การชักนำให้เกิดต้นแฮพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงรังไข่ของข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับ Rathu Heenati/KDML105//Chai Nat 1

Induction of Haploid Plants from Ovary Culture of Backcross Line Rathu Heenati/KDML105//Chai Nat 1

โสภณ บุญธรรม[1/] *ธีรยุทธ ตู้จินดา*[2/] *ณัฐา โพธาภรณ์*[3/]
และประสาทพร สมิตะมาน[1/]
Sophon Boontham[1/], *Theerayut Toojinda*[2/], *Nuttha Potapohn*[3/]
and Prasartporn Smitamana[1/]

(Received: 17 December 2013; Accepted: 18 September 2014)

Abstract: Callus induction from the rice ovaries of 2 backcross lines (BC_4F_3) of a cross Rathu Heenati/KDML 105 //Chai Nat 1 was performed on the N6 medium supplemented with different auxin and cytokinins combinations. Results showed that N6 medium supplemented with 2 mg/L of NAA, 2 mg/L of 2,4-D, 1 mg/L of kinetin, 500 mg/L of CH and 40 g/L of maltose gave the best result for the ovary callus induction, 11.00 and 6.60 % of CH75 and CH71 lines, respectively. Green plantlet regeneration from ovary calli successfully generated at the rate of 7.46 %, when culturing on MS medium supplemented with 2 mg/L of BAP, 0.5 mg/L of NAA, 500 mg/L of CH and 30 g/L of sucrose. Plants derived from ovary showed haploid characteristics. Chromosome number counting and microscopic observation on epidermal peels of expanded leaf confirmed that these plants were haploids.

Keywords: Rice, ovary culture, callus induction, plant regeneration, haploid plant

[1/] สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200
[1/] Department of Biotechnology, Faculty of Graduate School, Chiangmai University, Muang, Chiang Mai 50200, Thailand
[2/] หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140
[2/] Rice Gene Discovery Unit, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand
[3/] ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200
[3/] Department of Plant Science and Natural Resources, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

บทคัดย่อ: จากการชักนำให้เกิดแคลลัสจากรังไข่ของข้าวลูกผสมกลับรุ่นที่ BC_4F_3 ที่ได้จาก Rathu Heenati/KDML105 //Chai Nat 1 จำนวน 2 สายพันธุ์ บนอาหาร N6 ที่เติมออกซินและไซโทไคนินร่วมกัน พบว่าบนอาหารสูตร N6 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไคนีทิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร, CH 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และมอลโทส 40 กรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของรังไข่มากที่สุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 11.00 และ 6.60 เปอร์เซ็นต์ในข้าวสายพันธุ์ CH75 และ CH71 ตามลำดับ อัตราการเกิดต้นสีเขียวจากรังไข่ 7.46 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, CH 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 30 กรัมต่อลิตร โดยต้นสีเขียวที่ได้จากเพาะเลี้ยงรังไข่ทั้งหมดแสดงลักษณะที่เป็นต้นแฮพลอยด์ มีจำนวนโครโมโซมเพียงชุดเดียว ซึ่งสามารถยืนยันจากการนับจำนวนโครโมโซมและการตรวจสอบชั้นเอพิเดอร์มิสของใบ

คำสำคัญ: ข้าว การเพาะเลี้ยงรังไข่ การชักนำให้เกิดแคลลัส การชักนำให้เกิดต้น ต้นแฮพลอยด์

