

ผลของ 2,4-D และไคเนตินต่อการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

Effects of 2,4-D and Kinetin on Embryogenic Callus Induction in Rice (*Oryza sativa* L.) cv. Khao Dawk Mali 105

จุฑาทิพย์ ทนชัย^{1/2/} สงวนศักดิ์ ธนาพรพูนพงษ์^{1/} และ สุชาดา เวียรศิลป์^{1/}
Jutatip Tanuncha^{1/2/}, Sa-nguansak Thanapoompong^{1/} and Suchada Vearasilp^{1/}

Abstract: This research aimed to increasing amount of embryogenic callus by using 2,4-D and kinetin. All the experiments were set in Completely Randomized Design (CRD). Rice seeds were cultured on modified Linsmaier and Skoog (LS) medium and supplemented with 0, 2, 4, 6 and 8 mg L⁻¹ 2,4-D. It was found that the modified LS medium supplemented with 2 mg L⁻¹ 2,4-D could induced 67.33% calli which 90.73% were friable calli and 85.79% were greenish-yellow calli after culturing 30 days. Anyhow those calli could not developed into embryoids, after that 2 mg L⁻¹ 2,4-D combined with 2, 4, 6 and 8 mg L⁻¹ kinetin were applied in order to increase the production of embryogenic calli. It was found that the modified LS medium supplemented with 2 mg L⁻¹ 2,4-D combined with 2 mg L⁻¹ kinetin could induced 69.00% calli which 95.64% were friable calli and 89.44% were greenish-yellow calli after culturing 30 days and those calli could developed to embryoids more than using solely 2,4-D or kinetin in every concentration. Therefore the induction percentage, type and color of calli depend on suitable ratio between 2,4-D and kinetin.

Keywords: KDML 105, 2,4-D and kinetin, embryogenic callus

^{1/} ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

^{1/} Department of Plant Science and Natural Resources, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

^{2/} ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

^{2/} Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

บทคัดย่อ: ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสโดยใช้ 2,4-D และไคเนติน โดยทำการทดลองที่ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ชั้น 2 อาคารเฉลิมพระเกียรติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวบนอาหารสูตร LS ดัดแปลงที่ทำการเติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากทำการเพาะเลี้ยง 30 วัน พบว่าอาหารสูตร LS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D ในปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 67.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นชนิดไพโรเอเบิล 90.73 เปอร์เซ็นต์ และเกิดแคลลัสสีเหลืองปนเขียว 85.79 เปอร์เซ็นต์ ได้มากเมื่อเทียบกับชุดควบคุม สำหรับแคลลัสที่ได้ยังไม่สามารถที่จะพัฒนาเป็นเอ็มบริโอได้ จึงใช้ 2,4-D ในปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไคเนตินที่ระดับความเข้มข้น 2, 4, 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากทำการเพาะเลี้ยง 30 วัน พบว่าอาหารสูตร LS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนติน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสสูงถึง 69.00 เปอร์เซ็นต์ โดยเป็นชนิดไพโรเอเบิล 95.64 เปอร์เซ็นต์ เกิดแคลลัสสีเหลืองปนเขียว 89.44 เปอร์เซ็นต์ และยังสามารถที่จะพัฒนาเป็นเอ็มบริโอได้มากขึ้นกว่าการใช้ 2,4-D หรือไคเนตินที่ทุกระดับความเข้มข้น โดยเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ชนิดและสีของแคลลัส ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนความเข้มข้นของ 2,4-D และไคเนตินที่เหมาะสม

คำสำคัญ: ข้าวขาวดอกมะลิ 105 2,4-D และไคเนติน เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

คำนำ

การเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส โดยใช้สูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) มักเกิดปัญหาได้แคลลัสที่มีคุณภาพดีในปริมาณต่ำ และแคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลหลังจากทำการแบ่งย้ายเปลี่ยนอาหาร ซึ่ง Zhang (1995) พบว่าข้าวสายพันธุ์ indica บางพันธุ์สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้สูตรอาหาร LS (Linsmaier and Skoog, 1965) แต่บางพันธุ์สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เพียง 1 ใน 3 ในพืชส่วนใหญ่จะใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซินและไซโทไคนินอย่างใดอย่างหนึ่งหรือควบคู่กันในการชักนำ หรือกระตุ้นให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (embryogenic callus) ซึ่งเป็นแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ (สมพร, 2549) ทั้งนี้ต้องอาศัยสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ดังกล่าวในระดับที่เหมาะสมและใช้ปริมาณที่แตกต่างกันจากการทดลองที่ผ่านมา ในการชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวสายพันธุ์ไทย 4 สายพันธุ์ (RD6, KDML 105, SPR1 และ CNT) ของ Premvaranon *et al.* (2007) พบว่าอาหารสูตร LS ดัดแปลงที่มี KNO_3 ความเข้มข้น 10 μM และมีการเติม 2,4-D ในปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่าน

3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส และในงานวิจัยของสมดังใจ และคณะ (2554) สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ถึง 51.33 - 60.67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ในสูตรอาหาร LS ดัดแปลงที่มีการเติมผงถ่านกัมมันต์ 0.05 กรัมต่อลิตร และ 2,4-D ในปริมาณ 2 - 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้การชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในข้าวสามารถทำได้โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตหลายชนิด ได้แก่ BAP (benzylaminopurine) และ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) (Chand and Sahrawat, 2001) รวมไปถึง NAA (naphthylphthalamic acid) และ kinetin (ไคเนติน) (พิจิกา, 2545) ดังนั้นการกระตุ้นด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจเพื่อลดระยะเวลาในการผลิตเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่สมบูรณ์ให้ได้ปริมาณมากขึ้น จากการศึกษาของ Ilahi *et al.* (2005) พบว่าการใช้ไซโตไคนิน (kinetin และ BAP) ร่วมกับออกซิน (IAA และ NAA) ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L. cv. Swat-II) สามารถเพิ่มเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ในปริมาณมากที่สุดในสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่มีการเติมไคเนตินความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากงานวิจัยที่พบว่าการใช้สารควบคุมการ

เจริญเติบโต สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในข้าวดังกล่าว การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงอิทธิพลของการกระตุ้นด้วย 2,4-D และไคเนตินในการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษานี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) จำนวน 3 ซ้ำ โดยแต่ละซ้ำใช้เมล็ดพันธุ์ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 200 เมล็ดต่อซ้ำ โดยทำการทดลองที่ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ชั้น 2 อาคารเฉลิมพระเกียรติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ทั้งนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง ได้แก่

1. การศึกษาผลของ 2,4-D ต่อการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

นำเมล็ดข้าวเปลือกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มาแกะเปลือกออกแล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรีนเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปแช่ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ภายในตู้ปลอดเชื้อ นำเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 5 ระดับ คือ 0, 2, 4, 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยนำไปเพาะเลี้ยงในสภาพควบคุมที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นบันทึกผลการทดลอง โดยบันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ขนาดของแคลลัส น้ำหนักของแคลลัส ชนิดของแคลลัสและสีของแคลลัส เมื่อได้ความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสม (เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส น้ำหนักแคลลัสและขนาดของแคลลัสสูงสุด แคลลัสที่เป็นชนิดไฟรเอเบิลและมีสีเหลืองปนเขียวสูงสุด) จึงนำมาทำการทดลองต่อในการทดลองที่ 2

2. การศึกษาผลของไคเนตินร่วมกับการใช้ 2,4-D ต่อการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

นำเมล็ดข้าวเปลือกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มาแกะเปลือกออกแล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรีนเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปแช่ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ภายในตู้ปลอดเชื้อ นำเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D จากการทดลองที่ 1 (มีความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและมีลักษณะตามที่ได้กำหนดไว้) ร่วมกับการเติมไคเนตินที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 2, 4, 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยนำไปเพาะเลี้ยงในสภาพควบคุมที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นบันทึกผลการทดลอง โดยบันทึกชนิดของแคลลัส สีของแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส น้ำหนักของแคลลัส และขนาดของแคลลัส (ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส)

การบันทึกชนิดและสีของแคลลัสในการทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2

การบันทึกชนิดของแคลลัส ชนิดของแคลลัส มี 3 แบบ คือ คอมแพกแคลลัส (compact callus) มีลักษณะเกาะกันแน่นเป็นก้อน ไฟรเอเบิลแคลลัส (friable callus) มีลักษณะเกาะกันหลวม ๆ และฟู และแบบผสมรวม (mixed callus) มีลักษณะของคอมแพกผสมกับไฟรเอเบิลอยู่บนก้อนเดียวกัน (ภาพที่ 1)

การบันทึกสีของแคลลัส แบ่งตามสีของแคลลัสที่เกิดขึ้น คือ สีเหลือง (yellow; Y) สีเหลืองปนเขียว (greenish-yellow; GY) สีเหลืองเข้ม (dark yellow; DY) สีเหลืองอ่อน (pale yellow; PY) สีดำ (black; B) (ภาพที่ 2)



Figure 1 Characteristics of the calli after 30 days in culture



Figure 2 Color of calli after 30 days in culture (Y = yellow calli, GY = greenish-yellow calli, DY = dark yellow calli, PY = pale yellow calli, B = black calli)

ผลการทดลอง

1. ผลของ 2,4-D ต่อการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิค แคลลัส

ลักษณะของแคลลัส (ชนิดและสีของแคลลัส) หลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ได้ 1 สัปดาห์ จะพบกลุ่มเซลล์ของแคลลัสที่มีการเจริญเพิ่มขนาดมากขึ้น และมีลักษณะ 2 แบบ คือ คอมแพกต์แคลลัส (compact callus) มีลักษณะเกาะกันแน่นเป็นก้อน ไฟรเอเบิลแคลลัส (friable callus) มีลักษณะเกาะกันหลวม ๆ และฟู (ภาพที่ 1) ซึ่งเนื้อเยื่อที่เหมาะสมแก่การนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย คือ ไฟรเอเบิลแคลลัส เนื่องจากเป็นแคลลัสที่เซลล์เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ ง่ายต่อการแยกออกหรือกระจายเซลล์ออกจากกัน โดยอาหารสูตร LS ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดแคลลัสชนิดไฟรเอเบิลแคลลัสมากที่สุด คือ 90.73 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นสูตรอาหาร LS ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 4, 8 และ 6

มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสไฟเอเบิล แคลลัสเท่ากับ 85.75, 81.65 และ 75.50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ส่วนชุดควบคุม (ไม่มีการเติม 2,4-D) นั้นไม่พบว่ามีแคลลัสเกิดขึ้น

การเกิดสีของแคลลัสนั้น พบว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในอาหารสูตร LS ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ต่างกันสามารถชักนำให้แคลลัสเกิดได้ทั้งหมด 5 สี คือ สีเหลือง (yellow; Y) สีเหลืองปนเขียว (greenish-yellow; GY) สีเหลืองเข้ม (dark yellow; DY) สีเหลืองอ่อน (pale yellow; PY) สีดำ (black; B) (ภาพที่ 2) โดยแคลลัสที่มีสีเหลืองปนเขียวจะสามารถเจริญและพัฒนาต่อไปได้ แต่แคลลัสที่มีสีขาวจะตายในที่สุดเนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ และหากแคลลัสมีสีน้ำตาลหรือดำ ซึ่งเรียกว่า necrotic tissue จะเป็นเซลล์ที่ตายแล้ว จากการทดลอง พบว่าแคลลัสที่เกิดขึ้นส่วนมากจะเป็นสีเหลืองปนเขียว โดยอาหารสูตร LS ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดแคลลัสสีเหลืองปนเขียว

ผลของ 2,4-D และไคเนตินต่อการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส
ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

มากที่สุด คือ 85.79 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นสูตรอาหาร LS ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 4, 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร จะได้แคลลัสสีเหลืองปนเขียวเท่ากับ 75.06, 70.41 และ 70.02 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ขนาดของแคลลัส และน้ำหนักของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยง เมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในอาหารสูตร LS ดัดแปลงที่มีปริมาณความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ต่างกัน จนครบ 30 วัน จะพบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ขนาดของแคลลัส และน้ำหนักของแคลลัสมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยอาหารสูตร LS ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากที่สุด คือ 67.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นอาหารสูตร LS ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 4, 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ได้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 55.67, 51.67 และ 40.00 เปอร์เซ็นต์

ตามลำดับ (ตารางที่ 2) แต่ในชุดควบคุม (ไม่มีการเติม 2,4-D) นั้นไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น

ส่วนผลของขนาดของแคลลัส และน้ำหนักของแคลลัสนั้นมีแนวโน้มลดลงไปในทางเดียวกันกับเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D โดยอาหารสูตร LS ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ขนาดและน้ำหนักของแคลลัสมากที่สุด คือ ขนาด 12.00 มิลลิเมตร และน้ำหนัก 216.8 มิลลิกรัม รองลงมาเป็นอาหารสูตร LS ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 4 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีขนาด 10.00 มิลลิเมตร และน้ำหนัก 139.1 มิลลิกรัม ส่วนอาหารสูตร LS ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้แคลลัสมีขนาด 9.33 มิลลิเมตร และน้ำหนัก 128.0 มิลลิกรัม และอาหารสูตร LS ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 8 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีขนาด 7.00 มิลลิเมตร และน้ำหนัก 76.7 มิลลิกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

Table 1 Effects of the various 2,4-D concentration on color of the calli and callus types after 30 days in LS media

Concentration of 2,4-D (mg)	color of the calli (%)					callus types (%)	
	Yellow	Greenish-Yellow	Dark Yellow	Pale Yellow	Black	Compact	Friable
0 (control)	-	-	-	-	-	-	-
2	-	85.79	8.39	13.75	2.07	9.27	90.73
4	2.58	75.06	7.72	12.06	2.58	18.25	85.75
6	-	70.41	19.08	8.04	2.47	24.50	75.50
8	-	70.02	15.50	6.45	8.03	18.35	81.65

Table 2 Effects of the various 2,4-D concentration on callus induction, fresh weight and diameter of calli after 30 days in LS media

Concentration of 2,4-D (mg)	Callus induction (%) [*]	Fresh weight (mg/callus) [*]	Diameter of calli (mm) [*]
0 (control)	0.00 ^d	0.0 ^c	0.00 ^c
2	67.33 ^a	216.8 ^a	12.00 ^a
4	55.67 ^b	139.1 ^{ab}	10.00 ^{ab}
6	51.67 ^b	128.0 ^{ab}	9.33 ^{ab}
8	40.00 ^c	76.7 ^{bc}	7.00 ^b
LSD _{0.05}	11.65	91.54	3.85

^{*}Mean follow by different letter are significantly different ($P \leq 0.05$)

2. ผลของไคเนตินร่วมกับการใช้ 2,4-D ต่อการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

ลักษณะของแคลลัส (ชนิดและสีของแคลลัส) การชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารสูตร LS ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไคเนตินที่มีปริมาณความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จะพบกลุ่มเซลล์ของแคลลัส โดยจะมีลักษณะ 3 แบบ คือ คอมแพกต์แคลลัส (compact callus) มีลักษณะเกาะกันแน่นเป็นก้อน ไฟรเอเบิลแคลลัส (friable callus) มีลักษณะเกาะกันหลวม ๆ และฟู และแบบผสมรวม (mixed callus) มีลักษณะของคอมแพกต์ผสมกับไฟรเอเบิล อยู่บนก้อนเดียวกัน (ภาพที่ 1) โดยอาหารสูตร LS ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไคเนติน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดแคลลัสชนิดไฟรเอเบิลแคลลัสมากที่สุด คือ 95.64 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นชุดควบคุม (ไม่มีการเติมไคเนติน) 90.73 เปอร์เซ็นต์ และสูตรอาหาร LS ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไคเนติน 4, 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ 81.13, 21.15 และ 11.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

จากการทดลองแคลลัสที่ได้มีทั้งหมด 4 สี คือ สีเหลืองปนเขียว (greenish-yellow; GY) สีเหลืองเข้ม (dark yellow; DY) สีเหลืองอ่อน (pale yellow; Y) สีดำ (black; B) (ภาพที่ 2) แคลลัสที่เกิดขึ้นส่วนมากจะเป็นสีเหลืองปนเขียว โดยอาหารสูตร LS ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไคเนติน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดแคลลัสสีเหลืองปนเขียวมากที่สุด คือ 89.44 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นชุดควบคุม (ไม่มีการเติมไคเนติน) 85.79 เปอร์เซ็นต์ และสูตรอาหาร LS ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไคเนติน 4, 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ได้แคลลัสสีเหลืองปนเขียวเท่ากับ 81.13, 21.15 และ 11.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ขนาดของแคลลัส และน้ำหนักของแคลลัส จากผลการวิเคราะห์ พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของไคเนติน เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ขนาดของแคลลัส และน้ำหนักของแคลลัสจะมีแนวโน้มลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (อาหารสูตร LS ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว) โดยชุดควบคุม (ไม่มีการเติมไคเนติน) จะให้ผลที่ดีที่สุด คือ เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเป็น 67.33 เปอร์เซ็นต์ ขนาดของแคลลัสเป็น 12.00 มิลลิเมตร และน้ำหนักสดของแคลลัสเป็น 216.8 มิลลิกรัม ตามตารางที่ 4

Table 3 Effects of the various kinetin concentration on color of the calli and callus types after 30 days in LS media with 2 mg L⁻¹ 2,4-D

Concentration of Kinetin (mg)	color of the calli (%)					callus types (%)		
	Yellow	Greenish-Yellow	Dark Yellow	Pale Yellow	Black	Compact	Mixed	Friable
0 (control)	-	85.79	8.39	13.75	2.07	9.27	-	90.73
2	-	89.44	10.56	-	-	4.36	-	95.64
4	-	81.13	18.87	-	-	6.37	16.06	77.57
6	-	21.15	9.86	60.43	8.56	14.05	26.71	59.24
8	-	11.25	42.01	12.92	33.82	41.87	6.10	52.03

Table 4 Effects of the various kinetin concentration on callus induction, fresh weight and diameter of calli after 30 days in LS media with 2 mg L⁻¹ 2,4-D

Concentration of Kinetin (mg)	Callus induction (%)*	Fresh weight (mg/callus)*	Diameter of calli (mm)*
0 (control)	67.33 ^a	216.8 ^a	12.00 ^a
2	69.00 ^a	105.8 ^b	10.00 ^b
4	49.00 ^b	68.2 ^{bc}	7.67 ^c
6	44.33 ^b	68.1 ^{bc}	8.00 ^c
8	9.00 ^c	58.3 ^c	7.33 ^c
LSD _{0.05}	10.05	46.39	1.94

*Mean follow by different letter are significantly different ($P \leq 0.05$)

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลของ 2,4-D ต่อการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

จากผลการทดลอง พบว่าการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส น้ำหนักแคลลัส และขนาดของแคลลัสที่ดีที่สุด แคลลัสที่ได้เป็นชนิดไฟโรเอเบิลและมีสีเหลืองปนเขียวในปริมาณมากซึ่งแคลลัสดังกล่าวสามารถพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Saqlan *et al.* (2005) ที่ใช้ 2,4-D กับข้าวพันธุ์ปาสมาติสในการชักนำให้เกิดแคลลัสที่มากที่สุดเมื่อมีการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยง แต่หากไม่มีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชจะไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น เนื่องจาก 2,4-D มีคุณสมบัติในการปิดกั้นกระบวนการกำเนิดอวัยวะ จึงได้ผลดีในการเพิ่มจำนวนแคลลัสและรักษาสภาพการเลี้ยงเป็นแคลลัสไว้ ความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ใช้จะอยู่ในช่วง 1 - 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (รังสฤษฎ์, 2540) นอกจากนี้จากผลการทดลองยังพบว่าการใช้ 2,4-D ความเข้มข้นสูงขึ้นไปจะทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส น้ำหนักแคลลัสและขนาดของแคลลัสลดลง อีกทั้งแคลลัสที่ได้ยังเป็นชนิดคอมแพกมากขึ้นและมีสีเหลืองปนเขียวลดลง

เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับผลการทดลองของดาร์ณี และคณะ (2553) ที่ชักนำให้เกิด

แคลลัสจากเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เช่นกันที่ใช้สูตรอาหาร LS ดัดแปลงที่มีการเติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงถ่าน 0.05 กรัมต่อลิตร และปรับอาหารให้มี pH 6.0 ได้ปริมาณแคลลัสเฉลี่ยมากที่สุด 61.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ โดยสูตรที่ผู้วิจัยทำการทดลองได้ใช้สูตรอาหาร LS ดัดแปลงที่มีการเติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงถ่าน 0.005 กรัมต่อลิตร และปรับอาหารให้มี pH 5.8 ทำให้ได้ปริมาณแคลลัสเฉลี่ยมากที่สุดถึง 67.33 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ในการทดลองมีการใช้น้ำมะพร้าวมากกว่าของดาร์ณี และคณะ (2553) 50 มิลลิกรัม และมีการปรับ pH ที่ต่างกัน (0.2)

2. ผลของไคเนตินร่วมกับ 2,4-D ต่อการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

การใช้ 2,4-D ที่มีปริมาณความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไคเนตินที่มีปริมาณความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการทดลอง สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสแบบไฟโรเอเบิลและมีสีเหลืองปนเขียวมากกว่าการใช้ 2,4-D เพียงอย่างเดียว ซึ่งแคลลัสที่ได้จากการใช้ 2,4-D ร่วมกับไคเนตินจะให้แคลลัสที่มีคุณภาพที่ดีกว่าการใช้ 2,4-D เพียงอย่างเดียว เนื่องจากแคลลัสที่ได้จะมีโอกาสพัฒนาเป็นต้นอ่อน ยอดและรากได้สูง หรือนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยได้ดี แต่น้ำหนักและขนาดของแคลลัสไม่เพิ่มขึ้น โดยการใช้

2,4-D เพียงอย่างเดียวจะให้ผลที่ดีกว่าทางด้านปริมาณเท่านั้น นอกจากนี้เมื่อมีการใช้ความเข้มข้นของไคเนตินเพิ่มมากขึ้นจะทำให้ได้แคลลัสที่มีสีดำนมากขึ้นและเป็นแคลลัสชนิดคอมแพกมากยิ่งขึ้น สอดคล้องกับการทดลองที่มีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโคไคนินร่วมกับออกซินสามารถชักนำให้เกิดกลุ่มของแคลลัสได้ในข้าวสายพันธุ์ MDU 5 ได้ดีกว่าการใช้สารในกลุ่มไซโคไคนินหรือออกซินเพียงอย่างเดียว (Zaidi *et al.*, 2006) และจากการศึกษาของ Rashid *et al.* (2001) ที่ใช้สารในกลุ่มไซโคไคนิน (BAP) ในการชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวสายพันธุ์ indica ได้ดีแต่ไม่มีการเพิ่มของขนาดหรือน้ำหนักของแคลลัส และจากงานวิจัยของ Cha-um *et al.* (2009) ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงอับละของข้าวหอมพันธุ์ไทย 3 สายพันธุ์ (KDML 105, HJ และ PT1) พบว่าแคลลัสที่มีจุดสีเขียวสามารถพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้ดีที่สุด สำหรับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 Vajrabhaya *et al.* (1984) พบว่าองค์ประกอบของอาหารที่มี 2,4-D ร่วมกับไคเนตินจะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุดในการเพาะเลี้ยงแคลลัส

การใช้ 2,4-D ร่วมกับไคเนตินในปริมาณที่สูงจะทำให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวมากจนอาจกลายเป็นต้นพืชที่มีโครโมโซมหลายชุดได้ (ศิวพงศ์, 2546) ดังนั้นการใช้ 2,4-D ร่วมกับไคเนตินในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยให้แคลลัสมีการเจริญและพัฒนาได้ดีกว่าการใช้ 2,4-D หรือไคเนตินอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว โดยเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ชนิดและสีของแคลลัสขึ้นอยู่กับอัตราส่วนความเข้มข้นของ 2,4-D และไคเนตินที่ใช้

สรุป

การชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสโดยการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในอาหารสูตร LS ที่มีการเติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนติน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าได้เปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส รวมไปถึงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้ยังเป็นชนิดไพโรเบิลและมีสีเหลืองปนเขียวที่จะสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่มอบเงินทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- คารุณี ศรีภูธร สงวนศักดิ์ ธนาพรพูนพงษ์ และ สุชาดา เวียรศิลป์. 2553. ผลของความเป็นกรด-ด่าง ต่อชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105. วารสารเกษตร. 26(4): 61-69.
- พิจิกา ทิมสุกใส. 2545. การคัดเลือกข้าวเพื่อให้ทนเค็มโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. นครราชสีมา. 86 หน้า.
- รังสฤษฎ์ กาวิต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: หลักการและเทคนิค. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. 219 หน้า.
- ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2546. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏอุดรธานี, อุดรธานี. 187 หน้า.
- สมดังใจ สายสิงห์ทอง สงวนศักดิ์ ธนาพรพูนพงษ์ และ สุชาดา เวียรศิลป์. 2554. ผลของผงถ่านกัมมันต์และ 2,4-D ต่อการเกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1. วารสารเกษตร. 27(2): 175-185.
- สมพร ประเสริฐสงสกุล. 2549. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์วิทยาเขตปัตตานี. 127 หน้า.
- Chand, S. and A. K. Sahrawat. 2001. Stimulatory effect of partial desiccation on plant regeneration in Indica rice (*Oryza sativa* L.).

- Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 10: 43-47.
- Cha-um, S., B. Srianan, A. Pichakum and C. Kirdmanee. 2009. An efficient procedure for embryonic callus induction and double haploid plant regeneration through another culture of Thai aromatic rice (*Oryza sativa* L. subsp. *Indica*). In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 45: 171-179.
- Ilahi, I., S. Bano, M. Jabeen and F. Rahim. 2005. Micropropagation of rice (*Oryza sativa* L. cv. Swat-II) through somatic embryogenesis. Pakistan Journal of Botany 37(2): 237-242.
- Linsmaier, E. M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 18(1): 100-127.
- 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.
- Premvaranon P., Thanapornpoonpong S., Karladee D. and Vearasilp S. 2007. Influence of some components in tissue culture media on caulogenesis inducement in Local Thai rice genotypes. The 2nd international conference on rice for the future November 5-9, 2007, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand.
- Rashid, H., S. Y. A. Bokhari and A. Quraishi. 2001. Callus induction, regeneration and hygromycin selection of rice (Super Basmati). Journal Biological Sciences 1(12): 1145-1146.
- Saqan, S., M. Naqvi, R. Sultana and H. Rasheed. 2005. Tissue culture studies in *Oryza sativa* L. cvs. Basmati 385 and Super Basmati. Pakistan Journal of Botany 37(4): 823-828.
- Vajrabhaya, M., T. Vajrabhaya, Nabors, M. W. and S. Yoshida. 1984. New varieties of rice for saline and acid soil through tissue culture. Progress Report II: callus growth and regeneration. Chulalongkorn University. Bangkok. 41 p.
- Zaidi, M. A., M. Narayanan, R. Sardana, I. Taga, S. Postel, R. John, M. McNulty, Y. Mottiar, J. Mao, E. Loit and I. Altosaar. 2006. Optimizing tissue culture media for efficient transformation of different indica rice genotypes. Agronomy Research 4(2): 563-575.
- Zhang, S. 1995. Efficient plant regeneration from indica (group 1) rice protoplast of one advanced breeding line and three varieties. Plant Cell Report 15: 68-71.
-