

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวพันธุ์เบสมาติ 370

Tissue Culture in Rice (*Oryza sativa* L. : Basmati 370 variety)

เป็ดิม ระติสุนทร ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ เสาวนีย์ สุพุทธิธาดาและสุพรรณณี แก่นสาร¹

Paderm Ratisoontorn, Pradit Pongtongkam, Saowanee Suputtitada and Supunnee Kaensarn

ABSTRACT

Seeds of rice (Basmati 370 variety) were cultured on the modified Murashige and Skoog (MS) agar medium (1962) supplemented with 15 percent coconut water and the modified MS medium supplemented with 15 percent coconut water and 1.0, 2.0 mg/l 2,4 - dichlorophenoxy acetic acid (2,4 D), 1.0, 2.0 mg/l α - naphthalene acetic acid (NAA) and 0.5, 1.0 mg/l kinetin. It was found that the modified medium supplemented with 15 percent coconut water and the concentration of 2,4 D, NAA and kinetin at 2.0, 2.0 and 0.5 mg/l respectively could induce calli of about 33.33 percent. After subculture in the same medium for 4 weeks calli from these media were transferred to the modified MS agar medium without coconut water and growth regulators, and about 30 percent of them could regenerate to plantlets.

บทคัดย่อ

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์เบสมาติ 370 ในอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ พร้อมทั้งเติม 2,4 - D 1.0, 2.0 มก./ลิตร NAA 1.0, 2.0 มก./ลิตร kinetin 0.5, 1.0 มก./ลิตร พบว่าสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เติมน้ำ 2,4 - D 2.0 มก./ลิตร NAA 2.0 มก./ลิตร และ kinetin 0.5 มก./ลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ประมาณ 33.33 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายแคลลัสเหล่านี้เลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่ปราศจากน้ำมะพร้าวและสารควบคุมการเจริญ

เติบโต สามารถจะพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้สูงสุดประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์

คำนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญที่สุดของประเทศไทยคือ นอกจากจะใช้บริโภคเป็นอาหารหลักประจำวันของคนไทยแล้ว ยังเป็นสินค้าออกสำคัญชนิดหนึ่งที่ทำรายได้ให้แก่ประเทศด้วย พันธุ์ข้าวที่ทำชื่อเสียงให้แก่ประเทศไทยและมีราคาสูงสุดคือ พันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวหอมพันธุ์หนึ่งที่มีความนิยมนิยมจากผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศ ปัจจุบันได้มีการนำพันธุ์ข้าวหอมจากต่างประเทศเข้ามาทดลองปลูกในประเทศไทยคือ พันธุ์เบสมาติ

¹ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวของรัฐปันจาบ เมื่อรัฐนี้ถูกแบ่งออกเป็นของอินเดียและปากีสถาน พันธุ์ข้าวนี้จึงเป็นของทั้งสองประเทศ ข้าวพันธุ์บาสมาดิชอบขึ้นในดินเหนียวร่วน มีการตอบสนองต่อปุ๋ยคอกและไนโตรเจนเล็กน้อย ไม่ไวต่อช่วงแสง มีอายุประมาณ 125 – 150 วัน ผลผลิตในประเทศอินเดียอยู่ในช่วง 40 – 48 ถังต่อไร่ ข้าวพันธุ์บาสมาดิเป็นข้าวที่มีราคาสูงที่สุดในโลก มีราคาสูงกว่าพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในตลาดโลก 2 – 3 เท่า

ลักษณะโดยทั่วไปของข้าวพันธุ์บาสมาดิ มีลักษณะการแตกกอดี ลำต้นค่อนข้างเล็ก ใบเล็ก ต้นสีข้าว ใบสีเขียว ออกรวงโผล่พ้นใบธง เมล็ดต่อรวงไม่มากนัก มีเมล็ดลีบมาก เมล็ดข้าวเปลือกสีขาวเล็กพอม เมล็ดปลายรวงจะมีหนวดข้าว เมล็ดข้าวกล้องยาวประมาณ 6.8 – 7.0 มิลลิเมตร โรคที่เป็นมากมักเป็นโรคขอบใบแห้ง สามารถต้านทานโรคใบไหม้ โรครากเน่าได้ดีพอใช้ ลักษณะความหอม ท้องไข่ ความยาวเมล็ดขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ เมล็ดข้าวเปลือกบาสมาดิมีน้ำหนักรวม มีคุณภาพการขัดสีต่ำ แต่มีคุณภาพการหุงต้มมีกลิ่นหอม ถูกสนิยมของผู้บริโภคในประเทศแถบตะวันออกกลาง พันธุ์ข้าวบาสมาดิสามารถปลูกในประเทศไทยได้ทุกภาค แต่ผลผลิตที่ได้ค่อนข้างต่ำ (วรวิทย์, 2530)

ปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้เข้ามามีบทบาทต่อโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวและพืชอื่น ๆ เป็นจำนวนมาก เช่น มีส่วนช่วยย่นระยะเวลาในการสร้างสายพันธุ์แท้ หรือสร้างสายพันธุ์ใหม่ โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นพันธุ์ที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมบางอย่าง เช่น สร้างสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสภาพดินเปรี้ยว ดินเค็ม ทนทานต่อโรคหรือแมลงบางชนิด เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว ได้รับการพัฒนาอย่างรวดเร็ว ชิ้นส่วนของต้นเกือบทุกส่วนสามารถนำมาใช้เพาะเลี้ยงเพื่อสร้างเซลล์ได้ เช่น ราก, ใบ (Henke *et al.*, 1978) เมล็ด (Maeda, 1980) เมื่อ

ย้ายเซลล์ที่ได้ไปเลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมาะสม สามารถจะเจริญและพัฒนาเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ (Nishi *et al.*, 1968)

ในปี พ.ศ. 2529 รัชนี้และคณะได้ทำการทดลองศึกษาอิทธิพลของน้ำมะพร้าวระยะต่าง ๆ ต่อการเจริญของเซลล์ยอดและราก โดยใช้เมล็ดข้าวพันธุ์เหลืองประทิว เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม 2,4 - D 2.0 มก./ลิตร NAA 2.0 มก./ลิตร และ kinetin 1.0 มก./ลิตร พบว่าน้ำมะพร้าวอ่อนมีผลต่อการเจริญของเซลล์ และยอดมากที่สุด ผลการทดลองนี้เป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวพันธุ์อื่น ๆ ด้วย

จุดประสงค์ของการทดลองนี้ เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์บาสมาดิให้เจริญไปเป็นเซลล์แล้วเซลล์สามารถที่จะเจริญไปเป็นต้นใหม่ที่ย้ายลงปลูกในสภาพธรรมชาติได้ ผลการทดลองนี้จึงจะเป็นประโยชน์ต่อโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวบาสมาดิต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เมล็ดข้าวพันธุ์บาสมาดิ 370 G.S. No. 2607
2. อาหารสังเคราะห์สูตรต่าง ๆ ที่ใช้เพาะเลี้ยงเมล็ดเพื่อชักนำให้เกิดเซลล์ คือ สูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962) ดัดแปลง ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์แต่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และเติม 2,4 - D 1.0 และ 2.0 มก./ลิตร NAA 1.0 และ 2.0 มก./ลิตร และ kinetin 0.5 และ 1.0 มก./ลิตร รวมสูตรอาหารทั้งหมด 9 สูตร
3. อาหารสังเคราะห์ที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อชักนำให้พัฒนาเป็นต้นใหม่ ใช้สูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่ปราศจากน้ำมะพร้าวและสารควบคุมการ

เจริญเติบโต

4. นำเมล็ดข้าวเปลือกพันธุ์ปทุมมา 370 มาแกะเอาเปลือกออก แล้วนำไปพอกฆ่าเชื้อที่ผิว โดยแช่เมล็ดในสารละลายคลอโรกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ เดิมสารเปียกใบ 1 – 2 หยด แช่เป็นครั้งคราวนาน 30 นาที แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จึงนำเมล็ดข้าวไปเพาะเลี้ยงบนอาหารทั้ง 9 สูตร ที่ได้เตรียมไว้ตามข้อ 2 แต่ละสูตรอาหารทำการเพาะเลี้ยง 30 ขวด แล้วนำไปไว้ในห้องเพาะเลี้ยงอุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. มีความเข้มแสงประมาณ 2,000 ลักซ์ ให้ได้รับแสง 16 ชม./วัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และบันทึกผลของการเพาะแคลลัสดังนี้

- + หมายถึง แคลลัสมีขนาดเล็ก
- ++ หมายถึง แคลลัสมีขนาดปานกลาง
- +++ หมายถึง แคลลัสมีขนาดใหญ่

