

การคัดเลือกพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) ทนทานต่อสภาพแล้งโดยใช้สารเคมี polyethylene glycol Selection for Drought Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.) Using Polyethylene Glycol

ประภา ศรีพิจิตต์⁽¹⁾
Prapa Sripichit

ABSTRACT

In Vitro selection of rice for drought tolerance was conducted. Embryo derived calli of aromatic rice (*Oryza sativa* L.) variety Khao Dawk Mali 105 were cultured on filter paper bridges soaked in liquid MS medium containing polyethylene glycol 6000 (PEG) at the concentrations of 0, 10, 20, 30 and 40%, respectively. It was found that calli cultured on the medium containing 10% PEG gave higher rate of survival (70.1%) than calli cultured on medium without PEG (67.9%). Rate of survival decreased when the calli were cultured on the medium containing PEG at the concentrations higher than 10%. All calli died completely when cultured on the medium containing 40% PEG. The concentration of PEG which reduced the survival rate of calli to 50% (LD_{50}) was 29.5%. The surviving calli were selected and cultured on regenerating medium. The results showed that calli survived on the medium without PEG could regenerate into plants at the frequency of 5.7%. The total number of plants regenerated was 49 plants. Calli survived on the medium containing 10% PEG gave low frequency of plant regeneration (1.3%) and only 2 plants were produced. Plant regeneration from calli survived on medium containing PEG at the concentration higher than 10% was not recovered. The total 51 R₁ plants produced were grown under greenhouse condition. At maturity the seeds were harvested and will be grown as R₂ progenies. The progenies will be tested for drought tolerance under greenhouse or field condition.

Key words: rice, drought tolerance, callus

บทคัดย่อ

ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวทนทานต่อสภาพแล้งในหลอดทดลอง โดยการนำแคลลัสที่เจริญมาจากคัพภะของข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เลี้ยงบนกระดาดชกรูปสะพาน ซึ่งจุ่มอยู่ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม polyethylene glycol 6000 (PEG) ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30 และ 40% ตามลำดับ พบว่า แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG 10% มีอัตราการรอดชีวิต (70.1%) สูงกว่าแคลลัส

ที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม PEG (67.9%) อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสลดลงเมื่อเลี้ยงแคลลัสบนอาหารที่เติม PEG ความเข้มข้นสูงกว่า 10% แคลลัสตายหมดเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG 40% ความเข้มข้นของ PEG ที่ทำให้อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสลดลง 50% (LD_{50}) มีค่าเท่ากับ 29.5% หลังจากการคัดเลือกแคลลัสที่มีชีวิตรอดอยู่ได้บนอาหารที่เติม PEG ความเข้มข้นต่างๆ แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้น พบว่า

(1) ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

Dept. of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม PEG สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ในอัตรา 5.7% จำนวนต้นที่ได้ทั้งหมด 49 ต้น แคลลัสที่ผ่านการคัดเลือกบนอาหารที่เติม PEG 10% มีอัตราการพัฒนาไปเป็นต้นต่ำ (1.3%) จำนวนต้นที่ได้ทั้งหมด 2 ต้น แคลลัสที่ผ่านการคัดเลือกบนอาหารที่เติม PEG ความเข้มข้นมากกว่า 10% ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ ปลูกลงต้นข้าว R₁ ที่ได้ทั้งหมด 51 ต้น ในเรือนปลูกพืชทดลอง เมื่อแก่เก็บเกี่ยวเมล็ดและจะนำไปปลูกเป็นลูกข้าว R₂ เพื่อทดสอบความทนทานต่อสภาพแล้งในเรือนปลูกพืชทดลองหรือแปลงนาทดลองต่อไป

