KHON KAEN AGR. J. 48 (3): 585-596 (2020)./doi:10.14456/kaj.2020.54.

ผลของออกซินและชิ้นส่วนเมล็ด ต่อการงอกของยอดและการชักนำแคลลัสของข้าวสังข์หยดเมืองพัทลุง

Effects of auxin and explant types on seed germination and callus induction in *Sang yod muang phatthalung* rice

ปรมาภรณ์ น้อยมุสิก[1],สมปอง เตชะโต[1*] และ สุรีรัตน์ เย็นช้อน[1]

Paramaporn Noimusik[1], Sompong Te-chato[1*] and Sureerat Yenchon[1]

บทคัดย่อ: ศึกษาผลของออกซินและชิ้นส่วนเมล็ดต่อการงอกและการสร้างแคลลัสโดยเพาะเลี้ยงคัพภะแก่บนอาหารสูตร oil palm culture medium (OPCM) ที่ไม่เติม หรือที่เติม 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) หรือ 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic-acid (Dicamba) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ชิ้นส่วนของคัพภะแก่ประกอบด้วยเอนโดสเปิร์มร่วมกับเอ็มบริโอบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 5 มก./ล. เป็นเวลา 7 วัน ให้อัตราการงอกสูงสุด 100.00 % เวลาที่ใช้ในการงอกเฉลี่ยน้อยสุด 4.54 วัน แต่หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน อาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4 มก./ล. ให้อัตราการเกิดแคลลัสสูงสุด 88.00-90.00 % และขนาดของแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 24.65-28.8 ตร.มม. แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.01$) กับสิ่งทดลองอื่น ๆ แคลลัสที่ได้มีสีเหลืองอ่อน เกาะกันหลวมๆ

คำสำคัญ: ข้าวสังข์หยดเมืองพัทลุง การงอกของเมล็ด การชักนำแคลลัส

ABSTRACT: To study the effects of auxin and various explant types on seed germination and callus formation of *Sang Yod Muang Phatthalung* rice, mature seeds were cultured on PGRs-free oil palm culture medium (OPCM) with different concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) or 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic-acid (Dicamba). The results showed that mature seeds comprised of endosperm and embryo cultured on OPCM medium with 5 mg/L 2,4-D for 7 days gave the best results in seed germination at 100 %, mean germination time (MGT) at 4.54 days. After culture complete seeds on OPCM medium with 4 mg/L 2,4-D for 30 days, however, the most callus induction rate at 88.00-90.00 % and average size of callus at 24.65-28.8 mm^2 were obtained, significantly different ($P \leq 0.01$) with the other treatments. The characteristics of callus were white -yellow in color and friable.

Keywords: *Sang Yod Muang Phatthalung* rice, seed germination, callus induction

Received August 6, 2019

Accepted December 2, 2019

[1] ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

[1] Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112

* Corresponding author: stechato@yahoo.com

บทนำ

ข้าวเป็นธัญพืชซึ่งประชากรโลกบริโภคเป็นอาหารสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในทวีปเอเชีย จากข้อมูลเมื่อปี พ.ศ. 2553 ข้าวเป็นธัญพืชซึ่งมีการปลูกมากที่สุดเป็นอันดับ 2 ทั่วโลก รองจากข้าวโพด (ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าวและหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว, 2560) ข้าวอยู่ในวงศ์หญ้า (*Poaceae* หรือ *Gramineae*) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

ข้าวสังข์หยดเมืองพัทลุงเป็นข้าวเจ้าซึ่งได้รับการขึ้นทะเบียนสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ (Geographical Indications; GI) พันธุ์แรกของไทย (สำเริง, 2550) เป็นพันธุ์ข้าวที่ปลูกในจังหวัดพัทลุงมานานกว่า 100 ปี (กรมการข้าว, 2553) เมล็ดข้าวเปลือกโดยเฉลี่ยมีความยาว 9.26 มม. และความกว้าง 1.84 มม. ส่วนเมล็ดข้าวกล้องโดยเฉลี่ยมีความยาว 6.53 มม. และ ความกว้าง 1.76 มม. (นันทิยา, 2559) มีปริมาณอะมัยโลส 15 % (กรมการข้าว, 2553) มีลักษณะพิเศษ คือ เยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง มี Gamma Amino Butyric Acid (GABA) ช่วยลดอัตราเสี่ยงของการเป็นมะเร็ง มีรงควัตถุประเภทฟลาโวนอยด์ มีสารแอนโทไซยานิน 15.14 มก. ของ Cyanidin-3-glucoside: Cy-3-glc (Yodmanee et al., 2011) มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ชะลอความชรา ลดความเสี่ยงการเป็นโรคต่าง ๆ เช่น ป้องกันโรคหัวใจ โรคเบาหวาน มะเร็ง และหลอดเลือด (Ho et al., 2018) ดังนั้นการรับประทานข้าวสังข์หยดเมืองพัทลุงทำให้ลดการตีบตันของหลอดเลือด เพิ่มการไหลเวียนของโลหิต นอกจากนี้มีสารไนอะซินสูง 6.45 มก. ช่วยในเรื่องของระบบประสาทผิวหนัง มีสารแคลเซียมและฟอสฟอรัส 165 มก. โดยมีปริมาณสูงเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์อื่น (กรมการข้าว, 2553)

ปัจจุบันผู้บริโภคนิยมบริโภคข้าวเพื่อสุขภาพมากขึ้นทั่วโลก ซึ่งข้าวพันธุ์สังข์หยดเมืองพัทลุงนับว่าเป็นพันธุ์ที่ผู้บริโภคนิยมมากพันธุ์หนึ่งเนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการหลากหลายชนิดที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น เมื่อข้าวเป็นที่ต้องการของผู้บริโภคมาก ดังนั้นการขายข้าวในตลาดจะทำให้เกิดผลกำไรทางเศรษฐกิจแก่เกษตรกรและผลประโยชน์ทางโภชนาการแก่ผู้บริโภค แต่ปัญหาหนึ่งของข้าวสังข์หยดเมืองพัทลุง คือโรคไหม้ข้าว (Rice Blast Disease) (กรมการข้าว, 2553) เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* Sacc. สามารถเข้าทำลายข้าวได้ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะออกรวง ตั้งแต่ใบ ลำต้น ข้อและคอรวง ความเสียหายในระยะคอรวงทำให้น้ำหนักขนาดเมล็ด และเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดน้อยลง ทำให้ผลผลิตลดลง 0.4-100 % (จินตนา และคณะ, 2559) โดยงานวิจัยนี้จะเน้นการวิจัยและพัฒนาวิธีการขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมากเพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวดังกล่าวตามที่ต้องการโดยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป เช่นการปรับปรุงเพื่อให้ทนทานโรคใบไหม้ ทนแล้ง และไม่ไวแสง เป็นต้น สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโดยปกติจะประสบความสำเร็จขึ้นอยู่กับ จีโนไทป์ สูตรอาหาร ชนิดของชิ้นส่วนพืช สารควบคุมการเจริญเติบโต และ สภาพการวางเลี้ยง (Feng et al., 2011; Ge et al., 2006; Hoque and Mansfield, 2004; Hoque and Mansfield, 2004; Saharan et al., 2004; Wani et al., 2011) ส่วนใหญ่การชักนำแคลลัสของข้าวได้มาจากชิ้นส่วนหลายชนิด เช่น คัพภะอ่อน (Hiei and Komari, 2008), คัพภะแก่ (Zuraida et al., 2011; Zinnah et al., 2013), อับละอองเรณู (Raina et al., 1987; Xa and Lang, 2011), ไมโครสปอร์ (Datta et al., 1990) ใบ (Karthikeyan et al., 2011; Abiri et al., 2017) และราก (Abiri et al., 2017) แต่ชิ้นส่วนที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยงคือ คัพภะแก่

2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงข้าวโดยการใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับพันธุ์ เช่น ข้าวพันธุ์ MR 219 ใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 2 มก./ล. (Abiri et al., 2017) ข้าวพันธุ์หอมนิล ใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 2.5 มก./ล. (พันทิวา และ ขวัญเดือน, 2560) ข้าวพันธุ์ Super Basmati Basmati 370 Basmati 371 และ Fakhre Malakand (Tariq et al., 2008) และ ข้าวพันธุ์หอมกระดังงา (Yinxia and Te-chato, 2013) ข้าวพันธุ์กาบดำ (กมลทิพย์ และคณะ, 2560) ใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มก./ล. 2,4-D เป็นออกซินสังเคราะห์ช่วยเพิ่มการสร้างแคลลัส และมีออกซินสังเคราะห์อีกตัวหนึ่งที่ใช้ชักนำแคลลัสในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวแต่ในข้าวมีการใช้กันไม่แพร่หลาย คือ 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (Dicamba) โดยมีการนำมาประยุกต์ใช้ในข้าวพันธุ์หอมกระดังงา (อรุณี, 2557) และข้าวพันธุ์ MR 219 ของมาเลเซีย (Abiri et al., 2017) Dicamba เป็นออกซินที่ช่วยพัฒนาเนื้อเยื่อเทรคีด (Tracheid) ในแคลลัสและเซลล์ของพืช (Abiri et al., 2017) ส่งผลให้พืชสร้างแคลลัสได้เพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของคัพภะของข้าวพบว่ามี 2 ส่วนที่สำคัญคือเอนโดสเปิร์ม จมูก

ข้าวหรือคัพภะ ปัจจุบันยังไม่มีนักวิจัยรายใดศึกษาการเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชิ้นส่วน (เอนโดสเปิร์ม และคัพภะ) แยกกัน ในการศึกษานี้ได้แยกชิ้นส่วนเมล็ดเป็นส่วนของเอนโดสเปิร์ม และคัพภะ แยกเลี้ยงเพื่อชักนำแคลลัส และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงคัพภะแก่ โดยในขั้นต้นศึกษาผลของออกซิน ต่อการงอกและการสร้างแคลลัสของข้าวสังข์หยดเมืองพัทลุงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์ข้าวสังข์หยดเมืองพัทลุงในหลอดทดลอง

วิธีการศึกษา

ผลของชนิดและความเข้มข้นของออกซิน ต่อการงอกและการสร้างแคลลัส

นำเมล็ดแก่ของข้าวสังข์หยดเมืองพัทลุงซึ่งเป็นข้าวเจ้าที่มีลักษณะของข้าวสารหรือ ข้าวกล้องที่เยื่อหุ้มเมล็ดมีสีแดงจนถึงแดงเข้มในเมล็ดเดียวกัน ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง ลักษณะทั่วไปเป็นพันธุ์ข้าวนาสวน ไวต่อช่วงแสง มาฟอกฆ่าเชื้อโดยนำเมล็ด ที่ได้มาแกะเปลือก เปิดน้ำไหลผ่านเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 % นาน 2 นาที แช่เมล็ดในคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 20 % และเติมทวีน 20 ปริมาตร 0.05-0.1 มล.ต่อคลอร็อกซ์ 100 มล. นาน 6 นาที ล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง หลังจากนั้นวางเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM ที่ไม่เติมหรือเติม 2,4-D หรือ Dicamba ความเข้มข้นแตกต่างกัน (1 2 3 4 5 หรือ 6 มก./ล.) ภายใต้การให้แสง 15 ไมโครโมลต่อ ตร.ม.ต่อวินาที เป็นเวลา 10 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส แต่ละชนิดและความเข้มข้นของออกซินทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 1 จานเพาะเลี้ยง (แต่ละจานเพาะเลี้ยง วางเลี้ยง 25 ชิ้นส่วน) บันทึกการงอกของเมล็ดเป็นเวลา 30 วัน และหลังจากวางเลี้ยง ณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพพืชปลูก ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ เป็นเวลา 30 วัน บันทึกอัตราการชักนำแคลลัส ขนาดแคลลัส ลักษณะและสีของแคลลัส เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

ผลของชิ้นส่วนเมล็ดต่อการงอกของยอดและการสร้างแคลลัส

นำชิ้นส่วนเมล็ดข้าว 3 ชนิด คือ 1) ชิ้นส่วนทั้งเมล็ด (ประกอบด้วยเอนโดสเปิร์มร่วมกับเอ็มบริโอ) 2) ชิ้นส่วนเอนโดสเปิร์ม และ 3) ชิ้นส่วนเอ็มบริโอ มาใช้ในการทดลองที่ 2 หลังจากผ่านการฟอกฆ่าเชื้อทำให้ชิ้นส่วนเกิดกระบวนการดูดน้ำ โดยการแช่น้ำเป็นเวลา 30 นาที เพื่อ ง่ายต่อการตัดแยกชิ้นส่วนและนำชิ้นส่วน วางเลี้ยงบนอาหารสูตร ที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 วางเลี้ยงภายใต้แสง 15 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 10 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส แต่ละชิ้นส่วนเมล็ดทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 1 จานเพาะเลี้ยง (แต่ละจานเพาะเลี้ยงวางเลี้ยง 5 ชิ้นส่วน) บันทึกการงอกของเมล็ดทุกวันเป็นเวลา 30 วัน และหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน บันทึกอัตราการชักนำแคลลัส ขนาดแคลลัส ลักษณะและสีของแคลลัส เปรียบเทียบกันในแต่ละชิ้นส่วนที่ใช้ทดสอบ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ผลการศึกษา

ผลของชนิดและความเข้มข้นของออกซิน ต่อการงอกและการสร้างแคลลัส

การทดลองเปรียบเทียบความเข้มข้นของ 2,4-D และ Dicamba ต่อการงอกของยอดและการสร้างแคลลัสจากเมล็ดแก่ เมื่อพิจารณาการงอกพบว่า ทุกชุดการทดลองเมล็ดเริ่มงอกปลายยอดออกมา หลังวางเลี้ยงนาน 2 วัน โดย 2,4-D เข้มข้น 5 มก./ล. ให้อัตราการงอกของเมล็ดสูงสุด 90.00 % และหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน พบว่า 2,4-D เข้มข้น 5 และ 6 มก./ล. ให้อัตราการงอกของเมล็ดสูงสุด 100.00 % **(Figure 1)** โดย 2,4-D เข้มข้น 5 มก./ล. เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ 2,4-D และ Dicamba ต่ออัตราการงอก พบว่า 2,4-D ให้อัตราการงอกดีกว่า Dicamba **(Figure 2A)** พบว่า ใช้เวลาในการงอกของเมล็ดน้อยสุด 4.54 วัน **(Figure 2B)**

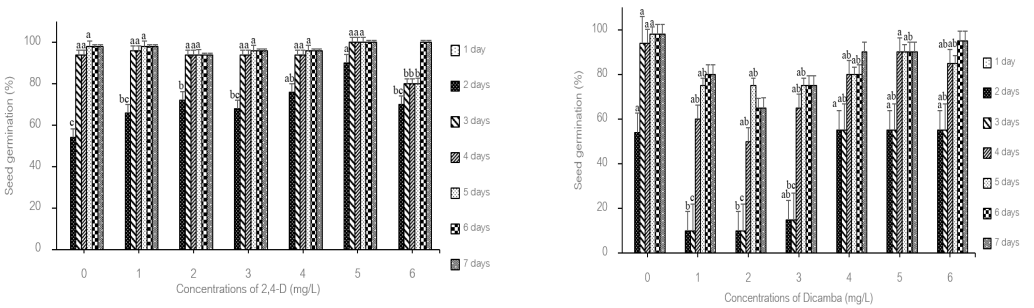

Figure 1 Effect of different types and concentrations of auxin culture on OPCM medium on seed germination after 7 days (bar = S.E.)

Mean values followed by the same letter are not significantly different according to DMRT.

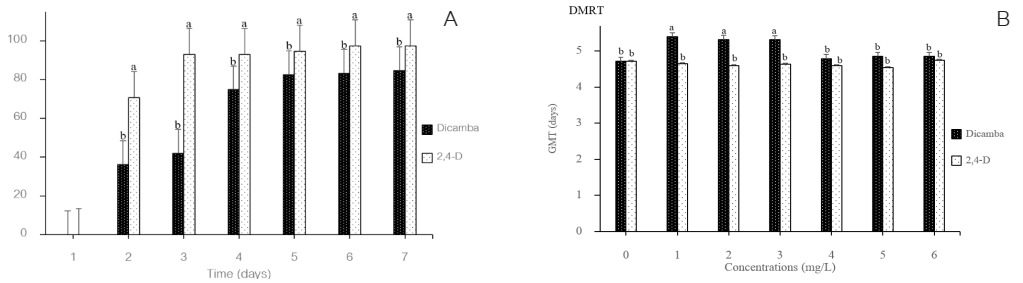

Figure 2 Effect of different types and concentrations of auxin culture on OPCM medium after 7 days (bar = S.E.)

A. Seed germination B. GMT

Mean values followed by the same letter are not significantly different according to DMRT.

เมื่อพิจารณาการสร้างแคลลัส พบว่า Dicamba ให้ผลดีกว่า 2,4-D ในด้านการชักนำและเพิ่มขนาดแคลลัส อาหารสูตร OPCM ที่เติม Dicamba เข้มข้น 5 มก./ล. ให้การชักนำแคลลัสสูงสุด 100.00 % (**Figure 3A**) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ในขณะที่ Dicamba เข้มข้น 5 มก./ล. ให้ขนาดแคลลัสสูงสุด 76 ตร.มม. (**Figure 3B**) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (P>0.05) กับการเติม Dicamba ที่ความเข้มข้นอื่น ๆ ยิ่งไปกว่านั้นแคลลัสที่ได้จากอาหารข้างต้นพัฒนามีลักษณะคล้ายราก (**Table 1**; **Figure 4**) ซึ่งเป็นแคลลัสที่ไม่เหมาะสมต่อการย้ายเลี้ยงเพื่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส การสร้างยอดและราก ดังนั้นจึงมาพิจารณา แคลลัสที่ได้จากการวางเลี้ยงเมล็ดบนอาหารที่เติม 2,4-D พบว่า แคลลัสมีลักษณะเป็นรูปกลม โดยเป็นแคลลัสที่เหมาะสม อย่างไรก็ตาม แคลลัสที่ได้จากอาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 5 และ 6 มก./ล. มีการเกิดรากร่วมกับแคลลัส ดังนั้น 2,4-D เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงเหมาะสมที่สุด

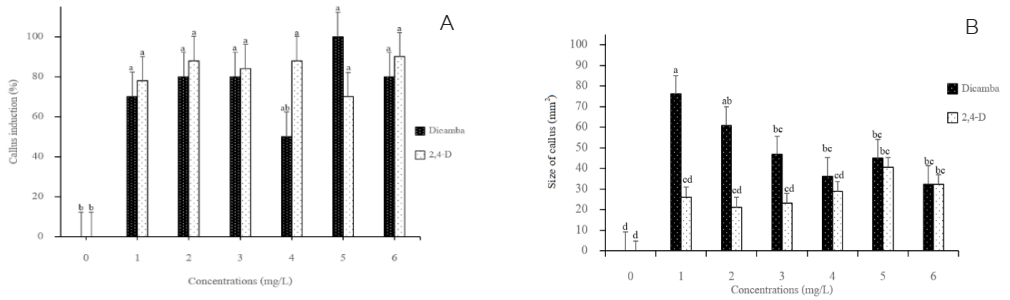

Figure 3 Effect of different types and concentrations of auxin culture on OPCM medium after 30 days (bar = S.E.)

A. Callus induction B. Size of callus

Table 1 Effect of types and concentrations of auxin on characteristics of callus for 30 days

2,4-D (mg/L)	Dicamba (mg/L)	Characteristics of callus
0	0	No callus formation
1	0	White-yellow color, globular, friable callus
2	0	White-yellow color, globular, friable callus
3	0	White-yellow color, globular, friable callus
4	0	White-yellow color, globular, friable callus
5	0	White-yellow color, globular, friable callus
6	0	White-yellow color, globular, friable callus
0	1	White-yellow color, root like structure and globular, friable callus
0	2	White-yellow color, root like structure and globular, friable callus
0	3	White-yellow color, root like structure and globular, friable callus
0	4	White-yellow color, root like structure and globular, friable callus
0	5	White-yellow color, root like structure and globular, friable callus
0	6	White-yellow color, root like structure and globular, friable callus

Mean values followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test (DMRT).

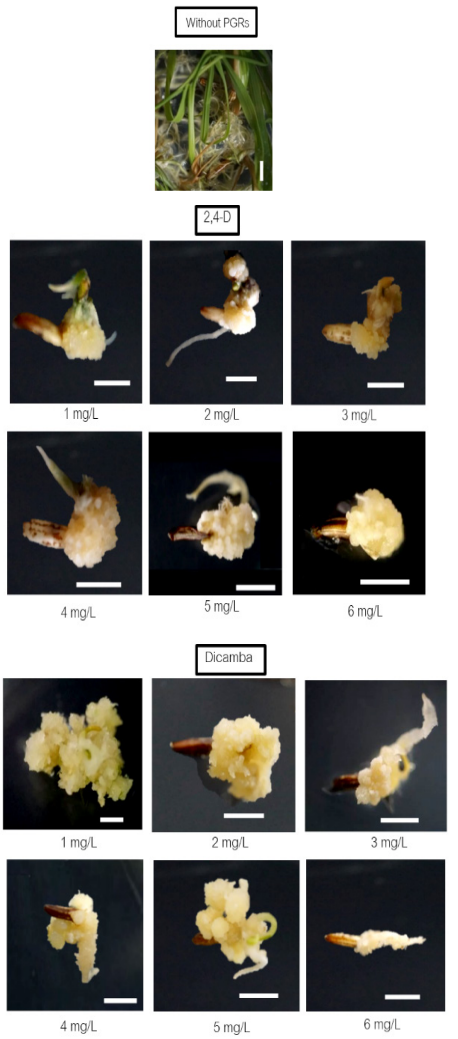

Figure 4 Seeds of *Sang Yod Muang Phatthalung* rice on OPCM medium supplemented with different concentrations of PGRs for 30 days (bar=5 mm).

ผลของชิ้นส่วนเมล็ดต่อการงอกและการสร้างแคลลัส

ชิ้นส่วนเมล็ดที่ต่างกันเมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร OPCM ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 4 มก./ล. ซึ่งเป็นอาหารสูตรดีที่สุดในการทดลองก่อนหน้า พบว่า ให้อัตราการงอกแตกต่างกัน วันที่ 1 ทุกชิ้นส่วนยังไม่มีการงอก วันที่ 2 ชิ้นส่วนของเอนโดสเปิร์มร่วมกับเอ็มบริโอเริ่มงอกปลายยอดออกมาโดยมีอัตราการงอกสูงสุด 44.00 % ในขณะที่ชิ้นส่วนอื่นยังไม่มีการงอก วันที่ 3 ชิ้นส่วนเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงเริ่มมีการงอก และเมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ชิ้นส่วนของเอนโดสเปิร์มร่วมกับเอ็มบริโอให้อัตราการงอกของเมล็ดสูงสุด 84.00 % (Figure 5A) แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ในขณะที่ชิ้นส่วนของเอนโดสเปิร์มไม่มีการงอก อย่างไรก็ตามเวลาที่ใช้ในการงอกของเมล็ดน้อยสุด 4.72 วัน (Figure 5B)

เมื่อพิจารณาการสร้างแคลลัส พบว่า การวางเลี้ยงชิ้นส่วนของเอนโดสเปิร์มร่วมกับเอ็มบริโอบนสูตรอาหาร OPCM ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 4 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน ให้การชักนำแคลลัสสูงสุด 90.00 % ขนาดแคลลัสสูงสุด 24.65 ตร.มม. แคลลัสมีลักษณะเป็นปมสีเหลืองอ่อนเกาะกันหลวมๆ (Table 2; Figure 5C) อย่างไรก็ตามไม่พบการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนของเอนโดสเปิร์ม (Figure 4C; Figure 6)

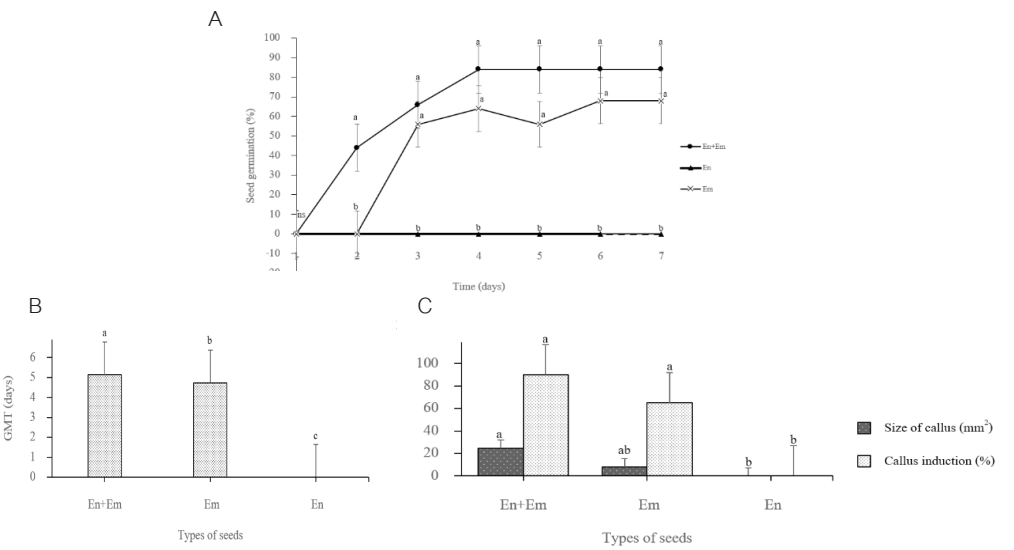

Figure 5 Effect of different types and concentrations of auxin culture on OPCM medium on seed germination after 7 days (bar = S.E.)
En+Em (Endosperm+Embryo) En (Endosperm) Em (Embryo)
A. Seed germination B. GMT C. Response of size of callus and callus induction
Mean values followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test (DMRT).

Table 2 Effect of types of seeds on characteristics of callus culture on OPCM medium supplemented with 4 mg/L 2,4-D for 30 days

Types of seeds	Characteristics of callus
Endosperm with embryo	White-yellow color, globular, friable callus
Endosperm	No callus formation
Embryo	White-yellow color, globular, friable callus

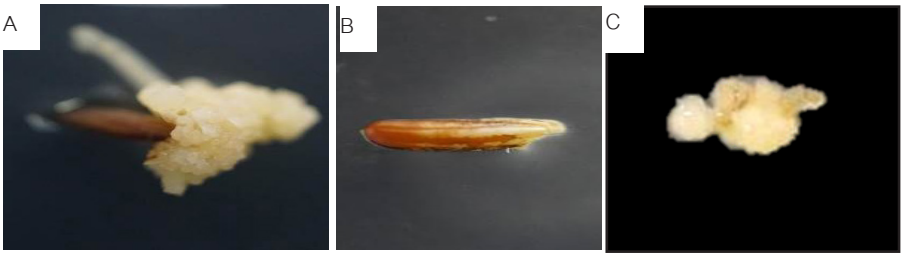

Figure 6 Characteristics of callus were obtained from seeds of *Sang Yod Muang Phatthalung* rice on OPCM medium supplemented with 4 mg/L 2,4-D for 30 days (bar=5 mm)
A. Endosperm with embryo B. Endosperm C. Embryo

วิจารณ์

ผลของชนิดและความเข้มข้นของออกซิน ต่อการงอกของยอดและการสร้างแคลลัสของเมล็ด

สารควบคุมการเจริญเติบโตมีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นอย่างมาก โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จะให้ผลต่างกันในพืชที่ต่างกัน ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว หากเลือกใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตและความเข้มข้นที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำแคลลัสได้มากยิ่งขึ้น สำหรับการงอกของเมล็ดสูตรอาหาร OPCM ที่เติม 2,4-D ให้อัตราการงอกของเมล็ดสูงกว่าการเติม Dicamba และใช้เวลาในการงอกของเมล็ดน้อยกว่าการเติม Dicamba แต่สำหรับการสร้างแคลลัส พบว่าการใช้ Dicamba ให้ขนาดแคลลัสเพิ่มขึ้นและการชักนำแคลลัสสูงสูงกว่าการเติม 2,4-D อย่างไรก็ตามการเติม Dicamba ในอาหารให้แคลลัสมีลักษณะคล้ายรากมากกว่าลักษณะกลม โดยแคลลัสที่มีลักษณะคล้ายรากเป็นลักษณะที่ไม่ต้องการ ดังนั้นจึงพิจารณา 2,4-D ซึ่งมีแคลลัสลักษณะกลมเพียงอย่างเดียว และขนาดแคลลัสรองลงมาจาก Dicamba

การเติม 2,4-D ที่เข้มข้น 4 มก./ล. เหมาะสมที่สุด เพราะมีลักษณะของแคลลัสที่ต้องการ ในขณะที่ Abiri et al. (2017) และ Jubair et al. (2008) รายงานว่าการชักนำแคลลัสในข้าวพันธุ์ MR 219 และข้าวพันธุ์ Topa โดยวางเลี้ยงเมล็ดแก่บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มก./ล. ชักนำแคลลัสได้สูงสุด 75 % และ มีอัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสครั้งแรกสูงสุด 0.085 ก. ต่อสัปดาห์ Yinxia and Te-chato (2013) รายงานการชักนำแคลลัสในข้าวพันธุ์หอมกระดังงา พบว่า 2,4-D เข้มข้น 3 มก./ล. ในอาหารสูตร MS สามารถชักนำแคลลัสได้สูงสุด 33.90 % นอกจากนี้ Yinxia (2013) ยังรายงานอีกว่าการใช้ 2,4-D เข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ NAA และ BA เข้มข้นเท่ากัน 1 มก./ล. และ Kinetin (KN) เข้มข้น 0.5 มก./ล. ให้การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในข้าวหอมกระดังงาได้ดี แต่ในการศึกษานี้ได้ทดลองทำแล้วปรากฏว่าแคลลัสที่ได้ลักษณะคล้ายรากซึ่งไม่เหมาะสมต่อการย้ายเลี้ยง การเพิ่มปริมาณแคลลัส และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ (ไม่แสดงข้อมูล) ทั้งนี้ความแตกต่างอาจเนื่องจากสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และพันธุ์ที่ใช้ใน

การศึกษา ซึ่งพันธุ์ที่แตกต่างกันตอบสนองต่อสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ต่างกัน Abiri et al. (2017) รายงานว่าออกซินสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ แบ่งเซลล์และใช้เป็นตัวเริ่มต้นในการสร้างแคลลัส โดย 2,4-D และ Dicamba เป็นออกซินที่มนุษย์สังเคราะห์ โดยจากการเปรียบเทียบผลของชนิดออกซินในการชักนำแคลลัส พบว่า 2,4-D สามารถชักนำแคลลัสสูงกว่า Dicamba สอดคล้องกับการศึกษานี้ซึ่งพบว่า Dicamba ให้การสร้างแคลลัสน้อยกว่า 2,4-D และยังส่งเสริมให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นโครงสร้างที่คล้ายรากซึ่งไม่เหมาะในการย้ายเลี้ยงและชักนำพืชต้นใหม่ต่อไป

ผลของชิ้นส่วนเมล็ดต่อการงอกของยอดและการสร้างแคลลัสของเมล็ด

เมื่อเปรียบเทียบชิ้นส่วนที่แตกต่างกัน พบว่า ชิ้นส่วนเมล็ดข้าว และชิ้นส่วนเอ็มบริโอเท่านั้นที่สามารถงอกและสร้างแคลลัสได้ เนื่องจากว่าชิ้นส่วนเอ็นโดเสปิร์มไม่มีต้นอ่อนและเป็นเนื้อเยื่อถาวรดังนั้นจึงไม่สามารถงอกและไม่สามารถสร้างแคลลัสได้ ทั้งนี้เห็นได้ว่าเมล็ดข้าวทั้งเมล็ดงอกและสร้างแคลลัสได้เร็วที่สุด เพราะมีอาหารจากทั้ง 2 แหล่ง คือ เอ็นโดเสปิร์มและอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ซึ่งสองวันแรกชิ้นส่วนเมล็ดข้าวทั้งเมล็ด มีการงอกของราก โดยรากมีการดูดน้ำและสารอาหารจากอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติม 2,4-D ส่งผลทำให้รากไม่มีการพัฒนา แต่มาสร้างแคลลัสแทน การศึกษาชิ้นส่วนของเมล็ดข้าวต่อการงอกและการสร้างแคลลัสยังไม่มีใครรายงานมาก่อน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงสรุปได้ว่าการวางเลี้ยงชิ้นส่วนทั้งเมล็ด ส่งผลให้การงอกและการสร้างแคลลัสดีที่สุด แม้ว่าการเพาะเลี้ยงเอ็นโดเสปิร์มข้าวในการศึกษานี้ไม่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยง แต่ยังไม่มีการศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม ดังนั้นหากมีการศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ร่วมด้วยเช่น สูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตเช่น Thidiazuron (TDZ) NAA หรือ BA เป็นต้น เพื่อสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้จะได้ต้นข้าวที่มีโครโมโซมที่มี 3 ชุด เป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในอนาคตซึ่ง Antoniazzi et al. (2018) รายงานการนำเอ็นโดเสปิร์มของเสาวรส (*Passiflora edulis* Sims) มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ เข้มข้น 9 มิลลิกรัมต่อลิตร ว่าให้การชักนำยอดดีสุด 32 % จำนวนยอดสูงสุด 59.20 ยอด นอกจากนี้ Thang et al. (2018) รายงานการนำเอ็นโดเสปิร์มของเลี่ยน (*Melia azedazach*) มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 2 มก./ล. และ BA เข้มข้น 1 มก./ล. ว่าให้การชักนำแคลลัสสูงสุด 55.90 % ชักนำยอดสูงสุด 98.00 %

การเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวทั้งเมล็ดบนสูตรอาหารที่ดีที่สุดคือ อาหารสูตร OPCM ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 4 มก./ล. ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวทั้งเมล็ดมีรายงานในข้าวหลายพันธุ์ โดย Yinxia (2013) รายงานการนำเมล็ดข้าว *indica* พันธุ์หอมกระดังงา ทั้งเมล็ด วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 3 มก./ล. ให้การชักนำแคลลัสสูงสุด 33.90 % Abiri และคณะ (2017) รายงานการนำเมล็ดแก่ของข้าว *indica* พันธุ์ MR 219 วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มก./ล. ให้การชักนำแคลลัสสูงสุด 61 % แสดงให้เห็นว่าแต่ละพันธุ์มีการตอบสนองต่อสูตรอาหาร ชนิดและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ต่างกัน อย่างไรก็ตาม He and Yang (2013) รายงานว่าเมล็ดมีเอ็นโดเสปิร์มสำหรับการสะสมเก็บอาหารเพื่อเลี้ยงเอ็มบริโอ การงอกของเมล็ดมีระยะที่สำคัญคือระยะที่ 1 เป็นการดูดน้ำเพื่อทำให้เปลือกเมล็ดอ่อนนุ่มให้น้ำและอากาศผ่านเข้าไปได้ ใช้เวลา 1 วัน ระยะที่ 2 เป็นการย่อยสลายอาหารโมเลกุลใหญ่โดยเฉพาะโพลีแซคคาไรด์ให้เป็นโมเลกุลเล็กของโมโนแซคคาไรด์ใช้เวลา 2 วัน ระยะที่ 3 มีการงอกของรากแรกเกิด ใช้เวลาอย่างน้อย 3 วัน ซึ่ง วัลลภ (2540) รายงานไว้ด้วยว่า กระบวนการงอกของเมล็ดประกอบไปด้วย การดูดน้ำ การกระตุ้นเอนไซม์ การเจริญของเอ็มบริโอ โดยการงอกของเมล็ดข้าวในหลอดช้ากว่านอกหลอด เพราะการทำให้เมล็ดข้าวงอกในหลอด ต้องมีการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าว ซึ่งอาจมีผลต่อการงอก

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2 ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง

สรุป

การศึกษาผลของออกซินต่อการงอกและการสร้างแคลลัสของข้าวสังข์หยดเมืองพัทลุง พบว่า เมล็ดที่เลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 5 มก./ล. หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ให้อัตราการงอกของเมล็ดสูงสุด 100.00 % และใช้เวลาในการงอกของเมล็ดเฉลี่ยน้อยสุด 4.54 วัน แต่หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ชิ้นส่วนของเอ็นโดเสปิร์มร่วมกับเอ็มบริโอที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร OPCM ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 4 มก./ล. ให้การชักนำแคลลัสดีสุด 88.00-90.00 % และให้ขนาดของแคลลัสสูงสุด 24.65-28.80 ตร.ซม. แคลลัสมีสีเหลืองอ่อน รูปกลม และเกาะกันหลวมๆ

เอกสารอ้างอิง

กมลทิพย์ สำลีแก้ว, อรพิมล แท่นทอง, ผการัตน์ โรจน์ดวง และสุภาวดี รามสูตร. 2560. การขยายพันธุ์ข้าวพื้นเมืองพันธุ์กาบดำด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วารสารวิชชา. 36: 25-35.

กรมการข้าว. 2553. ข้าวสังข์หยดเมืองพัทลุง ข้าวจีไอ พันธุ์แรกของประเทศไทย. สำนักพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าว กรมการข้าว, กรุงเทพฯ.

จินตนา ต๊ะย่วน, เกียรติศักดิ์ ราชัยสวรรค์ และสุขุมาภรณ์ ศรีเผด็จ. 2559. การควบคุมเชื้อรา *Pyricularia grisea* สาเหตุโรคใบไหม้ข้าว. แก่นเกษตร. 44: 972-976.

นันทิยา พนมจันทร์, ศันสนีย์ จำจด, เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม, Dell, B., และชนากานต์ พรมอุทัย. 2559. ความแปรปรวนของลักษณะสัณฐานวิทยาในเมล็ดข้าวพันธุ์สังข์หยดจากภาคใต้ของประเทศไทย. แก่นเกษตร. 44: 83-94.

พันทิวา ทีรวม และขวัญเดือน รัตนา. 2560. การชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นใหม่ของข้าวเจ้าหอมนิล. แก่นเกษตร. 45: 1052-1059.

ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าวและหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว. 2560. ข้าวคือชีวิต. แหล่งข้อมูล: http://dna.kps.ku.ac.th/index.php/rsc-news/new-rsc-rgd/news/205- rice-for-life. ค้นเมื่อ 10 พฤษภาคม 2562.

สำเริง แซ่ตัน. 2550. ข้าวพันธุ์แรก: สิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ (GI) สังข์หยดเมืองพัทลุง. ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง, พัทลุง.

อรุณี ยูโซ๊ะ. 2557. การขยายพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการอนุรักษ์พันธุกรรมในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

วัลลภ สันติประชา. 2540. เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Abiri, R., M. Maziah, N.A. Shaharuddin, Z. N. B. Yusof, N. Atabaki, M.M. Hanafi, M. Sahebi, P. Azizi, N. Kalhori, and A. Valdiani. 2017. Enhancing somatic embryogenesis of Malaysian rice cultivar MR219 using adjuvant materials in a high-efficiency protocol. Int. J. Environ. Sci. Technol.14: 1091-1108.

Antoniazzi, C.A., R.B.D. Faria, P.P.D. Carvalho, A.I. Mikovski, I.F.D. Carvalho, E.M.D. Matos, A.C. Reis, L.F. Viccini, D.L.P. Pinto, D.I. Rocha, W.C. Otoni, and M.L.D. Silva. 2018. *In vitro* regeneration of triploid plants from mature endosperm culture of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims). Scientia Horticulturae. 238: 408-415.

Datta, S. K., A. Peterhans, K. Datta, and I. Potrykus. 1990. Genetically engineered fertile *indica*-rice recovered from protoplasts. Bio/Technology. 8: 736-740.

Feng, X., P. Zhao, J. Hao, J. Hu, D. Kang, and

H. Wang. 2011. Effects of sorbitol on expression of genes involved in regeneration of upland rice (*Oryza sativa* L.). Plant Cell, Tiss and Organ Cult. 106: 455–463.

Ge, X., Z. Chu, Y. Lin, and S. Wang. 2006. A tissue culture system for different germplasms of *indica* rice. Plant Cell Rep. 25: 392-402.

He, D., and P. Yang. 2013. Proteomics of rice seed germination. Front Plant Sci. 246: 1-9.

Hiei, Y., and T. Komari. 2008. Agrobacterium-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. Nat Protoc. 3: 824-834.

Ho, T. L., S. Te-Chato, and S. Yenchon. 2018. Callus induction and plantlet regeneration systems in *indica* rice (*Oryza sativa* L.) cultivar Sangyod. Walailak J Sci & Tech. 15: 753-763.

Hoque, M. E., and J. W. Mansfield. 2004. Effect of genotype and explant age on callus induction and subsequent plant regeneration from root-derived callus of *indica* rice genotypes. Plant Cell, Tiss and Organ Cult. 78: 217–223.

Jubair, T.A., U. Salma, N. Haque, F. Akter, I.J. Mukti, A.K.M.F. Haque, and M.R. Ali. 2018. Callus induction and regeneration of local rice (*Oryza sativa* L.) Variety Topa. Asian J. Plant Sci. 7: 513-516.

Karthikeyan, A., S. K. Pandian, and M. Ramesh. 2011. Agrobacterium-mediated transformation of leaf base derived callus tissues of popular *indica* rice (*Oryza sativa* L. sub sp. *indica* cv. ADT 43). Plant Sci. 181: 258-268.

Lin, Y. J., and Q. Zhang. 2005. Optimizing the tissue culture conditions for high efficiency transformation of *indica* rice. Plant Cell Rep. 23: 540–547.

Raina, S. K., P. Sathish, and K.S. Sarma. 1987. Plant regeneration from *in vitro* cultures of anthers and mature seeds of rice (*Oryza sativa* L.) cv. Basmati-370. Plant Cell Rep. 6: 43-45.

Saharan, V., R. C. Yadav, N. R. Yadav, and B. P. Chapagain. 2004. High frequency plant regeneration from desiccated calli of *indica* rice (*Oryza sativa* L.). Afr. J. Biotechnol. 3: 256–259.

Tariq, M., G. Ali, F. Hadi, S. Ahmad, N. Ali, and A. A. Shah. 2008. Callus induction and *in vitro* plant regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) under various conditions. Pak. J. Biol. Sci. 11: 255-259.

Thang, B.V., N.V. Viet, V.Q. Nam, H.T. Tung, and D.T. Nhut. 2018. Triploid plant regeneration from immature endosperms of *Melia azedazach*. Plant Cell, Tiss and Organ Cult. 133: 351–357.

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. New Biotech. 28: 418–422.

Xa, T. T. T., and N. T. Lang. 2011. Rice breeding for high grain quality through anther culture. OmonRice. 18: 68-72.

Yinxia, Z. 2013. Establishment of *in vitro* regeneration systems and gene transforma-

tion into *indica* rice (*Oryza sativa* L.) Landrace Hom Kra Dang Ngah. Ph. D. dissertation. Prince of Songkla University,Songkhla.

Yinxia, Z., and S. Te-chato. 2013. Improve plantlet regeneration systems in *indica rice* (*Oryza sativa* L.) landrace Hom Kra Dang Ngah. J. Agric. Technol. 9: 1641–1654.

Yodmanee, S., T. T. Karrila, and P. Pakdeechanuan. 2011. Physical, chemical and antioxidant properties of pigmented rice grown in Southern Thailand. Int. Food Res. J. 18: 901-906.

Zinnah, K. M. A., N. Zobayer, S. U. Sikdar, L. N. Liza, M. A. N. Chowdhury, and M. Ashrafuzzaman.

2013. *In vitro* regeneration and screening for salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). Int. Res. J. Biological Sci. 2: 29-36.

Zuraida, A. R., B. Naziah, Z. Zamri, and S. Sreeramanan. 2011. Efficient plant regeneration of Malaysian *indica* rice MR 219 and 232 *via* somatic embryogenesis system. Acta Physiol Plant. 33: 1913-1921.