

ผลของ 2,4-D และ kinetin ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าว พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และปทุมธานี 1

Effect of 2,4-D and Kinetin on Callus Induction in Rice Varieties: Khao Dawk Mali 105 and Pathumthani 1

ยงศักดิ์ ขจรผดุงกิตติ* และอัญชลี จาละ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Yongsak Kachonpadungkitti* and Anchalee Jala

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

การชักนำให้เกิดแคลลัสจากเมล็ดข้าว 2 พันธุ์ คือ ขาวดอกมะลิ 105 และปทุมธานี 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS และสูตรดัดแปลง N6 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารสูตรดัดแปลง MS และ N6 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการเจริญเติบโตและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สูตรอาหารที่ให้ผลดีที่สุด ในพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 คือ สูตรอาหารดัดแปลง MS และ N6 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนพันธุ์ปทุมธานี 1 คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.0-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และในสูตรอาหารดัดแปลง N6 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.0-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่ได้มีลักษณะร่วนวบน้ำและลักษณะรวมเป็นกลุ่มก้อนจับตัวกันแน่น

คำสำคัญ : 2,4-D; 2,4-dichlorophenoxy acetic acid; แคลลัส; พันธุ์ข้าว; ขาวดอกมะลิ 105; ปทุมธานี 1

Abstract

Callus induction in 2 cultivars of rice, Khao Dawk Mali 105, Pathumthani 1 which cultured on modified Murashige and Skoog (MS) medium and modified N6 supplemented with 1 and 2 mg/l 2,4-D and 0.1-0.5 mg/l kinetin. It was found that synthetic modified medium MS and N6 supplemented with growth regulator were significance different ($p \leq 0.05$). The best synthetic medium MS and N6 supplemented with 2 mg/l 2,4-D and 0.1-0.5 mg/l kinetin gave the highest growth in Khao Dawk Mali 105 and supplemented with 1-2 mg/l 2,4-D and 0.0-0.5 mg/l kinetin gave the highest growth in

Pathumthani 1. Nevertheless, N6 with 2 mg/l 2,4-D and 0.0-0.5 mg/l kinetin, gave the highest callus formation in Pathumthani 1. Two morphological characteristics, friable and compact ones, were observed.

Keywords: 2,4-D; 2,4-dichlorophenoxy acetic acid; callus; rice cultivar; Khao Dawk Mali 105; pathumthani 1

1. คำนำ

ข้าวเป็นธัญพืชที่มีความสำคัญต่อวิถีชีวิตของคนไทย เป็นอาหารหลักและเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญในอันดับต้น ๆ โดยเฉพาะข้าวหอมมะลิงานวิจัยด้านการปรับปรุงข้าวหอมมะลิให้เจริญเติบโตได้ในพื้นที่ดินเค็ม (Moeljopawiro *et al.*, 1981) ซึ่งพบในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยจึงมีความสำคัญมาก เนื่องจากปัญหาพื้นที่ดินเค็มได้ทวีความรุนแรงมากขึ้น การผสมพันธุ์ข้าวหอมมะลิกับข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ทนเค็มเป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหา (ประภาและพรทิพย์, 2537) แต่เป็นวิธีที่ใช้เวลานานและพันธุ์ข้าวลูกผสมที่ได้มีลักษณะสำคัญบางอย่างสูญเสียไป (ประดิษฐ์, 2537) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีที่สามารถทำให้ประสบความสำเร็จได้เร็วขึ้นอย่างไรก็ตาม เซลล์ของพืชใบเลี้ยงเด็ยนั้นค่อนข้างที่จะเพาะเลี้ยงยาก (Torres, 1989) และประสบความสำเร็จได้ในพืชบางชนิดเท่านั้น (พิจิกา, 2545) ข้าวเป็นพืชใบเลี้ยงเด็ยเช่นกัน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงทำให้ได้เนื้อเยื่อปริมาณมากและมีคุณภาพเพื่อนำมาทดสอบลักษณะทางพันธุกรรม (พรทิพย์, 2537) และคัดเลือกเซลล์เพื่อขยายพันธุ์ให้ได้ต้นพันธุ์ที่ดีเป็นจำนวนมาก โดยสามารถทำได้โดยขยายเซลล์ (แคลลัส) ให้ได้จำนวนมาก ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาและพัฒนาหาลักษณะของสภาวะที่เหมาะสมกับการกำเนิดและเพิ่มจำนวนแคลลัสในข้าว ซึ่งเป็นที่มาของการวิจัยในครั้งนี้

