การขยายพันธุ์ข้าวพื้นเมืองพันธุ์กาบดำด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
Propagation of Kab-dum Native Rice Cultivar (*Oryza sativa*) by Tissue Culture Techniques

กมลทิพย์ สำลีแก้ว[*], อรพิมล แท่นทอง[*], ผการัตน์ โรจน์ดวง[**] และ สุภาวดี รามสูตร[***]
Kamontip Samleekaew [*], Onpimon Taenthorng [*], Phakarat Rotduang [**] and Supawadee Ramasoot [***]

บทคัดย่อ

ในอดีตข้าวกาบดำเป็นพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่นิยมปลูกในอำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูงและทนทานต่อโรคแมลง แต่ปัจจุบันมีการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมและเกษตรกรนิยมปลูกข้าวพันธุ์ดีแทนข้าวพันธุ์พื้นเมือง จึงเป็นสาเหตุให้ข้าวพันธุ์พื้นเมืองเกิดการสูญพันธุ์ได้ในอนาคต การศึกษานี้ใช้ชิ้นส่วนเมล็ดมาทำการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำชิ้นส่วนเมล็ดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) เติม 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) เข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การรอดชีวิตสูงสุด 100 % และชักนำแคลลัสสูงสุด 87±0.51 แคลลัสที่ชักนำได้มีลักษณะร่วน (friable callus) 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แคลลัสชนิดแน่น (compact callus) สำหรับการชักนำยอดและรากให้ผลดีบนอาหารสูตร MS เติม Benzyladenine (BA) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Naphthaleneacetic acid (NAA) เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำยอดสูงสุด 16.78% จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.40 ยอดต่อชิ้นส่วน และชักนำรากสูงสุด 16.67% ความสูงต้นเฉลี่ยสูงสุด 11.74 เซนติเมตรต่อต้น และจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด 1.13 ใบต่อชิ้นส่วน อย่างไรก็ตามอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 2.51 รากต่อต้น แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำสำคัญ : ข้าวกาบดำ, พันธุ์พื้นเมือง, การขยายพันธุ์, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

[*] นักศึกษาระดับปริญญาตรี หลักสูตรครุศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

[**] อาจารย์ประจำหลักสูตรครุศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

[***] ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช Corresponding author e-mail: supawadee.rs@gmail.com

Abstract

In the past, Kab-dum (*Oryza sativa*) is a popular native rice cultivar grown in Pak Phanang. Nakhon Si Thammarat province. It is highly nutritional value and resistant to insect pests. Nowadays, there is a change in the environment and farmers prefer to grow rice instead of native rice cultivar. Native rice cultivar may be extincted in the future. The present study was used mature seeds to propagate by tissue culture technique. Mature seeds were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with various concentrations of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D). After 1 month of culture, MS medium supplemented with 3 mg/L 2,4-D gave the highest percentage of survival rate at 100 and callus induction at 87±0.51% Callus was friable in texture. MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D gave the highest percentage of compact callus induction at 20±0.50 %. significant difference at $p \leq 0.05$. For shoot and root induction, MS medium supplemented with Benzyladenine (BA) at 1 mg/L BA and 0.1 mg/L Naphthaleneacetic acid (NAA) gave the highest percentage of shoot induction (16.78%), average number of shoots (2.40 shoots/explant), root induction (16.67%), average shoot height (11.74 cm./explant) and number of leaves (1.13 leaves/explant). However, MS supplemented with 1 mg/L BA and 0.5 mg/L NAA gave the highest number of roots at 2.51 roots/explant.
Keywords: Kab-dum, native cultivar , propagation, tissue culture technique