5. ทำการย้ายแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในอาหารแต่ละสูตรลงในอาหารสูตรเดิมเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัส

6. นำแคลลัสที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงของ MS ที่ปราศจากนํ้ามะพร้าวและสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นใหม่ แล้วนำไปไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. มีความเข้มแสงประมาณ 2,000 ลักซ์ ให้ได้รับแสง 16 ชม./วัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกผลของการเปลี่ยนแปลงแคลลัส ดังนี้

NR หมายถึง แคลลัสไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอดและราก

S หมายถึง แคลลัสมียอดเกิดขึ้น

R หมายถึง แคลลัสมีรากเกิดขึ้น

P หมายถึง แคลลัสที่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดและรากหรือต้นใหม่

7. แยกต้นข้าวที่ได้ใหม่ย้ายลงปลูกในดินที่บรรจุในถ้วยพลาสติก เพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงใน

สภาพแวดล้อมเดิมอีก 1 สัปดาห์ จากนั้นจึงย้ายออกมาปลูกในกระถาง ในสภาพแวดล้อมธรรมชาติ บันทึกการเจริญเติบโตของต้นข้าวเหล่านั้น

ผลและวิจารณ์

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ปทุมมา 370 ในอาหารสังเคราะห์ทั้ง 9 สูตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า เมล็ดที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงของ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่สามารถจะเจริญไปเป็นแคลลัสได้ แต่เจริญเป็นต้นอ่อนได้ สำหรับสูตรอาหารอื่น ๆ เมล็ดสามารถเจริญไปเป็นแคลลัสที่มีขนาดแตกต่างกัน และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสตั้งแต่ 23.3 เปอร์เซ็นต์ ไปจนถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (Table 1, Figure 1)

เมื่อนำแคลลัสที่ได้ในอาหารแต่ละสูตรไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม พบว่าแคลลัสมีปริมาณเพิ่มขึ้นในทุกสูตรอาหาร แต่แคลลัสที่เพิ่มขึ้นส่วนมากมีลักษณะค่อนข้างร่วนเกาะกันอยู่อย่างหลวม ๆ มีลักษณะฟูและเยิ้มเล็กน้อย มีสีเหลือง (Figure 1) ในสัปดาห์ที่ 4 พบว่า ผิวของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติมนํ้ามะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และ 2,4 - D 2.0 มก./ลิตร เริ่มเกิดจุดเขียวขึ้น

เมื่อย้ายแคลลัสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณในอาหารแต่ละสูตรไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่ปราศจากนํ้ามะพร้าว และสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติมนํ้ามะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ 2,4 - D 2.0 มก./ลิตร NAA 2.0 มก./ลิตร และ kinetin 0.5 มก./ลิตร สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ในอัตราสูงที่สุด คือ 30 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นยังพบต้นสีขาวที่เกิดจากการพัฒนาของแคลลัสในอาหารสูตรอื่น ๆ ด้วย (Figure 1, Table 2)

Table 1 Callus formation of rice seeds (Basmati - 370 variety) on modified MS media supplemented with 15 percent coconut water and various concentrations of growth regulators after 4 weeks.

Modified MS media supplemented with 15% coconut water and			Number of cultured seed	Number of callus formation	Size of callus			Callus formation (%)
2,4 - D (mg/l)	NAA (mg/l)	kinetin (mg/l)			+	++	+++	
1	1	0.5	25	10	2	4	4	40
1	1	1	30	7	2	2	3	23.3
1	2	0.5	23	7	1	4	2	30.4
1	2	1	28	10	2	5	3	35.7
2	1	0.5	28	14	2	12	—	50
2	1	1	26	12	2	6	4	46
2	2	0.5	30	10	4	3	3	33.3
2	2	1	28	10	1	4	5	35.7
0	0	0	30	—	—	—	—	—

+ = small callus

++ = medium callus

+++ = large callus

Table 2 Plantlet regeneration on modified MS media for 6 weeks.