คำหลัก : ข้าว การทนแล้ง แคลลัส

คำนำ

ข้าวเป็นอาหารหลักที่สำคัญที่สุดของคนไทย และเป็นสินค้าออกที่ทำรายได้ให้กับประเทศสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสินค้าออกทางการเกษตรอื่นๆ ในปีเพาะปลูก 2536/37 ประเทศไทยผลิตข้าวได้ทั้งหมด 18.5 ล้านตันข้าวเปลือก ใช้บริโภคภายในประเทศ 7.3 ล้านตันข้าวสาร และส่งออกไปจำหน่ายยังตลาดต่างประเทศ 5 ล้านตันข้าวสาร (1.5 ล้านตันข้าวเปลือกเท่ากับ 1 ล้านตันข้าวสาร) คิดเป็นมูลค่า 32,947 ล้านบาท (ศูนย์สถิติการเกษตร, 2537 ก)

การปลูกข้าวของชาวนาไทยต้องประสบกับปัญหาต่างๆ มากมาย เช่น โรคและแมลง ความแห้งแล้งสภาพดินที่ไม่เหมาะสม (ดินเค็ม ดินเปรี้ยว ดินทรายจัด) และราคาข้าวที่ตกต่ำ ฯลฯ เป็นต้น ความแห้งแล้งเป็นปัญหาที่สำคัญมากในการปลูกข้าว และนับวันจะทวีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปีเพาะปลูก 2536/37 การปลูกข้าวได้รับผลกระทบจากภาวะการขาดแคลนน้ำเป็นอย่างมาก โดยในปี 2536/37 นี้ ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมด 59.3 ล้านไร่ ปริมาณข้าวที่ผลิตได้ทั้งหมด 18.5 ล้านตันข้าวเปลือก แต่พื้นที่ปลูกและปริมาณการผลิตลดลงจากปี 2535/36 ประมาณ 1.2 ล้านไร่ และ 1.5 ล้านตันข้าวเปลือก ตามลำดับ เนื่องจากในระยะต้นฤดูนาปี เกิดภาวะฝนแล้ง และฝนทิ้งช่วงเป็นระยะเวลานาน ทำให้ผลผลิตข้าวลดลง ส่วนในฤดูนาปรังก็เกิดภาวะ

ขาดแคลนน้ำ ทำให้ไม่สามารถปลูกข้าวได้เต็มที่ โดยเฉพาะพื้นที่ที่อาศัยน้ำชลประทานจากเขื่อนภูมิพลและสิริกิติ์ได้รับผลกระทบค่อนข้างมาก (กองวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2537) ดังนั้นการพัฒนาพันธุ์ข้าวทนทานต่อความแห้งแล้งร่วมกับการพัฒนาแหล่งน้ำชลประทานจะช่วยแก้ปัญหาความเสียหายที่ต้นข้าวจะได้รับเนื่องจากความแห้งแล้ง

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชมาใช้ในการอนุรักษ์และพัฒนาพันธุ์พืชกันอย่างกว้างขวาง ซึ่งเทคนิคดังกล่าวจะช่วยทำให้ขั้นตอนการคัดเลือกพันธุ์พืชเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อช่วยทำให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถคัดเลือกพืชที่มีลักษณะที่ต้องการจากประชากรเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ และมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในเนื้อที่แคบๆ และภายใต้สภาพแวดล้อมที่เลียนแบบธรรมชาติและสม่ำเสมอ (ประภา 2532) ในข้าวได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อมาใช้ในการคัดเลือกพืชเพื่อปรับปรุงลักษณะต่างๆ หลายอย่าง เช่น ความต้านทานต่อสารพิษที่ทำให้เกิดโรคใบจุดสีน้ำตาล (Ling *et al.* 1985) โรคไหม้ (Sri Nanan and Sri Mariani 1994) ทนทานต่อดินเค็ม (Zapata and Arbio 1986) ทนแล้ง (Ketchum *et al.* 1987) และการคัดเลือกเพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนในเมล็ดให้สูงขึ้น (Schaeffer and Sharpe 1983) เป็นต้น

