การเพิ่มจำนวนต้นข้าวหอมกระดังงาสายพันธุ์บริสุทธิ์ผ่านกระบวนการสร้างแคลลัส

Shoot Multiplication of Pure-line Hom-Kradang-Nga Rice through Callus Formation

ราฮีมา วาแมดีซา[1], ศุภณัฏฐ์ กาญจนวัฒนาวงศ์[2]
Raheema Wamaedeesa[1], Supanath Kanjanawattanawong[2]

(Received: June 6, 2019; Revised: August 5, 2019; Accepted: August 14, 2019)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเจริญพัฒนาของเมล็ดข้าวหอมกระดังงา เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาต่อไปในอนาคต จากการศึกษาการชักนำเมล็ดข้าวหอมกระดังงาให้เกิดแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำตาลทรายที่ระดับแตกต่างกัน พบว่าเมล็ดข้าวหอมกระดังงาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติมน้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร เกิดแคลลัสทุกเมล็ด (95.31%) รองลงมาคืออาหารสูตร เติมน้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร (92.18%) สำหรับอาหารที่ไม่เติมน้ำตาลทรายพบว่ามีการชักนำให้เกิดแคลลัสได้น้อยที่สุด (56.25%) นอกจากนี้พบว่าแคลลัสที่เกิดขึ้นบนอาหารแต่ละสูตรมีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$) โดยอาหารสูตรที่เติมน้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตรแคลลัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยมากที่สุด (0.54 เซนติเมตร) เมื่อนำแคลลัสที่ได้มาชักนำให้เกิดต้นและเพิ่มจำนวนต้นบนอาหารที่เติม BA ระดับความเข้มข้น 0.5 1 1.5 2 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่า BA ที่ระดับแตกต่างกันมีอิทธิพลต่อความยาวของต้นและใบ ($P \leq 0.05$) โดยอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ความยาวเฉลี่ยของต้นและใบมากที่สุด (1.7, 1.12 เซนติเมตร ตามลำดับ) แต่ระดับความเข้มข้นของ BA ไม่มีอิทธิพลต่อจำนวนต้นและใบ สำหรับการเพิ่มจำนวนต้นนั้นพบว่าอาหารที่เติม BA ทุกระดับความเข้มข้นให้จำนวนต้นไม่แตกต่างกัน

คำสำคัญ: ข้าวหอมกระดังงา เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แคลลัส การเกิดต้น การเพิ่มจำนวนต้น

Abstract

This study aims to investigate the effect of suitable quantity of sugar and plant growth regulator on growth and development of Hom-kradang-nga rice seed. Hom-kradang-nga rice seeds were grown on MS medium added 0.5 mg/l 2,4-D and different concentration of table sugar. The result showed that percentage of callus formation was highest (95.31%) when cultured on MS medium with 20 g/l table sugar followed by cultured on MS medium with 10 g/l table sugar (92.18%). MS medium without table sugar gave lowest percentage of callus formation (56.25%).It was found that callus diameter was significant difference ($P \leq 0.01$). Diameteraverage of callus was highest when cultured on MS medium with 20 g/ltable sugar (0.54 cm). Moreover, calliwere culture on MS medium added 0.5 1 1.5 2 and2.5 mg/l BAin order to examine shoot production and proliferation. The consequence result showed that different concentration of BA influenced

[1] คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์
[1] Faculty of Agriculture, Princess of Naradhiwas University
[2] มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตอำนาจเจริญ
[2] Mahidol University Amnatcharoen Campus

on length of shoot and leaf ($P \leq 0.05$). MS medium added 2.5 mg/l table sugar gave highest average length of shoot and leaf whereas those concentrations of BA did not show significant difference of shoot and leaf number. Additionally, for shoot proliferation, it was found that all BA concentration did not show significant difference of shoot number average.

