

การเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนของข้าวลูกผสม

Immature Embryo Culture in Hybrid Rice

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ¹ กาญจนา กล้าแข็ง²

เผติม ระติสุนทร¹ เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา¹ สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล¹

นิตยศรี แสงเดือน¹ ชัยฤกษ์ มณีพงษ์³ หทัยรัตน์ อุไรวงศ์²

Pradit Pongtongkam Kanchana Klakhaeng

Paderm Ratisoontorn Saowanee Suputtitada Surin Peyachoknagul

Nitsri Sangduen Chairerk Maneepongse Hathairat Uraivong

ABSTRACT

The wild species of rice (*Oryza minuta*) containing BBCC genome was crossed with three varieties of cultivated species (*Oryza sativa*): IR70, IR72 and IR74 having AA genome. The seed formation from these crosses were between 9.33 - 20.28%. The immature embryos from the 9-14-day-old seeds could grow into plantlets on the MS agar medium supplemented with 1 g/l yeast extract and 2-3 mg/l BAP. The two hybrids which were transferred to grow in a natural condition showed the same plant type as their parental cultivated varieties but their panicles and seed shapes were similar to the wild species. Seeds were not produced in any of these hybrids.

Key words : rice, embryo, culture

บทคัดย่อ

การผสมข้าวต่างชนิด (interspecific hybridization) ระหว่างข้าวพันธุ์ป่า (*O. minuta*) ซึ่งมีชุดโครโมโซมเป็น BBCC กับข้าวพันธุ์ปลูก (*O. sativa*) 3 สายพันธุ์ คือ IR70, IR72, IR74 ซึ่งมีชุดโครโมโซมเป็น AA จะมีการติดเมล็ดอยู่ในช่วง 9.33 - 20.28% คัพภะอ่อนของเมล็ดที่มีอายุ 9 - 14 วัน ของแต่ละคู่ผสมสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลง ที่เติม yeast extract 1 ก./ล. และ BAP 2 - 3 มก./ล. เมื่อนำลูกผสมของสองคู่ผสมออกปลูกในสภาพธรรมชาติ จะมีลักษณะทรงต้นเหมือนกับข้าวพันธุ์ปลูก

แต่ลักษณะรวงและรูปร่างเมล็ดเหมือนกับข้าวพันธุ์ป่า และเมล็ดจะลีบทั้งหมด

คำนำ

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้ได้ข้าวพันธุ์ใหม่ที่มีคุณภาพดีและผลผลิตสูง ได้มีการนำเชื้อพันธุกรรมมาใช้ อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีการนำข้าวพันธุ์ป่ามาใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมของลักษณะความต้านทานต่อโรคและแมลง ที่สำคัญหลายชนิด เช่น IRRI ใช้ *O. nivara* เป็นแหล่งพันธุกรรมของความต้านทานต่อ grassy stunt virus strain 1 (Khush and Ling 1974) นอก

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

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

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

จากนี้ที่ประเทศจีนใช้ *O. sativa* f. *spontanea* เป็นแหล่งพันธุกรรมของความต้านทานต่อ ragged stunt virus (Ng et al. 1981)

การผสมพันธุ์พืชส่วนใหญ่จะเป็นการผสมพันธุ์กันระหว่างพันธุ์ต่างๆ ภายในพืชชนิดเดียวกัน ลักษณะต่างๆ ของพืชจึงถูกจำกัดอยู่ในกรอบแต่ละชนิดเท่านั้น การผสมพันธุ์พืชต่างชนิดกันมีจุดมุ่งหมายเพื่อถ่ายทอดลักษณะใดลักษณะหนึ่ง หรือเพียงสองสามลักษณะจากพืชชนิดหนึ่งไปยังพืชอีกชนิดหนึ่ง เช่น ลักษณะของความต้านทานโรค หรือเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชชนิดต่างๆ ซึ่งอาจจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชในอนาคตได้ แต่เนื่องจากการผสมพันธุ์ระหว่างพืชต่างชนิดกัน เป็นไปด้วยความยากลำบาก เมล็ดที่ผสมติดอาจมีน้อยมากหรือไม่ติดเมล็ดเลย เนื่องจากคัพภะอาจจะตายหรือสลายไปก่อนที่เมล็ดจะแก่ กรณีดังกล่าวนี้สามารถจะนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วยเหลือในการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนของลูกผสม (hybrid immature embryo rescue) ก่อนที่จะตาย โดยสามารถช่วยชีวิตคัพภะอ่อนให้เจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ เช่น การทดลองของเกรียงไกร และอรดี (2534) ได้ทำการผสมลิลลี่ข้ามชนิด ระหว่างลิลลี่พันธุ์พื้นเมืองหรือลิลลี่คอยกับลิลลี่พันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศชนิดต่างๆ พบว่าการนำคัพภะอ่อนของลูกผสมหลังจากการผสม 25 - 30 วัน มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรของ Murashige และ Skoong (MS) (1962) คัพภะจะเริ่มงอกหลังจากการเพาะเลี้ยงได้ 45 วัน

สำหรับวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อจะหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนของลูกผสม ระหว่างพันธุ์ข้าวป่า (*O. minuta*) ซึ่งมีชุดของโครโมโซมเป็น BBCC กับพันธุ์ข้าวปลูก (*O. sativa*)

ซึ่งมีชุดของโครโมโซมเป็น AA (Chang, 1976) ได้แก่ พันธุ์ IR70, IR72 และ IR74 เพื่อให้เจริญเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์และศึกษาลักษณะต่างๆ ของลูกผสมที่เกิดขึ้นในแต่ละกลุ่ม

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พันธุ์ข้าวป่า (*O. minuta*)
2. พันธุ์ข้าวปลูก (*O. sativa*) ใช้พันธุ์ IR 70, IR 72, และ IR 74
3. อาหารสังเคราะห์สำหรับใช้เพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนของข้าวลูกผสม รวมทั้งหมด 6 สูตร ดังนี้
 - E1 = สูตร MS ดัดแปลง + yeast extract 1 ก./ล. + 2,4-D 2 มก./ล. + BAP 0.5 มก./ล.
 - E2 = สูตร MS ดัดแปลง + yeast extract 1 ก./ล. + 2,4-D 3 มก./ล. + BAP 0.5 มก./ล.
 - E3 = สูตร MS ดัดแปลง + yeast extract 1 ก./ล. + 2,4-D 2 มก./ล. + BAP 1 มก./ล.
 - E4 = สูตร MS ดัดแปลง + yeast extract 1 ก./ล. + 2,4-D 3 มก./ล. + BAP 1 มก./ล.
 - E5 = สูตร MS ดัดแปลง + yeast extract 1 ก./ล. + BAP 2 มก./ล.
 - E6 = สูตร MS ดัดแปลง + yeast extract 1 ก./ล. + BAP 3 มก./ล.

วิธีการ

ผสมพันธุ์ข้าวป่ากับพันธุ์ข้าวปลูกทั้ง 3 พันธุ์คือ IR 70, IR 72 และ IR 74 โดยใช้พันธุ์ข้าวป่าเป็นฝ่ายพ่อ รวมทั้งหมด 3 คู่ผสม หลังจากผสมพันธุ์ได้ 9 - 14 วัน

Table 1. Percent seed formation of three crosses

Crosses	No. of pollination	No. of seed formation	% seed formation
IR 70/ <i>O. minuta</i>	164	17	10.37
IR 72/ <i>O. minuta</i>	225	21	9.33
IR 74/ <i>O. minuta</i>	212	43	20.28

จะนำคัพภะอ่อนของลูกผสมแต่ละคู่ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ได้เตรียมไว้ 6 สูตรดังกล่าว และบันทึกผลจากคัพภะอ่อนของข้าวลูกผสมแต่ละคู่ที่สามารถเจริญเติบโต และพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ในอาหารสังเคราะห์สูตรที่เหมาะสม

หลังจากนั้นทำการย้ายต้นข้าวที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตรเดิม เพื่อเพิ่มจำนวนต้นให้ได้มากเพียงพอ และย้ายต้นใหม่ที่ได้ไปปลูกในกระถางเพื่อศึกษาลักษณะต่างๆ ของข้าวลูกผสมแต่ละคู่

