิธีหนึ่งจากสีและขนาดของดอกและอับละอองเกสร ในข้าวลูกผสมทั้งสองดอกที่มีละอองเกสรอยู่ในระยะ mid-late uninucleate กลีบดอกจะมีสีเขียวจางๆ และอับละอองเกสรมีความสูงไม่เกินครึ่งหนึ่งของความยาวดอก ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Zapata (1992) ที่แนะนำให้เลือกใช้อับละอองเกสรจากดอกที่มีลักษณะดังกล่าวในการเพาะเลี้ยง

การชักนำให้อับละอองเกสรเจริญเป็นแคลลัส

จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ทั้งสองที่มีละอองเกสรพัฒนาอยู่ในระยะ mid-late uninucleate บนอาหารสังเคราะห์สูตร N_6 ดัดแปลงที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 มก./ล. และน้ำตาล 3 และ 5 % พบว่าภายหลังจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรไปนานประมาณ 1-2 สัปดาห์ อับละอองเกสรจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลถึงดำ เมื่อเพาะเลี้ยงไปนานประมาณ 2 เดือน อับละอองเกสรบางอันจะเริ่มสร้างแคลลัส ซึ่งมีสีขาวหรือเหลืองอ่อน (Figure 2 A) เมื่อนับจำนวนอับละอองเกสรที่เจริญไป

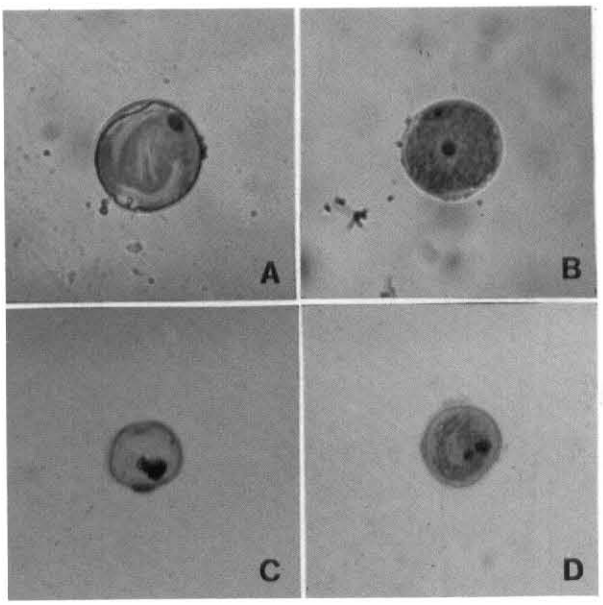

Figure 1 Stages of pollen development in F_1 hybrid rice.

A. Mid uninucleate microspore
B. Late uninucleate microspore
C. First mitosis
D. Binucleate microspore

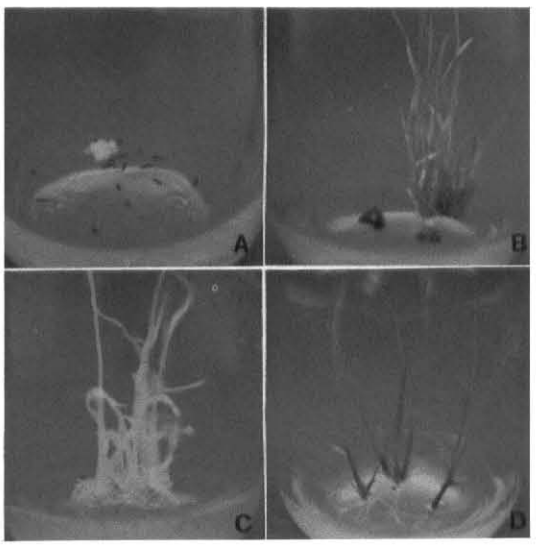

Figure 2 Plant regeneration from anther-derived callus of F_1 hybrid between KDML 105 and IR 841.