คำนำ

ข้าวเป็นแหล่งอาหารหลักของประชากรมากกว่าครึ่งโลก และมีพื้นที่ปลูกข้าวในประเทศต่าง ๆ มากกว่า 100 ประเทศ ยกเว้นในทวีปแอนตาร์กติกา (antarctica) สำหรับในทวีปเอเชียปลูกและบริโภคข้าวถึง 91 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณข้าวทั้งหมดที่ผลิตได้ทั่วโลก (Bindeshwar *et al*., 2007) การปรับปรุงพันธุ์ข้าวส่วนมากยังคงใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์ แบบดั้งเดิม (conventional breeding) ซึ่งยังคงมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มผลผลิตและคุณภาพ ในขณะที่เทคโนโลยีชีวภาพทางด้านพืชมีส่วนช่วยในการพัฒนาสายพันธุ์ข้าว เพื่อให้มีผลผลิตสูง ต้านทานต่อโรคและความเครียดจากสิ่งมีชีวิต (biotic stress) และไม่มีชีวิต (abiotic stress) (Chen *et al*., 2006) การนำเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น วิธีการเพาะเลี้ยงรังไข่ (ovary culture) สามารถช่วยลดขั้นตอนและเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้รวดเร็วและ เป็นไปตามวัตถุประสงค์ เนื่องจากสามารถผลิตต้นพืช double haploid (2n=2x) เพื่อใช้ในการสร้างสายพันธุ์พืชที่มีความคงตัวทางพันธุกรรม โดยการเพาะเลี้ยง haploid cell ที่เกิดจากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) ของเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งมีการจัดเรียงของยีนหรือโครโมโซมในหลายรูปแบบ จึงทำให้เกิดการกระจายตัวของยีน ออกมาในรูปแบบต่าง ๆ กัน และไม่มีผลต่อการข่มของยีน เมื่อมีการชักนำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซม (double haploid) จะทำให้ได้สายพันธุ์แท้ที่ไม่มีการกระจายตัวของลักษณะทางพันธุกรรม (fixed recombination) (Raina, 1989)

การชักนำให้เกิดต้นแฮพลอยด์จาก megaspore รายงานครั้งแรกโดย Uchimiya *et al*. (1971) โดยเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของข้าวโพด (*Zea mays*) และรังไข่ของ *Solanum melongena* เขาสังเกตการแบ่งเซลล์แฮพลอยด์ในแคลลัสและตั้งสมมุติฐานว่าสามารถที่จะชักนำให้เกิดต้นแฮพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อจาก angiosperm megagametophyte ได้ ในข้าวมีรายงานการชักนำให้เกิดต้นแฮพลอยด์จากรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสม (unpollinated ovary culture) จากนักวิจัยหลายคน (De Beauville, 1980; Zhou and Yang, 1980, 1981a,b,c; Kuo, 1982; Yang and Zhou, 1982) ซึ่งถือเป็นรากฐานของงานวิจัยทางด้านนี้

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการชักนำให้เกิดต้นแฮพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงรังไข่ของข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับรุ่นที่ BC_4F_3 ที่ได้จาก Rathu Heenati/KDML 105//Chai Nat 1 เพื่อใช้ในการสร้างข้าวสายพันธุ์แท้

อุปกรณ์และวิธีการ

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลองคือ สายพันธุ์ลูกผสมกลับ BC_4F_3 (Rathu Heenati/KDML 105//Chai Nat 1) จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ CH71 และ CH75 ขยายพันธุ์ข้าวในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ไม่เติมฮอร์โมน เพิ่มปริมาณต้นข้าวด้วยวิธีการ sub culture บนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BAP (benzylaminopurine)

ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นประมาณ 4 สัปดาห์ เลือกต้นข้าวที่แข็งแรงย้ายลงบนอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมน IAA (indole-3-acetic acid) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อเพิ่มการเกิดราก ประมาณ 3-4 สัปดาห์จึงนำออกปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว โดยผ่านการปรับสภาพก่อนปลูกลงกระถาง ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 หลังปลูก 7 วัน เมื่อต้นข้าวเข้าสู่ระยะตั้งท้อง (booting stage) เลือกเก็บช่อดอกจากต้นหลัก (main stem) ที่ปราศจากโรคและแมลง มีระยะห่างระหว่างข้อใบธงกับข้อใบที่อยู่ถัดลงมาประมาณ 12-16 เซนติเมตร โดยตัดดอกในช่วงเวลา 08.00-10.00 นาฬิกา ทำความสะอาดช่อดอกด้วยการฉีดพ่นด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ที่กาบใบในขณะเก็บดอก เมื่อนำช่อดอกมาใช้ฉีกกาบใบออกแล้วฉีดพ่นด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ที่ช่อดอกอีกครั้งจนชุ่ม จากนั้นตัดแยกดอกข้าวออกจากช่อดอกแล้วใช้มีดตัดแยกเปลือกดอกข้าว (lemma and palea) ออกจากกัน ตัดแยกอับเรณูและรังไข่ออกจากขั้วดอก (rachilla) จากนั้นจึงตัดแยกรังไข่ออกจากอับเรณูและนำรังไข่ไปใช้ในการทดลอง ซึ่งขั้นตอนนี้ทำใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสามมิติ ภายในตู้ปลอดเชื้อ

การชักนำให้เกิดแคลลัสจากรังไข่

ใช้อาหารสูตร MS, N6 (Chu,1978) และ Chu-2 (Chu *et al*., 1977) เป็นอาหารสูตรพื้นฐาน อาหารทุกสูตรเติม phytagel 2.5 กรัมต่อลิตร, CH (casein hydrolysate) 500 กรัมต่อลิตร และปรับระดับ pH ให้ได้ 5.8 โดยแบ่งอาหารออกเป็นทั้งหมด 8 สูตร ดังนี้ 1) A1 คือ N6 ที่เติม NAA (1-naphthalene acetic acid) 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไคนีทิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และมอลโทส 50 กรัมต่อลิตร, 2) A2 คือ N6 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไคนีทิน 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และมอลโทส 50 กรัมต่อลิตร, 3) A3 คือ N6 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไคนีทิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และมอลโทส 40 กรัมต่อลิตร, 4) A4 คือ MS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไคนีทิน 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และมอลโทส 50 กรัมต่อลิตร, 5) A5 คือ Chu-2 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไคนีทิน 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และมอลโทส 50 กรัมต่อลิตร, 6) A6 คือ N6 ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, ซอบิทอล 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 40 กรัมต่อลิตร, 7) O1 คือ N6 ที่เติม BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร, NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 40 กรัมต่อลิตร และ 8) O2 คือ N6 ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 40 กรัมต่อลิตร

การชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสจากรังไข่

ใช้อาหารสูตร MS เป็นอาหารสูตรพื้นฐาน อาหารทุกสูตรเติม phytagel 2.5 กรัมต่อลิตร และปรับ pH ให้ได้ 5.8 โดยใช้แคลลัสที่มีขนาด 2-3 มิลลิเมตร และแคลลัสที่มีขนาดใหญ่กว่า 3 มิลลิเมตรขึ้นไปวางลงบนอาหารเพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมแสงและอุณหภูมิ ให้ได้รับแสง 16 ชั่วโมงและความมืด 8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 26 ±2 องศาเซลเซียส อาหารสำหรับการชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสมีทั้งหมด 4 สูตรดังนี้ 1) AR1 คือ MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, CH 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 30 กรัมต่อลิตร, 2) AR2 คือ MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไคนีทิน 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 30 กรัมต่อลิตร, 3) AR3 คือ N6 ที่เติม NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร, IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อ ลิตร, ไคนีทิน 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ 4) AR4 คือ N6 ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, BAP 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไคนีทิน 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

การศึกษาจำนวนโครโมโซม และการตรวจสอบชั้นเอพิเดอร์มิส

ตัดปลายรากข้าว (root tips) ยาว 1 เซนติเมตร แช่สารละลายโคลชิซิน (colchicine) ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) นาน 2-3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียสในที่มืด จากนั้นนำมาแช่ในสารละลาย KCl ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ (hypotonic solution) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำมาแช่ในสารละลายเอนไซม์ (6% (w/v) cellulase and 6% (w/v) pectolyase, pH 4.0) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 40 นาที นำเนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายรากวางบน

สไลด์ ทำให้เนื้อเยื่อแตก แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover-slips) กดให้เซลล์อยู่ระนาบเดียวกัน ปล่อยให้แห้ง (air-drying) แล้วย้อมด้วยสี Giemsa Stain (4 percent (w/v) giemsa solution, pH 6.8) เป็นเวลา 30 นาที ตรวจนับจำนวนโครโมโซมในระยะเมทาเฟสภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ดัดแปลงจาก Kharabian and Darabi (2005)

ตรวจสอบชั้นเอพิเดอร์มิสของใบ โดยการลอกผิวใบด้านบนออกให้เป็นเนื้อเยื่อบาง ๆ วางบนสไลด์ หยดน้ำกลั่นลงบนชิ้นส่วนใบ และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

ผลการทดลอง

ผลการชักนำให้เกิดแคลลัสจากรังไข่

จากการเพาะเลี้ยงรังไข่บนอาหารสูตรต่าง ๆ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสบนอาหารแต่ละสูตรมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาหารสูตรที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือ อาหารสูตร A3 (N6 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อ ลิตร, 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไคนีทิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร, CH 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และ มอลโทส 40 กรัมต่อลิตร) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสสูงที่สุด 11.00 เปอร์เซ็นต์ในข้าวสายพันธุ์ CH75 และ 6.60 เปอร์เซ็นต์ในข้าวสายพันธุ์ CH71 รองลงมาคือสูตร A2 (N6 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไคนีทิน 3 มิลลิกรัมต่อลิตร, CH 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และ มอลโทส 50 กรัมต่อลิตร) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส 7.41 เปอร์เซ็นต์ในข้าวสายพันธุ์ CH75 และ 5.33 เปอร์เซ็นต์ในข้าวสายพันธุ์ CH71 (ตารางที่ 1) โดยพบการเกิดแคลลัสจากรังไข่ทั้งที่เป็นสีเขียว สีขาว และสีน้ำตาล (ภาพที่ 1) รังไข่สร้างแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงประมาณ 10 ถึง 45 วัน แคลลัสที่เกิดจากรังไข่ส่วนใหญ่เป็นสีเหลืองอ่อน มีลักษณะแคลลัสเป็นกลุ่มเซลล์ที่เกาะตัวกันแน่น (compact callus) มีบางส่วนเท่านั้นที่เป็นสีขาว และเป็นกลุ่มเซลล์ที่เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ (friable callus)

ผลการชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสของรังไข่

จากการทดลองพบว่าสูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพสำหรับการชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสของรังไข่คือ อาหารสูตร AR1 (MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, CH 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร) ให้เปอร์เซ็นต์การขยายขนาดของแคลลัสสูงสุด 74.63 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดต้นสีเขียว 7.46 เปอร์เซ็นต์ และเกิดต้นเผือก 1.49 เปอร์เซ็นต์ ในขณะเดียวกันก็ส่งผลให้แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (browning) 32.16 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) แคลลัสใช้เวลาในการพัฒนาเป็นยอดหลังจากเพาะเลี้ยง 4-7 วัน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการพัฒนาจากแคลลัสที่มี

Table 1 Callus formation percentage from ovaries of backcross lines (BC_4F_3) of a cross Rathu Heenati/KDML 105//Chai Nat 1 lines CH71 and CH75 cultured on induction media

Callus induction media	Number of culture		Number of callus formation		Percent of callus formation*	
	CH71	CH75	CH71	CH75	CH71	CH75
A1	124	129	5	4	4.08 ab	3.16 c
A2	131	128	7	9	5.33 a	7.14 b
A3	137	129	9	14	6.60 a	11.00 a
A4	133	130	0	0	0.00 c	0.00 c
A5	133	125	5	4	3.81 ab	3.16 c
A6	135	126	3	2	2.15 bc	1.48 c
O1	143	136	0	0	0.00 c	0.00 c
O2	130	135	0	0	0.00 c	0.00 c