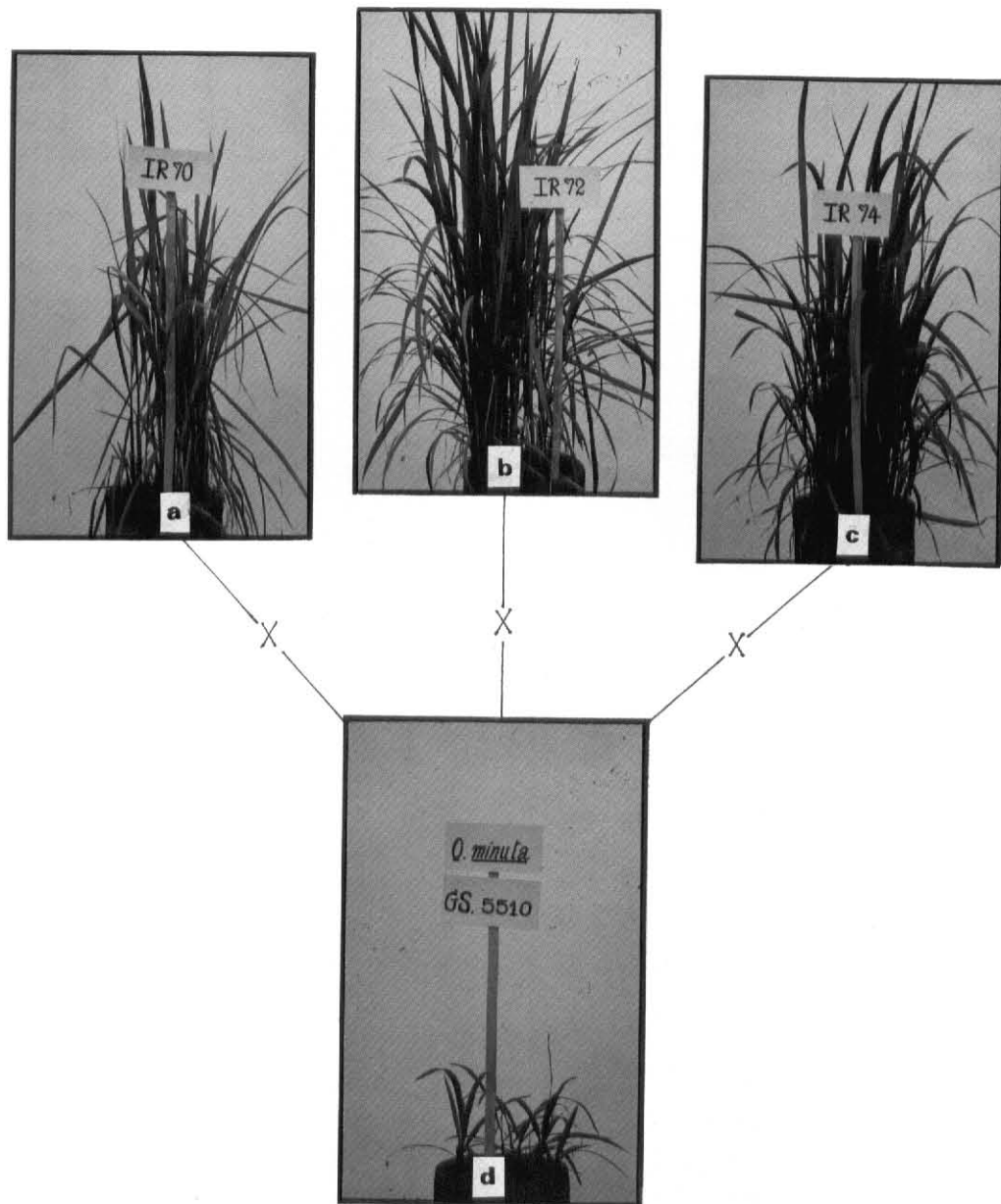


Figure 1 The performance and three crosses of four varieties of rice

a = IR 70 b = IR 72
c = IR 74 d = O. minuta

ผลและวิจารณ์

ในการผสมข้าวพันธุ์ป่า (*O. minuta*) กับพันธุ์ปลูก (*O. sativa*) ซึ่งใช้ 3 พันธุ์ คือ IR 70, IR 72 และ IR 74 เป็นการผสมข้ามต่างชนิด (interspecific hybridization) ดังนั้นโอกาสที่ผสมแล้วจะติดเมล็ดจึงมีน้อยมาก จาก