1. บทนำ

ข้าวกาบดำ (*Oryza sativa)* เป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่อยู่คู่กับคนลุ่มน้ำปากพนัง อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราชมาโดยตลอด ซึ่งมีคุณภาพข้าวสุกนิ่มร่วนเหมาะสมกับรสนิยมการบริโภคของคนในท้องถิ่น ลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวกาบดำเป็นข้าวไวต่อช่วงแสง ออกดอกประมาณกลางเดือนมกราคม ความสูงประมาณ 150 เซนติเมตร ต้นข้าวมักล้มในระยะสุกแก่ ต้นมีสีม่วงเข้ม ใบสีเขียวเข้ม กาบใบสีดำ ทรงกอแผ่ ใบธงแผ่เป็นแนวนอน คอรวงยาว รวงยาวจับกันแน่น ระแง้ถี่ เมล็ดสั้น เมล็ดต่อรวงมาก ประมาณ 300-400 เมล็ด คุณภาพการสีดี เมล็ดข้าวสารขาวขุ่น ข้าวสุกนิ่ม รสชาติดี ผลผลิตค่อนข้างสูงเมื่อปลูกในสภาพที่ลุ่ม โดยเฉลี่ยประมาณ 550 กิโลกรัม (ศูนย์วิจัยข้าวนครศรีธรรมราช, 2553) การทำนาแบบดั้งเดิมเป็นแบบนาดำ ใช้ข้าวพันธุ์พื้นบ้านหรือพันธุ์พื้นเมืองและใช้เมล็ดพันธุ์จำนวนไม่มาก แต่เมื่อการทำนาเปลี่ยนไปข้าวพันธุ์พื้นเมืองไม่ตอบสนองต่อการทำนาแบบสมัยใหม่ที่มุ่งขายเป็นหลัก และเมื่อมีการเปลี่ยนพันธุ์ข้าวเป็นพันธุ์ส่งเสริม ทำให้การปลูกข้าวพันธุ์พื้นเมืองลดน้อยลง อีกทั้งการใช้ข้าวพันธุ์ส่งเสริมยังทำให้เพิ่มต้นทุนการทำนาสูงขึ้นอีกด้วย (รักบ้านเกิด, 2560) นอกจากนี้ยังพบว่าปัญหาในการปลูกข้าวของเกษตรกรส่วนใหญ่ได้รับผลกระทบจากปัญหาในด้านต่าง ๆ ที่กระทบต่อปริมาณผลผลิตข้าวทั้งปัจจัยทางด้านชีวภาพ เช่น ปัญหาโรคและแมลงศัตรูข้าว และปัจจัยทางด้านกายภาพ เช่น ปัญหาความแห้งแล้ง

และน้ำท่วม ที่ล้วนส่งผลทำให้ผลผลิตข้าวมีปริมาณลดลง (พันทิวา ทีรวม และ ขวัญเดือน รัตนา, 2560)

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจัดว่าเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่นิยมนำมาใช้เพื่อช่วยเพิ่มปริมาณจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น และยังช่วยอนุรักษ์สายพันธุ์ข้าวไว้ได้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวทำโดยนำชิ้นส่วนต่าง ๆ เช่น Immature embryos, Proembryo, Mature seed และ ต้นอ่อน มาเพาะเลี้ยง วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว เพื่อเพิ่มจำนวนต้นอ่อนของข้าวนั้น จำเป็นที่จะต้องเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการสร้างแคลลัสและต้นใหม่ได้ในสภาพหลอดทดลอง ดังนั้นการศึกษาถึงการเลือกใช้ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตจึงมีความจำเป็นยิ่ง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ศึกษาระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและเกิดต้นใหม่จำนวนมากของข้าวพื้นเมืองพันธุ์กาบดำ ทั้งนี้เพื่อจะได้นำผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไปประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พื้นเมืองพันธุ์กาบดำต่อไปในอนาคต

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

2.1 การเตรียมวัสดุพืช

นำเมล็ดข้าวพื้นเมืองพันธุ์กาบดำมาแกะเปลือก จากนั้นนำไปล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปาและให้น้ำไหลผ่านเป็นเวลา 20 นาที ฟอกฆ่าเชื้อผิวด้านนอกด้วยสารละลายแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรสังเคราะห์ต่อไป

2.2 ผลของความเข้มข้นของ 2,4-D ต่อการชักนำแคลลัส

นำเมล็ดข้าวพื้นเมืองพันธุ์กาบดำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารทุกสูตรเติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 8 กรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.7 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที วางเลี้ยงในสภาพความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25± 2 องศาเซลเซียส ทำการทดลองสูตรอาหารละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ขวด ๆ ละ 2 เมล็ด สังเกตและบันทึกผลเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เปอร์เซ็นต์การชักนำแคลลัส และชนิดของแคลลัส ทุกเดือน เป็นระยะเวลา 2 เดือน วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