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 เมล็ดพันธุ์ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และปทุมธานี 1

2.2 อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962) และสูตร N6 (Chu, 1975)

2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโต : 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) และ kinetin

2.4 จานแก้ว (petri dish) และขวดแก้ว

2.5 เตรียมอาหารดัดแปลงสูตร MS และ N6 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข้อ 2.3) ความเข้มข้นต่าง ๆ

2.6 การชักนำแคลลัสจากเมล็ดข้าวและต้นข้าวในอาหารสังเคราะห์สูตรต่าง ๆ โดย

2.6.1 แกะเปลือกเมล็ดข้าวทั้ง 2 พันธุ์ออกให้เหลือแต่เมล็ดข้าวสมบูรณ์ที่ยังมีส่วนของเอมบริโอและเอนโดสเปิร์มอยู่ครบ

2.6.2 นำเมล็ดข้าวที่แกะเปลือกแล้ว จุ่มฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 % เป็นเวลานาน 1 นาที ตามด้วยสารละลายคลอโรกซ์ 5 % ที่หยด Tween 20 ปริมาณ 2-3 หยด แล้วนำไปแช่ด้วยเครื่องเขย่าข้ามคืน จากนั้นนำมาฟอกด้วยสารละลายคลอโรกซ์ 30 % นาน 30 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แต่ละครั้งนาน 5 นาที จนหมดฟอง แล้วนำไปแช่อย่างต่อเนื่องในน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง

2.6.3 นำเมล็ดข้าวที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว (จากข้อ 2.6.2) และต้นข้าวอ่อน (embryo) ในสภาพที่ปลอดเชื้อมาวางเลี้ยงบนอาหารดัดแปลงสูตร MS

และสูตร N6 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันเพื่อชักนำแคลลัสดังนี้

สูตรอาหารดัดแปลง MS และ N6 ที่ปราศจากฮอร์โมน (control)

(1) สูตรอาหารดัดแปลง MS และสูตร N6 แต่ละสูตรเติม kinetin 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร

(2) สูตรอาหารดัดแปลง MS และสูตร N6 แต่ละสูตรเติม kinetin 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร

(3) สูตรอาหารดัดแปลง MS และสูตร N6 แต่ละสูตรเติม 2,4-D 1 มิลลิกรัม/ลิตร

(4) สูตรอาหารดัดแปลง MS และสูตร N6 แต่ละสูตรเติม 2,4-D 1 มิลลิกรัม/ลิตร และ kinetin 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร

(5) สูตรอาหารดัดแปลง MS และสูตร N6 แต่ละสูตรเติม 2,4-D 1 มิลลิกรัม/ลิตร และ kinetin 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร

(6) สูตรอาหารดัดแปลง MS และสูตร N6 แต่ละสูตรเติม 2,4-D 2 มิลลิกรัม/ลิตร

(7) สูตรอาหารดัดแปลง MS และสูตร N6 แต่ละสูตรเติม 2,4-D 2 มิลลิกรัม/ลิตร และ kinetin 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร

(8) สูตรอาหารดัดแปลง MS และสูตร N6 แต่ละสูตรเติม 2,4-D 2 มิลลิกรัม/ลิตร และ kinetin 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร

ทุกสูตรอาหาร (MS และ N6) เติม picloram 1 มิลลิกรัม/ลิตร และ sucrose 3 %

2.6.4 ย้ายเปลี่ยนต้นอ่อนลงอาหารสูตรเดิม (subculture) เพื่อเพิ่มจำนวนแคลลัสในสารอาหารสำหรับพัฒนาแคลลัสทุก ๆ สัปดาห์

