# บทที่ 1

# บทนำ

การเพิ่มผลผลิตข้าวต่อไร่ให้อยู่ในเกณฑ์สูงมีหลายวิธี วิธีการหนึ่งคือ การปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งทำได้หลายวิธี เช่น การคัดเลือกพันธุ์จากพันธุ์พื้นบ้าน การผสมพันธุ์แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ และการสร้างสายพันธุ์ใหม่โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ปัจจุบันเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นวิธีการหนึ่งที่นำมาประยุกต์เพื่อช่วยเร่งกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้เร็วขึ้น โดยนักวิทยาศาสตร์อาศัยหลักการที่ว่าในขณะทำการเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะในรูปของแคลลัสมีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์ หรือการผันแปรได้ตลอดเวลาเช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ยิ่งกว่านั้น การผันแปรที่เกิดขึ้นในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีโอกาสแสดงออกได้มากกว่า เนื่องจากเซลล์พืชมีคุณสมบัติที่สามารถเจริญเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ ทั้งความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ของประชากรที่เกิดจากเซลล์ที่เลี้ยงในขวดแก้วมีค่าสูงกว่าการกลายพันธุ์ของต้นพืชที่เกิดในธรรมชาติ (Vajrabhaya, 1988) จากหลักการดังกล่าว จึงสามารถนำเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไปใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้ เช่น การสร้างความผันแปรทางพันธุกรรมเพื่อคัดเลือกพันธุ์ที่มีลักษณะต้านทานต่อสภาวะแวดล้อมที่จำกัด เช่น สภาวะแห้งแล้ง ดินเค็ม ดินเปรี้ยว โรคและแมลง เป็นต้น ซึ่งวิธีการนี้จะช่วยประหยัดเวลา ค่าใช้จ่าย แรงงาน และพื้นที่ในการคัดเลือกพันธุ์ได้มากกว่าการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีอื่น (Vajrabhaya et al., 1983 ; Vajrabhaya et al., 1987)

การศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น เริ่มได้รับความสนใจเมื่อประมาณสิบกว่าปีที่ผ่านมาและกำลังอยู่ในระหว่างการศึกษาเทคนิคต่างๆ ที่นิยมทำกันโดยการชักนำเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของต้นข้าวให้เจริญเป็นแคลลัสก่อนและเชื่อว่าในระหว่างการแบ่งเซลล์เพื่อเป็นแคลลัสนั้นมีโอกาสเกิดการผันแปรหรือการกลายพันธุ์ได้มาก ปัญหาที่ตามมาและยังต้องศึกษาอีกมาก คือ การชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ โดยเฉพาะข้าวในกลุ่ม indica พบว่าการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ยังอยู่ในอัตราต่ำ (Vajrabhaya et al.,1984a ; Kavi kishor and Reddy, 1986 ; Koetje et al., 1989 ; Quimio and Zapata, 1990) ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุหลายประการ ได้แก่

1. อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่

1.1 องค์ประกอบ ความเข้มข้นและสัดส่วนของธาตุอาหารอนินทรีย์ ได้แก่ ธาตุ-อาหารหลัก และธาตุอาหารรอง

1.2 องค์ประกอบ ความเข้มข้นและสัดส่วนของสารอาหารอินทรีย์ ได้แก่ วิตามิน กรดอะมิโนต่างๆ รวมทั้งสารควบคุมการเจริญคือ สารกลุ่มออกซินและไซโตไคนิน ซึ่งมีความสำคัญต่อการเลี้ยงเนื้อเยื่อมาก นอกจากนี้ยังรวมถึงสารอินทรีย์เสริม ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่ทราบองค์ประกอบที่แน่นอน

1.3 แรงดันออสโมซิส ความสมดุลของอิออนในอาหาร

2. สิ่งแวดล้อมต่างๆ ได้แก่

2.1 แสง ได้แก่ ความเข้มแสง ความยาวคลื่น และช่วงแสง

2.2 อุณหภูมิ

2.3 ความชื้น

2.4 ก๊าซ เช่น ออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทธิลีน เป็นต้น

3. ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเลี้ยง (explant)

4. ลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรมของพืช

5. อายุของส่วนของพืชที่นำมาเลี้ยง

6. ระยะเวลาที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อ

7. ชนิดของเซลล์ที่เจริญในอาหาร

8. เทคนิคการทำให้ปลอดเชื้อ

<u>วัตถุประสงค์และขอบเขตของงานวิจัย</u>

ศึกษาองค์ประกอบของอาหารในการเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว ที่สามารถชักนำแคลลัสข้าวให้เกิดเป็นต้นใหม่ให้ได้มากที่สุด และสร้างสูตรอาหารใหม่เพื่อลดขั้นตอนของการพัฒนาหน่อใหม่จากการเลี้ยงแคลลัส ที่อาจนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นพื้นฐานของการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยการคัดเลือกต้นที่เกิดการผันแปรที่เกิดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (somaclonal variation)

การสำรวจเอกสาร

การเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ เริ่มได้รับความสนใจเมื่อสิบกว่าปีที่แล้ว โดยนักวิทยาศาสตร์อาศัยหลักการเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อในหลอดแก้ว แล้วคัดเลือกต้นที่เกิดการกลายพันธุ์ หรือความผันแปรของเซลล์ร่างกาย (somaclonal variation) ซึ่งมีความถี่ในการเกิดสูงกว่าในธรรมชาติ (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1974 ; Larkin and Scowcroft, 1981 ; Ozias-akins and Vasil, 1988 ; Wildholm, 1988) Zong-xiu et al. (1983) รายงานว่า ลักษณะของต้นข้าวที่เกิดจากความผันแปรของเซลล์ร่างกายที่คัดเลือกได้ มีลักษณะความสูงของต้นลดลง จำนวนกอเพิ่มขึ้น และน้ำหนักของเมล็ด 1,000 เมล็ดลดลง ดังนั้นการคัดเลือกต้นข้าวที่มีลักษณะที่ดี จึงเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่เหมาะสม และเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้รวดเร็วยิ่งขึ้น (Vajrabhaya et al., 1987)

ปัญหาสำคัญที่เป็นข้อจำกัดของการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อคือ การชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ให้ได้จำนานมาก โดยเฉพาะในข้าวไทยหลายพันธุ์ เช่น กข.23 กข.25 เป็นต้น (Vajrabhaya et al., 1983) สำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสนั้น ปัจจุบันไม่มีปัญหามากนัก Vajrabhaya et al. (1983) รายงานว่า สามารถชักนำแคลลัสจากเอมบริโอของเมล็ดที่เจริญเต็มที่ของข้าวไทย 8 พันธุ์ ได้สูงถึง 93.3 % ปัจจุบันการชักนำให้เกิดแคลลัสสามารถชักนำให้เกิดได้จากส่วนต่างๆ ของต้นข้าว เช่น เอมบริโอจากเมล็ดที่เจริญเต็มที่ (Vajrabhaya et al., 1983 ; Kavi kishor and Reddy, 1986 ; Maeda et al., 1986) เอมบริโอจากเมล็ดที่ยังไม่เจริญเต็มที่ (Koetje et al., 1989) รวงข้าวที่ยังไม่เจริญเต็มที่ (Jun and Rush, 1987) กาบใบอ่อน (Wu and Li, 1970) แผ่นใบ (Yan and Zhao, 1982) อับเรณู (Chu et al., 1975) และ ราก (Yatazawa et al., 1967) เป็นต้น สำหรับข้าวไทย Vajrabhaya et al. (1985) ศึกษาส่วนต่างๆ ของต้นข้าว ได้แก่ เอมบริโอจากเมล็ดที่เจริญเต็มที่และที่ยังไม่เจริญเต็มที่ ดอก ข้อ และใบอ่อน พบว่าแคลลัสที่เกิดจากเอมบริโอจากเมล็ดที่ยังไม่เจริญเต็มที่ เจริญได้ดีกว่าเอมบริโอจากเมล็ดที่เจริญเต็มที่ ส่วนแคลลัสที่เกิดจากดอก ข้อ และใบอ่อน เจริญช้ากว่าและมีอัตราการเกิดเป็นต้นใหม่ต่ำ แม้ว่าเอมบริโอจากเมล็ดที่ยังไม่เจริญเต็มที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าเอมบริโอจากเมล็ดที่เจริญเต็มที่ แต่สำหรับงานวิจัยที่ต้องการคัดเลือกต้นจำนวนมากเพื่อนำไปคัดเลือกต่อในสภาวะที่

