ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอม

Effect of media and growth regulators on callus induction in Khao Dawk Pa-yawm rice

เบญจมาศ หนูแป้น[1*], ไซนีย๊ะ สะมาลา[1], กนกรัตน์ ใสสะอาด[1], กิตติมา คงทน[1], กนกอร ทองใหญ่[1] และ ศิริพร ทวีโรจนการ[1]

Benjamas Nupan[1*], Sainiya Samala[1], Kanokrat Saisa-ard[1], Kittima Kongton[1], Kanokon Thongyai[1] and Siriporn Taweerodjanakarn[1]

บทคัดย่อ: ข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่เหมาะสมต่อการปลูกในภาคใต้ของไทย ปัจจุบันการปลูกข้าวไร่กำลังลดจำนวนลง จึงได้ศึกษาวิธีการขยายพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรมต่อไป จากการนำเมล็ดมาชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารสูตร MS ½MS และ N6 ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าให้อัตราการเกิดแคลลัสเฉลี่ยสูง 75.56%, 62.23% และ 46.67% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามขนาดของแคลลัสจากอาหารสูตร ½MS มีขนาดเฉลี่ยใหญ่ที่สุด คือ 1.12 ซม. และจากการเพิ่มปริมาณแคลลัส โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 3 ชนิด คือ 2,4-D NAA และ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าที่ความเข้มข้น 1 มก./ล. และ 1.5 มก./ล. แคลลัสเพิ่มปริมาณได้ดีมีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุดคือ 1.03 และ 0.93 กรัม ตามลำดับ สำหรับการชักนำให้มีการพัฒนาเป็นต้นบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA Kin และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ Kin ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. และ NAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. สามารถชักนำการเกิดต้นได้ดีที่สุดเฉลี่ยร้อยละ 20

คำสำคัญ: ข้าวดอกพะยอม, แคลลัส, สารควบคุมการเจริญเติบโต BA NAA

ABSTRACT: Khao Dawk Pa-yawm Rice is native rice and suitable for growing in the Southern part of Thailand. Currently, the rice fields are in decline. The experiment was study of micro propagation for the conservation of genetic further. Callus induction from seed *in vitro* cultured on MS, ½MS and N6 media for 4 weeks. The results showed that the callus formation were 75.56%, 62.23% and 46.67%, respectively. However, The largest callus was found on the ½MS medium with average size is 1.12 cm. Increasing the amount of callus by cultured its on ½MS medium and addition of three types of growth regulators are 2,4-D, NAA and BA at various concentrations was done for 4 weeks. It was found that medium supplemented with 1 mg/L and 1.5 mg/L of growth regulators gave the highest callus proliferation. The maximum weight is 1.03 and 0.93 g, respectively. For plant regeneration, the cultured on MS medium supplemented with BAP, Kin and NAA difference concentrations was conducted for 4 weeks. The results showed that MS medium supplemented the combination 2.0 mg/L BAP with 0.5 mg/L Kin and 0.5 mg/L NAA was regenerated the plant average 20% of shoot formation.

Keywords: Khao Dawk Pa-yawm Rice, callus, growth regulators BA NAA

[1] สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี 84100
Program in Biology, Faculty of Science and Technology, Suratthani Rajabhat University, Suratthani 84100

* Corresponding author: kunben_biot@hotmail.com

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของไทยและระดับโลก ประชากรส่วนใหญ่ของโลกบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก ข้าวดอกพะยอม (Dawk Pa-yawm) เป็นข้าวไร่ ชนิดข้าวเจ้า ไวต่อช่วงแสง จัดเป็นข้าวพื้นเมืองภาคใต้ ข้อดีคือให้ผลผลิตสูง แตกกอดี เก็บเกี่ยวง่าย ต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูข้าว ทนต่อสภาพการขาดน้ำได้ดี มีกลิ่นหอมใกล้เคียงกับข้าวหอมมะลิ ด้วยกระแสการรักษาสุขภาพในปัจจุบันประชาชนหันมานิยมบริโภคข้าวพื้นเมืองเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตาม พื้นที่ในการปลูกข้าวไร่แถบภาคใต้ลดลงเป็นอย่างมาก เนื่องจากเกษตรกรส่วนใหญ่หันมาปลูกยางพาราและปาล์มน้ำมัน ทำให้พื้นที่ในการปลูกข้าวไร่มีพื้นที่น้อยลง นอกจากนี้ยังพบว่า ปัญหาในการปลูกข้าวของเกษตรกรส่วนใหญ่ที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณผลผลิตข้าวเกิดจากปัญหาในด้านต่างๆ เช่น ปัญหาโรคและแมลงศัตรูข้าว ปัญหาความแห้งแล้งและน้ำท่วม ส่งผลให้ข้าวดอกพะยอมเริ่มลดน้อยลง ไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด และมีโอกาสเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ ดังนั้นการขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุกรรมข้าวพื้นเมืองภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ จึงจัดเป็นวิธีการที่น่าสนใจในการศึกษาเนื่องจากสามารถขยายพันธุ์ให้ได้จำนวนมากภายในระยะเวลาอันสั้น