A. Anther-derived callus
B. Green shoots regenerated from callus
C. Albino shoots
D. Shoots were rooted

เป็นแคลลัส พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร N6 ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 2 มก./ล. ร่วมกับน้ำตาล 5 % สามารถชักนำให้อับละอองเกสรของลูกผสมทั้งสองสร้างแคลลัสได้ในอัตราสูงสุด กล่าวคือ 6.2 และ 5.8 % ในลูกผสมขาวดอกมะลิ 105/IR 841 (Table 1) และลูกผสมขาวดอกมะลิ 105/BAS 370 (Table 2) ตามลำดับ รองลงมาคือ สูตรอาหาร N_6 ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 1 มก.ล. ร่วมกับน้ำตาล 3 % สามารถชักนำให้อับละอองเกสรของลูกผสมขาวดอกมะลิ 105/IR 841 สร้างแคลลัสได้ 4.6 % และ 5.3 % ในลูกผสมขาวดอกมะลิ 105/BAS 370 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างปริมาณน้ำตาลทั้ง 2 ระดับที่เติมลงไปในอาหาร พบว่าโดยเฉลี่ยปริมาณน้ำตาล 5 % ชักนำให้อับละอองเกสรของลูกผสมทั้งสองสร้างแคลลัสได้ในอัตราที่สูงกว่าปริมาณน้ำตาล 3 %

ในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรเพื่อชักนำให้เจริญเป็นแคลลัส สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน (auxin) มีบทบาทที่สำคัญมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 2, 4 - D เป็นออกซินที่นิยมใช้ในการชักนำให้อับละอองเกสรสร้างแคลลัส ซึ่งอาจใช้ 2, 4 - D เพียงอย่างเดียว หรือใช้ร่วมกับออกซินชนิดอื่นๆ เช่น NAA, IAA และไซโตไคนิน (cytokinin) เช่น kinetin และ zeatin เป็นต้น ในการทดลองครั้งนี้ได้เลือกใช้ 2, 4 - D เพียงอย่างเดียวก่อน และพบว่า 2, 4 - D 2 มก./ล. สามารถชักนำให้อับละอองเกสรของลูกผสมทั้งสองสร้างแคลลัสได้ในอัตราสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองจำนวนมากที่พบว่า 2, 4 - D 2 มก./ล. เหมาะสมที่สุดต่อการชักนำให้อับละอองเกสรข้าวสร้างแคลลัสและพัฒนาไปเป็นต้นสีเขียว (Chen *et al.*, 1974 ; Raina, 1989) นอกจากนี้ Chen *et al.*, (1974) ยังพบอีกว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2, 4 - D ขึ้น จนถึง 10 มก./ล. อัตราการเกิดแคลลัสของอับละอองเกสรจะเพิ่มขึ้น แต่อัตราการพัฒนาไปเป็นต้นสีเขียวของแคลลัสลดลงอย่างเห็นได้ชัด ในการทดลองครั้งนี้ความเข้มข้นของ 2, 4 - D ที่เพิ่มขึ้นไม่ช่วยทำให้อัตราการสร้างแคลลัสของอับละอองเกสรเพิ่มขึ้น ยิ่งกว่านั้นยังมีแนวโน้มที่จะลดลงด้วย อย่างไรก็ตามจะได้ทำการทดลองต่อไปเพื่อเพิ่มอัตราการชักนำให้เกิดแคลลัสของอับละอองเกสรข้าวลูกผสมทั้งสอง โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมที่เติม 2, 4 - D 2 มก./ล. ร่วมกับ NAA, kinetin, picloram และ organic substance บางชนิด