จำกัด เช่น สภาวะแห้งแล้ง ดินเค็มและดินเปรี้ยว เป็นต้น เอมบริโอจากเมล็ดที่เจริญเต็มที่ จึงเหมาะสำหรับงานวิจัยดังกล่าว เนื่องจากหาได้สะดวกมีตลอดปี ประหยัดเวลา สามารถเก็บรักษาไว้ใช้ได้นานที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และเกิดความเสียหายน้อยจากอันตรายในการฆ่าเชื้อที่ผิว เช่นเดียวกับข้าวญี่ปุ่นซึ่ง Mikami and Kinoshita (1988) พบว่าการชักนำแคลลัสจากส่วนของเมล็ดสามารถเกิดขึ้นได้เกือบ 100 %

สูตรอาหารพื้นฐานและสารควบคุมการเจริญกลุ่มออกซินและไซโตไคนิน เป็นปัจจัยแรกที่สำคัญในการศึกษาการชักนำแคลลัสจากเอมบริโอของเมล็ดที่เจริญเต็มที่ให้ประสบความสำเร็จ Vajrabhaya et al. (1983) พบว่าสูตรอาหารพื้นฐานในการชักนำแคลลัส สูตร LS (1965) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือน้ำมะพร้าวปริมาณ 100 มิลลิลิตรต่อลิตร เหมาะสำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวไทย 8 พันธุ์ สำหรับในข้าวญี่ปุ่น Motokazu et al. (1988) ศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารพื้นฐานระหว่างสูตร MS (1962) และสูตร $N_6$ (Chu et al., 1975) ในการชักนำแคลลัสในข้าวกลุ่ม japonica 500 พันธุ์ พบว่าสูตรอาหารพื้นฐานสูตร $N_6$ ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 53.8 % ซึ่งสูงกว่า สูตรอาหารพื้นฐานสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับลักษณะแคลลัสที่เกิดจากเอมบริโอของเมล็ดที่เจริญเต็มที่นั้น อรัญญา ตันติปัญจพร (2531) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของเอมบริโอของข้าวไทย 3 พันธุ์ ในระยะการชักนำให้เกิดแคลลัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่าลักษณะแคลลัสที่เกิดมี 2 ชนิด คือ embryogenic callus (E callus) และ non-embryogenic callus (NE callus) โดย E callus มีสีเหลืองเกาะกันแน่น ผิวหยักโค้ง ประกอบด้วยเซลล์รูปร่างค่อนข้างกลม มีไซโตพลาสซึมเข้มข้น เจริญมาจากการแบ่งตัวของ scutellar epithelium ส่วน NE callus มีสีขาวใส เกาะกันหลวมๆ ประกอบด้วยเซลล์รูปร่างยาว ไซโตพลาสซึมใส เจริญมาจากการแบ่งตัวของเซลล์แถวนอกของ procambium ของ mesocotyl นอกจากนี้ยังพบว่า ชนิดของแคลลัสมีผลต่อการเกิดเป็นต้นใหม่ โดยเฉพาะ E callus เท่านั้นที่สามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้ (Vajrabhaya et al., 1984a ; Maeda et al., 1986 ; Bajaj and Gupta, 1987 ; Motokazu et al., 1988) เนื่องจาก E callus นี้จะพัฒนาเป็น greenspot ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ (Vajrabhaya et al., 1984a)

ความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อ นอกจากจะขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของการชักนำให้เกิดแคลลัสแล้ว ยังขึ้นอยู่กับความสามารถในการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่อีกด้วย เนื่องจากจำนวนของต้นใหม่ที่เกิดจากแคลลัสเป็นปัจจัยที่กำหนดความสำเร็จในการคัดเลือก cell line หรือต้นที่เกิดจากความผันแปรของเซลล์ร่างกายเนื่องจากการกลายพันธุ์ซึ่งมีโอกาสเกิดต้นที่มีลักษณะที่ดี หรือมีการแสดงออกทางพันธุกรรมใหม่ๆ (Nabors et al., 1983 ; Vajrabhaya et al., 1985 ; Motokazu et al., 1988) สำหรับลักษณะของการพัฒนาการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่จากแคลลัสข้าวนั้น Abe and Futsuhara (1984) พบว่ามี 2 แบบ คือ โดยทางตาหน่อ เจริญแบบทางเดียว (unipolar) ไปเป็นหน่อ หรือราก เรียกว่า organogenesis และ โดยทาง somatic embryo เจริญแบบสองทาง (bipolar) ไปเป็นหน่อและราก เรียกว่า somatic embryogenesis โดยที่แคลลัสของข้าวในกลุ่ม japonica ส่วนใหญ่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่แบบ organogenesis และแคลลัสของข้าวในกลุ่ม indica ส่วนใหญ่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่แบบ somatic embryogenesis อย่างไรก็ตาม การศึกษาลักษณะการพัฒนาเป็นต้นใหม่จากแคลลัสข้าว ส่วนใหญ่เป็นแบบ organogenesis (Davoyan and Smetanin, 1979 ; Maeda et al., 1986 ; อรัญญา ตันติปัญจพร, 2531)

การชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ เกิดขึ้นค่อนข้างยากและเป็นปัญหาหลักในการเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว โดยเฉพาะข้าวในกลุ่ม indica พบว่าการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ยังอยู่ในอัตราต่ำ (Vajrabhaya et al., 1984a ; Kavi kishor and Reddy,1986 ; Koetje et al., 1989) ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุหลายประการ ได้แก่ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ สิ่งแวดล้อมต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเข้มแสง และความชื้น ลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรมของพืช ระยะเวลาที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อ ชนิดของเซลล์ที่เจริญในอาหาร และเทคนิคของการทำให้ปลอดเชื้อ (Vajrabhaya et al., 1985 ; Koetje et al., 1989 ; Croughan and Chu, 1991)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่มีบทบาทสำคัญในการเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว ได้แก่ ความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง วิตามิน น้ำตาล สารควบคุมการเจริญ และสารอินทรีย์เสริม (Vajrabhaya et al., 1987 ; Croughan and Chu, 1991) การศึกษาสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงแคลลัสเพื่อให้พัฒนาเป็นต้นใหม่ของข้าวในกลุ่ม japonica ชักนำได้ง่ายกว่าในกลุ่ม indica (Abe and Futsuhara, 1984) ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ในหลายประเทศได้

พัฒนาสูตรอาหารต่างๆมากมาย เพื่อชักนำให้แคลลัสของข้าวในกลุ่ม indica ให้เกิดเป็นต้นใหม่ แต่ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควรเพราะอัตราการเกิดเป็นต้นใหม่ยังต่ำมาก ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับธาตุอาหารหลักสำคัญ Chu et al. (1975) ศึกษาดัดแปลงปริมาณและชนิดของแหล่งธาตุไนโตรเจน โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 463 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับโปแตสเซียม-ไนเตรต ความเข้มข้น 2,830 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหารพื้นฐานสูตร $N_6$ เพื่อชักนำแคลลัสจากอับเรณูข้าวและชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการเกิดเป็นต้นใหม่ได้สูงถึง 70 % Vajrabhaya et al. (1985) รายงานว่าสามารถชักนำแคลลัสของข้าวไทย 8 พันธุ์ ให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้ตั้งแต่ 5-30 % โดยใช้สูตรอาหารประกอบด้วยธาตุอาหารหลักของ White (1963) ซึ่งดัดแปลงโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตแทนโซเดียมซัลเฟต และธาตุอาหารรองของ MS (1962) ต่อมา สิริพร ชาตะปัทมะ (2529) ศึกษาผลของธาตุ-อาหารหลักต่อการเกิดเป็นต้นใหม่จากแคลลัสข้าวพันธุ์ กข.23 โดยใช้สูตรอาหารที่ประกอบด้วยธาตุอาหารหลักของ White (1963) และสูตรศึกษาซึ่งดัดแปลง โดยการเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของอิออนไนเตรต ฟอสเฟต โปแตสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียม ที่มีอยู่เดิม 3 ถึง 16 เท่า และเติมอิออนแอมโมเนียม ซึ่งไม่มีในสูตรเดิม พบว่าเมื่อเติมไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียม ความเข้มข้น 171 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสูตรใดๆ มีผลให้เกิดต้นเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า สูตรอาหารพื้นฐานสูตร MS เหมาะสำหรับการชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่เช่นกัน (Jun and Rush, 1987 ; Croughan and Chu, 1991) อย่างไรก็ตาม Lee et al. (1989) รายงานว่าสูตรอาหารพื้นฐานสูตร MS และ $N_6$ สามารถชักนำแคลลัสจากการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของข้าวพันธุ์ IR 54 ได้ไม่แตกต่างกัน ต่อมา Ghoshbiswas and Zapata (1992) ศึกษาการชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่จากการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์ IR 43 ที่เลี้ยงเป็นเวลานาน พบว่าอาหารเหลวสูตรพื้นฐาน 1/2 $N_6$ สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้ดีกว่า อาหารเหลวสูตรพื้นฐาน $N_6$ นอกจากสูตรอาหารพื้นฐานต่างๆในการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ มีผลต่อการเกิดเป็นต้นใหม่ของแคลลัสข้าวแล้ว สูตรอาหารพื้นฐานต่างๆ ในการชักนำให้เกิดแคลลัส ก็มีผลต่อการเกิดเป็นต้นใหม่เช่นกัน Chung (1988) ศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานสูตร $N_6$ ดัดแปลง โดยลดความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต ที่มีอยู่เดิม 463 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 231.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเป็นสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากอับเรณูข้าวที่มีความสามารถเกิดเป็นต้นใหม่ได้สูง อย่างไรก็ตาม Koetje et al. (1989) ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างสูตรอาหารพื้นฐานสูตร MS และสูตร $N_6$ ในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเอมบริโอที่ยังไม่เจริญเต็มที่