ในการคัดเลือกพืชให้ทนทานต่อสภาพแล้งโดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อนั้นสามารถกระทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือกลุ่มเซลล์บนอาหารที่เติมสารพวก osmoticum บางชนิด เช่น polyethylene glycol (PEG), mannitol, sucrose และ glucose เป็นต้น โดยสารเหล่านี้จะทำให้ค่า osmotic potential ของสารละลายอาหารที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ ทำให้เซลล์อยู่ในสภาพที่ขาดน้ำ (water stress) (Bressan *et al.* 1981) คัดเลือกเซลล์ที่ทนทานต่อสภาพแล้ง แล้วชักนำให้เซลล์เหล่านี้พัฒนาเป็นต้น ทดสอบความทนแล้งของต้นพืชที่ได้ตลอดจนลูกข้าวต่อๆ มา ในเรือนปลูกพืชทดลองและในสภาพไร่ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสภาพแล้ง

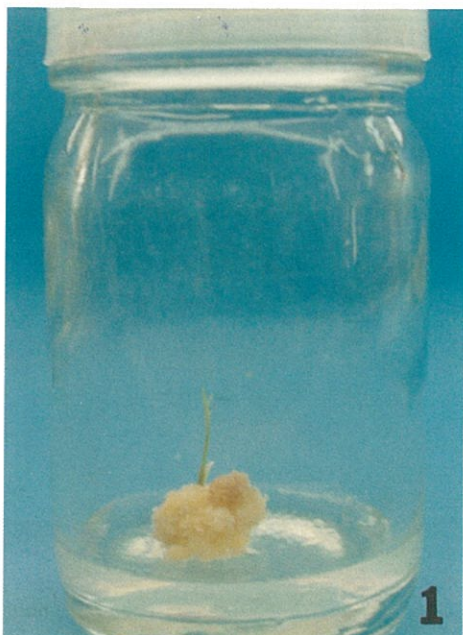


Fig 1. Embryo-derived callus of aromatic rice variety Khao Dawk Mali 105.



Fig 2. Calli were cultured on filter paper bridge soaked in MS medium containing polyethylene glycol.



Fig 3. Plant regeneration from callus survived on medium containing 10% polyethylene glycol.



Fig 4. Regenerated plants (R_1) were grown in the greenhouse.

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะพัฒนาพันธุ์ข้าวให้ทนทานต่อสภาพแล้ง โดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์ข้าวในการคัดเลือกเซลล์หรือกลุ่มเซลล์ที่ทนทานต่อการขาดน้ำในสภาพหลอดทดลอง

อุปกรณ์และวิธีการ

พันธุ์ข้าว

การทดลองครั้งนี้ได้ใช้ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวหอมที่มีคุณภาพดีที่สุดและเป็นที่ต้องการของตลาดมากที่สุด ข้าวพันธุ์นี้เป็นข้าวที่ไวต่อช่วงแสง ประมาณ 140-150 เซนติเมตร สามารถแตกกอปานกลาง ต้นและใบค่อนข้างเล็ก ใบยาวมีสีเขียวอ่อน ออกดอกประมาณวันที่ 20 ตุลาคม รวงมีขนาดปานกลาง ระบายไม่ถี่ ไม่หว่าง เมล็ดข้าวเปลือกมีสีขาวฟาง เรียวยาว เมล็ดข้าวกล้องใส เลื่อมมัน คุณภาพหุงต้มดีมาก ข้าวสุกนุ่มนวล มีกลิ่นหอม ไม่ต้านทานต่อโรคไหม้ โรคใบสีส้ม และโรคจุก ไม่ต้านทานต่อแมลงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล หนอนกอ และแมลงบัว (วรวิทย์, 2530) ให้ผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 260 กิโลกรัมต่อไร่ ในแปลงเกษตรกร (ศูนย์สถิติการเกษตร, 2537ข)

การชักนำให้คัพภะสร้างแคลลัส

นำเมล็ดข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มาแกะเปลือกออก ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยเอทานอล (ethanol) 70% นาน 2 นาที แล้วแช่ในสารละลายคลอโรกซ์ (chlorox) 10% นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 4 ครั้ง นำเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร Murashige and Skoog (1962) (MS) ที่เติม 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) 2 มก./ล. และ casein hydrolysate 300 มก./ล. น้ำตาล 3% และวุ้น 0.7% (ประภาและพรทิพย์, 2537) เก็บรักษาขวดเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวไว้ในสภาพที่มีแสง 2,000 ลักซ์ ให้ได้รับแสง 16 ชม./วัน อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. เลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้คัพภะสร้างกลุ่มเซลล์หรือแคลลัส (callus) ไว้ใช้ในการคัดเลือกต่อไป

การคัดเลือกแคลลัสที่ทนทานต่อสภาพแล้ง

นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะ (Fig. 1) มาแบ่งเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 มม. ย้ายแคลลัสที่ได้ไปเลี้ยงบนกระดาษกรองรูปสะพาน (paper bridge) ซึ่งจุ่มอยู่ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม polyethylene glycol 6000 (PEG) ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30 และ 40% (Fig. 2) เก็บรักษาขวดเพาะเลี้ยงแคลลัสไว้ในที่ที่มีสภาพ ดังกล่าวข้างต้น เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ บันทึกการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสในลักษณะต่างๆ เช่น ขนาดสี อัตราการรอดชีวิต การพัฒนาไปเป็นจุดสีเขียว (green spot) ยอดและรากของแคลลัส เพื่อประกอบการพิจารณาคัดเลือกแคลลัสที่ทนทานต่อสภาพแล้งต่อไป

การชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอด

แคลลัสที่มีชีวิตรอดบนอาหารคัดเลือกที่มี PEG ความเข้มข้นต่างๆ แบ่งออกได้เป็น 2 พวก คือ แคลลัสที่สามารถพัฒนาไปเป็นจุดสีเขียวหรือยอดได้ ขณะที่อยู่บนอาหารคัดเลือก และแคลลัสที่ไม่สามารถพัฒนาไปยอด นำแคลลัสที่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดไปพักไว้ในจานแก้วที่มีฝาปิด (petridish) เป็นเวลานาน 1 สัปดาห์ เพื่อนำให้แคลลัสแห้ง (dehydration) ซึ่งจะช่วยให้อัตราการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสเพิ่มขึ้น (ประภา และ พรทิพย์, 2537) ย้ายแคลลัสที่แห้งแล้วไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม indoleacetic acid (IAA) 1 มก./ล. และ benzyladenine (BA) 4 มก./ล. น้ำตาล 3% และวุ้น 0.7% (ประภา และ พรทิพย์, 2537) วางไว้ในที่ที่มีสภาพดังกล่าวข้างต้นเป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอด ส่วนแคลลัสที่พัฒนาไปเป็นจุดสีเขียว หรือยอดเล็กๆ ในขณะที่อยู่บนอาหารคัดเลือก ก็ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นทันที โดยไม่มีการทำให้แคลลัสแห้งก่อน ทั้งนี้เพื่อชักนำให้จุดสีเขียวหรือยอดเล็กๆ ที่เกิดขึ้นมีการเจริญเติบโตเป็นยอดที่สมบูรณ์และแข็งแรง

การชักนำให้ยอดสร้างราก

นำยอดที่พัฒนามาจากแคลลัสที่มีชีวิตรอดบนอาหารคัดเลือก ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่

ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้ยอดสร้างราก (ประภา และ พรทิพย์ 2537) เมื่อได้ต้นข้าว (R_1) ที่สมบูรณ์แล้ว จึงย้ายออกปลูกลงดินในกระถางภายใต้สภาพเรือน ปลูกพืชทดลอง โดยปลูกต้นละหนึ่งกระถาง ดูแลรักษา จนกระทั่งออกดอกและเก็บเกี่ยวเมล็ดไว้ใช้ปลูก ทดสอบการทนทานต่อสภาพแล้งของลูกข้าว R_2 ใน เรือนปลูกพืชทดลองหรือในแปลงนาทดลองต่อไป