*Means within the same column followed by different letters were significantly different at $P<0.05$ by LSD

การแบ่งตัวจนมีขนาดประมาณ 5 มิลลิเมตรขึ้นไป และมีการพัฒนาของยอดจากหลายจุดบนแคลลัสชิ้นเดียวกัน (ภาพที่ 2) ยอดที่เกิดสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ภายในเวลา 15 วัน ในการทดลองนี้สามารถชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสได้ทั้งหมดจำนวน 5 ต้น ต้นที่ได้นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนเพื่อเลี้ยงให้ต้นเจริญเติบโตและนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

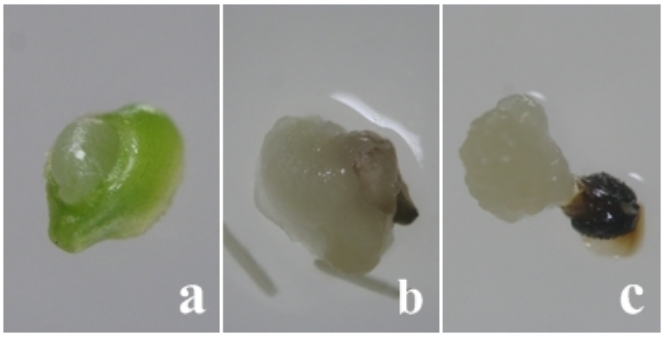

Figure 1 The development of callus generated from various shapes of ovary of backcross lines (BC_4F_3) of a cross Rathu Heenati/KDML 105//Chai Nat 1 after culture on callus induction medium for 10-45 days from; a) green, b) white and c) brown ovaries

Table 2 Development of calli from ovaries of backcross lines (BC_4F_3) of a cross Rathu Heenati/KDML 105//Chai Nat 1 line CH75 on regeneration media

Regeneration media	Number of culture ovaries	Browning calli (%)	Proliferated calli (%)	Plant formation (%)	
				Green plantlets	Albino plantlets
AR1	67	32.16	74.63	7.46	1.49
AR2	84	52.08	52.38	0	0
AR3	72	40.32	31.94	0	0
AR4	65	22.10	52.31	0	1.54

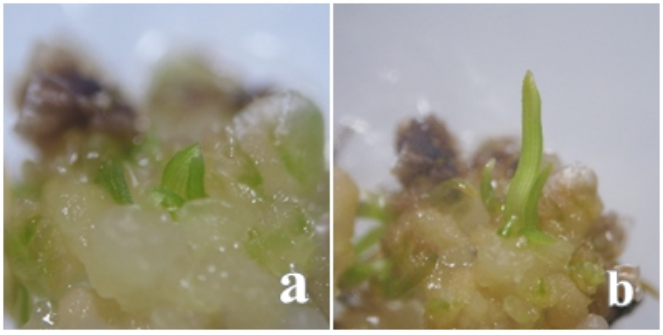

Figure 2 Shoot development from callus of ovary cultured on plant regeneration medium for; a) 4 days and b) 7 days

การศึกษาจำนวนโครโมโซม และตรวจสอบชั้นเอพิเดอร์มิสของใบ

จากการตรวจสอบจำนวนโครโมโซม และชั้นเอพิเดอร์มิสของใบข้าว พบว่าต้นข้าวที่พัฒนามาจากแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงรังไข่ของข้าวมีลักษณะเป็นต้นแฮพลอยด์ (haploid plant) ซึ่งต้นแฮพลอยด์ที่ได้มีจำนวนโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่งจากต้นปกติ (donor plant) โดยต้นแฮพลอยด์มีจำนวนโครโมโซม 2n=12 ส่วนต้นปกติมีจำนวนโครโมโซม 2n=24 ขนาดของเซลล์คุม (guard cell) ของต้นแฮพลอยด์เล็กกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับต้นปกติ และมีจำนวนเซลล์คุมต่อพื้นที่มากกว่าต้นปกติ (ภาพที่ 3)