การทดลองพบว่ากลุ่มผสมของ IR 70/*O. minuta* จำนวนที่ผสมทั้งหมด 164 ดอก ผสมติด 17 เมล็ด คิดเป็น 10.37% กลุ่มผสมของ IR 72/*O. minuta* จำนวนที่ผสมทั้งหมด 225 ดอก ผสมติด 21 เมล็ด คิดเป็น 9.33% และกลุ่มผสมของ IR 74/*O. minuta* จำนวนที่ผสมทั้งหมด 212 ดอก ผสมติด 43 เมล็ด คิดเป็น 20.28% (Table 1)

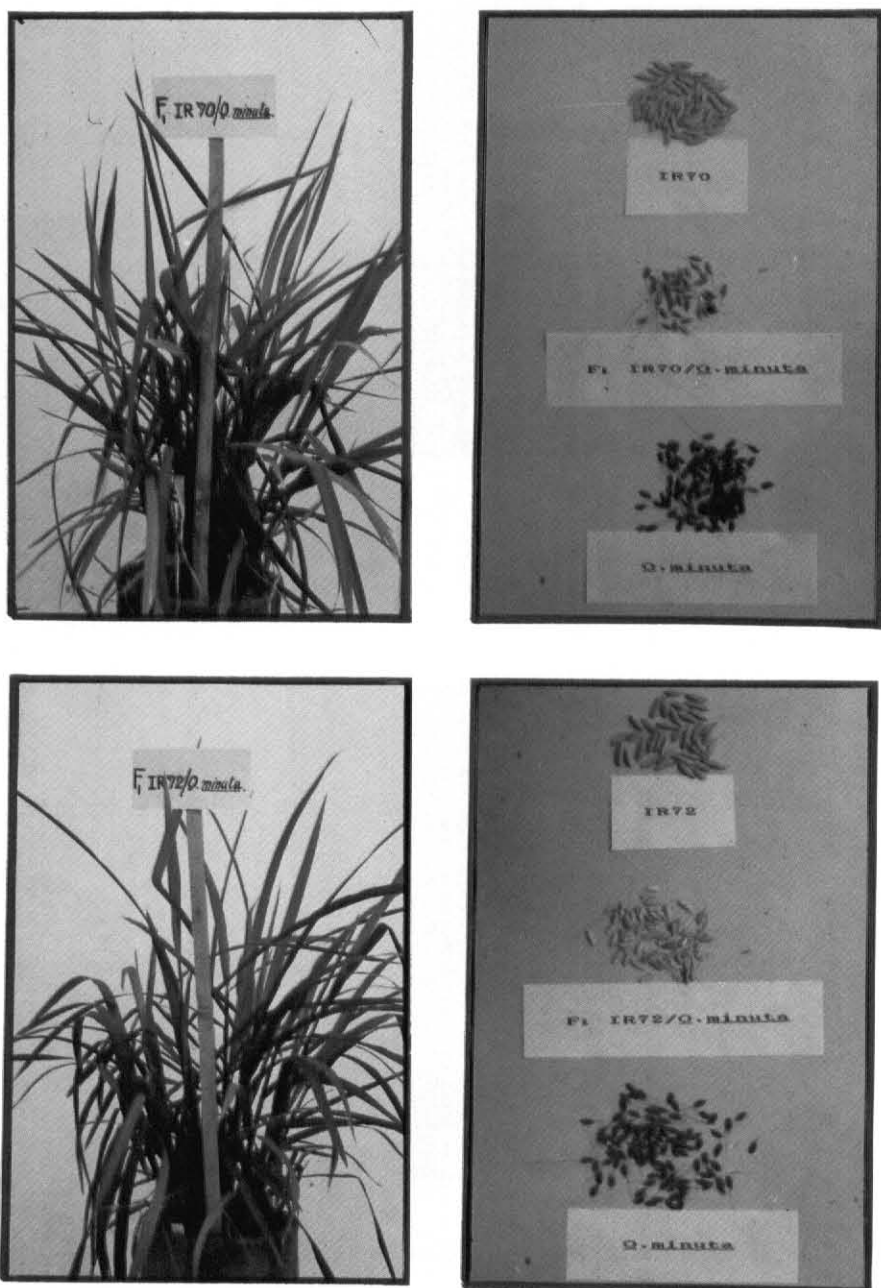


Figure 2 The performance of F1 hybrids and seed shapes of parents and F1 hybrids.