2.7 การเก็บผลและวิเคราะห์ผลการวิจัย

2.7.1 วัดการพัฒนาของแคลลัสโดยการนับจำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้นและติดอัตราการเกิดแคลลัสจากสูตร อัตราการเกิดแคลลัส (%) = (จำนวนเมล็ดข้าวที่เกิดแคลลัส ÷ จำนวนเมล็ดข้าวที่เพาะเลี้ยง) x 100

2.7.2 วัดขนาดของแคลลัสเฉลี่ย

2.7.3 ให้คะแนนลักษณะการเกิดก้อน

แคลลัสบนอาหารที่คัดเลือก โดยคะแนนนี้ได้มาจากการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสบนอาหารคัดเลือก มีลักษณะการเปลี่ยนแปลง 5 แบบ จึงกำหนดให้แต่ละแบบแทนระดับคะแนน ได้แก่ 5 = แคลลัสมีสีขาวหรือสีเหลืองครีมทั้งก้อน 4 = แคลลัสมีสีเหลืองครีมคล้ำกว่าปกติ 3 = แคลลัสมีสีเหลืองครีมแต่มีบางส่วนที่เป็นสีน้ำตาลหรือดำน้อยกว่า 50 % 2 = แคลลัสมีสีเหลืองครีมแต่มีบางส่วนที่เป็นสีน้ำตาลหรือดำ 50 % และ 1 = แคลลัสมีสีเหลืองครีมแต่มีบางส่วนที่เป็นสีน้ำตาลหรือดำมากกว่า 50 %

2.8 วางแผนการทดลองแบบ 2 x 3 x 3 factorial in CRD (complete randomized design) จำนวน 5 ซ้ำ โดยมีปัจจัยที่ 1 คือ สูตรอาหาร ปัจจัยที่ 2 คือ ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทออกซิน (2,4-D) ปัจจัยที่ 3 คือ ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโทไคนิน (kinetin) โดยใช้โปรแกรม SPSS ในการวิเคราะห์ผลการเจริญเติบโตของเซลล์

3. ผลการวิจัย

3.1 การชักนำแคลลัสจากเมล็ดข้าวและต้นข้าวในอาหารชักนำสูตรต่าง ๆ

เมื่อนำเมล็ดข้าว 2 พันธุ์ คือ ข้าวดอกมะลิ 105 และปทุมธานี 1 มาชักนำให้เจริญเป็นแคลลัสบนอาหารสูตร MS และ N6 ดัดแปลงที่เติม picloram 1 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำตาลซูโครส 3 % และมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-D และ kinetin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ในอาหารสูตรที่ไม่มีการเติม 2,4-D จะไม่มีการสร้างแคลลัส แต่มีการเจริญเป็นต้นและราก แต่เมล็ดข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่ามีการพัฒนาเจริญเป็นแคลลัสได้ดี

(ตารางที่ 1) โดยในสัปดาห์แรกเมล็ดข้าวจะเกิดยอด เวลา 2 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น
อ่อนสีเขียวและเริ่มสร้างแคลลัสสีขาวฟูที่บริเวณ และมีลักษณะเกาะกันแน่นมีสีขาวและเหลืองอ่อน
คัพภะใกล้กับฐานยอดอ่อน และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็น (รูปที่ 1)

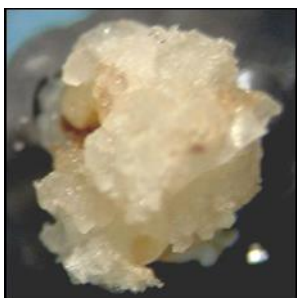
ตารางที่ 1 อัตราการเกิดแคลลัส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัส และคะแนนลักษณะแคลลัสของข้าวพันธุ์
ขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารสูตร MS และ N6 เติม 2,4-D และ kinetin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