การชักนำให้เกิดแคลลัสข้าว สามารถชักนำได้จากหลายชิ้นส่วน เช่น คัพภะอ่อน (Ling et al., 1983) ช่อดอกอ่อน (Chen et al., 1985) และราก (Abe, 1986) นอกจากนี้ Rashid et al. (2000) รายงานว่าส่วนของเมล็ดข้าวมีศักยภาพในการพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ดีกว่าชิ้นส่วนข้อและปลายยอด โดยมีหลายรายงานที่ประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเมล็ด (Gonzalez, 2000; Shahsavari et al., 2010) โดยทั่วไปแล้วนิยมใช้สูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) ในการชักนำให้เกิดแคลลัสในพืช อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสโดยใช้สูตรอาหาร MS มักเกิดปัญหาได้แคลลัสคุณภาพดีต่ำ และแคลลัสเปลี่ยนสีน้ำตาลหลังการแบ่งย้าย (จุฑาทิพย์ และคณะ, 2556) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชส่วนใหญ่จะใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต (Plant Growth Regulators; PGRs) ในกลุ่มของออกซินและไซโตไคนินอย่างใดอย่างหนึ่งหรือควบคู่กันในการชักนำหรือกระตุ้นให้เกิดเอ็มบริโอเจนิกแคลลัส (embryogenic callus) ซึ่งเป็นแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ (สมพร, 2549) ทั้งนี้การชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสในข้าวสามารถทำได้โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตหลายชนิด ได้แก่ benzyl amino purine (BA) และ 2,4-di-chlorophenoxy acetic acid (2,4-D) รวมไปถึง napthalene acetic acid (NAA) โดย BA เป็นสารที่ใช้กระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์และเกิดการแตกยอดใหม่ (Taiz and Zeiger, 2002) 2,4-D มีคุณสมบัติในการปิดกั้นกระบวนการกำเนิดอวัยวะได้อย่างดีและใช้ในการเพิ่มจำนวนและรักษาสภาพการเพาะเลี้ยงเป็นแคลลัส (รังสฤษฎ์, 2540) ส่วน NAA สามารถกระตุ้นให้เกิดการขยายขนาดของเซลล์และชักนำให้เกิดราก (Hopkins, 1999) นอกจากนี้ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่านขั้นตอนการชักนำให้เกิดแคลลัส จะประสบปัญหาการชักนำให้เกิดต้นใหม่ โดยเฉพาะข้าวสายพันธุ์ indica ซึ่งการชักนำให้เอ็มบริโอเจนิกแคลลัสพัฒนาไปเป็นต้น มีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น อายุของแคลลัส แคลลัสที่มีอายุมากมีความสามารถในการเจริญและพัฒนาไปเป็นยอดได้ต่ำ (Henke et al., 1978) การเปลี่ยนอาหาร และการตัดแบ่งชิ้นเนื้อเยื่อจะลดเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นได้ การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มออกซินความเข้มข้นต่ำๆ เช่น 2,4-D และ NAA ร่วมกับไซโตไคนิน สามารถชักนำให้เกิดต้นข้าวจากแคลลัสได้ นอกจากนี้สายพันธุ์ที่แตกต่างกันก็มีผลต่อการชักนำให้เกิดต้นข้าวเช่นเดียวกัน (Upadhyaya et al., 2015) การศึกษาครั้งนี้ จึงขยายพันธุ์ข้าวดอกพะยอมในหลอดทดลอง โดยใช้ชิ้นส่วนเมล็ดศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัส การเพิ่มปริมาณแคลลัสและการชักนำให้เกิดต้นข้าว เพื่อเป็นเทคนิคขั้นพื้นฐานในการขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุกรรมข้าวดอกพะยอมต่อไป

วิธีการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ใช้เมล็ดพันธุ์ข้าวดอกพะยอมจากศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวพัทลุง จ.พัทลุง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design : CRD) จำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 200 เมล็ด และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ทำการทดลองที่ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี ทั้งนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง ได้แก่

1. ผลของสูตรอาหารต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส

นำเมล็ดข้าวพันธุ์ดอกพะยอม แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก ล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วนำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ในสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70% นาน 30 วินาที ย้ายลงฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 40% นาน 20 นาที ซึ่งเติมสารเปียกใบ (Tween 20) ความเข้มข้น 2.5 มล./ล.นาน 30 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 4-5 ครั้ง นำเมล็ดข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ววางลงบนกระดาษชำระ ซับให้แห้ง จากนั้นวางลงบนอาหาร 3 สูตร คือ ½MS MS และ N6 (Chu et al., 1975) ที่เติมสาร 2,4-D ความเข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. และ benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 1 มก./ล.เติมน้ำตาลเข้มข้น 3% วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีแสง 14 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจสอบอัตราการสร้างแคลลัส (อัตราการสร้างแคลลัส = จำนวนเมล็ดที่เกิดแคลลัส/จำนวนเมล็ดทั้งหมด x 100) และลักษณะของแคลลัสที่ปรากฏ เปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหาร วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

2. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

นำแคลลัสข้าวที่มีลักษณะเกาะกลุ่มกันแบบร่วนสีเหลืองอายุ 4 สัปดาห์ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส ที่มีการพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีและก้อนแคลลัสมีขนาดใหญ่ มาเพิ่มปริมาณ โดยวางเลี้ยงกลุ่มแคลลัสน้ำหนัก 0.5 กรัม บนอาหารสูตร ½MS ที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (กรรมวิธีควบคุม) และอาหารสูตร ½MS เติมสาร 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.5, 1 และ 1.5 มก./ล.ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1 และ 1.5 มก./ล.และ BA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1 และ 1.5 มก./ล. เติมผงถ่านกัมมันต์ 2 กรัม วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีแสง 14 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจสอบอัตราการเพิ่มจำนวนแคลลัส เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

3. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำต้น

นำเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสข้าวที่ชักนำจากการทดลองที่ 2 มาชักนำให้เกิดต้นบนอาหารสูตร MS ที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (กรรมวิธีควบคุม) และอาหารสูตร MS ที่เติมสาร BA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มก./ล.ร่วมกับ kinetin (Kin) ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5 และ 0.75 มก./ล. และ NAA ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5 และ 0.75 มก./ล. วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีแสง 14 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อศึกษาการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่และการเกิดราก เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ผลการศึกษา

ผลของสูตรอาหารต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส

เมล็ดข้าวพันธุ์ดอกพะยอมที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสาร 2,4-D ความเข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. และ BA ความเข้มข้น 1 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้

75.56% อาหารสูตร ½MS สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 62.23% ส่วนอาหารแข็งสูตร N6 ให้อัตราการเกิดแคลลัสได้ 46.67% (**Table 1**, **Figure 1**) จะเห็นได้ว่าอาหารทั้ง 3 สูตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ดอกพะยอมบนอาหารแข็งสูตร ½MS พบขนาดของแคลลัสโดยเฉลี่ยใหญ่ที่สุดคือ 1.12 ซม. (**Table 1**, **Figure 2**) ซึ่งแคลลัสที่เกิดขึ้นบนอาหารทุกสูตร เป็นแคลลัสที่มีลักษณะแบบร่วน (Friable callus) สีเหลืองอ่อน (Yellow callus : YC) และได้เลือกอาหารแข็งสูตร ½MS ในการเพิ่มปริมาณแคลลัสต่อไป

Table 1 Callus formation and size of callus from Khao Dawk Pa-yawm Rice seeds cultured on difference media.

Media	PGRs (mg/L)			Callus induction	Size of callus
	2,4-D	NAA	BA	(%) ± SD	(cm.) ± SD
T_1 : ½ MS	1	1	1	62.23±23.33^{ab}	1.12±0.14^{a}
T_2 : MS	1	1	1	75.56±26.03^{a}	0.83±0.07^{b}
T_3 : N6	1	1	1	46.67±14.14^{b}	0.61±0.1^{b}
C.V. (%)				35.41	31.98
F-test				*	*

[1/] Means (n = 600) with in a column followed by the different letter are significantly different by DMRT.