Calli from modified MS media supplemented with 15% coconut water and			Number of calli	Callus differentiation					Plantlet formation (%)
2,4 - D (mg/l)	NAA (mg/l)	kinetin (mg/l)		NR	S	R	G	P	
1	1	0.5	10	8	—	2	—	—	0
1	1	1	7	5	—	1	—	1	14.3
1	2	0.5	7	5	—	—	—	2*	28.5
1	2	1	10	9	—	—	—	1*	10.0
2	1	0.5	14	10	—	1	1	2	14.3
2	1	1	12	10	—	1	1	—	0
2	2	0.5	10	5	—	1	1	3	30
2	2	1	10	8	—	2	—	—	0

* = some albino plantlets

NR = non regeneration

S = shoot formation

R = root formation

G = green spot on callus

P = whole plantlet

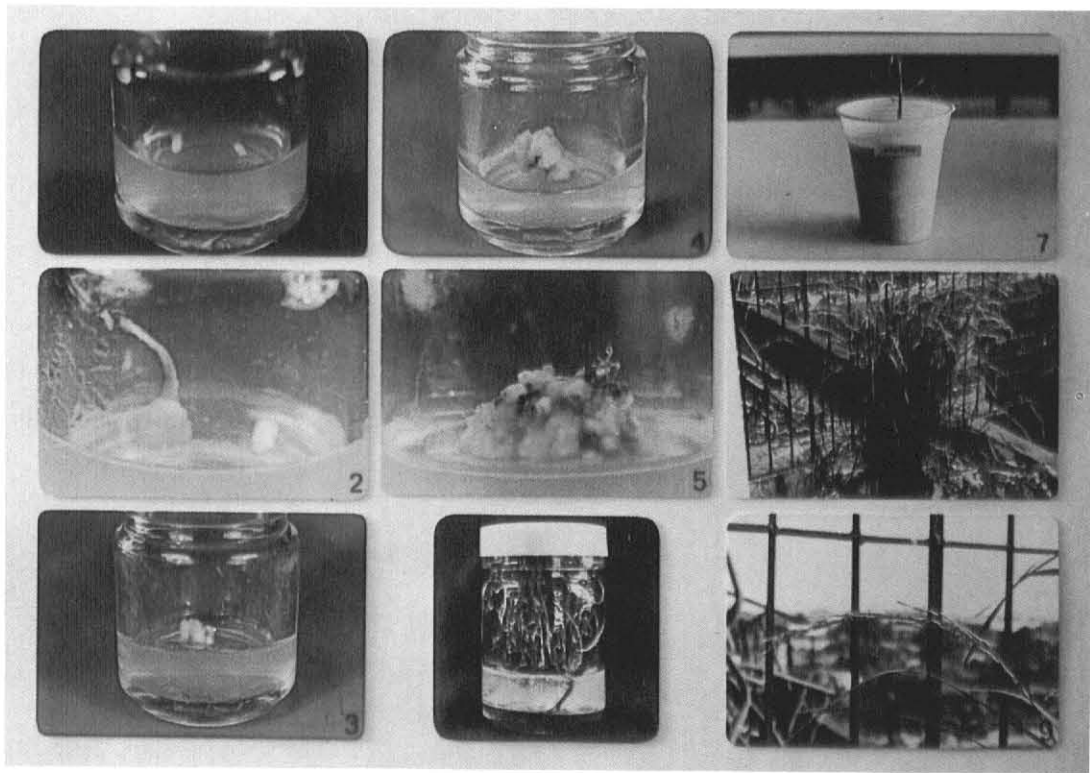


Figure 1. Tissue culture of rice (Basmati - 370 variety).

- 1 - 3 Callus formation from seed culture on modified MS media for 4 weeks.
 4 - 6 Plantlet regeneration from callus.
 7 - 9 Transfer plantlets to pots.

การเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์บาสมัติ 370 ในอาหารสูตร MS ดัดแปลงทั้ง 9 สูตร เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสนั้น แคลลัสที่เกิดขึ้นเจริญจากเนื้อเยื่อ ส่วนของ scutellum ซึ่งมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว พร้อมกับ การงอกของต้นกล้า ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว (รัชนี และคณะ, 2529) แคลลัสที่ได้มีทั้งชนิดที่มีสีเหลืองค่อนข้างเข้ม เกาะกันอยู่ หลวม ๆ ซึ่งเป็นลักษณะของ non - embryogenic callus (NE) และแคลลัสที่มีสีขาวหรือสีนวล ผิวแห้ง ประกอบด้วยเซลล์ขนาดเล็กเกาะกันแน่น ซึ่งเป็นลักษณะของ embryogenic callus (E) แคลลัสที่เกิดขึ้นนี้สามารถแยกออกจากต้นกล้าแล้วนำไปเลี้ยงต่อในอาหาร

สูตรเดิม พบว่าแคลลัสสามารถเจริญได้ โดยแคลลัสชนิด NE เจริญเร็วกว่าแคลลัสชนิด E มาก และแคลลัสชนิด NE สามารถเปลี่ยนไปเป็นแคลลัสชนิด E ได้

เมื่อนำแคลลัสที่ได้ในแต่ละสูตรอาหารไปเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่ปราศจากน้ำมะพร้าว และสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าแคลลัสจากบางสูตรอาหารไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้เพียงแต่มีรากเกิดขึ้น ในขณะที่แคลลัสจากบางสูตรอาหารเกิดมีจุดเขียวขึ้น หรือพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ นอกจากนี้ต้นที่เกิดขึ้นใหม่นั้นบางต้นเป็นสีขาวซึ่งตายไปในที่สุด เพราะไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้

ต้นใหม่ที่ได้เมื่อย้ายออกปลูกในสภาพแวดล้อม

ธรรมชาติ สามารถแตกกอ ออกรวง ติดเมล็ดได้ ในบาง รวงมีเมล็ดลีบเกิดขึ้นด้วย วิธีการขยายพันธุ์โดยการ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวพันธุ์บาสมาดิ 370 ซึ่งดำเนินการ โดยชักนำให้เกิดแคลลัสแล้วพัฒนาเป็นต้นใหม่นี้ น่าจะ เป็นประโยชน์ในการสร้างสายพันธุ์กลายในข้าวบาสมาดิ เพราะการก่อการกลายต่อแคลลัสจะมีโอกาสในการที่ จะได้ต้นที่เกิดการกลายสูงกว่าการชักนำเมล็ดให้เกิด การกลายตามวิธีการที่ปฏิบัติกันอยู่ การนำเทคนิคการ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมารวมกับกรรมวิธีการก่อการกลาย จึงน่าจะเป็นประโยชน์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป

สรุป

การเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์บาสมาดิ 370 ในสูตร อาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และเติม 2,4 - D NAA และ kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า เมล็ดสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ในสูตรอาหารทุกสูตร ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต แคลลัสที่เกิดขึ้น สามารถเพิ่มปริมาณได้ในทุกสูตรอาหาร เมื่อนำแคลลัส เหล่านี้ไปเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงของ MS จะสา- มารถพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้เพียง 5 สูตรอาหาร โดย สูตรอาหารที่เติม 2,4 - D 2.0 มก./ลิตร NAA 1.0 มก./ลิตร และ kinetin 0.5 มก./ลิตร สามารถชักนำให้ เกิดแคลลัสได้สูงสุด คือ 50 เปอร์เซ็นต์ แต่สามารถ พัฒนาเป็นต้นใหม่ได้เพียง 14.3 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่

แคลลัสจากสูตรอาหารที่เติม 2,4 - D, NAA และ kinetin ในอัตรา 2.0, 2.0 และ 0.5 มก./ลิตร ซึ่งเกิด แคลลัส 33.33 เปอร์เซ็นต์ นั้นสามารถพัฒนาไปเป็นต้น ใหม่ได้สูงสุด คือ 30 เปอร์เซ็นต์

เอกสารอ้างอิง

- รัชนี จำปาเทศ, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และ อธิ เจริญ- ทรัพย์. 2529. อิทธิพลของน้ำมะพร้าวระยะ ต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของยอด, ราก และ แคลลัสในข้าว. ว. วิทย. กษ. 19(6) : 379 - 387.
- วรวิทย์ พาณิชพัฒน์. 2530. ข้าวหอม ขาวดอกมะลิ 105 บาสมาดิและอื่น ๆ. มหาวิทยาลัยเกษตร- ศาสตร์, กรุงเทพฯ. 45 น.
- Henke, R.R., M.A. Mansur and M.J. Constan- tin. 1978. Organogenesis and plantlet for- mation from organ and seedling derived calli of rice (*Oryza sativa* L.). *Physiol. Plant.* 44 : 11 - 14.
- Maeda, E. 1980. Organogenesis and cell culture in rice plants under sterile condition Part 1. *Jap. Agr. Res. Quart.* 14 (1) : 4 - 8.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473 - 497.
- Nishi, T., Y. Yamada and E. Takahashi. 1968. Organ redifferentiation and plant restora- tion in rice callus. *Nature* 219 : 508 - 509.