การเติมน้ำตาลลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าว ก็เพื่อให้ละอองเกสรใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน และเป็นตัวปรับแรงดันออสโมซิส (osmotic pressure) ของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง โดยทั่วไปนิยมใช้น้ำตาลความเข้มข้น 3 ถึง 5 % (Raina, 1989) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าน้ำตาล 5 % ช่วยทำให้อับละอองเกสรเจริญไปเป็นแคลลัสได้ดีกว่าน้ำตาล 3 % ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Chen (1978) ซึ่งรายงานว่า เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลซูโครสจาก 3 เป็น 6 % ช่วยทำให้อัตราการสร้างแคลลัสของละอองเกสรที่ระยะ mid uninucleate เพิ่มขึ้นแต่จะลดลงเมื่อปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นเป็น 9 % ในทำนองเดียวกัน Chen *et al.* (1974) พบว่าแคลลัสที่เจริญมาจากอับละอองเกสรข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 6 % มี อัตราการพัฒนาไปเป็นต้นสีเขียวได้สูงกว่าที่ปริมาณน้ำตาล 3 %

การชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น

จากการย้ายแคลลัสที่เจริญมาจากอับละอองเกสรของข้าวลูกผสมไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น พบว่าภายหลังจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสไปนานประมาณ 5 - 7 วัน แคลลัสจะมีการขยายขนาดเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แคลลัสบางอันเริ่มสร้างจุดสีเขียว (green spot) ที่บริเวณผิวแคลลัส ซึ่งจะค่อยๆพัฒนาเป็นยอดสีเขียวอย่างรวดเร็วภายใน 10 วัน แคลลัสบางอันถึงแม้ว่าจะสร้างจุดสีเขียว แต่ก็ไม่สามารถพัฒนาเป็นยอดได้และค่อยๆ จางหายไป อย่างไรก็ตามแคลลัสส่วนใหญ่พัฒนาเป็นยอดเผือก (albino) ส่วนแคลลัสที่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นยอดก็มักจะขยายขนาดเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละออง

Table 1 Callus induction from anthers of F1 hybrids between KDML 105 and IR841 cultured on modified N_6 medium supplemented with various concentration of 2,4-D and sucrose.

2,4-D (mg/l)	Sucrose (%)	No. of anthers cultured	No. of anthers producing callus	%Callus induction
1	3	240	11	4.6
2	3	600	12	2.0
3	3	210	3	1.4
4	3	60	1	1.7
Average	3	278	6.8	2.4
1	5	330	7	2.1
2	5	210	13	6.2
3	5	510	17	3.3
4	5	120	3	2.5
Average	5	293	10	3.5

Table 2 Callus induction from anthers of F_1 hybrids between KDML 105 and BAS 370 cultured on modified N_6 medium supplemented with various concentration of 2,4-D and sucrose.

2,4-D (mg/l)	Sucrose (%)	No. of anthers cultured	No. of anthers producing callus	% Callus induction
1	3	510	27	5.3
2	3	570	23	4.0
3	3	180	3	1.7
4	3	450	9	2.0
Average	3	428	15.5	3.3
1	5	360	17	4.7
2	5	240	14	5.8
3	5	270	12	4.4
4	5	90	3	3.3
Average	5	240	11.3	4.5

Table 3 Plant regeneration from anther-derived callus of the two F_1 hybrids cultured on MS medium supplemented with 1 mg/l NAA and 4 mg/l kinetin.

F_1 hybrid	No. of calli cultured	No. of calli regenerated shoots (%)			No. of shoots per callus		
		Green	Albino	Total	Green	Albino	Total
KDKL105/IR841	65	6.2	16.9	23.1	27.0	3.4	30.4
KDML105/BAS370	102	1.0	16.7	17.7	2.0	3.9	5.9