ของข้าวพันธุ์ IR 54 เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสที่เจริญจากสูตรอาหารพื้นฐานสูตร $N_6$ มีความสามารถในการเกิดเป็นต้นใหม่ได้สูงกว่าแคลลัสที่เจริญจากสูตรอาหารพื้นฐานสูตร MS

บทบาทสำคัญของความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนิน มีผลต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่เช่นเดียวกับสูตรอาหารพื้นฐานต่างๆ สำหรับข้าวไทย Vajrabhaya et al. (1985) รายงานว่า ความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่างออกซินแและไซโตไคนิน ที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสข้าว กข.23 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้ยากนั้น ได้แก่ IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อมา สุภาพร วัฒนวีรเดช (2531) ศึกษาผลของออกซินและไซโตไคนินต่อการเกิดเป็นต้นใหม่จากแคลลัสข้าวพันธุ์ กข.23 พบว่าชนิดและความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนิน ได้แก่ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มอัตราการเกิดเป็นต้นใหม่ได้ถึง 30 % ต่อมา ลัดดา แสงเดือน (2531) ศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการเกิดเป็นต้นใหม่จากแคลลัสข้าวพันธุ์ กข.23 เช่นเดียวกัน พบว่าเมื่อเลี้ยงแคลลัสอายุ 2 สัปดาห์ ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ สูตรที่ 1 เพื่อชักนำแคลลัสให้เกิด greenspot คือ สูตรอาหารพื้นฐานสูตร $N_6$ ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ และย้ายแคลลัสจากสูตรที่ 1 เลี้ยงในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ สูตรที่ 2 เพื่อชักนำแคลลัสที่มี greenspot ให้พัฒนาเป็นหน่อ คือ สูตรอาหารพื้นฐานเดียวกันแต่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้มากที่สุดถึง 37.4 % ต่อมา Vajrabhaya and Vajrabhaya (1990) รายงานว่า สารควบคุมการเจริญกลุ่มออกซินและไซโตไคนิน ที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสข้าวพันธุ์ กข.23 ให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้มาก ได้แก่ NAA และ BAP ส่วนข้าวในกลุ่ม japonica นั้น Maeda et al. (1986) พบว่าการลดความเข้มข้นของ 2,4-D และเพิ่มความเข้มข้นของ kinetin สามารถเพิ่มจำนวนแคลลัสให้เกิด greenspot และเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ได้มาก ต่อมา Motokazu et al. (1988) รายงานว่าความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนิน ที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ ได้แก่ 2,4-D ความเข้มข้นต่ำเช่นกันคือ 0.002 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ใช้ BAP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานสำคัญที่มีผลต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ อย่างไรก็ตาม Vajrabhaya et al. (1984b) พบว่า สูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ที่มี