2.3 ผลของระดับความเข้มข้นของ BA ร่วมกับ NAA ต่อการชักนำให้เกิดยอดและราก

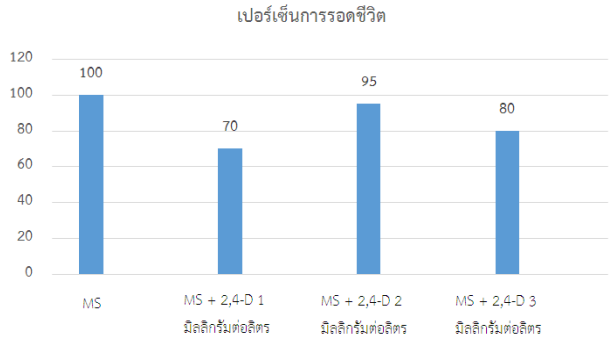
นำแคลลัสของข้าวพื้นเมืองพันธุ์กาบดำขนาด 0.4 × 0.4 เซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารทุกสูตรเติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 8 กรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.7 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อ

ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที วางเลี้ยงในสภาพแวดล้อมเดียวกับ 2.2 ทำการทดลองสูตรอาหารละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ขวด ๆ ละ 1 ชิ้นส่วน สังเกตและบันทึกผลเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เปอร์เซ็นต์การชักนำยอด จำนวนยอดเฉลี่ย การชักนำราก จำนวนราก จำนวนใบ และความสูงต้น หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน วางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

3. ผลการวิจัย

3.1 ผลของความเข้มข้นของ 2,4-D ต่อการชักนำแคลลัส

จากการนำชิ้นส่วนเมล็ดข้าวพันธุ์กาบดำ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าชิ้นส่วนเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้การรอดชีวิตสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การรอดชีวิตคือ 86.67 และ 81.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ชิ้นส่วนเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การรอดชีวิต คือ 66.67 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนเมล็ดข้าวพื้นเมืองพันธุ์กาบดำที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

สำหรับการชักนำแคลลัส พบว่าชิ้นส่วนเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การชักนำแคลลัสสูงสุดคือ 87 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การชักนำแคลลัส 82 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับชนิดของแคลลัส พบว่าชิ้นส่วนเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แคลลัสชนิดร่วนสูงสุดคือ 68 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แคลลัสแบบ friable 63 และ 48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ชิ้นส่วนเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แคลลัสแบบ compact สูงสุด 20 รองลงมาอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เติม

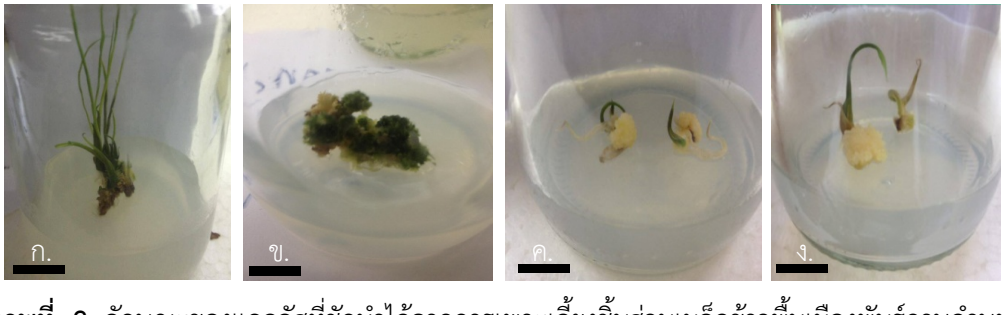
2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แคลลัสแบบ compact 15 และ 13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) โดยลักษณะของแคลลัสแบบ friable มีลักษณะเซลล์เกาะกันอย่างหลวม เปราะง่าย และมีสีเหลืองนวลขนาดใหญ่ ในขณะที่ลักษณะของแคลลัสแบบ compact มีลักษณะเซลล์เกาะกันแน่น เป็นปมแข็งขนาดใหญ่ และในก้อนแคลลัสมีทั้งสีเหลืองนวลและสีเขียวซึ่งเกิดจากสารสีคลอโรฟิลล์ โดยแคลลัสดังกล่าวจะพัฒนาไปเป็นยอดต่อไป ส่วนชิ้นส่วนเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม 2,4-D มีการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ต้น และราก (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 ผลของระดับความเข้มข้นต่าง ๆของ 2,4-D ต่อการชักนำแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	การชักนำแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)	ชนิดของแคลลัส(เปอร์เซ็นต์)	
		แคลลัส แบบ friable	แคลลัส แบบ compact
0	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00b
1	70±0.56b	48±0.62b	20±0.50a
2	82±0.55ab	68±0.58a	13±0.47a
3	87±0.51a	63±0.61ab	15±0.48a
F-test	*	*	*
C.V. (%)	22.80	29.92	29.37