เกสรของลูกผสมทั้งสองมีจำนวนไม่มากนัก จึงได้ย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นได้เพียงสูตรเดียว คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 1 มก./ล. และ kinetin 4 มก./ล. พบว่าแคลลัสของอับละอองเกสรลูกผสมขาวดอกมะลิ 105/IR 841 สามารถพัฒนาไปเป็นยอดสีเขียว (Figure 2 B) ได้สูงถึง 6.2 % (Table 3) หรือคิดเป็น 0.4 % เมื่อเทียบกับจำนวนอับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยง และในแต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงถึง 27 ยอด อย่างไรก็ตามแคลลัสส่วนใหญ่พัฒนาเป็นยอดเผือก (Figure 2 C) สูงถึง 16.9 % แต่จำนวนยอดเผือกต่อแคลลัสต่ำเพียง 3.4 ยอดเท่านั้น ส่วนแคลลัสของอับละอองเกสรลูกผสมขาวดอกมะลิ 105/BAS 370 สามารถพัฒนาไปเป็นยอดสีเขียวได้เพียง 1 % หรือคิดเป็น 0.06 % เมื่อเทียบกับจำนวนอับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยง และแต่ละแคลลัสมียอดเพียง 2 ยอดเท่านั้น แคลลัสส่วนใหญ่จะพัฒนาเป็นยอดเผือกสูงถึง 16.7 % แต่ละแคลลัสมีจำนวนยอดเฉลี่ย 3.9 ยอด ซึ่งจะเห็นได้ว่าแคลลัสจากอับละอองเกสรของลูกผสมขาวดอกมะลิ 105/IR 841 สามารถพัฒนาไปเป็นยอดสีเขียวได้ในอัตราที่สูงกว่าของลูกผสมขาวดอกมะลิ 105/BAS 370 ถึงแม้ว่าอัตราการพัฒนาไปเป็นยอดเผือกใกล้เคียงกันมาก ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากพันธุกรรมที่แตกต่างกันของลูกผสมทั้งสองมากกว่าจะเป็นผลของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง เพราะใช้อาหารสูตรเดียวกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งน่าจะเป็นผลของพันธุกรรมจากฝ่ายพ่อซึ่งแตกต่างกัน Lentini and Martinez (1993) รายงานว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นสีเขียวจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวพวก indica อยู่ระหว่าง 0.09-4.44 % เมื่อคิดเทียบกับจำนวนอับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงซึ่งจะแตกต่างกันไปตามพันธุ์ อย่างไรก็ตามจะได้ทำการทดลองต่อไปเพื่อเพิ่มอัตราการพัฒนาไปเป็นต้นสีเขียวของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของลูกผสมทั้งสอง โดยใช้อาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นสูตรอื่นๆ ดังได้กล่าวไว้ในตอนต้น ทั้งนี้เพื่อให้ได้จำนวนต้นที่มากเพียงพอสำหรับใช้ในการคัดเลือกต้นข้าว doubled haploid ที่มีลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสงต่อไป

ต้นข้าว H_1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

ยอดสีเขียวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของลูกผสมขาวดอกมะลิ 105/IR841 มีจำนวนทั้งหมดประมาณ 108 ยอด เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตนานประมาณ 1 สัปดาห์ ยอดจะเริ่มสร้างราก (Figure 2 D) ต่อมารากจะเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ ยอดสามารถสร้างรากได้ 100 % หลังจากย้ายยอดไปเลี้ยงบนอาหารสูตรดังกล่าวประมาณ 2-3 สัปดาห์จะได้ต้นข้าว H_1 ที่สมบูรณ์สามารถย้ายออกปลูกลงดินในกระถางภายใต้สภาพเรือนปลูกพืชทดลอง เนื่องจากในระหว่างการย้ายต้นข้าวออกปลูก ต้นข้าวจำนวนหนึ่งถูกหนูกัดกินไป ต้นข้าว 2 ต้นแห้งตายไป และในระยะก่อนออกดอกต้นข้าวตายไปอีก 2 ต้น รวมต้นข้าวที่รอดชีวิตทั้งหมด 60 ต้น ส่วนยอดสีเขียวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของลูกผสม

ขาวดอกมะลิ 105/BAS 370 มีจำนวนเพียง 2 ยอดเท่านั้น เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดรากยอดข้าวทั้งสองได้แห้งตายไปหมด

ความแปรปรวนในลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นข้าว H_1

ในจำนวนต้นข้าว H_1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของลูกผสมขาวดอกมะลิ 105/IR 841 ทั้งหมด 60 ต้น (Figure 3 A) พบต้น haploid ซึ่งเป็นหมันไม่สามารถผลิตเมล็ดได้จำนวน 38 ต้น (63.3 %) และต้น doubled haploid ซึ่งไม่เป็นหมันสามารถผลิตเมล็ดได้จำนวน 22 ต้น (36.7 %) Raina (1989) รายงานว่าต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรประกอบด้วยต้นที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเป็น haploid, diploid, polyploid และ mixoploid และส่วนใหญ่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์เป็นต้น diploid รองลงมาจะเป็นพวก haploid อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้พบต้น H_1 ที่เป็น doubled haploid หรือ diploid ในอัตราที่ต่ำกว่า 50 % ทั้งนี้อาจเป็นเพราะต้น H_1 ได้ถูกหนูกัดกินไปเป็นจำนวนมาก ทำให้ต้นที่เหลืออาจไม่ใช่ตัวแทนที่ดีของกลุ่มต้นข้าว H_1 ทั้งหมด Reinert and Bajaj (1976) รายงานว่าต้นพืช doubled haploid ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร เกิดจากนิวเคลียสของละอองเกสรมีการแบ่งตัวแบบ mitosis ทำให้ได้นิวเคลียส 2 อันที่เหมือนกัน จากนั้นนิวเคลียสทั้งสองมารวมตัวกัน เมื่อนิวเคลียสดังกล่าวเจริญเป็นแคลลัสและพัฒนาเป็นต้น ต้นที่ได้จึงเป็นต้น doubled haploid

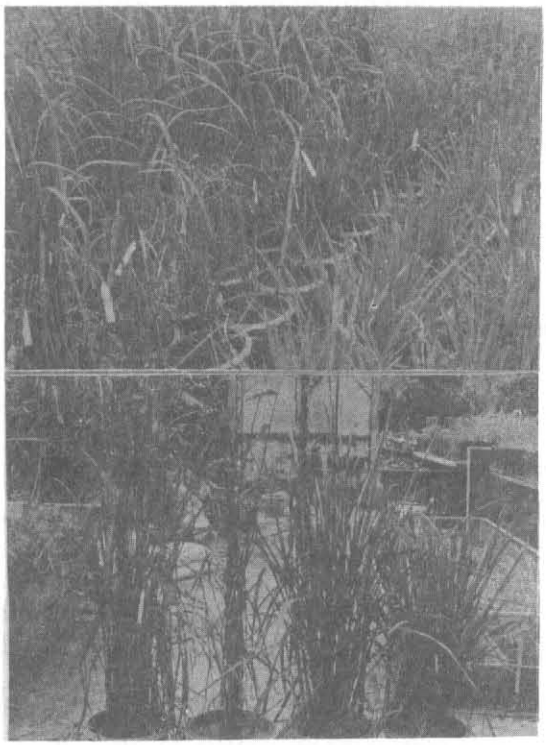

Figure 3 **H_1 plants derived from anther culture of F_1 hybrid between KDML 105 and IR841 were grown under greenhouse condition (A). H_1 plants were classified into 4 groups according to morphological characters (B).**