Keywords: Hom kradang nga rice, Tissue culture, Callus, Shoot induction, Shoot proliferation

บทนำ

ข้าวเป็นพืชหลัก ปลูกทั่วทุกภาคของประเทศไทย เกษตรกรปลูกเพื่อจำหน่ายและเพื่อบริโภคภายในครัวเรือน นราธิวาสเป็นอีกจังหวัดหนึ่งที่อยู่ทางตอนใต้สุดของไทยที่มีการปลูกข้าว ถึงแม้ว่าข้าวจะไม่ใช่พืชเศรษฐกิจของจังหวัดนี้ แต่เกษตรกรบางท้องที่มีอาชีพทำนาเป็นหลัก เช่น บ้านโคกอิฐ โคกใน อำเภอตากใบ ที่มีการปลูกข้าวหลายสายพันธุ์ โดยเฉพาะข้าวหอมกระดังงา ที่เป็นข้าวพันธุ์พื้นเมือง มีการปลูกเพื่อผลิตเป็นข้าวกล้อง ลักษณะของข้าวพันธุ์นี้มีสีน้ำตาลเข้ม เมล็ดยาวรีคล้ายกับข้าวสังข์หยดของจังหวัดพัทลุง แต่มีความหอมกว่าคล้ายกับข้าวขาวดอกมะลิ มีคุณสมบัติทนต่อสภาพแห้งแล้งได้ดี ปลูกได้ทั้งสภาพนาที่เป็นที่ดอนและที่ลุ่ม อายุการเก็บเกี่ยวสั้นประมาณ 120 - 130 วัน ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ประมาณ 400 กิโลกรัม นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณทางยา โดยช่วยรักษาอาการเหน็บชาได้ดี สำหรับผลผลิตมีการนำมาแปรรูปเป็นข้าวสารหรือข้าวซ้อมมือ ซึ่งมีคุณภาพการหุงต้มดี เนื้อนุ่ม และกลิ่นหอม (Khaopakro & Krainara, 2018) จึงเป็นที่นิยมรับประทานกันมากในปัจจุบันจนได้รับการสนับสนุนให้มีการผลิตข้าวพันธุ์นี้ให้มากขึ้น

อย่างไรก็ตามในการผลิตข้าวหอมกระดังงานั้นมีปัญหาที่สำคัญคือผลผลิตต่อไร่ต่ำ เนื่องจากมีการปลูกข้าวพันธุ์ดังกล่าวติดต่อกันมานาน ทำให้เกิดการปะปนพันธุ์ นอกจากนี้ฤดูการปลูกข้าวหอมกระดังงานั้นเป็นช่วงที่มีฝนตกชุก ความชื้นสูง ทำให้เกิดโรคกับข้าวหลายโรค เช่น โรคใบไหม้ ใบจุด ใบขีด เป็นต้น บางครั้งอาจระบาดทำความเสียหายได้ดังนั้นการศึกษาเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ได้ผลผลิตสูง จึงมีความจำเป็นเพื่อการเพิ่มผลผลิตข้าวให้เพียงพอกับความต้องการบริโภคข้าวเพื่อสุขภาพของผู้บริโภค ปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้มีการพัฒนาเทคนิคต่างๆ โดยเฉพาะเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การเลือกใช้ marker assisted selection ซึ่งเป็นการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาช่วยคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว และการสร้างข้าวดัดแปลงพันธุกรรมโดยเทคนิค genetic engineering อย่างไรก็ตามเทคนิคขั้นสูงเหล่านี้จะต้องอาศัยเทคนิคพื้นฐานในด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวพันธุ์ที่ต้องการปรับปรุง ส่งผลให้สามารถปรับปรุงข้าวได้รวดเร็วกว่าการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบดั้งเดิม (conventional plant breeding) ปัจจุบันพบว่าข้อมูลด้านการเพาะเลี้ยงข้าวหอมกระดังงาในสภาพปลอดเชื้อยังน้อยอยู่ ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของน้ำตาล และสารควบคุมการเจริญเติบโต ต่อการเจริญพัฒนาของเมล็ดข้าวหอมกระดังงาผ่านกระบวนการสร้างแคลลัส ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสของเมล็ดข้าวหอมกระดังงา
2. เพื่อศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ต่อการชักนำแคลลัสให้เป็นต้นและการเพิ่มจำนวนต้น