ผลการทดลองและวิจารณ์

การคัดเลือกแคลลัสที่ทนทานต่อสภาพแล้ง

ในการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่เจริญมาจากคัพภะ ของข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในอาหารเหลว สูตร MS ที่เติม PEG ความเข้มข้นต่างๆ (0, 10, 20, 30 และ 40%) นั้น PEG ซึ่งเป็นสารพวก osmoticum ชนิดหนึ่งจะทำให้หน้าที่ลด osmotic potential ของอาหารเหลวที่อยู่ล้อมรอบแคลลัส ทำให้แคลลัส อยู่ในสภาพที่ขาดน้ำ (Bressan *et al.* 1981)

ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหาร เหลวที่มี PEG นาน 4 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสที่เลี้ยง บนอาหารที่เติม PEG 10% มีอัตราการรอดชีวิต (70.1%) สูงกว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม PEG (67.9%) (Table 1) ผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับการทดลองของ Handa *et al.* (1983) ซึ่ง พบว่าเซลล์แขวนลอยหลายสายพันธุ์ของมะเขือเทศ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี PEG ความเข้มข้นต่ำๆ

(5%) ให้น้ำหนักสดของเซลล์สูงกว่าเซลล์แขวน ลอยที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม PEG

อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสลดลงตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารที่เติม PEG ความเข้มข้นสูงกว่า 10% ขึ้นไป แคลลัสตายหมด (0%) เมื่อเลี้ยง บนอาหารที่เติม PEG ความเข้มข้นสูงสุด (40%)

จากการคำนวณโดยเปรียบเทียบกับแคลลัสที่ เลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม PEG พบว่าความเข้มข้นของ PEG ที่ทำให้อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) มีค่าเท่ากับ 29.5% (Fig. 5) ขนาดของแคลลัสลดลงเมื่อความเข้มข้นของ PEG เพิ่มขึ้น ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการทดลองของ Handa *et al.* (1983) ที่พบว่าในการเพาะเลี้ยงเซลล์ แขวนลอยบางสายพันธุ์ของมะเขือเทศ ภายหลังจาก การเพาะเลี้ยงไประยะหนึ่งน้ำหนักสดของเซลล์จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ PEG ในอาหารเพิ่มขึ้น

ในการทดลองครั้งนี้มีสิ่งที่น่าสนใจอย่าง หนึ่ง คือแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม PEG หรือเติม PEG ความเข้มข้นต่างๆ สามารถพัฒนาไป เป็นจุดสีเขียว ยอด และรากได้ทันทีโดยไม่ต้องย้าย แคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นก่อน ซึ่ง ถ้ายอดที่เกิดขึ้นสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ ก็ จะช่วยย่นระยะเวลาในการชักนำให้แคลลัสที่ทนทาน ต่อสภาพแล้งพัฒนาไปเป็นต้นได้ แคลลัสที่เพาะเลี้ยง บนอาหารที่เติม PEG 10% สามารถพัฒนาไปเป็นราก (36.2%) และยอด (7.8%) ได้ในอัตราที่สูงกว่า แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม PEG ซึ่งสามารถ

Table 1. Morphogenetic response of embryo-derived calli cultured on MS medium supplemented with various concentraions of polyethylene glycol 6000 (PEG) 4 weeks after culture initiation.

PEG %	No. of calli cultured	No. of surviving calli (%)	Size of callus ¹⁾	No. of Calli forming		
				root (%)	green spots (%)	shoots (%)
0	134	67.9	7.0	35.8	29.1	3.0
10	141	70.1	6.1	36.2	9.9	7.8
20	119	56.3	3.5	2.5	5.9	0.8
30	120	32.5	2.8	0	0	0
40	150	0.0	2.1	0	0	0

1) Size of callus : 1 = very small, 3 = small, 5 = medium, 7 = large, 9 = very large

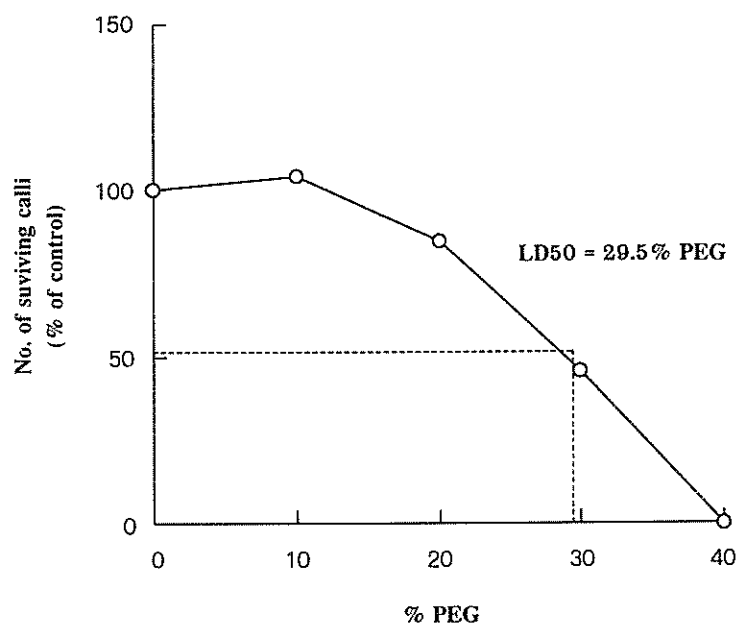


Fig 5. Effect of polyethylene glycol (PEG) on the number of surviving calli expressed as percent of control (0 % PEG).

Table 2 Plant regeneration from embryo-derived calli cultured on MS medium supplemented with various concentraion of polyethylene glycol 6000 (PEG).

PEG (%)	No. of				
	calli cultured	surviving calli (%)	calli forming shoots (%)	total shoots	shoots per callus
0	70	52.9	5.7	49	12.3
10	75	78.7	1.3	2	2.0
20	95	50.0	0	0	0
30	80	18.8	0	0	0
40	70	0	0	0	0

พัฒนาไปเป็นราก 35.8% และยอด 3.0% อัตราการ
พัฒนาไปเป็นรากและยอดลดลงอย่างมากเมื่อเลี้ยง
แคลลัสบนอาหารที่เติม PEG ความเข้มข้นสูงกว่า 10%
ขึ้นไป คัดเลือกแคลลัสที่มีชีวิตรอดอยู่ได้บนอาหาร
ที่เติม PEG ความเข้มข้นต่างๆ

การพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสที่ผ่านการ คัดเลือก

แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม PEG
หรือเติม PEG ความเข้มข้นต่ำๆ บางแคลลัส ซึ่งรอดชีวิต
สามารถพัฒนาไปเป็นจุดสีเขียว ยอดและรากได้ แต่
ยอดที่ได้มีขนาดเล็กมาก จึงได้ย้ายแคลลัสตั้ง

กล่าวไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดขึ้นอีกครั้ง
หนึ่ง เพื่อชักนำให้จุดสีเขียวพัฒนาเป็นยอดและยอด
เล็กๆ เจริญเป็นยอดที่มีขนาดใหญ่และแข็งแรง

ผลการทดลองพบว่า ภายหลังจากการเพาะ
เลี้ยงไปนาน ประมาณ 2 สัปดาห์ จุดสีเขียวบนแคลลัส
ค่อยๆ จางหายไป ส่วนยอดที่เกิดขึ้นก็ค่อยๆ เปลี่ยน
จากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลและตายไปในที่สุด ส่วนแคล
ลัสที่มีชีวิตรอดอยู่ได้บนอาหารที่เติม PEG ความ
เข้มข้นต่างๆ แต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นจุดสีเขียว
ยอดหรือรากได้ ก็ย้ายแคลลัสดังกล่าวไปพักในจานแก้ว
ที่มีฝาปิดเป็นเวลานาน 1 สัปดาห์ก่อน แล้วจึงย้าย

ไปเลี้ยงบนสูตรชักนำให้เกิดต้น พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม PEG สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ในอัตรา 5.7% (Table 2) แต่ละแคลลัสมียอดเกิดขึ้นเฉลี่ย 12.3 ยอด แคลลัสที่ผ่านการคัดเลือกบนอาหารที่เติม PEG 10% มีอัตราการพัฒนาไปเป็นยอดต่ำเพียง 1.3% แต่ละแคลลัสมียอดเกิดขึ้นเฉลี่ย 2 ยอดเท่านั้น (Fig.3) ส่วนแคลลัสที่ผ่านการคัดเลือกบนอาหารที่เติม PEG 20 และ 30% ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ หรือมีอัตราการเกิดยอด 0% สำหรับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG 40% ตายหมด ไม่มีแคลลัสที่รอดชีวิต ซึ่งสามารถนำไปชักนำให้เกิดต้นได้

จะเห็นได้ว่า ในการคัดเลือกข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ทนแล้ง โดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารที่เติม PEG 10% เท่านั้นที่เซลล์ซึ่งรอดชีวิตสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ อย่างไรก็ตามอัตราการพัฒนาไปเป็นต้นต่ำมากเพียง 1.3% ยิ่งกว่านั้นแคลลัสที่ผ่านการคัดเลือกบนอาหารที่มี PEG สูงกว่า 10% ขึ้นไปไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ในทำนองเดียวกัน Ketchum *et al.* (1987) ได้คัดเลือกพันธุ์ข้าวทนแล้งโดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารที่มี PEG ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.5% และสามารถชักนำให้แคลลัสที่มีชีวิตรอดบนอาหารคัดเลือกพัฒนาเป็นต้นได้ 6 ต้น ในข้าวพันธุ์ Pokkali และ 2 ต้นจากพันธุ์ Giza 159 ซึ่งจำนวนต้นที่ได้้น้อยมากเช่นกัน

โดยปกติในการคัดเลือกพืชในระดับเซลล์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือเซลล์พืชนั้น มักจะประสบกับปัญหาเกี่ยวกับเซลล์ที่ทนทานหรือมีชีวิตรอดจากการคัดเลือกไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้น หรือพัฒนาไปเป็นต้นในอัตราที่ต่ำมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในระหว่างขั้นตอนการคัดเลือกเซลล์ถูกเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เป็นเวลานาน (Sarma and Rao 1991) จนทำให้เกิดความผิดปกติของยีนและโครโมโซม (Evans *et al.* 1984, Ling 1987) ซึ่งมีผลทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้น (totipotency)

ต้นข้าว R₁ ที่พัฒนามาจากแคลลัสที่ทนทานต่อสภาพแล้ง

ยอดที่เจริญมาจากแคลลัสที่ทนทานต่อสภาพแล้ง เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถสร้างรากได้ 100% เมื่อได้ต้นข้าว R₁ ที่สมบูรณ์แล้วจึงย้ายออกปลูกในกระถางภายใต้สภาพเรือนปลูกพืชทดลอง (Fig.4) โดยแคลลัสที่ผ่านการคัดเลือกบนอาหารที่เติม PEG 10% สามารถพัฒนาเป็นต้นข้าว R₁ ที่สมบูรณ์ได้เพียง 2 ต้นเท่านั้น (Table 2) ส่วนอีกจำนวน 49 ต้นพัฒนามาจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม PEG ดูแลรักษาจนกระทั่งต้นข้าวออกดอก เมื่อแก่เก็บเกี่ยวเมล็ดจากต้น R₁ จากนั้นจะนำไปปลูกเป็นลูกข้าว R₂ และทดสอบการทนทานต่อสภาพแล้งในเรือนปลูกพืชทดลองหรือในแปลงนาทดลองต่อไป โดยควบคุมให้ต้นข้าวขาดน้ำในระยะต่างๆ ของการเจริญเติบโต ได้แก่ ระยะกล้า ระยะตั้งท้อง และระยะออกรวงเป็นต้น