* มีค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ p≤0.5

a,b,c อักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p≤0.5)



ภาพที่ 2 ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเมล็ดข้าวพื้นเมืองพันธุ์กาบดำบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

ก. อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ปราศจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

ข. อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

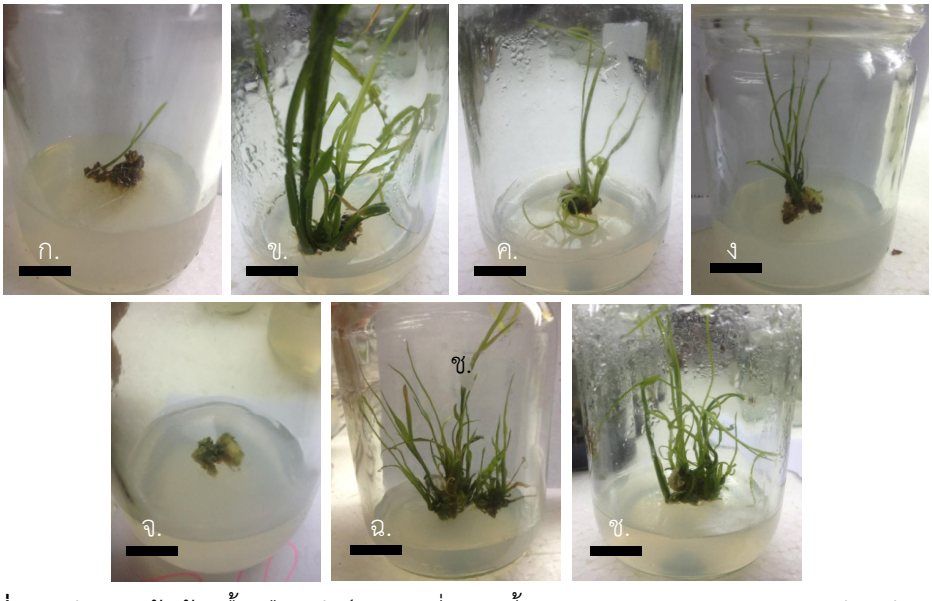
3.2 ผลของระดับความเข้มข้นของ BA ร่วมกับ NAA ต่อการชักนำให้เกิดยอดและราก

หลังการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสของข้าวพื้นเมืองพันธุ์กาบดำขนาด 0.4 × 0.4 เซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่าชิ้นส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA และ NAA ทุกระดับความเข้มข้นส่งเสริมการชักนำยอด โดยชิ้นส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การชักนำยอดสูงสุด คือ 16.78 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การชักนำยอด 13.53 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การชักนำยอดเพียง 5.33 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าชิ้นส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์การชักนำราก ความสูงต้นเฉลี่ย และจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด คือ 2.40 ยอดต่อชิ้นส่วน 16.67 เปอร์เซ็นต์ 11.74 เซนติเมตรต่อชิ้นส่วน และ 1.13 ใบต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ อย่างไรก็ตามอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด คือ 2.51 รากต่อชิ้นส่วน (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลของความเข้มข้นของ BA ร่วมกับ NAA ต่อการชักนำยอดและราก หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	NAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	การชักนำยอด (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนยอด (ยอดต่อชิ้นส่วน)	การชักนำราก (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนราก (รากต่อชิ้นส่วน)	ความสูงต้นเฉลี่ย (เซนติเมตร)	จำนวนใบ (ใบต่อกลุ่มยอด)
0	0	12	1.33±0.17	10	0.39±0.14	3.61±0.44	0.22±0.03
1	0.1	16.78	2.40±0.72	16.67	1.25±0.12	11.74±0.94	1.13±0.24
1	0.5	13	1.33±0.31	10	2.51±0.15	4.60±0.24	0.21±0.02
2	0.1	5.33	0.30±0.04	3.33	0.49±0.02	8.38±0.33	0.20±0.01
2	0.5	7.67	1.03±0.41	6.67	0.93±0.03	5.66±0.14	0.15±0.41
3	0.1	11	1.42±0.51	10	0.30±0.04	8.11±0.21	0.22±0.03
3	0.5	13.53	1.93±0.81	13.33	0.73±0.04	4.12±0.22	0.14±0.06
F-test		ns	ns	ns	ns	ns	ns
C.V. (%)		11.26	18.92	10.26	10.66	12.63	12.35