ระเบียบวิธีวิจัย

การชักนำแคลลัสจากเมล็ดข้าวหอมกระดังงาสายพันธุ์บริสุทธิ์

นำเมล็ดพันธุ์บริสุทธิ์ที่ได้จากการคัดเลือกพันธุ์มาเพาะลงในอาหารสูตรพื้นฐาน MS ร่วมกับการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเปรียบเทียบการเติมน้ำตาลทราย 3 ระดับคือ 010 และ 20 กรัมต่อลิตร วางขวดเพาะเลี้ยงบนชั้นวางขวดที่มีแสงสีขาว day light ซึ่งให้แสงสว่างประมาณ 24 $molm^{-2}s^{-1}$ นาน 12 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิห้องเพาะเลี้ยง 25 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 15 ซ้ำๆ ละ 1 ขวดๆ ละ 4 เมล็ดบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของเมล็ดทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 30 วัน

การชักนำแคลลัสให้เป็นต้น

ชักนำแคลลัสที่ได้จากเพาะเลี้ยงเมล็ดให้พัฒนาเป็นต้นโดยตัดแคลลัสให้มีขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร มาเพาะลงในอาหารสูตรพื้นฐาน MS ที่เติมน้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติม BA 5 ระดับ คือ 0.5 1 1.5 2 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 15 ซ้ำๆ ละ 1 ขวด บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 30 วัน

การเพิ่มจำนวนต้น

คัดเลือกต้นกล้าที่ได้จากการพัฒนามาจากแคลลัสและมีความสูง 1 cm มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติม BA 5 ระดับ คือ 0.5 1 1.5 2 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 10 ซ้ำๆ ละ 1 ขวดๆ ละ 4 ต้น บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของต้นกล้าทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 30 วัน

การรอดชีวิตของต้นกล้าหลังการย้ายออกจากขวด

นำต้นกล้าที่ได้จากการเพิ่มจำนวนมาปลูกในกระถางเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ และบันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

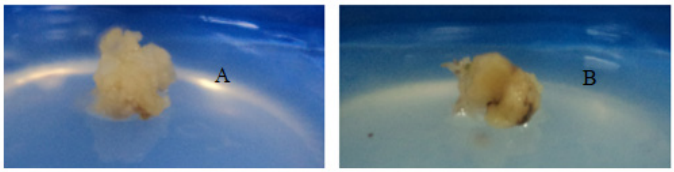
วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Desigu, CRD) นำข้อมูลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธี DMRT (Duncan's multiple rang test) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป R version 3.6.0

ผลการทดลอง

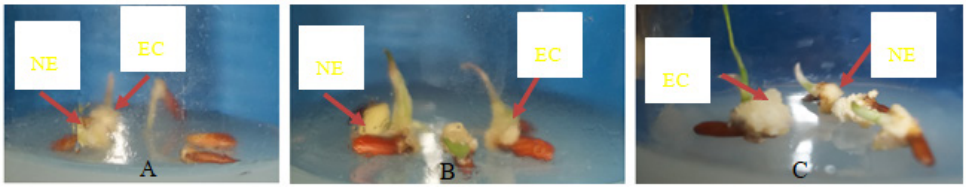
การชักนำแคลลัส

เมื่อเพาะเมล็ดข้าวหอมกระดังงาลงบนอาหารสูตรพื้นฐาน MS ร่วมกับการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเปรียบเทียบผลของน้ำตาลทราย 3 ระดับ คือ 0 10 และ 20 กรัมต่อลิตร พบว่าหลังเพาะเลี้ยงนาน 7 วัน เมล็ดข้าวมีการบวมเต่งเล็กน้อยบนอาหารทุกสูตร หลังเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน อาหารที่เติมน้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร ทำให้เมล็ดข้าวเพียงบางเมล็ดเท่านั้นมีการพัฒนาสร้างแคลลัสสำหรับเมล็ดข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร ทุกเมล็ดเริ่มมีการสร้างแคลลัสบริเวณจมูกข้าว (rice germ) แต่อาหารที่เติมน้ำตาลทราย 0 กรัมต่อลิตร พบว่า เมล็ดยังไม่มีการพัฒนาเป็นแคลลัส นอกจากนี้บนอาหารทั้งสามสูตร เริ่มมีการเกิด coleorhiza บริเวณ rice germ เช่นกัน

หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 21วัน อาหารทั้งสามสูตรทำให้เมล็ดข้าวที่มีการพัฒนาเป็นแคลลัสแล้วมีการสร้างแคลลัสเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยลักษณะแคลลัสที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่มี 2 ลักษณะ คือnon-embryogenic calli (NE) ซึ่งมีลักษณะเป็นสีครีมบางก้อนสีเขียว แต่ละก้อนมีลักษณะใหญ่บางและฉ่ำน้ำ (translucent) แคลลัสอีกชนิดหนึ่งคือ embryogenic calli (EC) มีสีขาวซีดหรือเหลืองอ่อน รวมกันเป็นก้อนเล็กๆ อย่างหลวมๆ (friable) แต่ละก้อนสังเกตุเห็นจุดกำเนิดของเอ็มบริโอซัดเจน (ภาพที่ 1A-B) สำหรับเมล็ดที่ยังไม่มีการสร้างแคลลัสในระยะแรกของการเพาะเลี้ยงนั้น พบว่าบนอาหารสูตรที่ไม่เติมน้ำตาลทราย บางเมล็ดเริ่มมีการสร้างแคลลัส และบางเมล็ดยังคงไม่มีการพัฒนาสร้างแคลลัสนอกจากนั้นพบว่าเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาล 10 และ 20 กรัมต่อลิตร มีการเกิด coleoptile อย่างเด่นชัด (ภาพที่ 2 A-C)



ภาพที่ 1 ลักษณะแคลลัสที่เกิดขึ้น (A) embryogenic calluses (B) non-embryogenic calluses



ภาพที่ 2 การเจริญพัฒนาเป็นแคลลัสและยอดของเมล็ดข้าวเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 21 วัน แคลลัสที่พบลักษณะเป็น NE และ EC บนอาหารทุกสูตร
A เมล็ดข้าวเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลทราย 0 กรัมต่อลิตร
B เมล็ดข้าวเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร
C เมล็ดข้าวเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร

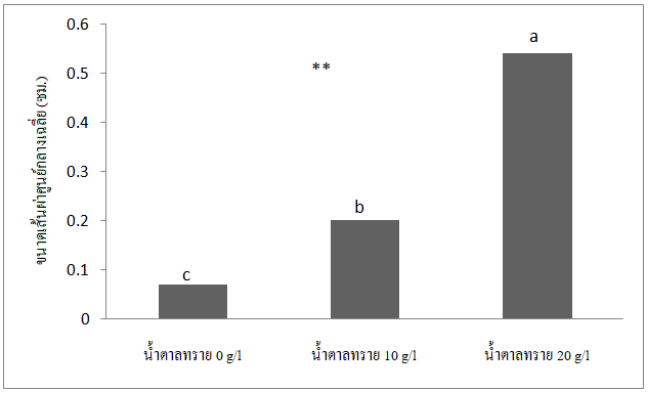
นอกจากนี้พบว่าเมล็ดข้าวหอมกระดังงาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติมน้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร มีการสร้างแคลลัสมากที่สุด (95.31%) สำหรับอาหารที่เติมน้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร นั้นพบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เกือบทุกเมล็ด (92.18%) แต่สำหรับอาหารที่ไม่เติมน้ำตาลทรายนั้น มี การพัฒนาเป็นแคลลัสได้น้อยที่ (56.25%) (ตารางที่ 1) บนอาหารทั้งสามสูตรแคลลัสที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่เป็นแคลลัสที่มีลักษณะเป็น EC

ทำการวัดขนาดแคลลัสซึ่งเกิดขึ้นบนเมล็ดข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 21 วัน พบว่าขนาดแคลลัสมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$) โดยเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติมน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร แคลลัสมีขนาดเฉลี่ย 0.54 เซนติเมตร รองลงมาคือเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร แคลลัสมีขนาดเฉลี่ย 0.20 เซนติเมตร สำหรับอาหารที่ไม่เติมน้ำตาลทราย แคลลัสที่เกิดขึ้นมีขนาดเฉลี่ยน้อยที่สุดคือ 0.07 เซนติเมตร (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและลักษณะแคลลัส ที่เกิดขึ้นบนเมล็ดข้าวหอมกระดังงาเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 21 วัน

น้ำตาลทราย (g/l)	การเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนทั้งหมด (%)	ลักษณะแคลลัส
0	57.81 b	แคลลัสเกาะกันหลวมๆ เป็นก้อนเล็กๆ สีเหลือง บางก้อนแคลลัสมีสีเขียวและฉ่ำน้ำ
10	92.18a	แคลลัสเกาะกันหลวมๆ เป็นก้อนเล็กๆ สีเหลือง บางก้อนแคลลัสมีสีเขียวและฉ่ำน้ำ
20	95.31a	แคลลัสเกาะกันหลวมๆ เป็นก้อนเล็กๆ สีเหลือง บางก้อนแคลลัสมีสีเขียวและฉ่ำน้ำ
F-test	**	
C.V.(%)	22.94	

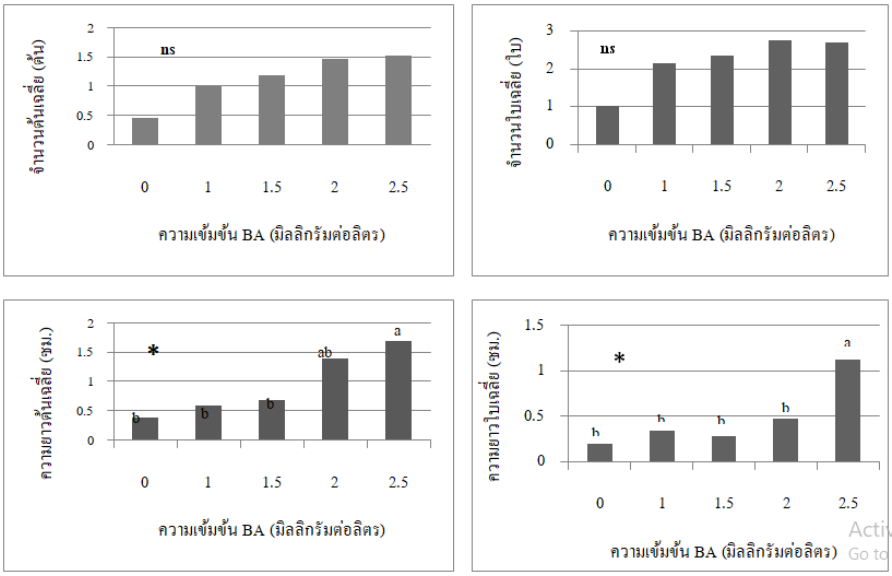
ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน แสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกัน ($P \leq 0.01$)



ภาพที่ 3 ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัสที่เกิดขึ้นเมล็ดข้าวหอมกระดังงาเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารทั้งสามสูตรเป็นระยะเวลานาน 21 วัน ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันบนกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกัน ** ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$)