เมื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นข้าว H_1 สามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม (Figure 3 B) ดังนี้ พวกที่มีทรงต้นสูงคล้ายคลึงกับพันธุ์แม่ขาวดอกมะลิ 105 รวงยาวและแน่น ดอกไม่เป็นหมันและติดเมล็ดดี เมล็ดมีขนาดค่อนข้างใหญ่ มีจำนวนทั้งหมด 22 ต้น พวกที่มีทรงต้นสูงปานกลาง ลำต้นเรียวเล็ก แตกกอน้อย รวงค่อนข้างสั้น และกระจาย ดอกเป็นหมัน ไม่ติดเมล็ด มีจำนวนทั้งหมด 7 ต้น พวกที่มีทรงต้นค่อนข้างเตี้ย ลำต้นใหญ่ ใบค่อนข้างกว้าง แตกกอดี รวงยาว ดอกค่อนข้างใหญ่และมีหางสั้นๆ ตรงปลาย แต่เป็นหมันไม่ติดเมล็ด มีจำนวนเพียง 1 ต้น พวกที่มีทรงต้นเตี้ย คล้ายคลึงกับพันธุ์พ่อ IR 841 แตกกอดี ใบเล็กแคบและตั้งตรง รวงสั้นและโผล่พ้นใบธงไม่หมด ดอกมีขนาดเล็ก และเป็นหมันไม่ติดเมล็ด มีจำนวนทั้งหมด 30 ต้น

จะเห็นได้ว่าต้น H_1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของลูกผสมชั่วที่ 1 มีการกระจายตัวของลักษณะต่างๆ ตั้งแต่มีลักษณะคล้ายพ่อแม่และอยู่ระหว่างพ่อแม่ทั้งสอง ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากยีนจากพ่อแม่มีการกระจายตัว (segregation) และรวมตัวกันในรูปแบบต่างๆ (recombination) ต้น H_1 ที่พัฒนามาจากแคลลัสก้อนเดียวกันมักมีลักษณะเหมือนกัน แต่ก็มีแคลลัสบาง

Table 4 Variation in some agronomic characters of H_1 plants regenerated from anthers of F_1 hybrids between KDML 105 and IR841.

Range	Date of 75% flowering	Days to 75% flowering	Plant height (cm)	No. of tillers per plant	No. of panicles per plant	% Seed fertility	1,000 Seed weight(g)
Min.	Sept.3,93	135	66.0	7.0	5.0	0.0	24.0
Max.	Oct.29,93	197	217.0	45.0	45.0	93.0	30.8
Mean	Oct.10,93	176	130.0	20.5	19.8	27.5	27.2
C.V.(%)	-	8.4	40.3	45.1	46.9	133.5	5.8

ก้อนให้ต้น H_1 ที่มีลักษณะแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากต้น H_1 ดังกล่าวพัฒนามาจากละอองเกสรคนละอัน ซึ่งอยู่ในอับละอองเกสรเดียวกัน

ความแปรปรวนในลักษณะทางการเกษตรของต้นข้าว H_1

ต้นข้าว H_1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของลูกผสมขาวดอกมะลิ 105/IR 841 ออกดอกระหว่างวันที่ 3 กันยายน ถึง 29 ตุลาคม 2536 (Table 4) หรือมีอายุดอกผันแปรตั้งแต่ 135 ถึง 197 วัน เมื่อพิจารณาจากวันออกดอกจะเห็นได้ว่าต้น H_1 ทั้งหมดออกดอกหลังวันที่ 1 กันยายน 2536 จึงอาจจัดได้ว่าต้น H_1 ทั้งหมดแสดงลักษณะไวต่อช่วงแสง โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้น H_1 ที่เป็น doubled haploid ซึ่งสามารถผลิตเมล็ดได้ออกดอกระหว่าง วันที่ 19 ถึง 29 ตุลาคม 2536 ซึ่งใกล้เคียงกับวันออกดอกของพันธุ์แม่ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่ไวต่อช่วงแสง โดยปกติออกดอกในราววันที่ 20 ถึง 25 ตุลาคมของทุกปี