เมล็ดที่ผสมติดของกลุ่มผสมแต่ละคู่ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ทั้ง 6 สูตร พบว่าในกลุ่มผสมของ IR 70/*O. minuta* เมล็ดที่มีอายุ 11 และ 13 วัน คัพภะอ่อนสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นใหม่ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม yeast extract 1 ก./ล. และ BAP 2 และ 3 มก./ล. สำหรับกลุ่มผสม IR 72/*O. minuta* และกลุ่มผสม IR 74/*O. minuta* เมล็ดที่มีอายุ 9 - 12 วัน และ 13 - 14 วัน คัพภะอ่อนสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นใหม่ในอาหารสังเคราะห์สูตรเดียวกับ IR 70/*O. minuta* โดยที่คัพภะอ่อนของลูกผสมแต่ละคู่จะเริ่มงอกหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์ และจะเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์เมื่ออายุ 4 สัปดาห์

เมื่อมีการย้ายต้นใหม่ที่ได้ในแต่ละกลุ่มผสมไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม yeast extract 1 ก./ล. และ BAP 3 มก./ล. เพื่อเพิ่มจำนวนต้น ปรากฏว่ากลุ่มผสม IR 74/*O. minuta* เกิดการปนเปื้อนทำให้เกิดการสูญเสียต้นลูกผสมดังกล่าว สำหรับกลุ่มผสมที่เหลืออีก 2 คู่สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนต้นได้เป็นจำนวนมาก และเมื่อย้ายต้นใหม่ของลูกผสมที่ได้จากกลุ่มผสมทั้ง 2 คู่ออกปลูกในสภาพธรรมชาติ พบว่าลูกผสมที่ได้ของแต่ละกลุ่มผสมจะมีลักษณะรูปทรงของลำต้นคล้ายคลึงกับ IR 70 และ IR 72 (Figure 1) แต่ลักษณะของรวงข้าว และลักษณะรูปร่างของเมล็ดจะมีขนาดข้าวเหมือนกับ *O. minuta* (Figure 2) แต่เมล็ดทุกเมล็ดจะลีบหรือไม่ติดเมล็ดที่เป็นเช่นนี้ก็เนื่องจากลูกผสมที่ได้จะมีชุดของโครโมโซมเป็น ABC (triploid) จึงมีโอกาสมันมากหรือไม่ติดเมล็ดเลย แต่ลูกผสมที่เป็นหมันนี้ ถ้าถูกชักนำให้มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมอีกเท่าตัว คือมีชุดของโครโมโซมเป็น AABBCC (allohexaploid) ก็อาจจะไม่เป็นหมันสามารถผสมตัวเองและติดเมล็ดได้

สรุป

การผสมข้ามข้ามชนิด (interspecific hybridization) ระหว่างข้าวป่า (*O. minuta*) กับข้าวพันธุ์ปลูก *O. sativa* 3 สายพันธุ์ คือ IR 70, IR 72 และ IR 74 มีการติดเมล็ดอยู่ในช่วง 9.33 - 20.28% คัพภะอ่อนของเมล็ดที่มีอายุ 9 - 14 วัน ของแต่ละกลุ่มผสมสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ในอาหารสังเคราะห์สูตรการดัดแปลงที่เติม yeast extract 1 ก./ล. และ BAP 2 - 3 มก./ล. ลูกผสมสองคู่ที่นำออกปลูกในสภาพธรรมชาติมีลักษณะทรงต้นเหมือนกับพันธุ์ข้าวปลูก แต่มีลักษณะรวงและรูปร่างเมล็ดเหมือนกับข้าวป่าและเมล็ดลีบทั้งหมด

เอกสารอ้างอิง

- เกรียงไกร อังอานวยศิริ และ อร์ดี สหวัชรินทร์. 2534. การสร้างลูกผสมลิ้นลิ้นข้ามชนิด. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 29 วันที่ 4 - 7 กุมภาพันธ์ 2534. หน้า 415 - 422.
- Chang, T. T. 1976. Manual on genetic conservation of rice germplasm for evaluation and utilization. IRRI, Los Banos, Philippines. 77 p.
- Khush, G. S. and K. C. Ling. 1974. Inheritance of resistance to grassy stunt virus and its vector in rice. J. Hexed. 65 : 134 - 136.
- Ng, N. Q., J. G. Hawkes, J. T. Williams and T. T. Chang. 1981. The recognition of a new species of rice (*Oryza*) from Australia. Bot. J. Lin. Soc. 82 : 327 - 330.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Pl. 15 : 473 - 479.