[2/] * = Significant at 95% (P ≤ 0.05)

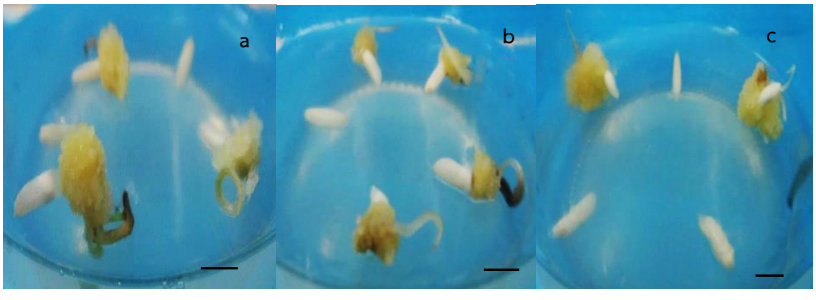

Figure 1 Callus formation from Khao Dawk Pa-yawm Rice seeds cultured on difference media on (a) ½MS medium, (b) MS medium and (c) N6 medium (photo taken 4 weeks after inoculation and bar = 0.5 cm.).

Figure 2 Size of callus from Khao Dawk Pa-yawm Rice seeds cultured on difference media on (a) ½MS medium, (b) MS medium and (c) N6 medium (photo taken 4 weeks after inoculation).

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

หลังจากนำแคลลัสที่ชักนำได้อายุ 4 สัปดาห์ ย้ายลงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัสพบว่า แคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ½MS (T_3) และอาหารแข็งสูตร ½MS (T_4) มีการเพิ่มน้ำหนักสดได้มากกว่ากรรมวิธีควบคุม (½MS ที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต) มีน้ำหนักรวมเฉลี่ย 1.03 และ 0.93 กรัม ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอย่างยิ่ง ($P \leq 0.01$) ชุดควบคุมมีการเพิ่มปริมาณแคลลัสน้อยที่สุด มีน้ำหนักรวมเฉลี่ย 0.71 กรัม (Table 2) ซึ่งลักษณะและสีของแคลลัสที่พบคือ แคลลัสมีสีเหลืองอ่อน เกาะกันแบบร่วน (Figure 3)

Table 2 Callus proliferation from Khao Dawk Pa-yawm Rice sub-cultured on various concentration of 2,4-D and NAA for 4 weeks.

Medium	PGRs (mg/L)			Callus fresh weight (g) ±SD
	2,4-D	NAA	BA	
T_1 : ½ MS (Control)	-	-	-	0.71±0.11[b]
T_2 : ½ MS	0.5	0.5	0.5	0.87±0.18[ab]
T_3 : ½ MS	1.0	1.0	1.0	1.03±0.22[a]
T_4 : ½ MS	1.5	1.5	1.5	0.93±0.24[a]
	C.V. (%)			22.39
	F-test			**

[1/] Means (n = 90) with in a column followed by the different letter are significantly different by DMRT.

[2/] ** = Significant at 99% ($P \leq 0.01$)

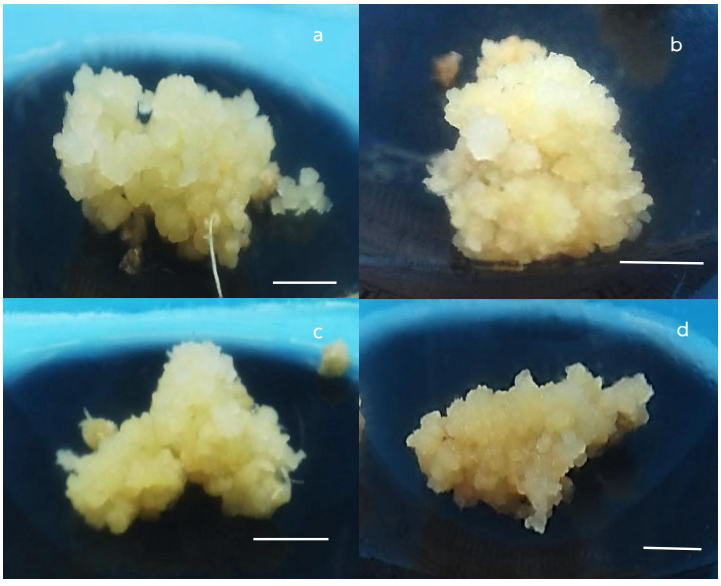

Figure 3 Characteristic and colour of Khao Dawk Pa-yawm Rice calli on ½MS medium supplemented with (a) control (b) 0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA (c) 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l NAA + 1 mg/l BA and (d) 1.5 mg/l 2,4-D + 1.5 mg/l NAA +1.5 mg/l after sub cultured for 4 weeks (bar = 0.5 cm.).