น้ำตาลซูโครสปริมาณสูงกว่า 30 และ 60 กรัมต่อลิตร ทำให้การเกิด greenspot และต้นใหม่ลดลง โดยเฉพาะอาหารที่ใช้น้ำตาลร่วมกับน้ำมะพร้าวยิ่งทำให้ greenspot ลดลง 4-4.6 เท่า เช่นเดียวกับ Kavi kishor and Reddy (1986) พบว่า น้ำตาลซูโครสปริมาณ 5-20 กรัมต่อลิตร เท่านั้นที่เหมาะต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ Abe and Futsuhara (1986) พบว่าการเติมน้ำตาลซูโครสปริมาณสูงถึง 60 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวในกลุ่ม japonica ทำให้อัตราการเกิด E callus และการเกิดเป็นต้นใหม่ลดลง แต่การชักนำแคลลัสจากอับเรณูข้าวต้องการน้ำตาลปริมาณสูงถึง 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีผลต่อความสามารถในการเกิดเป็นต้นใหม่ (Chen, 1978) เช่นเดียวกับ Higuchi and Maeda (1991) ซึ่งพบว่าการเติมน้ำตาลซูโครสปริมาณ 60 กรัมต่อลิตร หรือ manitol ในสูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสมีผลต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่างน้ำตาลและวุ้นผง ก็มีผลเช่นเดียวกัน Vajrabhaya and Vajrabhaya (1990) รายงานว่า การใช้วุ้นผงในปริมาณที่ทำให้วุ้นอาหารแข็งมากร่วมกับการเติมน้ำตาลซูโครสปริมาณน้อยกว่า 30 กรัมต่อลิตร ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่สามารถเพิ่มจำนวนแคลลัสข้าวพันธุ์ กข.23 ให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้สูงถึง 28 %

การเติมสารอินทรีย์เสริมในสูตรอาหารต่างๆ เพื่อเพิ่มอัตราการเกิดเป็นต้นใหม่จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวนั้น เริ่มได้รับความสนใจโดย Chuang et al.(1978) ศึกษาสูตรอาหารอย่างง่าย โดยการเติมน้ำสกัดมันฝรั่งน้ำหนัก 200 กรัมต่อลิตร แทนธาตุอาหารหลักทุกชนิดยกเว้นธาตุเหล็กในอาหารสูตร $N_6$ พบว่าสามารถชักนำอับเรณูข้าวสาลีให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้เพิ่มขึ้นจากเดิม 13.6 % ต่อมาได้พัฒนาสูตรอาหารเดิมนี้ โดยการลดปริมาณของธาตุอาหารหลักและน้ำหนักของน้ำสกัดมันฝรั่งเป็น 100 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการชักนำอับเรณูข้าวสาลีให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้มากขึ้นกว่าเดิม ต่อมา Zapata and Torrizo (1985) รายงานว่าการเติมน้ำมะพร้าวปริมาณ 100 มิลลิลิตรต่อลิตร ในสูตรอาหารชักนำอับเรณูข้าวให้เกิดแคลลัสสามารถเพิ่มจำนวนแคลลัสได้มากขึ้นกว่าเดิม 1.4 เท่า ต่อมา Vajrabhaya et al.(1987) พบว่าการเติมน้ำมะพร้าวปริมาณ 100 มิลลิลิตรต่อลิตร แทนน้ำตาลซูโครสในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ สามารถเพิ่มอัตราการเกิดเป็นต้นใหม่ได้มากขึ้นกว่าเดิม และยังพบว่าการเติมน้ำมะพร้าวในสูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส และการเติมน้ำสกัดมันฝรั่งน้ำหนัก 100 กรัมต่อลิตร ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ สามารถเพิ่มอัตราการเกิดเป็นต้นใหม่ได้มากยิ่งขึ้นเช่นกัน (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1990) Zhang and Zhang (1991) รายงานว่าการ