สูตรอาหาร	2,4-D (มก./ล.)	Kinetin (มก./ล.)	อัตราการเกิด แคลลัส (%)	ขนาดความกว้าง ของแคลลัส (ซม.)	คะแนนลักษณะ แคลลัส (คะแนน)
MS	0	0	0.0±0.0f	0.0±0.00f	0.0±0.00e
		0.1	0.0±0.0f	0.0±0.00f	0.0±0.00e
		0.5	0.0±0.0f	0.0±0.00f	0.0±0.00e
	1	0	10.0±70.0de	0.0±0.31d	0.0±2.18cd
		0.1	8.8±76.7bc	0.0±0.37bc	0.0±2.39cd
		0.5	6.7±63.3e	0.0±0.24e	0.0±2.33cd
	2	0	3.3±73.3cd	0.0±0.23e	0.0±1.27de
		0.1	8.8±83.3ab	0.0±0.37bc	0.4±2.93bc
		0.5	0.0±100.0a	0.0±0.57a	0.3±4.70a
N6	0	0	0.0±0.0f	0.0± 0.0f	0.0± 0.0c
		0.1	0.0±0.0f	0.0± 0.0f	0.0± 0.0c
		0.5	0.0±0.0f	0.0 ±0.0f	0.0 ±0.0c
	1	0	80.0±10.0bc	0.41± 0.0bc	2.72 ±0.0bc
		0.1	73.3± 3.3cd	0.35± 0.0cd	2.67± 0.0bc
		0.5	63.3± 3.3e	0.33 ±0.0cd	3.31± 0.0bc
	2	0	93.3 ±3.3ab	0.38± 0.0bc	2.31± 0.0cd
		0.1	90.0 ±5.7ab	0.45 ±0.0b	3.9± 0.0ab
		0.5	86.7± 6.7ab	0.41 ±0.0bc	3.37± 0.0bc
2,4-D			**	**	**
kinetin			ns	*	**
ระหว่างสูตรอาหาร			ns	*	ns

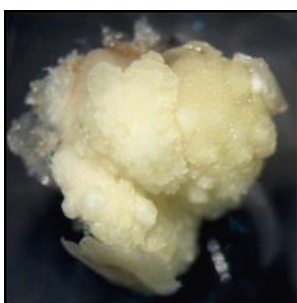
a b c d e f ในแถวเดียวกันเป็นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey test ที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

**แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %



2,4-D 1 mg/l



2,4-D 2 mg/l

รูปที่ 1 ลักษณะแคลลัสสีขาวฟูในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังเพาะเลี้ยงนาน 1 สัปดาห์

จากตารางที่ 1 ศึกษาปฏิกริยาระหว่าง 2,4-D และ kinetin ในสูตรอาหารที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่ามีผลต่อลักษณะของแคลลัสและขนาดของแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญ โดยสูตรอาหาร MS สามารถสร้างแคลลัสให้มีขนาดใหญ่มากที่สุด เมื่อเติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้ขนาดของแคลลัสเท่ากับ 0.57 เซนติเมตร และคะแนนลักษณะแคลลัสเท่ากับ 4.7 คะแนน รองลงมาคือสูตรอาหาร N6 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้ขนาดของแคลลัสเท่ากับ 0.45 เซนติเมตร และคะแนนลักษณะแคลลัสเท่ากับ 3.90 คะแนน ขณะที่สูตรอาหารที่ให้ผลน้อยที่สุดคือสูตรอาหารดัดแปลง MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1