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพที่ 3 ลักษณะต้นข้าวพื้นเมืองพันธุ์กาบดำที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 2 เดือน (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

ก. อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ปราศจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

ข. อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

จ. อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ฉ. อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ช. อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. การวิจารณ์และสรุปผล

การนำชิ้นส่วนเมล็ดข้าวพันธุ์กาบดำ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของ 2,4-D สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยชิ้นส่วนเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การชักนำแคลลัสสูงสุด 87 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการทดลองของ Revathi และ Arumugam (2011) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวที่สุกแก่ 5 สายพันธุ์ คือ ASD16 ADT43 Basmati370 Pusa Basmati และ Pokkali บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5

และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าทุกความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสขนาดกลางได้ 58.33-96.67 เปอร์เซ็นต์ ทั้ง 5 สายพันธุ์ เช่นเดียวกับ การทดลองของ Libin และคณะ (2012) ประสบความสำเร็จในการชักนำแคลลัสจากเมล็ดข้าวหอมพันธุ์ Sarawak Biris บนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การเกิดแคลลัสสูงสุด 97 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสมีลักษณะเป็นปมสีครีม มีขนาดค่อนข้างใหญ่ ทั้งนี้เนื่องจาก 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน มีคุณสมบัติเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกระตุ้นการแบ่งเซลล์ การยืดตัวของเซลล์ และการเกิดราก (ภพเก้า พุทธรักษ์ และวารุต อยู่คง, 2554) นอกจากนี้ 2,4-D ยังนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีคุณสมบัติดียิ่งในการปิดกั้นกระบวนการกำเนิดอวัยวะและใช้ได้ผลดีในการเพิ่มจำนวนและการเพาะเลี้ยงแคลลัส (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, 2545) อีกทั้งแหล่งสร้างออกซินอยู่บริเวณตายอด และบริเวณอื่น ๆ ที่มีเนื้อเยื่อเจริญ ได้แก่ ปลายยอด ตา แคมเบียม และเมล็ด (พีรเดช, 2537) แต่สำหรับความเข้มข้นที่ใช้ก็จะมีความแตกต่างกันไปทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อและพันธุ์ข้าว (Htwe *et al*., 2011) มีรายงานว่าการเติม 2,4-D ความเข้มข้นที่สูงเกินไปจะมีผลยับยั้งการชักนำให้เกิดการสร้างแคลลัสของข้าว (Michiba *et al*., 2001) ในขณะเดียวกันการเลือกใช้แคลลัสที่เจริญจากอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นที่เหมาะสมจะส่งผลต่อการชักนำให้เกิดการสร้างพืชต้นใหม่ได้เช่นกัน Silva และคณะ (2015) รายงานว่า การย้ายแคลลัสที่เจริญจากยอดบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำให้แคลลัสข้าวเจริญเป็นต้นใหม่ได้ดีกว่าแคลลัสเจริญจากอาหารเพาะที่เติม 2,4-D เข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งต่างจากงานวิจัยนี้ ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์กาบดำ พบว่าเมล็ดข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การชักนำแคลลัสได้สูงที่สุด ซึ่งจากการทดลองสรุปได้ว่าความเข้มข้นของ 2,4-D มีผลต่อการชักนำแคลลัส เมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D เพิ่มขึ้น สามารถชักนำแคลลัสได้มากขึ้น