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำต้น

จากการนำเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสข้าวพันธุ์ดอกพะยอมจากการทดลองที่ 2 มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ Kin ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. และ NAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. พบว่าสามารถชักนำการเกิดต้นได้ 20% ในขณะที่อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในความเข้มข้นดังกล่าวสามารถชักนำให้แคลลัสข้าวพัฒนาไปเป็นรากได้มากกว่ากรรมวิธีควบคุม (Table 3, Figure 4)

Table 3 Effect of various concentration of plant growth regulator on shoot and root formation after cultured for 4 weeks.

Medium	PGRs (mg/L)			Shoot formation	Root formation
	BA	Kin	NAA	(%) ± SD	(%) ± SD
T_1 : MS (Control)	-	-	-	0.00±0.00	20.00±44.72[b]
T_2 : MS	1.00	0.25	0.25	0.00±0.00	80.00±44.72[ab]
T_3 : MS	2.00	0.50	0.50	20.00±44.72	100.00±0.00[a]
T_4 : MS	3.00	0.75	0.75	0.00±0.00	60.00±54.77[ab]
	C.V. (%)			57.58	
	F-test			*	

1/ Means (n = 90) with in a column followed by the different letter are significantly different by DMRT.

2/ * = Significant at 95% (P ≤ 0.05)

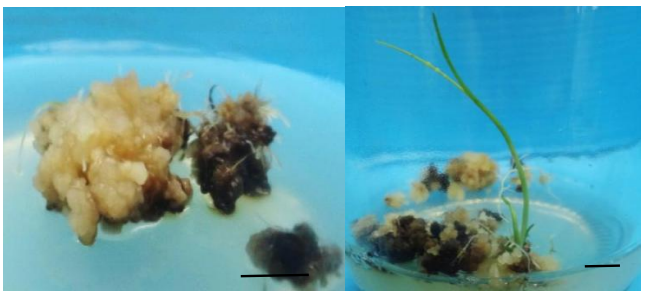

Figure 4 Shoot and root formation of Khao Dawk Pa-yawm Rice on MS medium (a) without plant growth regulators and (b) with 2 mg/l BA plus 0.5 mg/l Kin and 0.5 mg/l NAA after cultured for 4 weeks (bar = 0.5 cm.).

วิจารณ์

จากการชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าเมล็ดข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ให้อัตราการเกิดแคลลัสสูง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hussain et al. (2010) ที่รายงานว่าการชักนำแคลลัสจากเมล็ดของข้าวปากีสถาน 3 สายพันธุ์ (GNY-53, JP-5, Basmati-370) เกิดได้ดีที่สุดบนอาหารแข็งสูตร MS โดยมีอัตราการเกิดแคลลัส 70-100% เช่นเดียวกับการศึกษาของ Azria and Bhalla (2000) และ Niroula et al. (2005) ที่รายงานว่า เมล็ดข้าวเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดบนอาหารสูตร MS อาจเนื่องจากอาหารสูตร MS มีชนิดและปริมาณธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของเมล็ดข้าว อย่างไรก็ตาม Gul et al. (2000) และ Naqvi et al. (2005) รายงานว่าอาหารสูตร N6 มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการชักนำให้เมล็ดข้าวเกิดแคลลัส ทั้งนี้ Islam et al. (2005) รายงานว่า อัตราการเกิดแคลลัส ขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมและสูตรอาหาร ความเข้มข้นของสูตรอาหาร และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตาม

การศึกษาครั้งนี้พบว่าแคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุดบนอาหารสูตร ½MS ทั้งนี้อาจเนื่องจากการลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง ทำให้ระดับอาหารที่แคลลัสได้รับอยู่ในที่ช่วงที่เหมาะสมต่อการขยายขนาดของเซลล์ จึงได้ใช้อาหารสูตรดังกล่าวในการศึกษาการเพิ่มปริมาณแคลลัส