ความสูงของต้น H1 ผันแปรตั้งแต่เตี้ยมาก 66 ซม. จนถึงสูงมาก 217 ซม. จำนวนต้นต่อกอผันแปรกว้างมากตั้งแต่ 7 ถึง 45 ต้น จำนวนรวงต่อกอผันแปรกว้างมากเช่นกันตั้งแต่ 5 ถึง 45 รวง เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดผันแปรตั้งแต่ 0 % ในต้นที่เป็น haploid ซึ่งเป็นหมันไม่สามารถผลิตเมล็ดได้ จนถึง 93 % ในต้นที่เป็น doubled haploid ซึ่งสามารถผลิตเมล็ดได้ น้ำหนัก 1,000 เมล็ด ผันแปรตั้งแต่ 24.0 ถึง 30.8 กรัม ความแปรปรวนในลักษณะทางการเกษตรต่างๆ ของต้น A_1 เกิดจากการกระจายตัวและรวมตัวของยีนที่ควบคุมลักษณะต่างๆ ของพ่อแม่ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Yin *et al.* (1981) ที่ได้ศึกษาการกระจายตัวของลักษณะต่างๆ ของต้น H_1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวลูกผสม พบว่าต้น H_1 มีความแปรปรวนสูงมากในลักษณะต่างๆ เช่น มีอายุการเจริญเติบโตผันแปรตั้งแต่ 165 ถึง 195 วัน ความสูง 50 ถึง 115 ซม. จำนวนเมล็ดต่อรวง 25 ถึง 195 เมล็ด และน้ำหนัก 1,000 เมล็ด 18 ถึง 31 กรัม

ในการศึกษาครั้งนี้ได้เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพันธุ์ข้าวที่ไวต่อช่วงแสงและไม่ไวต่อช่วงแสง โดยคาดหวังว่าจะพบต้นข้าว doubled haploid ที่มียีนด้อยซึ่งควบคุมลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสง (สุวิช, 2535) อยู่ในสภาพที่เป็น homozygous และสามารถแสดงลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสงออกมาให้เห็นได้ตั้งแต่ชั่วแรก (H_1) แต่ต้น doubled haploid ที่ได้ทั้งหมดแสดงลักษณะไวต่อช่วงแสง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะต้นข้าว H_1 ที่เป็น doubled haploid ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรมีจำนวนน้อยเกินไป (22 ต้น) ที่จะพบต้นที่มีพันธุกรรมซึ่งได้จากการรวมตัวของยีนจากพ่อแม่ในรูปแบบที่ต้องการ ประชากรของต้น H_1 ที่

เป็น doubled haploid อย่างน้อยที่สุดควรมีจำนวน 140-150 ต้น จึงจะสามารถคัดเลือกต้นที่มีลักษณะที่ต้องการได้ (Shen *et al.*, 1983)

อย่างไรก็ตามจะเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของลูกผสมชั่วที่ 1 ของทั้งสองคู่ผสมอีกครั้งหนึ่ง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำให้อับละอองเกสรเจริญเป็นแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นเขียวในอัตราที่สูงขึ้น ทั้งนี้เพื่อผลิตต้นข้าว H_1 ที่มีจำนวนมากเพียงพอสำหรับการคัดเลือกให้ได้ต้น doubled haploid ที่มีลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสง

จำนวนโครโมโซมของต้นข้าว H_1

ในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถนับจำนวนโครโมโซมที่แน่นอนของต้นข้าว H_1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร เนื่องจากโครโมโซมกระจายตัวไม่ดี ทั้งนี้อาจเป็นเพราะรากที่ใช้ในการศึกษาไม่อยู่ในระยะที่มีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว หรือเทคนิคในการศึกษาไม่เหมาะสม

สรุป

ในการปรับปรุงข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ไม่ไวต่อช่วงแสงโดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่ไวต่อช่วงแสงกับพันธุ์ IR 841 และ Basmati 370 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง พบว่าอับละอองเกสรของลูกผสมขาวดอกมะลิ 105/IR 841 สามารถเจริญเป็นแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นเขียวได้ในอัตราที่สูงกว่าอับละอองเกสรของลูกผสมขาวดอกมะลิ 105/Basmati 370 ต้นข้าว H_1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของลูกผสมขาวดอกมะลิ 105/IR 841 จำนวนทั้งหมด 60 ต้น ประกอบด้วยต้น haploid จำนวน 38 ต้น และต้น doubled haploid จำนวน 22 ต้น ต้น H_1 เหล่านี้มีความแปรปรวนสูงมากทั้งในลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางการเกษตร อย่างไรก็ตามต้น H_1 ทั้งหมดแสดงลักษณะไวต่อช่วงแสงเช่นเดียวกับพันธุ์แม่ขาวดอกมะลิ 105 ไม่พบต้นที่ไม่ไวต่อช่วงแสงที่ต้องการเนื่องจากต้น H_1 มีจำนวนน้อยเกินไป