วิจารณ์

จากทดลองเพาะเลี้ยงรังไข่ของข้าวบนอาหารสูตรต่าง ๆ พบว่าอาหารสูตรพื้นฐาน N6 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากรังไข่ของข้าว อาหารสูตรพื้นฐาน N6 ถูกพัฒนาขึ้นโดย Chu *et al*. (1975) เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงไมโครสปอร์ของข้าวโดยอาศัยหลักการที่ว่าปริมาณของ NH_4^+ ในอาหารมีผลต่อการชักนำไมโครสปอร์ของข้าวให้เกิดการแบ่งตัวเป็นแคลลัส และการลดปริมาณ NH_4^+ ส่งผลต่อการเกิดแคลลัสในข้าวอินดิกาได้ดีมากขึ้น ซึ่งต่อมา Zhou and Yang (1980, 1981) และ Kuo (1982) ประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากรังไข่ของข้าวบนอาหารสูตรพื้นฐาน N6 นอกจากอาหารสูตรพื้นฐานมีความสำคัญต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากรังไข่ของข้าวแล้วการเลือกใช้ชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนก็มีส่วนสำคัญ ในการทดลองนี้ประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากรังไข่ของข้าวบนอาหารสูตร N6 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไคนีทิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สอดคล้องกับการทดลองของ Rongbai *et al*. (1998) ซึ่งพบว่าการใช้ฮอร์โมน 2,4-D 0.2-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคนีทิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลที่ดีและเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากรังไข่ของข้าว จากการทดลองชี้ให้เห็นว่าอาหารที่มีอัตราส่วนของออกซิน (auxins) สูงกว่าไซโทไคนิน (cytokinin) ให้ผลดีในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากรังไข่ กล่าวคือเมื่อลดความเข้มข้นของ ไคนีทิน จาก 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เหลือเพียง 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเพิ่มขึ้นจาก 5.33 เป็น 6.00 เปอร์เซ็นต์ในข้าวสายพันธุ์ CH71 และจาก 7.14 เป็น

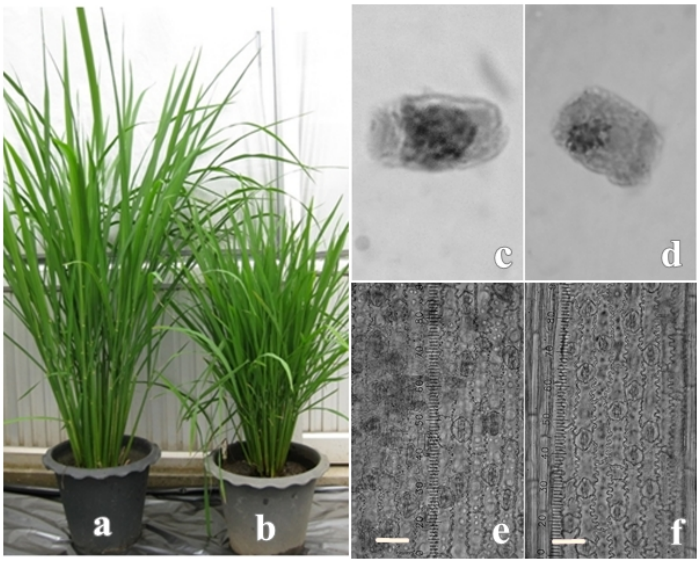

Figure 3 Characteristics comparison of plant; a) donor plant backcross lines (BC_4F_3) of a cross Rathu Heenati/KDML 105//Chai Nat 1, b) haploid plant derived from ovary culture, chromosome number of; c) donor plant, d) haploid plant derived from ovary culture, guard cell number and size of; e) donor plant, f) haploid plant derived from ovary culture (bar = 40 μM)