จากการเพิ่มปริมาณของแคลลัส พบว่าแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ½MS (T_3 และ T_4) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ NAA และ BA แคลลัสมีการเพิ่มปริมาณได้ดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับ พิจิกา และอารีย์ (2548) ที่รายงานว่าแคลลัสข้าวไทยเกิดได้ดีในอาหารที่เติม 2,4-D และ NAA อย่างละ 1 มก./ล. ร่วมกับ Kin 0.1-1 มก./ล. อย่างไรก็ตามการเพิ่มปริมาณแคลลัสไม่สอดคล้องกับรายงานของ Yan et al. (2010) ที่รายงานว่า ข้าว *indica* ชักนำแคลลัสได้ ร้อยละ 9.1-100 ในอาหาร MS ที่เติม BA 2 มก./ล. ร่วมกับ Kin 0.5 มก./ล. และ NAA 1 มก./ล. ทั้งนี้ Hussain et al. (2010) รายงานว่า พันธุกรรม ชนิดของอาหาร และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของแคลลัส การเกิดลักษณะและรูปร่างของแคลลัสควบคุมด้วยชนิดและระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโต ในการศึกษาส่วนนี้ใช้ปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งออกซินและไซโตไคนินในสัดส่วนที่เท่ากันเพราะต้องการชักนำให้เกิดเฉพาะแคลลัสและยับยั้งจุดกำเนิดของอวัยวะ

จากการวางเลี้ยงแคลลัสเพื่อชักนำต้น พบว่าแคลลัสข้าวพันธุ์ดอกพะยอมที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ Kin ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. และ NAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. สามารถชักนำการเกิดต้นได้ดีที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wani และคณะ (2011) รายงานว่า อาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มก./ล. Kin เข้มข้น 0.5 มก./ล. และ NAA เข้มข้น 0.5 มก./ล. สามารถชักนำการเกิดต้นได้ดีที่สุด ร้อยละ 42.5 อย่างไรก็ตาม Agarwal et al. (2006) รายงานว่าแคลลัสข้าวพัฒนาเป็นต้นได้ดีบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. และ BAP ความเข้มข้น 2 มก./ล. อาจเนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นสารกลุ่มที่มีความจำเป็นต่ออาหารเพาะเลี้ยงพืชหลายชนิดโดยส่วนใหญ่มักจะมีส่วนประกอบระหว่างออกซิน (Auxin) และไซโตไคนิน (Cytokinin) ในอัตราส่วนที่เหมาะสมซึ่งจะมีผลต่อการเกิดยอดและราก ซึ่งสารกลุ่มไซโตไคนินมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์และช่วยในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ให้เกิดยอด เช่น BA แต่ถ้ามีสารกลุ่มออกซินจะกระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ทำให้เกิดราก เช่น NAA และ 2,4-D (ปิยะดา และอารีย์. 2551) อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองครั้งนี้พบว่าสามารถชักนำต้นได้เพียง 20% บนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มก./ล. Kin เข้มข้น 0.5 มก./ล. และ NAA เข้มข้น 0.5 มก./ล. และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของระดับสารควบคุมการเจริญเติบโตสูงขึ้นพบว่า ยับยั้งการพัฒนาไปเป็นต้น ดังนั้นการศึกษาในระยะต่อไปควรปรับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมมากขึ้น

สรุป

การศึกษาครั้งนี้สามารถชักนำแคลลัสจากเมล็ดและแคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้บนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มก./ล. Kin เข้มข้น 0.5 มก./ล. และ NAA เข้มข้น 0.5 มก./ล. ซึ่งวิธีการดังกล่าวสามารถขยายพันธุ์ข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมภายใต้สภาวะปลอดเชื้อได้ แต่ควรศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการพัฒนาไปเป็นต้นให้สูงขึ้นและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์พันธุกรรมต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2558 หมวดสนับสนุนโครงงานทางวิทยาศาสตร์ ขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชและขยายพันธุ์พืชเศรษฐกิจ สาขาวิชา

ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

จุฑาทิพย์ ทนันไชย, สงวนศักดิ์ ธนาพรพูนพงษ์ และสุชาดา เวียรศิลป์. 2556. ผลของ 2,4-D และไคเนตินต่อการเกิดเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105. วารสารเกษตร. 29: 177-185.

ปิยะดา ตันคสวัสดิ์ และ อารีย์ วรัญญูวัฒน์. 2551. ปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. เอเจนเทคจำกัด, กรุงเทพฯ.

พิจิกา ทิมสุกใส และ อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2548. สูตรอาหารเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวไทย. ว.ราชภัฏสกลนคร. 2: 24-29.