การชักนำแคลลัสให้เป็นต้น

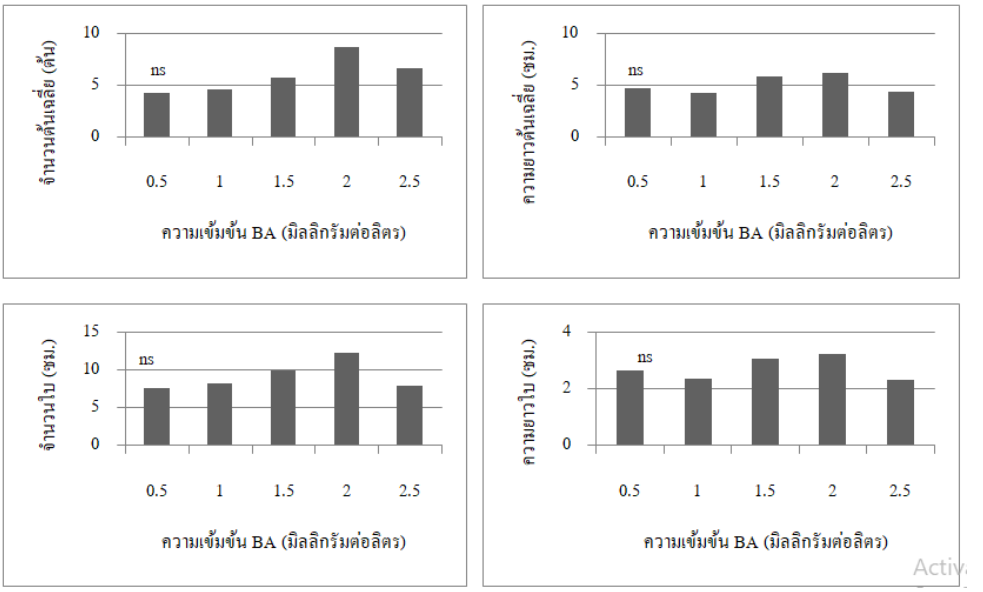
เมื่อนำแคลลัสที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 1.5 2 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 30 วัน ผลปรากฏว่าแคลลัสมีการเจริญพัฒนาไปเป็นต้น บนอาหารที่เติม BA ทุกระดับ นอกจากนี้พบว่า BA ที่ระดับแตกต่างกันมีอิทธิพลต่อความยาวของต้นและใบ ($P \leq 0.05$) โดยอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวเฉลี่ยของต้นและใบมากที่สุด อย่างไรก็ตามระดับความเข้มข้นของ BA ไม่มีอิทธิพลต่อจำนวนต้นและใบ โดยพบว่าอาหารที่เติม BA ทุกระดับความเข้มข้นให้จำนวนเฉลี่ยต้นและใบไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ผลของ BA ต่อการชักนำแคลลัสให้เป็นต้นและใบในระยะเวลา 30 วัน ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันบนกราฟแท่ง แสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกัน * ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญ ($P \leq 0.05$)

การเพิ่มจำนวนต้นข้าวจากต้นที่พัฒนามาจากแคลลัสและการออกปลูก

นำต้นข้าวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกันกับอาหารที่ใช้ชักนำแคลลัสให้เป็นต้นพบว่าอาหารทุกสูตรให้การเจริญเติบโตด้านจำนวนต้น ความยาวต้น จำนวนใบ และความยาวใบไม่แตกต่างกัน โดยอาหารที่เติม BA ปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป มีแนวโน้มทำให้จำนวนต้น ความยาวต้น จำนวนใบ และความยาวใบมากที่สุด (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ผลของ BA ต่อการเพิ่มจำนวนต้นข้าวจากต้นที่พัฒนามาจากแคลลัสในระยะเวลา 30 วัน
ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

เพาะเลี้ยงต้นข้าวที่มีอายุ 30 วัน ต่อไปบนอาหารสูตรเดิม (MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าต้นข้าวมีการเพิ่มจำนวนและสูงขึ้น มีจำนวนใบเพิ่มขึ้น และเกิดรากร่วมด้วย หลังจากนั้นจึงนำออกปลูก (ภาพที่ 5 และภาพที่ 6 A-B)

ภาพที่ 5 ต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัส แถบสีเหลืองแทนความยาว 1 เซนติเมตร

ภาพที่ 6 ต้นข้าวที่นำมาออกปลูก (A) ชักนำรากในน้ำสะอาด (B) ย้ายลงดินที่มีน้ำขังเพื่อนำไปลงแปลงปลูกต่อไป

อภิปรายผล

โดยทั่วไปแล้วการเติม auxin ในอาหารมีวัตถุประสงค์เพื่อชักนำให้เกิดการสร้างแคลลัสซึ่ง auxin มีกลไกในการทำงานโดยไปเปลี่ยนแปลงสรีรวิทยาของเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆ (tissue) ที่ถูกกำหนดให้มีหน้าที่เฉพาะแล้วทำให้กลุ่มเซลล์ของเนื้อเยื่อเหล่านั้นกลับมาอยู่ในสถานะที่ยังไม่มีหน้าที่เฉพาะ (dedifferentiation) นำไปสู่การแบ่งเซลล์ และยืดยาวของเซลล์ได้อีกครั้ง และสร้างเป็นแคลลัสขึ้นมา ดังนั้นกลุ่มเซลล์ที่ตอบสนองต่อ auxin จึงสามารถสร้างแคลลัสได้ (George, 2008) นอกจากนี้ auxin นับว่ามีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องในวัฏจักรของเซลล์อีกด้วย (Zhang & Te-Chato, 2013) จากการทดลองพบว่าอาหารทุกสูตรมีการเติม 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่ม auxin ดังนั้นเมล็ดข้าวหอมกระดังงาบนอาหารทั้งสามสูตรจึงสามารถถูกชักนำให้เกิดแคลลัสได้ สอดคล้องกับการรายงาน ของ Zhang& Te-chato (2013) ซึ่งได้กล่าวว่า ในการชักนำแคลลัสของเมล็ดข้าวหอมกระดังงานั้น อาหารที่เติม 2,4-D สามารถชักนำให้เกิดการสร้างแคลลัสได้ นอกจากนี้ MohdDin, Ahmad, Wagiran, Abd Samad, Rahmat & Sarmidi (2016) ได้กล่าวว่าเมล็ดข้าว Panderas ที่ถูกนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับการเติม 2,4-D สามารถชักนำให้สร้างแคลลัสได้มากถึง 99 % สำหรับ Mendoza & Kaeppler (2002) ได้รายงานเช่นกันว่าเมล็ดข้าวสาลี ที่เพาะเลี้ยงบนบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 4 ชนิดคือ 3,6-dichloro-o-anisic acid (dicamba); 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (picloram); 2-(2-methyl-4-chlorophenoxy) propionic acid (2-MCPP) และ 2,4-D สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้บนอาหารทุกสูตร

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าอาหารทั้งสามสูตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของเมล็ดข้าวและขนาดของแคลลัสนั้นมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเกิดจากอิทธิพลของปริมาณน้ำตาลที่แตกต่างกัน ซึ่งจากการทดลองพบว่าอาหารที่ไม่เติมน้ำตาลทรายทำให้เมล็ดข้าวสร้างแคลลัสได้น้อย ในขณะที่อาหารที่เติมน้ำตาลทราย 10 และ 20 กรัมต่อลิตร นั้นพบว่าเมล็ดข้าวถูกชักนำให้เกิดแคลลัสได้มาก ยิ่งกว่านั้นปริมาณน้ำตาลทรายที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเพิ่มขึ้นด้วย แสดงว่าปัจจัยที่ทำให้การสร้างแคลลัสบนอาหารทั้งสามสูตรต่างกันนั้นน่าจะเกิดจากอิทธิพลของน้ำตาลทรายและปริมาณที่ใช้สอดคล้องกับการทดลองของ Mendoza & Kaeppler (2002) ซึ่งได้รายงานว่า น้ำตาลมอลโทสมีอิทธิพลอย่างมากในการสร้างแคลลัสของเอ็มบริโอข้าวสาลี โดยจากการทดลองนั้นได้มีการเติมน้ำตาลมอลโทสลงในอาหารสูตร MS พบว่าแคลลัสมีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุด 394 มิลลิกรัมต่อชิ้นส่วน นอกจากนี้ Mostafiz & Agirun (2018) ได้รายงานเพิ่มเติมว่า การใช้น้ำตาลมอลโทสที่ระดับความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการสร้างแคลลัสของเมล็ดข้าวมาเลเซียสายพันธุ์ MR220, MR220-CL2, MR232, และ Bario เพิ่มมากขึ้น

สำหรับการใช้ BA ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินเพื่อชักนำให้แคลลัสเป็นต้นและเพิ่มจำนวนต้น พบว่าปริมาณ BA 2 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยส่งเสริมให้แคลลัสเจริญพัฒนาไปเป็นต้นและเพิ่มจำนวนต้นได้ดี สอดคล้องกับการรายงานของ Mostafiz & Agirun (2018) ซึ่งได้กล่าวว่า การเกิดต้นของแคลลัสที่ได้จากเมล็ดข้าวพันธุ์มาเลเซีย 4 สายพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของไซโทไคนิน ทั้งนี้เนื่องจาก BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินซึ่งมีบทบาทในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการขยายขนาดของเซลล์ (Chuenboonngarma, Charoonsotea & Bhamarapravati, 2001) เมื่อมีปริมาณความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจึงมีบทบาทไปกระตุ้นให้เกิด somatic embryogenesis และการเกิด plantlet (Rueb, Leneman, Schilperoort & Hensgens, 1994)นอกจากนี้ Abe & Futsuhara (1986) ได้รายงานว่าไคเนตินซึ่งเป็นฮอร์โมนกลุ่มไซโทไคนินมีบทบาทในการช่วยพัฒนากระบวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอจินิซิสในข้าวสายพันธุ์ Japonica โดยไคเนตินช่วยกระตุ้นกระบวนการ ไมโทซิส ไซโทไคนิซิส การสังเคราะห์โปรตีนโดยรวม การสังเคราะห์ลิกนิน กระบวนการสร้างท่อลำเลียงและการสร้างคลอโรพลาสต์ซึ่งกระบวนการเหล่านี้ล้วนส่งเสริมให้มีการเจริญพัฒนาของแคลลัสไปเป็นต้นพืช

สรุป

จากการเพาะเมล็ดข้าวหอมกระดังงาบนอาหารเติมน้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร เกิดแคลลัส 95.31% และมีเปอร์เซ็นต์การเกิด embryogenic callus สูงนอกจากนี้อาหารสูตรที่เติมน้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้แคลลัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยมากที่สุด คือ 0.54 เซนติเมตร เมื่อนำแคลลัสที่ได้มาชักนำให้เกิดต้นบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวเฉลี่ยของต้นและใบมากที่สุด และเมื่อเพิ่มจำนวนต้นจากต้นที่เกิดจากแคลลัส พบว่าอาหารที่เติม BA ทุกระดับความเข้มข้นให้จำนวนต้นไม่แตกต่างกัน

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจาก Zhang & Te-chato (2013) ได้รายงานว่าในการเพิ่มจำนวนต้นกล้าข้าวในสภาพปลอดเชื้อ หากมีการใช้ฮอร์โมนกลุ่มออกซินร่วมกับไซโทไคนินจะส่งผลให้ต้นกล้าที่ได้มีความแข็งแรง และรอดชีวิตสูงเมื่อนำไปปลูกในแปลงดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงควรศึกษาเปรียบเทียบอิทธิพลของฮอร์โมนทั้งสองกลุ่มต่อการรอดชีวิตของต้นกล้าข้าวหอมกระดังงาเมื่อนำออกปลูกในแปลง

รายการอ้างอิง (Reference)

Abe,T. & Futsuhara, Y. (1986). Genotypic variability for callus formation and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics, 72*(1), 3-10.

Chuenboonngarma, N., Charoonsotea, S. & Bhamarapravati, S. (2001). Effect of BA and 2iP on shoot proliferation and somaclonal variation of *Gardenia jasminoides* Ellis *in vitro* culture. Science Asia, 27, 137-141.

George, E.F. (2008). Plant growth regulators I:Introduction; auxins, their analogues and inhibitors. in Edwin F George, Michael A Hall andGeert-Jan (Eds.) De Klerk, *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition* (page 502). Basingstoke, UK: Springer Netherlands.

Khaopakro, S. & Krainara, P. (2018). The physical properties and nutritional values of 8 native rice varieties at Narathiwat and Yala province. *Burapa Science Journal, 23*(2), 1123-1134.

Mendoza, M.G. & Kaeppler, H.F. (2002). Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum Aestivum* L.). In Vitro Cell. Dev. *Biol.—Plant, 38*(1), 39-45.

MohdDin, A.J., Ilyas, F.I., Wagiran, A., AbdSamad, A., Rahmat, Z. & Sarmidi, M.R. (2016). Improvement of efficient in vitro regeneration potential of mature callus induced from Malaysian upland rice seed (*Oryza sativa* cv. Panderas). *Saudi Journal of Biological Sciences, 1*(23), S69–S77.

Mostafiz, S.B. & Wagiran, A. (2018). Efficient callus induction and regeneration in selected Indica Rice. *Agronomy, 8*(5), 77.

Rueb, S.,Leneman, M., Schilperoort, R.A. &Hensgens, L.A.M. (1994). Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture, 36*, 259–264.

Zhang,Y. & Te-Chato, S. (2013). Improvedplantletregeneration systemsin Indicarice (*Oryza sativa* L.) landrace HomKra DangNgah. *International Journal of Agricultural Technology, 9*(6), 1641-1654.