สรุป

ในการปรับปรุงข้าวหอมพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ทนทานต่อสภาพแล้งโดยการคัดเลือกแคลลัสที่มีชีวิตรอดบนอาหารที่มี PEG ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสลดลงเมื่อความเข้มข้นของ PEG ในอาหารเพิ่มขึ้นจาก 10 เป็น 30% แคลลัสตายหมดที่ความเข้มข้นของ PEG 40% แคลลัสที่รอดชีวิตบนอาหารที่ไม่เติม PEG และเติม PEG 10% เท่านั้นที่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ แต่อัตราการพัฒนาไปเป็นต้นต่ำมาก ดังนั้นความเข้มข้นของ PEG ที่เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกแคลลัสที่ทนทานต่อสภาพแล้ง ไม่ควรสูงกว่า 10% ถ้าสูงกว่านี้แคลลัสที่รอดชีวิตจะไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้

เอกสารอ้างอิง

- กองวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2537. สรุปสถานการณ์การผลิต การตลาด ผลผลิตผลเกษตรปี 2537 และคาดคะเน แนวโน้มปี 2538. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ. หน้า 1.
- ประภา ศรีพิจิตร. 2532. เทคโนโลยีชีวภาพกับการปรับปรุง พันธุ์พืช. ว. วิทย. กษ. 20 : 461-473.
- ประภา ศรีพิจิตร และ พรทิพย์ ชีวะเศรษฐกรรม. 2537. การ พัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสที่เจริญมาจาก คัพภะของ ข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 28 : 27-37.
- วรวิทย์ พานิชพัฒน์. 2530. ข้าวหอมขาวดอกมะลิ 105 บั ส- มาติและอื่นๆ โครงการดำราชาวบ้าน มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 45 หน้า.
- ศูนย์สถิติการเกษตร. 2537 ก. สถิติการเกษตรของประเทศ ไทย ปีเพาะปลูก 2536/37 สำนักงานเศรษฐกิจการ เกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ. หน้า 138-141.
- ศูนย์สถิติการเกษตร. 2537 ข. รายงานผลการสำรวจข้าวนาปี รายจังหวัด ปีเพาะปลูก 2535/36 สำนักงานเศรษฐกิจ การเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ. หน้า 61.
- Bressan, R.A., P.M. Hasegawa and A.R. Handa. 1981. Resistance of cultured higher plant cells to polyethylene glycol induced water stress. *Plant Sci. Lett.* 21 : 23-30.
- Evans, D.A., W.R. Sharp and H.P. Medina-Filho. 1984. Somaclonal and gametoclonal variation. *Amer. J. Bot.* 71 : 759-774.
- Handa, A.K., R.A. Bressan, S. Handa and P.M. Hasegawa. 1983. Clonal variation for tolerance to polyethylene glycol-induced water stress in cultured tomato cells. *Plant Physiol.* 72 : 645-653.
- Ketchum, J.L.F., O.L. Gamborg, G.E. Hanning and M.W. Nabors. 1987. Tissue Culture for Crop Project Progress Report. Colorado State University. Fort Collins, Colorado. p.24.
- Ling, D.H. 1987. A quintuple reciprocal translocation produced by somaclonal variation in rice. *Cereal Res. Comm.* 15 : 5-12.
- Ling, D.H., P. Vidhyaseharan, E.S. Borromeo, F.J. Zapata and T.W. Mew. 1985. *In vitro* screening of rice germplasm to brown spot disease using phytotoxin. *Theor. Appl. Genet.* 71 : 133-135.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.
- Sarma, N.P. and G.J.N. Rao. 1991. Tissue culture in rice improvement. *Oryza* 28 : 283-294.
- Schaeffer, G.W. and F.T. Sharpe, Jr. 1983. Improve rice proteins in plant regenerated from S-AEC tolerant callus. *In Proceedings of a Workshop on Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improve- ment.* Science Press, Beijing. p. 279-290.
- Sri Nanan, W. and T. Sri Mariani. 1994. *In vitro* selection and production of rice plantlets tolerant to picolinic acid. *In Seven Meeting of the International Program on Rice Biotechnology.* May 16-20, 1994. Bali. p. 299.
- Zapata, F.J. and E.M. Abrigo. 1986. Plant regeneration and screening from long-term NaCl-stressed rice callus. *IRRN* 11 : 24-25.