รังสฤษฎ์ กาวีตั๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมพร ประเสริฐส่งสกุล. 2549. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี. 127 หน้า.

Abe, T., and Y. Futsuhara. 1986. Genotypic variability for callus formation and plant regeneration rice Oryza sativa L. Theor. Appl. Genet. 72: 3-10.

Agarwal, P.K., S.S. Gossal, and S.G. Sidhu. 2006. Sequential reduction of 2,4-D improves whole plant regeneration from long-term maintained calli in some *indica* cultivars of rice. Oryza. 43: 10-15.

Azria, D., and P.L. Bhalla. 2000. Plant regeneration from mature embryo-derived callus of Australian rice (*Oryza sativa* L.) varieties. Australian J. Agri. Res. 51: 305-312.

Chen, T.H., L. Lam, and S.C. Chen. 1985. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured young inflorescences of *Oryza sativa* L. (rice). Plant Cell Tissue Organ Cult. 4: 51-54.

Chu, C.C., C.C. Went, C.S. Sun, C. Hsu, K.C. Yin, C.Y. Chu, and E.Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice throuth comparative experiment on the nitrogen sources. Science Sinica. 18: 659-668.

Gonzalez, M.C. 2000. Effects of different growth regulators on *In vitro* culture of rice cv. Amistad-82. Cultivos trop. 21: 23-27.

Gul, N., Z.A. Swati, S.M.S. Naqvi, I. Ullah, and A. Quraishi. 2000. Magnitude of Somaclonal variation in *Oryza sativa* L. cvs. Basmati-385, JP-5, Pakhal and Swat-II. Plant Tissue Cult. 10: 119-124.

Henke, R. R., M. A. Mansur, and M. J. Constantin. 1978. Organogenesis and plantlet formation from organ and seedling-derived calli of rice (Oryza sativa). Physiol. Plant. 44: 11-14.

Hopkins, G.W. 1999. Introduction to plant physiology. John Wiley and Sons, Ltd.

Hussain, Z., M. H. Khan, R. Bano, H. Rashid, and Z. Chaudhry. 2010. Protocol optimization for efficient callus induction and regeneration in three Pakistani rice cultivars. Pak. J. Bot. 42: 879-887.

Islam, M. M., M. Ahmed, and D. Mahaldear. 2005. *In vitro* callus induction and plant regeneration in seed explant of rice (*oryza sativa L.*) RJABS. 1: 72-75.

Ling, D.H., W.F. Chen, and Z.R. Ma. 1983. Somatic embryogenesis and plant regeneration in an interspecific hybrid of Oryza. Plant Cell Reports. 2: 169-171.

Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant. 15: 473-497.

Naqvi, S.M.S., R. Sultana, and H. Rasheed. 2005. Tissue culture studies in *Oryza sativa* L. cvs. Basmati-385 and Super-Basmati. Pak. J. Bot. 37: 823-828.

Niroula, R.K., B.P. Sah, H.P. Bimb, and S. Nayak. 2005. Effect of genotype and culture media on callus induction and plant regeneration from matured rice grain culture. J. Inst. Agri. Anim. Sci. 26: 21-26.

Rashid, H., A.Toriyama, K. Qurashi, and K. A. Malik. 2000. An improved method for shoot regeneration from calli of *Indica* rice. Pak. J. Biol. Sci. 3: 2229-2231.

Shahsavari, E., A.A. Maheran, A.S.N. Akmar, and M.M. Hanafi. 2010. The effect of plant growth regulators on optimization of tissue culture system in Malaysian upland rice. Afr. J. Biotechnol. 9: 2089-2094.

Taiz, L., and E. Zeiger. 2002. Plant physiology. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Califonia.

Upadhyaya, G., M. Sen, and A. Roy. 2015. *In vitro* callus induction and plant regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) var. 'Sita', 'Rupali' and 'Swarna Masuri'. AJPSKY. 5: 24-27.

Wani, S.H., G.S. Sanghera, and S.S. Gosal. 2011. An efficient and reproducible method for regeneration of whole plants from mature seeds of a high yielding *Indica* rice (*Oryza sativa* L.) variety PAU 201. N. Biotechnol. 28: 419-421.

Yan, L.N., L.I. Xia, and W.U. Dan. 2010. The comparison in tissue culture ability of mature embryo in different cultivars of rice. Agric. Sci. China. 9: 840-846.