การเจริญเติบโตแคลลัสข้าวพื้นเมืองพันธุ์กาบดำที่เกิดขึ้นในช่วง 1-2 สัปดาห์แรก พบจำนวนของการเกิดแคลลัสเป็นกลุ่มก้อนเล็ก ๆ เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งตำแหน่งการเกิดแคลลัสอยู่ตรงบริเวณฐานของยอด เมื่อเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ แคลลัสที่เกิดขึ้นเจริญเติบโตรูปร่างขนาดใหญ่ขึ้น และในก้อนแคลลัสมีทั้งสีเหลืองนวลและสีเขียว โดยแคลลัสดังกล่าวจะพัฒนาไปเป็นยอดต่อไปซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ อรุณี ยูโซ๊ะ (2557) ที่ได้รายงานเช่นกันว่าแคลลัสที่ได้เจริญมาจากชิ้นส่วนคัพภะแก่ของข้าวหอมกระดังงาบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ จะมีลักษณะแคลลัสแบบ compact สีเขียว เซลล์เกาะตัวกันแน่น แคลลัสที่มีสีเขียวเกิดขึ้นนี้เพราะมีคลอโรฟิลล์ และปริมาณของคลอโรฟิลล์จะขึ้นกับชนิดของพืช ธาตุอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะปัจจัยแสง และในงานวิจัยนี้ก็ใช้อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าเกิดแคลลัสทั้งแบบ friable มีลักษณะเซลล์เกาะกันอย่างหลวมเปราะง่าย และมีสีเหลืองนวลขนาดใหญ่ และแคลลัสแบบ compact มีลักษณะเซลล์เกาะกันแน่นเป็นปมแข็งขนาดใหญ่ และในก้อนแคลลัสมีทั้งสีเหลืองนวลและสีเขียวที่เกิดขึ้นเพราะมีคลอโรฟิลล์ จึงสรุปได้ว่า ฮอร์โมน 2,4-D สามารถเร่งการเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้

จากการชักนำยอดจากชิ้นส่วนแคลลัสของข้าวพื้นเมืองพันธุ์กาบดำที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าทุกระดับความเข้มข้นส่งเสริมการชักนำยอด โดยชิ้นส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การชักนำยอดสูงสุด คือ 16.67 เปอร์เซ็นต์ ในการเกิดต้นใหม่ของข้าวส่วนใหญ่จะเกิดจากจุดสีเขียว (green spot) ขึ้นบริเวณผิวของแคลลัสภายหลังจากย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดยอด/ต้น (Sahrawat and Chand, 2001) อรัญญา ตันติปัญจพร (2534) รายงานว่าแคลลัสบริเวณที่มีจุดสีเขียว และปมสีเขียว (green nodule) สามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้และรากจะเจริญมาจากเซลล์ชั้นในของแคลลัส เนื่องจากแคลลัสเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กในการพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากของแคลลัสอาจจะผ่านขบวนการออร์แกนโนเจเนซิส หรือเอ็มบริโอเจเนซิสก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะของเซลล์ เช่น ถ้าหากเกาะตัวเป็นกลุ่ม การพัฒนาไปเป็นต้นหรือรากจะผ่านขบวนการออร์แกนโนเจเนซิส นอกจากนี้ BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโตไคนิน ซึ่งกระตุ้นการแบ่งเซลล์ ส่งเสริมการสร้างยอดใหม่ได้ดี (Taiz & Zeiger, 2002) ส่วน NAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทออกซิน สามารถกระตุ้นให้เกิดการขยายเซลล์และชักนำให้เกิดราก (Hopkins, 1999) โดยเมื่อนำมาใช้ร่วมกันจึงทำให้ BA และ NAA มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของข้าวพื้นเมืองพันธุ์กาบดำ ซึ่งการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดออกซินร่วมกับไซโตไคนินในอาหารเพาะเลี้ยง สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ในข้าวบางพันธุ์เช่นกัน (Sahrawat *et al*., 2001; Rattana *et al*., 2012) โดยถ้าอัตราส่วนของออกซินมากกว่าไซโทไคนินมีผลต่อเนื้อเยื่อเจริญเป็นก้อนแคลลัสและราก แต่ถ้าอัตราส่วนของออกซินน้อยกว่าไซโทไคนินมีผลต่อเนื้อเยื่อเจริญเป็นยอดมาก ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้พบว่า อาหารสูตร MS มีความเข้มข้นของ BA มากกว่า NAA ทุกสูตร จะมีการเกิดยอดได้จำนวนมากกว่าราก และแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ NAA มากขึ้น จะมีการเจริญเติบโตของรากได้ดีขึ้น

5. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช (อพ.สธ. – มรภ.นครศรีธรรมราช)

6. เอกสารอ้างอิง

พันทิวา ทีรวม และ ขวัญเดือน รัตนา. (2560). **การชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นใหม่ของข้าวเจ้าหอมนิล**. **วารสารแก่นเกษตร** 45 (ฉบับพิเศษ 1) : 1052-1059.

พีรเดช ทองอำไพ. (2537**). ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์ : แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย**. กรุงเทพมหานคร: หจก.ไดนามิกส์การพิมพ์.

ภพเก้า พุทธรักษ์ และ วารุต อยู่คง. (2554). ผลของ TDZ และ 2,4-D ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดของใบอ่อนพุดจีบ. **วารสารวิชาการเกษตร 29**(2) : 161-169.

รักบ้านเกิด. (2560). **การคัดพันธุ์ข้าวหยุมหนุน**. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก http://www.rakbankerd.com/agriculture/ page.php?id=8147&s=สืบค้นเมื่อวันที่ 3 พฤศจิกายน 2560.

รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, (2541). **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: หลักการและเทคนิค**. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร : มหาวิทยาลยเกษตรศาสตร์.

ศูนย์วิจัยข้าวนครศรีธรรมราช. (2553). **ข้าวพื้นเมืองพันธุ์กาบดำ.** ศูนย์วิจัยข้าวนครศรีธรรมราช ตำบลบางจาก อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช.

อรัญญา ตันติปัญจพร. (2534). กายวิภาคและสัณฐานวิทยาของข้าว (*Oryza sativa* L.) จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ. **วารสารศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. 1(3): 201-204.

อรุณี ยูโซ๊ะ. (2557). **การขยายพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการอนุรักษ์พันธุกรรมในหลอดทดลอง.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

Htwe, N. N., M. H. Maziah, C. Ling, F.Q. Zaman, and A.M. Zain. (2011). Responses of some selected Malaysian rice genotypes to callus induction under in vitro salt stress. **African J. of Biotech**. 10(3): 350-362

Hopkins, G.W. (1999). **Introduction to plant physiology**. Town: John Wiley & Sons Ltd.

Libin, A., King, P.J.H., Ong, K.H., Chubo, J. K. and Sipen, P.(2012). Callus induction and plant regeneration of Sarawak rice (*Oryza sativa* L.) variety Biris. **African Journal of Agricultural Research** 7:4260-4265.

Michiba, K., T. Okamoto, and M. Mii. (2001). Increasing ploidy level in cell suspension cultures of Doritaenopsis by exogenous application of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. **Physiology Planta**. 112(): 142-148.

Rattana, K., P. Theerakulpisut, and S. Bunnag. (2012). The effect of plant growth regulators and organic supplements on callus induction and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). **Asian J. of Plant Sci.** 11(): 182-189.

Revathi and Arumugam. (2011). *In vitro* callus induction in rice *Oryza sativa* L. **Plant Biology 1**: 13-15.

Silva, F, C. J. Stevens, A. Weisskopf, C. Castillo, L. Qin, A. Bevan and D. Q. Fuller. (2015). Modelling the geographical origin of rice cultivation in Asia using the rice archaeological database. **PLoS One**. 9: 100-104.

Sahrawat, A.K., and S. Chand. (2001). High frequency plant regeneration from coleoptile tissue of indica rice (*Oryza sativa* L.). ***In vitro*: Cell Dev Biol**. 37: 55-61.

Taiz, L. and E. Zeiger. (2002). **Plant Physiology**. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc.