ผลของผงถ่านกัมมันต์และ 2,4-D ต่อการเกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1

Effects of Activated Charcoal and 2,4-D on Callus Induction and Formation of *Indica* Rice (*Oryza sativa* L.) cv. Supunburi 1

สมดังใจ สายสิงห์ทอง[1/] สงวนศักดิ์ ธนาพรพูนพงษ์[1/,2/] และ สุชาดา เวียรศิลป์[1/,2/]

Somdangjai Saisingthong[1/] , Sa-nguansak Thanapornpoonpong[1/,2/] and Suchada Vearasilp[1/,2/]

Abstract: This *in vitro* study was aimed to investigate the effects of activated charcoal (AC) and 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) on increasing in caulogenesis amount of *Indic*a rice cv. Supunburi 1 (SPR1). The factorial in completely randomized design (Factorial in CRD) was conducted. Mature rice seeds were cultured in modified Linsmaier and Skoog (LS) based medium supplemented with different concentrations of activated charcoal and 2,4-D. Activated charcoal in various concentrations, 0, 0.05, 0.10, 0.15 and 0.20 g L-1, in combination with 2,4-D concentrations of 0, 1, 2 and 3 mg L-1 were applied to the media. There were 20 treatments used for callus embryogenesis, each was performed in triplicate. After 15 days of cultivation, the result showed that the LS medium containing 0.05 g L-1 activated charcoal and 2-3 mg L-1 2,4-D stimulated high frequency of friable and yellow embryogenic calli. Moreover, the frequency of embryogenic calli was increased to 51.33-60.67% and the average calli diameter was 8.00-8.57 mm. Therefore, the *in vitro* culture using this modified LS medium can be used to improve high frequency of embryogenic calli, which lead further to develop more somatic embryos or embryoid.

Keywords: *Indica* rice, activated charcoal, 2,4-D, Caulogenesis, LS medium

---

[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/] สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว/ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

[2/] Postharvest Technology Research Institute/Postharvest Technology Innovation Center, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

บทคัดย่อ: การศึกษาผลของผงถ่านกัมมันต์และ 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 โดยวางแผนการทดลองเป็นแบบ factorial in completely randomized design (Factorial in CRD) ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวบนอาหารสูตร Linsmaier และ Skoog (LS) ดัดแปลงที่เติมผงถ่านกัมมันต์และ 2,4-D ในความเข้มข้นต่างๆ โดยความเข้มข้นผงถ่านกัมมันต์ ที่ใช้คือ 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ใช้คือ 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร รวม 20 สูตร แต่ละสูตรทำการศึกษา 3 ซ้ำ หลังจากทำการเพาะเลี้ยง 15 วัน พบว่าอาหารสูตร LS ดัดแปลงที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ 0.05 กรัมต่อลิตร และ 2,4-D 2-3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส ชนิดไฟรเอเบิลและมีสีเหลือง นอกจากนั้นอาหารสูตรนี้ยังทำให้เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสได้สูงถึง 51.33-60.67% และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 8.00-8.57 มิลลิเมตร โดยเอมบริโอเจนิกแคลลัสที่ได้นี้สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอมบริโอหรือเอมบริออยด์ต่อไป

คำสำคัญ: ข้าวชนิดอินดิกา ผงถ่านกัมมันต์ 2,4-D การเจริญเป็นแคลลัส อาหารสูตร LS

คำนำ

ในปัจจุบันข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและภายนอกประเทศ เพราะนอกจากจะใช้บริโภคเป็นอาหารหลักแล้ว ยังเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญที่ทำรายได้ให้กับประเทศ แต่ข้าวบางพันธุ์ยังให้ผลผลิตต่ำ มีลักษณะประจำพันธุ์หลายอย่างที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการเพิ่มผลผลิต เช่น ต้นสูงทำให้หักล้มง่าย ไม่ต้านทานต่อโรค แมลงหลายชนิด และมีความไวต่อช่วงแสง ดังนั้น จึงต้องมีการศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้มีลักษณะตามต้องการ โดยวิธีปกติที่นักปรับปรุงพันธุ์ข้าวใช้อยู่คือการผสมพันธุ์ข้าว แต่วิธีการนี้ใช้เวลาค่อนข้างนานจึงได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture) มาประยุกต์ใช้ร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าว เพื่อช่วยย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ซึ่งเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเทคนิคขั้นพื้นฐานในการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส การเพิ่มปริมาณแคลลัส การชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัส และการชักนำให้ต้นข้าวเกิดราก เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป จะเห็นได้ว่าแคลลัสเป็นชิ้นส่วนสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ชิ้นส่วนพืชเกือบทุกชนิดจากอวัยวะต่างๆ สามารถนำมาชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่โดยทั่วไปแล้วเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จสูงในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนของคัพภะ ใบอ่อน ปลายยอด ดอกอ่อน และส่วนของเมล็ดที่เริ่มงอกให้ผลดีที่สุด (รังสฤษดิ์, 2540) การเกิดแคลลัสขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายปัจจัย เช่น ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยง ธาตุอาหาร สภาพแวดล้อม และปัจจัยที่มีผลอีกอย่าง คือ สารควบคุมการเจริญเติบโต ออกซินเป็นกลุ่มสารที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เนื้อเยื่อเจริญเป็นแคลลัส ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้อยู่ในช่วง 0.01-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยออกซินที่ใช้กันทั่วไป คือ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) เป็นออกซินชนิดหนึ่งที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติในการไปยับยั้งกระบวนการสร้างอวัยวะ และใช้ได้ผลดีในการเพิ่มจำนวนและรักษาสภาพการเลี้ยงเป็นแคลลัสไว้ ข้อควรระวัง คือ การใช้ 2,4-D ในระดับความเข้มข้นที่สูงเกินไปสามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ หรืออาจทำให้อาหารเป็นพิษต่อพืช เนื่องจากทำให้อาหารมีความเป็นกรดมากขึ้น (Pierik, 1987) นอกจากนั้นยังพบว่าหลังจากนำเนื้อเยื่อพืชไปเลี้ยงในอาหารในช่วงระยะเวลาหนึ่งอาหารมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น เช่น อาหารมีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของสารจำพวกสารประกอบฟีโนลิก หรืออาจเกิดสารพิษบางอย่างที่ไม่สามารถจะมองเห็นได้ การแก้ปัญหานี้ คือ การเติมผงถ่านกัมมันต์ลงไปในอาหาร เพราะผงถ่านกัมมันต์มีคุณสมบัติในการช่วยดูดซับสารยับยั้งการเจริญเติบโต (บุญยืน, 2544)

มีรายงานการศึกษาสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงข้าว เช่น Zhang (1995) รายงานว่า การใช้อาหารสูตร LS (Linsmaier and Skoog, 1965) ในการเพาะเลี้ยงข้าวเมล็ดยาวบางพันธุ์สามารถทำให้เกิด

แคลลัสได้สูงถึง 95 % แต่บางพันธุ์เกิดแคลลัสเพียง 1 ใน 3 เท่านั้น Vajrabhya *et al.* (1984) พบว่าพันธุ์ข้าวไทยในแต่ละพันธุ์ สามารถตอบสนองต่ออาหารแตกต่างกันในแต่ละสูตร โดยพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เหลืองประทิว 123 ข้าวเหนียวสันป่าตอง และ กข 23 เหมาะสำหรับอาหารที่ใส่ 2,4-D และไคเนติน แต่บางพันธุ์เกิดได้ดีเมื่อใช้น้ำมะพร้าวแทนไคเนติน ในการเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ Pajam ในอาหารสูตร MS จากการทดลองพบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับแคลเซียมซิลิเกต ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด (Islam *et al.*, 2005) เนื่องจาก 2,4-D ไปทำการยับยั้งการเกิดยอด จึงทำให้เกิดการแบ่งเซลล์และเซลล์มีการขยายขนาด พัฒนาไปเป็นก้อนแคลลัส (Pierik, 1987) และหลังจากเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารไปช่วงหนึ่งการเติบโตของแคลลัสเป็นไปอย่างรวดเร็วใช้อาหารไปจำนวนมากและมีการปล่อยของเสียออกมา ซึ่งเรียกว่าสารประกอบฟีโนลิก สารนี้ทำให้การเจริญเติบโตของพืชหยุดชะงัก การเติมผงถ่านกัมมันต์ช่วยไปดูดซับสารพิษพวกสารประกอบฟีโนลิกที่เกิดจากเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยง ทำให้เนื้อเยื่อพืชเจริญต่อไปได้ (รังสฤษดิ์, 2540) และ Buffard-Morel *et al.* (1995) ได้ทำการเพาะเลี้ยงส่วนยอดของมะพร้าวในอาหารที่เติม 2,4-D ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ พบว่านอกจากผงถ่านกัมมันต์ช่วยดูดซับสารยับยั้งการเจริญเติบโต เช่น สารประกอบฟีโนลิกแล้ว ผงถ่านกัมมันต์ยังช่วยส่งเสริมให้เกิดโซมาติกเอมบริโอเจเนซิส จะเห็นได้ว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการเกิดแคลลัสและการเติมผงถ่านกัมมันต์ยังเป็นตัวช่วยส่งเสริมให้เกิดโซมาติกเอมบริโอเจเนซิสได้อีกด้วย

ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง และเพิ่มปริมาณแคลลัสของข้าว เพื่อพัฒนาเป็นโซมาติกเอมบริโอที่มีคุณภาพ และนำมาใช้ในการผลิตเมล็ดสังเคราะห์ (synthetic seeds) อีกทั้งยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์

อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการศึกษาโดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design (Factorial in CRD) ปัจจัยที่ศึกษามี 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของผงถ่านกัมมันต์ ต่างกัน 5 ระดับ คือ 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 กรัมต่อลิตร ปัจจัยที่สอง คือ ความเข้มข้นของ 2,4-D ต่างกัน 4 ระดับ คือ 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีพืชทดลอง คือ ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 อาหารในแต่ละสูตรทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวจำนวน 100 เมล็ด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยนำเมล็ดข้าวมาแกะเปลือกและฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์เข้มข้น 15 % เป็นเวลา 10 นาที ขณะฟอกฆ่าเชื้อทำการเขย่าเป็นระยะ แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง ภายในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทธานอล 70 % เป็นเวลา 5 นาที ในขณะฟอกฆ่าเชื้อทำการเขย่าเป็นระยะ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง ภายในตู้ปลอดเชื้อ นำเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของผงถ่านกัมมันต์ 5 ระดับ คือ 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 กรัมต่อลิตรและความเข้มข้นของ 2,4-D 4 ระดับ คือ 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส สำหรับสูตรอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัสมีทั้งหมด 20 สูตร ได้แก่

สูตรที่ 1 LS

สูตรที่ 2 LS + 1 mg L^{-1} 2,4-D

สูตรที่ 3 LS + 2 mg L^{-1} 2,4-D

สูตรที่ 4 LS + 3 mg L^{-1} 2,4-D

สูตรที่ 5 LS + 0.05 g L^{-1} activated charcoal

สูตรที่ 6 LS + 1 mg L^{-1} 2,4-D + 0.05 g L^{-1} activated charcoal

สูตรที่ 7 LS + 2 mg L^{-1} 2,4-D + 0.05 g L^{-1} activated charcoal

สูตรที่ 8 LS + 3 mg L^{-1} 2,4-D + 0.05 g L^{-1} activated charcoal

สูตรที่ 9 LS + 0.10 g L^{-1} activated charcoal

สูตรที่ 10 LS + 1 mg L^{-1} 2,4-D + 0.10 g L^{-1} activated charcoal

สูตรที่ 11 LS + 2 mg L^{-1} 2,4-D + 0.10 g L^{-1} activated charcoal

สูตรที่ 12 LS + 3 mg L^{-1} 2,4-D + 0.10 g L^{-1} activated charcoal

สูตรที่ 13 LS + 0.15 g L^{-1} activated charcoal

สูตรที่ 14 LS + 1 mg L^{-1} 2,4-D + 0.15 g L^{-1} activated charcoal

สูตรที่ 15 LS + 2 mg L^{-1} 2,4-D + 0.15 g L^{-1} activated charcoal

สูตรที่ 16 LS + 3 mg L^{-1} 2,4-D + 0.15 g L^{-1} activated charcoal

สูตรที่ 17 LS + 0.20 g L^{-1} activated charcoal

สูตรที่ 18 LS + 1 mg L^{-1} 2,4-D + 0.20 g L^{-1} activated charcoal

สูตรที่ 19 LS + 2 mg L^{-1} 2,4-D + 0.20 g L^{-1} activated charcoal

สูตรที่ 20 LS + 3 mg L^{-1} 2,4-D + 0.20 g L^{-1} activated charcoal

ทำการเพาะเลี้ยงในสภาพควบคุมที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน และบันทึกจำนวนเมล็ดที่เกิดแคลลัส โดยรายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส บันทึกขนาดของแคลลัส โดยวัดความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลาง นำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทำการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SX version 8 (Analytical Software, USA) บันทึกสีและชนิดของแคลลัส การบันทึกสีของแคลลัส แบ่งตามสีของชิ้นแคลลัสที่เกิดขึ้น คือ สีขาว (white; W) สีเหลือง (yellow; Y) สีเหลืองปนขาว (yellow white; YW) แคลลัสมีจุดสีเขียว (green spot; GS) สีน้ำตาล (brown;B) และสีดำ (black;BL) การให้คะแนนตามสีมีเกณฑ์ดังนี้

- คือ ไม่มีจำนวนชิ้นแคลลัส (no callus) 0%
+ คือ แคลลัสที่เกิดมีจำนวนน้อย (low) อยู่ในช่วง 1-25%
++ คือ แคลลัสที่เกิดมีจำนวนปานกลาง (medium) อยู่ในช่วง 26-50%
+++ คือ แคลลัสที่เกิดมีจำนวนมาก (optimal/good) อยู่ในช่วง 51-75%
++++ คือ แคลลัสที่เกิดมีจำนวนดีมาก (excellent/very good) อยู่ในช่วง 76-100%

การบันทึกชนิดของแคลลัส ชนิดของแคลลัสมี 2 ชนิด คือ คอมแพคแคลลัส (compact callus) มีลักษณะเกาะกันแน่นเป็นก้อนและ ไฟรเอเบิลแคลลัส (friable callus) มีลักษณะ เกาะกันหลวมๆ และฟู การบันทึกชนิดของแคลลัส ให้คะแนนตามเกณฑ์เช่นเดียวกับการให้คะแนนสีแคลลัส

ผลและวิจารณ์การทดลอง

ชนิดและสีของแคลลัส

การชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 บนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส สูตร LS ดัดแปลงที่เติมผงถ่านกัมมันต์และ 2,4-D ในความเข้มข้นต่างๆ ในช่วง 5-10 วัน หลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าว พบว่าอาหารทุกสูตร ยกเว้นอาหารสูตรที่ 1, 5, 9, 13, 14,17 และ 18 เริ่มมีการชักนำให้เกิดแคลลัส และแคลลัสมีการเจริญ เติบโตขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งแคลลัสที่เกิดอาจเจริญเป็นแคลลัสต่อไป หรืออาจมีการเปลี่ยนสภาพไปเป็นอวัยวะในภายหลัง เช่น ยอดหรือราก การเจริญของแคลลัสในระยะนี้ยังไม่มีความแตกต่างกันมากนัก แต่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 15 วัน สามารถแบ่งชนิดแคลลัสที่เกิดได้เป็น 2 ชนิด คือ ชนิดแรกเป็นแคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์หลวมๆ มีลักษณะร่วน สามารถแยกออกจากกันง่าย เรียกว่า ไฟรเอเบิลแคลลัส (friable callus) ซึ่งมักไม่เปลี่ยนเป็นอวัยวะ แคลลัสชนิดนี้สามารถนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยต่อไปได้ แคลลัสชนิดที่สอง เป็นแคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์ที่เกาะกันแน่น เรียกว่า คอมแพคแคลลัส (compact callus) มักเจริญต่อไปเป็นอวัยวะ และพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้ดี (ภาพที่ 1) โดย ศิวพงศ์ (2546) รายงานว่าเมื่อความเข้มข้นออกซินในอาหารสูงขึ้น เกิดไฟรเอเบิลแคลลัสในปริมาณที่มากขึ้น จากการทดลองนี้ พบว่าเมื่อความเข้มข้น 2,4-D เพิ่มขึ้น แคลลัสที่เกิดส่วนใหญ่เป็นไฟรเอเบิลแคลลัส โดยเกิดไฟรเอเบิลแคลลัส 76-100% เมื่อใช้ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0-0.05 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 1 และ

ตารางที่ 1) แต่เมื่อความเข้มข้นของผงถ่านกัมมันต์เพิ่มขึ้น คือ เมื่อใช้ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.10-0.20 กรัมต่อลิตร ไม่ว่าใช้ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้นมากน้อยเท่าไหร่ก็ตาม แคลลัสที่เกิดส่วนใหญ่เป็นชนิดที่สอง คือ คอมแพคแคลลัส จากการทดลองเกิดแคลลัสชนิดนี้ 76-100% (ภาพที่ 1 และตารางที่ 1) ผงถ่านกัมมันต์นอกจากมีคุณสมบัติในการดูดซับสารประกอบฟีโนลิกแล้ว ยังสามารถดูดซับฮอร์โมนที่ใส่ลงไปในอาหารได้อีกด้วย (บุญยืน, 2544) จึงทำให้แคลลัสไม่สามารถดูดฮอร์โมนไปใช้ได้อย่างเพียงพอต่อการเจริญและพัฒนา

จากการทดลองสามารถแบ่งสีของแคลลัสได้เป็น 6 สี ตามวิธีการของ สุริยันตร์ และคณะ (2540) คือ ขาว เหลืองปนขาว เหลือง น้ำตาล ดำและจุดสีเขียว (ภาพที่ 2) การเกิดสีของเนื้อเยื่อแคลลัสขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของรงควัตถุต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น สีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ สีเหลืองเพราะมีแคโรทีนอยด์และฟราโวนอยด์ ซึ่งมีปริมาณมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหารและอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมของการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะปัจจัยแสง แคลลัสที่มีสีเหลืองสามารถเจริญและพัฒนาต่อไปได้ สำหรับแคลลัสที่มีสีขาวตายในที่สุด เนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (ประศาสตร์, 2536) จากการทดลองนี้พบว่า แคลลัสของเมล็ดข้าวส่วนใหญ่มีสีเหลือง (76-100%) และรองลงมามีสีเหลืองปนขาว (26-50%) (ภาพที่ 2 และตารางที่ 1) อาหารทุกสูตรส่วนใหญ่เกิดเป็นสีอื่นๆ นอกเหนือจากสีเหลืองและสีเหลืองปนขาวเพียงเล็กน้อยหรือไม่เกิดเลย โดยแคลลัสที่เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำ แสดงว่าเนื้อเยื่อถูกทำลายหรือถูกยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อและเนื้อเยื่อนั้นตายในที่สุด

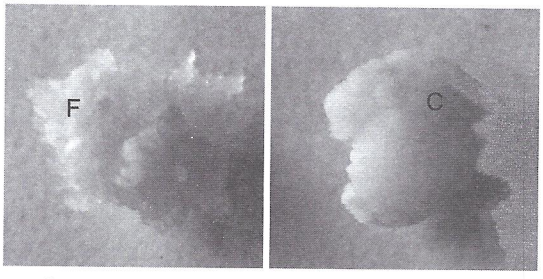

Figure 1 Characteristics of the calli after 15 days in culture
(F = friable callus, C = compact callus)

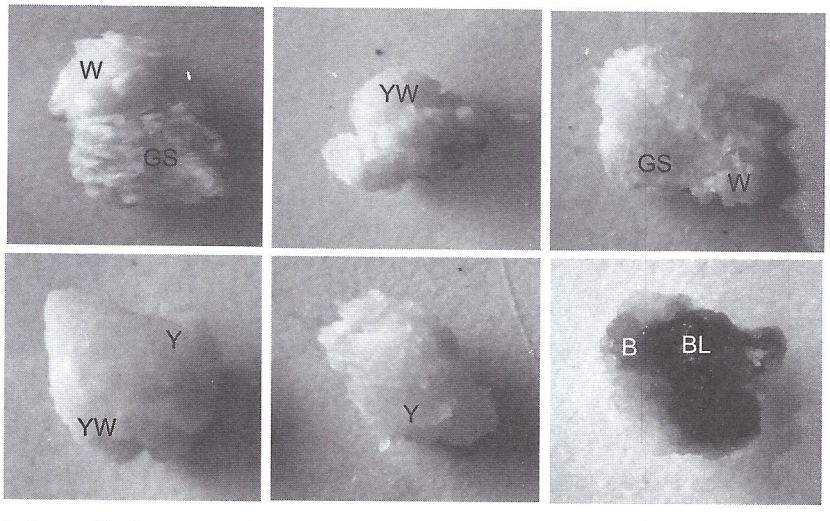

Figure 2 Colour of the calli after 15 days in culture (W = white calli, Y = yellow calli, YW = yellow white calli, GS = green spot, B = brown calli, BL = black calli)

Table 1 Effect of activated charcoal and 2,4-D on colour of the calli and callus types after 15 days in culture media

Components	Colour of the calli						Callus types	
	White	Yellow white	Yellow	Brown	Black	Green spot	Compact	Friable
1) LS	-	-	-	-	-	-	-	-
2) LS + 1 mg L^{-1} 2,4-D	++	+	+	+	-	+	++	+++
3) LS + 2 mg L^{-1} 2,4-D	+	++	++	+	-	+	++	+++
4) LS + 3 mg L^{-1} 2,4-D	+	+	++++	+	-	+	++	+++
5) LS + 0.05 g L^{-1} AC	-	-	-	-	-	-	-	-
6) LS + 1 mg L^{-1} 2,4-D + 0.05 g L^{-1} AC	+	-	++	+	+	+	++	+++
7) LS + 2 mg L^{-1} 2,4-D + 0.05 g L^{-1} AC	+	+	+++	+	-	+	+	++++
8) LS + 3 mg L^{-1} 2,4-D + 0.05 g L^{-1} AC	-	+	++++	+	-	+	+	++++
9) LS + 0.10 g L^{-1} AC	-	-	-	-	-	-	-	-
10) LS + 1 mg L^{-1} 2,4-D + 0.10 g L^{-1} AC	-	+++	++	-	-	-	++++	-
11) LS + 2 mg L^{-1} 2,4-D + 0.10 g L^{-1} AC	+	+	+++	-	-	+	++	+++
12) LS + 3 mg L^{-1} 2,4-D + 0.10 g L^{-1} AC	-	+	++++	+	-	-	+++	++
13) LS + 0.15 g L^{-1} AC	-	-	-	-	-	-	-	-
14) LS + 1 mg L^{-1} 2,4-D + 0.15 g L^{-1} AC	-	-	-	-	-	-	-	-
15) LS + 2 mg L^{-1} 2,4-D + 0.15 g L^{-1} AC	-	+	+++	-	-	++	++++	-
16) LS + 3 mg L^{-1} 2,4-D + 0.15 g L^{-1} AC	-	++	+++	-	-	-	++++	+
17) LS + 0.20 g L^{-1} AC	-	-	-	-	-	-	-	-
18) LS + 1 mg L^{-1} 2,4-D + 0.20 g L^{-1} AC	-	-	-	-	-	-	-	-
19) LS + 2 mg L^{-1} 2,4-D + 0.20 g L^{-1} AC	-	+++	++	-	-	-	++++	-
20) LS + 3 mg L^{-1} 2,4-D + 0.20 g L^{-1} AC	-	+++	++	-	-	-	++++	-

*Note: - = no callus, + = low, ++ = medium, +++ = optimal/good, ++++ = excellent/very good

เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแคลลัส

จากการทดลองหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ในอาหารดัดแปลง 20 สูตร เป็นระยะเวลา 15 วัน พบว่าผงถ่านกัมมันต์ มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่ากรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากที่สุด มีค่าเฉลี่ย 30.94% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับกรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0, 0.10, 0.15 และ 0.20 กรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ย 21.44%, 14.71%, 3.40% และ 0.66% ตามลำดับ

(ตารางที่ 2) และพบว่ากรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ยังมีผลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร แคลลัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 4.84 มิลลิเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ กับกรรมวิธีที่ไม่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ แคลลัสที่เกิดมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 4.58 มิลลิเมตร แต่กรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ในความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น คือ 0.10, 0.15 และ 0.20 กรัมต่อลิตร แคลลัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 2.86, 0.60 และ 0.32 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3) รังสฤษฏ์ (2540) ได้รายงานว่าหลังจากเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารไปช่วงหนึ่ง พบว่าการเติบโตของแคลลัสเป็นไปอย่างรวดเร็ว จึงมีการใช้อาหารไปจำนวนมากและมีการปล่อยของเสียออกมา ซึ่งสารประกอบที่เนื้อเยื่อพืชปล่อยออกมานี้ เรียกว่าสารประกอบฟีโนลิก สารนี้ทำให้การเจริญของพืชหยุดชะงักไป การเติมผงถ่านกัมมันต์ช่วยไปดูดซับสารพิษพวกสารประกอบฟีโนลิกที่เกิดจากเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยง ทำให้เนื้อเยื่อพืชเจริญต่อไปได้ และคำนูณ (2544) ได้รายงานว่า ของเสียที่ปล่อยออกมาทำให้ pH ในอาหาร มีค่าต่ำ ทำให้ฮอร์โมนบางตัว เช่น IAA จิบเบอเรลลิน วิตามินบีและกรดแพนโทเทนิกสลายได้ง่ายและทำให้วุ้นไม่แข็งตัว พืชจึงดูดสารอาหารเหล่านี้ไปใช้ไม่เพียงพอ เมื่อมีการใช้ผงถ่านกัมมันต์เป็นตัวบัฟเฟอร์เพื่อควบคุม pH ของอาหาร ช่วยให้ pH ในอาหารคงสภาพเสถียร ทำให้เนื้อเยื่อพืชสามารถดูดสารอาหารไปใช้ในการเจริญได้ และจากการทดลองนี้ พบว่าหากมีการใช้ผงถ่านกัมมันต์ในความเข้มข้นที่มากขึ้นคือ ตั้งแต่ 0.10 – 0.20 กรัมต่อลิตร เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัสมีค่าลดลง บุญยืน (2544) ได้รายงานว่าผงถ่านกัมมันต์มีคุณสมบัติทั้งข้อดีและข้อเสีย คือ นอกจากผงถ่านกัมมันต์สามารถดูดซับสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญแล้ว ผงถ่านกัมมันต์อาจดูดซับฮอร์โมนที่ใส่ลงไปได้ด้วยเช่นกัน ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อพืช และทำให้อาหารมีสีดำ ทำให้แคลลัสที่จมอยู่ในอาหารไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ หากเติมในระดับความเข้มข้นที่สูงเกินไป

นอกจากนี้ยังพบว่า 2,4-D ก็มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยมากที่สุด คือ 31.14% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับกรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ความเข้มข้น 2 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ย 20.36% และ 5.32% ตามลำดับ และหากไม่มีการใส่ 2,4-D ทำให้ไม่มีการชักนำให้เกิดแคลลัส (ตารางที่ 2) นอกจากนี้ยังพบว่า 2,4-D มีผลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัส โดยกรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 4.69 มิลลิเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ กับกรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 4.08 มิลลิเมตร ทั้งสองกรรมวิธีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับกรรมวิธีที่ใส่ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.69 มิลลิเมตร และหากไม่มีการใส่ 2,4-D ทำให้ไม่มีการชักนำให้เกิดแคลลัส (ตารางที่ 3) จากการทดลองเมื่อความเข้มข้น 2,4-D เพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัสมีค่าเพิ่มขึ้น Pierik (1987) รายงานว่าการที่ 2,4-D สามารถชักนำแคลลัสให้มีจำนวนมากและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่ได้ เนื่องจาก 2,4-D ไปยับยั้งการเกิดยอดทำให้เกิดการแบ่งเซลล์เป็นแคลลัสและเซลล์มีการขยายขนาด สุริยันตร์ และคณะ (2540) รายงานว่าเมล็ดข้าวนางมล เอส 4 สร้างแคลลัสได้ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ทุกระดับความเข้มข้นทั้งในที่มืดและสภาพที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ส่วนในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม 2,4-D ไม่สร้างแคลลัส และแคลลัสเกิดได้ดีขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้น 2,4-D เป็น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

Table 2 Effect of activated charcoal and 2,4-D on callus induction of *Indica* rice (*Oryza sativa* L.) cv. Supunburi 1 after 15 days in culture

Callus induction (%) after 15 days in culture					
Activated charcoal ($g L^{-1}$)	2,4-D ($mg L^{-1}$)				Average
	0	1	2	3	
0	0.00e	12.33e	30.67cd	42.67bc	21.44B
0.05	0.00e	11.67e	51.33ab	60.67a	30.94A
0.10	0.00e	2.40e	14.67de	41.67bc	14.71B
0.15	0.00e	0.00e	4.07e	9.33e	3.40C
0.20	0.00e	0.00e	1.07e	1.37e	0.66C
Average	0.00C	5.32C	20.36B	31.14A	
$LSD_{0.05}$ Activated charcoal (A)		8.49			
$LSD_{0.05}$ 2,4-D (B)		7.59			
$LSD_{0.05}$ AxB		16.98			

Means within the row and column followed by the same letter were not significantly different at p= 0.05 by the Least Significant Difference (LSD)

Table 3 Effect of activated charcoal and 2,4-D on cullus size of *Indica* rice (*Oryza sativa* L.) cv. Supunburi 1 after 15 days in culture

Diameter of calli (mm) after 15 days in culture					
Activated charcoal ($g L^{-1}$)	2,4-D ($mg L^{-1}$)				Average
	0	1	2	3	
0	0.00f	4.70d	6.13bcd	7.40abc	4.58A
0.05	0.00f	2.70e	8.00ab	8.57a	4.84A
0.10	0.00f	0.83ef	4.77d	5.73cd	2.86B
0.15	0.00f	0.00f	0.97ef	1.23ef	0.60C
0.20	0.00f	0.00f	0.53f	0.53f	0.32C
Average	0.00C	1.69B	4.08A	4.69A	
$LSD_{0.05}$ Activated charcoal (A)		0.96			
$LSD_{0.05}$ 2,4-D (B)		0.86			
$LSD_{0.05}$ AxB		1.92			

Means within the row and column followed by the same letter were not significantly different at p= 0.05 by the Least Significant Difference (LSD).

กรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ ร่วมกับ 2,4-D มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสมากกว่าการใช้ผงถ่านกัมมันต์ หรือ 2,4-D อย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว จากการทดลองพบว่าผงถ่านกัมมันต์ และ 2,4-D มีปฏิกิริยาร่วมซึ่งกันและกัน ซึ่งมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกรรมวิธีที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ย คือ 60.67% (ตารางที่ 2) และแคลลัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 8.57 มิลลิเมตร (ตารางที่ 3) ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ กับการใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น-2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ย 51.33% และแคลลัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 8.00 มิลลิเมตร แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารสูตรอื่น Pierik (1987) ระบุว่า ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพวกธัญพืช จำเป็นต้องใส่ 2,4-D ในอาหาร เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของแคลลัส ซึ่ง 2,4-D มีส่วนสำคัญในกระบวนการเอมบริโอเจเนซิสของพืช และรังสฤษดิ์ (2540) รายงานว่า ความเข้มข้น 2,4-D ที่ใช้ อยู่ในช่วง 1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Vajrabhya *et al.* (1984) รายงานว่า ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมสำหรับข้าวไทยอยู่ในช่วง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจากการทดลองนี้ พบว่าความเข้มข้น 2,4-D ที่ทำให้แคลลัสเจริญได้ดี คือ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยมากที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม Pierik (1987) ได้ให้เหตุผลว่า การใช้ 2,4-D ในระดับความเข้มข้นที่สูงเกินไป ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ เนื่องจาก 2,4-D มีคุณสมบัติในการปิดกั้นกระบวนการกำเนิดอวัยวะและใช้ได้ผลดีในการเพิ่มจำนวนและรักษาสภาพการเลี้ยงเป็นแคลลัสไว้ และ อารีย์ (2541) รายงานว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารช่วงหนึ่ง พืชมีการปล่อยของเสีย จำพวกสารประกอบฟีโนลิกออกมา จึงมีการเติมผงถ่านกัมมันต์ เพื่อช่วยดูดซับของเสียเหล่านั้น ซึ่งปริมาณที่ใช้อยู่ที่ 0.5-2% แต่ทั้งนี้ บุญยืน (2544) ได้รายงานว่า ผงถ่านกัมมันต์มีทั้งข้อดีและข้อเสีย คือ นอกจากผงถ่านกัมมันต์สามารถดูดซับสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญแล้ว ผงถ่านกัมมันต์อาจดูดซับฮอร์โมนที่ใส่ลงไปในอาหารด้วยเช่นกัน ทำให้เนื้อเยื่อมีสารอาหารไปใช้ไม่เพียงพอต่อการเจริญ นอกจากนี้หากเติมผงถ่านกัมมันต์ในปริมาณมากเกินไปทำให้อาหารมีสีดำ ทำให้แคลลัสที่จมอยู่ในอาหารไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ และทำให้แคลลัสตายในที่สุด

ในการทดลองนี้ได้ใช้ 2,4-D ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ ซึ่ง 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญในกลุ่มออกซิน โดยอารีย์ (2541) ได้รายงานไว้ว่า 2,4-D มีคุณสมบัติเป็นสารชักนำให้เกิดแคลลัสและรักษาแคลลัสให้อยู่สภาพนี้ต่อไป โดยเฉพาะใช้กับพืชพวกธัญพืช นอกจากนี้ยังช่วยในการยับยั้งการเกิดยอด คำนูณ (2544) ได้อธิบายเกี่ยวกับคุณสมบัติของผงถ่านกัมมันต์ไว้ว่าผงถ่านกัมมันต์มีคุณสมบัติในการช่วยดูดซับของเสียจำพวกสารประกอบฟีโนลิกที่เนื้อเยื่อพืชปล่อยออกมา ทำให้พืชไม่ได้รับอันตรายจากสารพิษเหล่านี้ หรือไม่ได้ไปยับยั้งการดูดสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญ และผงถ่านกัมมันต์ยังช่วยส่งเสริมให้เกิดโซมาติกเอมบริโอเจเนซิส ดังนั้นการใช้ 2,4-D ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ช่วยให้แคลลัสมีการเจริญและพัฒนาที่ดีกว่าการใช้ 2,4-D หรือผงถ่านกัมมันต์อย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว จากการทดลองนี้ พบว่าเมื่อใส่ผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น3 มิลลิกรัมต่อลิตร เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัส มีค่ามากกว่าการใช้ผงถ่านกัมมันต์ หรือ 2,4-D อย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว Kee-yoeup and Eun-joo (1999) ได้ศึกษาอิทธิพลของไซโตไคนิน ออกซิน และผงถ่านกัมมันต์ ที่มีต่อการสร้างอวัยวะของดอกไลซิแอนตัส พบว่า การใช้ N_6-Benzyladenine (BA) และ kinetin ในระดับความเข้มข้นที่สูง (13.32-22.2 และ 13.94-23.23 ไมโครโมล) มีผลทำให้เกิดยอดได้ดี และการเพิ่มความเข้มข้น indole-3-acetic acid (IAA) และ indole butyric acid (IBA) ในอาหารช่วยให้เกิดราก แต่เมื่อมีการเติมผงถ่านกัมมันต์ลงไปเป็นตัวไปยับยั้งการพัฒนาของยอดและราก ทำให้แคลลัสสามารถดูดสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตได้เต็มที่ และ Buffard-Morel *et al.* (1995) ได้รายงานว่า การเพาะเลี้ยง

ส่วนยอดของมะพร้าวในอาหารที่เติม 2,4-D ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ พบว่าผงถ่านกัมมันต์เป็นตัวส่งเสริมให้เกิดโซมาติกเอมบริโอเจเนซิส และเป็นตัวช่วยดูดซับสารยับยั้งการเจริญเติบโตได้อีกด้วยโดยเฉพาะสารประกอบฟีโนลิก

จากการทดลอง หากต้องการให้แคลลัสที่เกิดขึ้นเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ บุญยืน (2544) ได้รายงานว่าการเติมไซโตไคนินลงไปในอาหารที่เพาะเลี้ยงช่วยกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์และเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอด จากส่วนของแคลลัสได้ และการเติมออกซิน เช่น IBA และ NAA ช่วยกระตุ้นให้เกิดราก และการใส่ผงถ่านกัมมันต์ลงไปในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมทำอาหารมีสีดำ ส่งผลให้เกิดรากได้ดีอีกด้วย

สรุป

การชักนำให้เกิดแคลลัสโดยการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ในอาหารสูตร LS ดัดแปลง 20 สูตร พบว่า การเติมผงถ่านกัมมันต์ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 2-3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด อยู่ในช่วง 51.33-60.67% และแคลลัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่ที่สุด อยู่ในช่วง 8.00-8.57 มิลลิเมตร แคลลัสส่วนใหญ่ที่ได้มีสีเหลืองและมีลักษณะที่เกาะตัวกันหลวม (friable callus) การใช้ผงถ่านกัมมันต์ร่วมกับ 2,4-D มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัส สีและชนิดของแคลลัส มากกว่าการใช้ผงถ่านกัมมันต์หรือ 2,4-D อย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว ซึ่งทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางและได้แคลลัสที่มีสีและชนิดที่มีคุณภาพมากกว่า

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว/ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ และภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่มอบเงินทุนสนับสนุน งานวิจัยในครั้งนี้ และงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)

เอกสารอ้างอิง

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2544. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 162 หน้า.

บุญยืน กิจวิจารณ์. 2544. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา, ขอนแก่น. 207 หน้า.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2536. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 158 หน้า.

รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ : หลักการและเทคนิค. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 219 หน้า.

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2546. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏอุดรธานี. 187 หน้า.

สุริยันตร์ ฉะอุ่ม, ศรีสม สุรวัฒนานนท์, กมลพรรณ นามวงศ์พรหม และเฉลิมชัย วงศ์วัฒนะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวพันธุ์นางมลเอส-4. วารสารเกษตรศาสตร์ 31(2): 166-174.

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. โรงพิมพ์อักษรสวรรค์, กรุงเทพ. 133 หน้า.

Buffard-Morel, J., J.L. Verdeil, S. Dussert, C. Magnaval, C. Huet and F. Grosdemange. 1995. Initiation of somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.). Laboratorie des Ressources Genetiques et Amelioration des Plantes Tropicales, France.

Kee-yoeup P. and H. Eun-joo. 1999. Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anstomical characteristics of shoot-tip cultures of *Lisianthus (Eustoma grandiflorum (*RAF.*) shinn)*. Department of Horticulture. Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, South Korea.

Linsmaier, E.M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiology Plant 18:100-127.

Islam, Md.M., A. Mahatalat and M. Debabrata. 2005. *In vitro* Induction and Plant Regeneration in Seed Explants of Rice (*Oryza Sativa* L.). Journal of Agriculture and Biological Sciences. 1(1): 72-75.

Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro* Culture of Higher Plant. Martinus Nijhoff Publisher. Boston. 344 p.

Vajrabhaya, M., T. Vajrabhaya, M. W. Nabors 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. p 41.

Zhang, S. 1995. Efficient plant regeneration from indica (group 1) rice protoplasts of one advanced breeding Line and three varieties. Plant Cell Reports. 15:68-71.