มิลลิกรัม/ลิตร และ kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ให้ขนาดของแคลลัสเท่ากับ 0.24 เซนติเมตร และคะแนนลักษณะแคลลัสเท่ากับ 2.33 คะแนน อย่างไรก็ตาม ชนิดของอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสนั้น เมื่อเปรียบเทียบค่าที่ได้ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งเช่นเดียวกับคะแนนลักษณะของแคลลัสนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่การเกิดแคลลัสและมีขนาดต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหาร (MS และ N6) และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตส่งผลให้การเจริญของแคลลัสมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อศึกษาอิทธิพลสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ละลายอยู่ในอาหารสังเคราะห์ ในข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (ตารางที่ 2) จากปัจจัยเดียวพบว่าสูตรอาหาร MS มีอิทธิพลต่อการเพิ่มขนาดของแคลลัส ขณะที่เมื่อพิจารณาอิทธิพลจาก 2,4-D พบว่ามีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส ขนาดของแคลลัส และคะแนนลักษณะของแคลลัสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p \leq 0.01$) อาหารสูตร MS และ N6 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลมากที่สุดถึง 94.0 % ในการสร้างแคลลัส ซึ่งค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในแคลลัสที่ได้จากสูตร MS และ N6 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.0-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 2) ขณะที่อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.0-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้แคลลัสที่ได้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 เซนติเมตร และให้คะแนนลักษณะของแคลลัส 4.1 คะแนน ซึ่งค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนอาหารที่เติม kinetin เพียงอย่างเดียวพบว่ามีอิทธิพลต่อลักษณะของแคลลัสเท่านั้น ซึ่งจากการวิจัยแสดงให้เห็นผลที่ดีที่สุดในการชักนำแคลลัสของเมล็ดข้าวพันธุ์

ปทุมธานี 1 คือ สูตรอาหาร MS และ N6 ที่เติม 2,4- ความเข้มข้น 0.0-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
D ความเข้มข้น 1-2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ kinetin

ตารางที่ 2 อัตราการเกิดแคลลัส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัส และคะแนนลักษณะแคลลัสของข้าวพันธ์
ปทุมธานี 1 บนอาหารสูตร MS และ N6 ที่เติม 2,4-D และ kinetin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หลัง
เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

สูตรอาหาร	2,4-D (มก./ล.)	Kinetin (มก./ล.)	อัตราการเกิด แคลลัส (%)	ขนาดความกว้าง ของแคลลัส (ซม.)	คะแนนลักษณะ แคลลัส (คะแนน)
MS	0.0	0	10.0±7.7bc	0.0±0.0b	0.2±0.2cd
		0.1	0.0±0.0c	0.0±0.0b	0.0±0.0d
		0.5	16.0±8.1bc	0.0±0.0b	1.1±0.7c
	1.0	0	84.0±2.4a	0.2±0.0a	4.1±0.1ab
		0.1	80.0±4.5a	0.2±0.0a	3.8±0.3ab
		0.5	80.0±5.5a	0.2±0.0a	3.5±0.3ab
	2.0	0	94.0±0.2a	0.2±0.0a	4.4±0.4a
		0.1	80.0±5.5a	0.2±0.0a	3.9±0.2ab
		0.5	80.0±8.4a	0.2±0.0a	4.3±0.2a
N6	0.0	0	16.0 ±13.6bc	0.0±0.0b	0.5±0.4cd
		0.1	8.0±8.0c	0.0±0.0b	0.2±0.2cd
		0.5	24.015.0bc	0.0±0.0b	0.9±0.5cd
	1.0	0	78.0±.4.9b	0.2±0.0a	4.2±0.3a
		0.1	76.0±5.1 b	0.1±0.0a	3.4±0.2b
		0.5	84.0±5.1a	0.2±0.0a	3.3±0.1b
	2.0	0	94.0±4.0a	0.2±0.0a	4.3±0.2a
		0.1	88.0±5.8a	0.2±0.0a	3.9±0.4ab
		0.5	92.0±3.7a	0.2±0.0a	3.7±0.2ab
2,4-D			**	**	**
kinetin			ns	ns	*
ระหว่างสูตรอาหาร			ns	ns	ns

a b c d e f ในแถวเดียวกันเป็นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey test ที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

**แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

จากตารางที่ 2 ในข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 พบว่าทั้งเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส ขนาดของแคลลัส และคะแนนลักษณะของแคลลัสตอบสนองต่อความเข้มข้นของ 2,4-D อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) โดยพบว่าในอาหารสูตร MS และ N6 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตร จะให้ผลที่ดีที่สุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสมากที่สุดถึง 94 % มีขนาดของแคลลัสเฉลี่ยที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 เซนติเมตร และให้คะแนนลักษณะของแคลลัสมากที่สุดที่ 4.4 คะแนน และเนื้อเยื่อข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ N6 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติทั้งเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส ขนาดของแคลลัส และคะแนนลักษณะของแคลลัส

4. วิจารณ์

การศึกษาอิทธิพลของ 2,4-D ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสข้าวจากเมล็ดบนอาหารสูตร MS และ N6 ทำให้จำนวนแคลลัสที่สร้างขึ้น ขนาดของแคลลัส และลักษณะของแคลลัสที่ปรากฏ มีความแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของพรทิพย์ (2545) และ Kou และคณะ (2013) ที่เติม 2,4-D ลงในอาหารสูตร MS สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงถึง 56.2 % ซึ่ง Chu และ คณะ (1975) ได้กล่าวว่าอาหารสูตร N6 เป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าว เช่นเดียวกับ Zawawi และคณะ (2013) ที่สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนใบและเอนโด สเปิร์มของ *Barringtonia racemosa* เกิดแคลลัสได้ ถึง 100 %

Jala (2013) ศึกษา *Curcuma alismatifolia* และ *Curcuma hybrid* 'Laddawan' ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเช่นกัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่

เติม 2,4-D ความเข้มข้น 14.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อเกิดการสร้างแคลลัสแบบหลวมและสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ได้ แต่ Viu และคณะ (2009) ชักนำให้เนื้อเยื่อขมิ้นชันเกิดแคลลัสโดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสเกาะกันอย่างหลวม (friable callus) ซึ่งอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ซึ่งเป็นสารกลุ่มออกซิน ส่งผลต่อการเจริญเติบโตเป็นแคลลัสมากกว่า โดยให้ผลเช่นเดียวกับ Raval และคณะ (1981) ที่ศึกษาการเกิดแคลลัสในข้าวที่ทนต่อสภาพแวดล้อม นอกจากนั้น Wardana และคณะ (1983) ศึกษาสาร tryptophan ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของออกซินก็ได้ผลเช่นเดียวกับสาร 2,4-D

มีรายงานว่า 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่นิยมใช้และมีประสิทธิภาพดีที่สุดในกลุ่มของออกซินเพื่อการชักนำเนื้อเยื่อพืชใบเลี้ยงเดี่ยวให้เจริญเป็นแคลลัส (Ling *et al.*, 1987) โดยในข้าวขาวดอกมะลิ 105 และปทุมธานี 1 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตร จะให้ผลการสร้างแคลลัส ขนาดของแคลลัส และลักษณะของแคลลัสที่ดีดีกว่า 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วน Jameel และคณะ (1995) สามารถชักนำให้เมล็ดข้าวเจ้าเกิดแคลลัสจำนวนมากบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ส่วน kinetin นั้นพบว่ามียิทธิพลต่อลักษณะของแคลลัสที่แสดงออกมากกว่าที่จะมียิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส รวมทั้งขนาดของแคลลัสในข้าวทั้ง 2 พันธุ์ แคลลัสที่สร้างขึ้นจะเกิดตรงบริเวณคัพภะใกล้กับฐานยอดอ่อน แคลลัสที่ได้ส่วนใหญ่มีลักษณะเกาะกันแน่น สีเหลือง (รูปที่ 1) ผิวแห้ง มีปุ่มเล็ก ๆ จำนวนมาก ซึ่งเจริญมาจากการ

แบ่งตัวของเนื้อเยื่อ scutellum (เบญจวรรณ, 2543) และแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันอย่างหลวม ๆ ผิวมัน เจริญมาจากเซลล์แถวนอกของ procambium หรือ บางครั้งอาจเกิดจากส่วนฐานของปลอกหุ้มยอดอ่อน ซึ่งสอดคล้องกับประภาและพรทิพย์ (2537) ที่ศึกษาในข้าว เช่นเดียวกับ Raval และคณะ (1981) ซึ่งศึกษาการเกิดแคลลัสในข้าวที่ทนต่อสภาพแวดล้อม