11.00 เปอร์เซ็นต์ในข้าวสายพันธุ์ CH75 การเลือกใช้ BAP ร่วมกับ NAA หรือการใช้ 2,4-D เพียงชนิดเดียวบนอาหารสูตร N6 ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากรังไข่ของข้าวได้

การชักนำให้เกิดต้นสีเขียว (green plant regeneration) จากแคลลัสของรังไข่ พบว่าความสมดุลของออกซินและไซโทไคนินมีความสำคัญต่อการขยายตัวและการพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากจากแคลลัสเป็นอย่างมาก (Raina, 1989) ถ้าอัตราส่วนของไซโทไคนินสูงกว่าออกซินแคลลัสจะพัฒนาไปเป็นยอดมากกว่ารากแต่ถ้าอัตราส่วนของออกซินสูงกว่าไซโทไคนิน แคลลัสจะมีการพัฒนาไปเป็นรากมากกว่ายอด (ไพบูลย์, 2524) ในการทดลองนี้ประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดต้นสีเขียวบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีอัตราส่วนอัตราส่วนของไซโทไคนินสูงกว่าออกซิน แต่เมื่อทดลองเปลี่ยนชนิดของไซโทไคนินจาก BAP มาเป็น ไคนีทิน ไม่พบการเกิดต้นจากแคลลัสของรังไข่ นอกจากนี้ยังพบว่าแคลลัสจากรังไข่ที่มีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์เกาะตัวกันแน่น มีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นยอดและต้นสีเขียวมากกว่าแคลลัสที่มีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ (Toriyama *et al.,* 1986)

จากการนับจำนวนโครโมโซม และตรวจสอบชั้นเอพิเดอร์มิสของใบข้าวพบว่าต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงรังไข่ทั้งหมดมีลักษณะเป็นต้นแฮพลอยด์ แสดงให้เห็นว่าแคลลัสที่ได้จากรังไข่นั้นเกิดจากการแบ่งตัวของ haploid cell ภายในรังไข่ของข้าว สอดคล้องกับรายงานของ Zhou and Yang (1981 a, b) ซึ่งกล่าวไว้ว่าการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (gynogenesis) ภายในรังไข่ของข้าวขณะเพาะเลี้ยงเกิดขึ้นเมื่อรังไข่เข้าสู่ระยะแกมีโทไฟต์อย่างสมบูรณ์ (mature gametophyte) พวกเขาพบการเกิด proembryos จากการแบ่งเซลล์ของไข่ (egg cell) บริเวณส่วนปลายของไมโครไพล์ (micropyle) โดยการตัดเนื้อเยื่อรังไข่ของข้าวด้วยเทคนิค paraffin section ในขณะเพาะเลี้ยงมาศึกษา การทดลองในข้าวนี้ถูกยืนยันโดย Kuo (1982) และ Huang *et al.* (1982) ในข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare* L.)

สรุป

อาหารสูตรที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการเพาะเลี้ยงรังไข่ คือ อาหารสูตร N6 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไคนีทิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร, CH 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และมอลโทส 40 กรัมต่อลิตร แคลลัสจากรังไข่ของข้าวสายพันธุ์ที่ CH75 สามารถใช้ชักนำให้เกิดต้นสีเขียวบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, NAA 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร, CH 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเมื่อนำต้นที่ได้จากรังไข่มาตรวจสอบจำนวนโครโมโซม และชั้นเอพิเดอร์มิสของใบพบว่า ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ทั้งหมดมีลักษณะเป็นต้น แฮพลอยด์ โดยมีจำนวนโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่ง ขนาดของเซลล์คุมลดลง และมีจำนวนเซลล์คุมต่อพื้นที่น้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกันต้นแม่ ซึ่งต้นข้าวแฮพลอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่สามารถนำไปเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม (doubled haploid) ด้วยการใช้สารโคลชิซิน เพื่อสร้างข้าวสายพันธุ์แท้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์จากยีนข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม สำหรับเงินทุนสนับสนุนการทำงานวิจัย ขอขอบคุณคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านพืช มูลนิธิโครงการหลวง ที่ให้การสนับสนุนด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี ในการทำงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. 2524. หลักการและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 109 หน้า.