เติมน้ำสกัดจากลำต้นของบวบกลม (*Luffa cylindrica* Rome) ในสูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสจากอับเรณูข้าว สามารถเพิ่มอัตราการเกิดเป็นต้นใหม่จากแคลลัสข้าวในกลุ่ม japonica 8 พันธุ์ และข้าวในกลุ่ม indica 14 พันธุ์ ได้สูงถึง 90 % และ 70 % ตามลำดับ นอกจากนี้ Koetje et al. (1989) พบว่าการเติม casein hydrolysate ในสูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส สามารถเพิ่มอัตราการเกิดเป็นต้นใหม่ได้มากกว่าการเติม L-tryptophan และ yeast extract ในสูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตรเดียวกัน ส่วนการเติม casein hydrolysate ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่นั้น Vajrabhaya et al. (1985) พบว่าการเติม casein hydrolysate และ yeast extract ทั้งการเติมร่วมกันหรือแยกกันในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่นั้น กลับทำให้อัตราการเกิดเป็นต้นใหม่ลดลง สำหรับการเติมวิตามินและกรดอะมิโนเพื่อเพิ่มอัตราการเกิดเป็นต้นใหม่จากแคลลัสนั้น Vajrabhaya et al. (1987) รายงานว่าการใช้ thiamine HCL และ myo-inositol สามารถเพิ่มอัตราการเกิดเป็นต้นใหม่จากแคลลัสได้

นอกจากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีผลต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่แล้ว สิ่งแวดล้อมต่างๆก็มีผลเช่นกัน สำหรับแสงพบว่า ช่วงแสงที่ใช้ในการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ของข้าวไทย ได้แก่ การให้แสง 16 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้แสง 8 ชั่วโมง โดยใช้หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ Philips TL 40/33 และอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 21-27 องศาเซลเซียส (Vajrabhaya et al., 1987)

สาเหตุสำคัญที่เป็นปัจจัยกำหนดการเกิดเป็นต้นใหม่จากแคลลัสข้าว นอกจากขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ และสิ่งแวดล้อมต่างๆแล้ว ลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรมของต้นเดิมก็มีผลเช่นกัน ถึงแม้จะเป็นข้าวที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันแต่ต่างพันธุ์กัน ความสามารถในการชักนำให้เกิดแคลลัส และการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ก็มีความแตกต่างกันอย่างมาก ทั้งนี้เนื่องจากมีลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรมที่ต่างกันนั่นเอง (Abe and Futsuhara, 1984 ; Reddy et al., 1985 ; Koetje et al., 1989 ; Motokazu et al., 1988) สำหรับข้าวในกลุ่ม indica โดยเฉพาะข้าวไทยนั้น Vajrabhaya and Vajrabhaya (1990) รายงานว่าข้าวพันธุ์ กข.23 และ กข.25 เป็นพันธุ์ที่ชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้ยากที่สุดจากการศึกษาข้าวไทยทั้งหมด 8 พันธุ์ ยิ่งกว่านั้นข้าวพันธุ์ กข.23 ยังมีลักษณะที่น่าสนใจคือ เป็นข้าวพันธุ์ที่ไม่ไวแสง มีอายุประมาณ 120-130 วัน ความสูงของต้นประมาณ 115-120 เซนติเมตร แตกกอค่อนข้างดี ต้านทานต่อโรคฐ์และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ให้ผลผลิตสูง เมล็ดยาวเรียว ข้าวสารสวย

เมื่อหุงสุกมีความนุ่มพอเหมาะและรสชาติดี (อรรควุฒิ ทัศน์สองชั้น, 2526 ; เอกสารประกอบ 1, 2526) ดังนั้นถ้าสามารถเพิ่มลักษณะที่มีความทนทานต่อสิ่งแวดล้อมได้ดีเข้าไปในพันธุ์ข้าวนี้ได้ โดยอาศัยการกลายพันธุ์ พันธุ์ข้าว กข.23 นี้ จะมีประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

ดังนั้นผู้วิจัยจึงคิดแนวทางในการปรับปรุงวิธีการชักนำแคลลัสข้าวให้เกิดเป็นต้นใหม่ให้ได้มากในข้าวกลุ่ม indica พันธุ์ กข.23 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ได้ยาก โดยศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนิน การใช้สารอินทรีย์เสริมต่างๆ ความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่างน้ำตาลซูโครสและ gelrite และแป้งข้าวโพดแทนวุ้นผง

<u>ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ</u>

1. ได้สูตรอาหารใหม่ที่สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้เพิ่มขึ้น
2. ลดขั้นตอนในการชักนำแคลลัสให้เกิดหน่อ
3. สูตรอาหารและวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นมาใหม่ สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวต่อไป