5. สรุป

การชักนำให้เกิดแคลลัสจากเมล็ดข้าว 2 พันธุ์ คือ ข้าวดอกมะลิ 105 และปทุมธานี 1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารจัดแปลงสูตร MS และ N6 โดยเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าข้าวแต่ละพันธุ์ตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ N6 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุด สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส 100 และ 80.7 % ตามลำดับ ส่วนพันธุ์ปทุมธานี 1 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ N6 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุด สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส 94 % แคลลัสมีลักษณะร่วนอวบน้ำ (friable callus) และรวมเป็นกลุ่มก้อนจับตัวกันแน่น (compact callus)

6. รายการอ้างอิง

เบญจวรรณ ยันต์วิเศษภักดี, 2543, เนื้อเยื่อวิทยาของการเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.), ว.สงขลานครินทร์ 22(1): 1-6.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, 2537, การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในข้าวโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ตอนที่ 1, ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 28: 381-389.

ประภา ศรีพิจิตร และพรทิพย์ ชีวะเศรษฐกรรม, 2537, การพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสที่เจริญมาจากเอ็มบริโอของข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105, ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 28: 27-37.

พรทิพย์ ชีวะเศรษฐกรรม, 2537, ความผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงข้าวหอมพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ .

พิจา ทิมสุกใส, 2545, การคัดเลือกข้าวเพื่อให้ทนเค็มโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, ว.เทคโนโลยีสุรนารี 30: 164-170.

Chu, C.C., Wang, C.S., Sun, C.C., Hsu, C., Yin, K.C. and Chu, C.Y., 1975, Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources, rice research strategies for the future, IRRI., 610 p.

Jala, A., 2013, Callogenesis and organogenesis from inflorescence segments of *Curcuma alismatifolia* and *Curcuma* hybrid 'Laddawan', Amer. Trans. Eng. Appl. Sci. 2(3): 213-222.

Jameel, M., Edwin, A.K. and Anderson, J., 1995, Callus induction and plant regeneration of commercial rice (*Oryza sativa* L.) cultivars, Proc. Arkansas Acad. Sci. 9: 17-21.

Kou, Y., Ma, G. and Jaime, A., Silva, T.D. and Liu, N., 2013, Callus induction and shoot

- organogenesis from anther cultures of *Curcuma attenuata* Wall., Plant Cell Tis. Organ Cult. 112: 1-7.
- Ling, D.H. and Yoshida, S., 1987, Study of some factors affecting somatic embryogenesis in IR lines of rice (*Oryza sativa* L.), Acta Bot. Sinica 29: 1-8.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant 15: 473-497.
- Moeljopawiro, S. and Ikehashi, H., 1981, Inheritance of salt tolerance in rice, Euphytica 30: 291-300.
- Raval, M. and Chattoo, B.B., 1993, Role of media constituents and proline in callus growth, somatic embryogenesis and regeneration of *Oryza sativa* cv Indica, Indian J. Exp. Biol. 31(7): 600-603 .
- Torres, K., 1989, Tissue Culture Techniques of Horticultural Crops, van Nostrand Reinhold, New York.
- Wardana, S. and Nabors, M.W., 1983, Tryptophan enhancement of somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* L.), Plant Physiol. 73: 142-146.
- Viu, A.F.M., Viu, M.A.O., Tavares, A.R., Vianello, F. and Lima, G.P.P., 2009, Endogenous and exogenous polyamines in the organogenesis in *Curcuma longa* L., Sci. Hortic. 121: 501-504.
- Zawawi, D.D., Ali, A.M. and Jaafar, H., 2013, Effects of 2,4-D and kinetin on callus induction of *Barringtonia racemosa* leaf and endosperm explants in different types of basal media, Asian J. Plant Sci. 12(1): 21-27.