Bindeshwar S. P., R. K. Niroula and H. P. Bimb. 2007. Culture of embryo with a segment of ovary Improved germination and

crossability of distant hybrids in indica rice. Scientific World 5 (5): 46-50.

Chen, C., H. Xiao, W. Zhang, A. Wang, Z. Xia, X. Li, W. Zhai, Z. Cheng and Z. Zhu. 2006. Adapting rice anther culture to gene transformation and RNA interferenc. Science in China Series C: Life Sciences 49: 414-428.

Chu, C. C., C. C. Wang, C. S. Sun, C. Hsu, K. C. Yin, C. Y. Chu and F. Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiment on the nitrogen sources. Scientia Sinica 18: 659-668.

Chu, C. C. 1978. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. pp. 43-50. In: Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture. Science Press, Peking.

Chu, Q. R., H. X. Cao and S. Linscombe. 1977. A novel medium for induction of embryogenic callus in rice anther culture of Southern US crosses. Rice Biotechnology Quarterly 32: 19-20.

De Beauville, A. M. 1980. Obtention haploides in vitro a partir d'ovaires non fecondes de riz, *Oryza sativa* L. Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences. Serie D 296: 489-492.

Huang, Q. F., H. Y. Yang. and C. Zhou. 1982. Embryological observations on ovary culture of unpollinated young flowers in *Hordeum vulgare* L. Acta Botanica Sinica 24: 295-300.

Kharabian, A. and A. Darabi. 2005. Characterization of some chromosomal aberrations in regenerated rice plants (*Oryza sativa*). Plant cell, Tissue and Organ Culture 83: 161-168.

Kuo, C. S. 1982. The preliminary studies on culture of unfertilized ovary of rice in vitro. Acta Botanica Sinica 24: 33-38.

Toriyama, K., K. Hinata and T. Sasaki. 1986. Haploid and diploid plant regeneration from protoplasts of anther callus in rice. Theoretical and Applied Genetics 73(1): 16-19.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15(3): 473-497.

Raina, S. K. 1989. Tissue culture in rice improvement: Status and potential. Advances in Agronomy 42: 339-397.

Rongbai, L., M. P. Pandey, G. K. Garg, S. K. Pandey, D.K. Dwivedi and Ashima. 1998. Development of a technique for *in vitro* unpollinated ovary culture in rice, *Oryza sativa* L.. Euphytica 104: 159-166.

Uchimiya, H., T. Kameya and N. Takanashi. 1971. *In vitro* culture of unfertilized ovules in *Solanum melongena* and *Zea mays*. Japanese Journal of Breeding 21: 247-250.

Yang, H. Y. and C. Zhou. 1982. *In vitro* induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules. Theoretical and Applied Genetics 63(2): 97-104.

Zhou, C. and H.Y. Yang. 1980. In vitro induction of haploid plantlets from unpollinated young ovaries of *Oryza sativa* L.. Acta Genetica Sinica 7: 287-288.

Zhou, C. and H. Y. Yang. 1981a. Induction of haploid rice plantlets by ovary culture. Plant Science Letters 20: 231-237.

Zhou, C. and H. Y. Yang. 1981b. Studies on the in vitro induction of callus from embryo sac of rice. Hereditas 3(5): 10-12.

Zhou, C. and H. Y. Yang. 1981c. In vitro embryogenesis in unfertilized embryo sacs of *Oryza sativa* L. Acta Botanica Sinica 23: 176-180.