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ประภา ศรีพิจิตต์. 2532. การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวหอมในสภาพปลอดเชื้อ. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 23 : 324-330.

สุวิช ทาเจริญ. 2535. ระยะเวลาการเจริญเติบโตทางลำต้น ระดับและพันธุกรรมของลักษณะความไวต่อช่วงแสงของข้าวหอม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Alemanno, L. and E. Guiderdoni. 1994. Increased doubled haploid plant regeneration from rice (*Oryza sativa* L.) anthers cultured on colchicine supplemented media. Plant Cell Rep. 13 : 432-436.

Chen, C.C. 1977. *In vitro* development of plants from microspores of rice. *In Vitro* 13 : 484-489.

Chen, C.C. 1978. Effects of sucrose concentration on plant production in anther culture of rice. Crop Sci. 18 : 105-106.

Chen, Y., L.C. Li, J. Zhu, R.F. Wang, S.Y. Li, W.Z. Tian and S.W. Zeng. 1974. Investigation on the induction and genetic expression of rice

pollen plants. Sci. Sin. 17 : 209-226.

Chu, C.C., C.C. Wang, C.S. Sun, H. Chen, K.C. Yin, C.Y. Chu and F.Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources. Sci. Sin. 18 : 659-668.

Khan, S.H. 1975. A technique for staining rice chromosome. Cytologia 40 : 595-598.

Lentini, Z. and C.P. Martinez. 1991. Generation of doubled haploids fesible for rice breeding program, pp. 34. *In* 5th Annual Meeting of the International Program on Rice Biotechnology (Abstract). October 25, 1991. Tucson, Arizona.

Lentini, Z. and C.P. Martinez. 1993. Generation of doubled haploid feasible for rice breeding program. CIAT, Colombia. 16 p.

Mercy, S.T. and F.J. Zapata. 1987. Position of anthers at plating and its in fluence on anther callusing in rice. Plant Cell Rep. 6 : 318-319.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 474-497.

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

Raina, S.K. 1989. Tissue culture in rice : Status and potential. Adv. Agron. 42 : 339-398.

Reiffers, I. and A.B. Freire. 1990. Production of doubled haploid rice plants (Oryza sativa L.) by anther culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 21 : 165-170.

Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj. 1976. Anther culture : Haploid production and its significance, pp. 251-267. *In* J. Reinert and Y.P.S. Bajaj (eds.). Plant Cell Tissue and Organ Culture. IRRI, Los Banos.

Rout, J.R. and N.P. Sarma. 1987. High-frequency plantlet regeneration in rice anther culture. Rice. Gen. Newslett. 3 : 105-107.

Shen, J., M. Li, Y. Chen and Z. Shang. 1983. Improving rice by anther culture, pp. 183-205. *In* Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. Science Press, Beijing.

Vergara, B.S., B. Jackson and S.K. De Datta. 1976. Deepwater rice and its response to deep water stress, pp 301-309. In Climate and Rice. IRRI, Los Banos.

Ying, G.,R. Zeng, X. Wang, Z. Yuan and H. Liu. 1981. Studies on the utilization of rice anther culture breeding. *Cited by* J. Shen, M. Li, Y. Chen and Z. Zhang. Improving rice by anther culture, pp 183-205. *In* Cell and Tissue Culture Technigues for Cereal Crop Improvement. Science Press, Beijing.

Zapata, F.J. 1992. Rice biotechnology training course. IRRI, Los Banos. 44 p.