การพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวพันธุ์รับรองโดยใช้ระบบเพาะเลี้ยงยอดอ่อน

Development of Shoot Apical Meristem Regeneration System Of Recommended Rice (*Oryza sativa* L.)

เมธินี ศรีวัฒนกุล จารุวรรณ จาติเสถียร[1]

กลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

Abstract

In this experiment, the establishment of multiple shoot formation from shoot apical meristem was carried out by observing the effect of plant growth regulators, 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l) and thidiazuron (TDZ) (0, 1.0, 2.0, 4.0 mg/l). Higher number of multiple shoots could be induced from intact meristem on rice seedlings than excised meristem due to less browning on the explants. The media containing only TDZ gave rise to direct multiple shoots without an intervening callus stage. Shoot meristem cultured on media containg 2,4-D generated callus.

There was no significant differences (p = 0.05) on multiple shoot induction among 4, 6 and 8 mg/l TDZ. However, regenerated shoots cultured on 4 mg/l TDZ were bigger than those on 6 and 8 mg/l TDZ. Thus, 4 mg/l TDZ was selected to be an appropriate concentration for the multiple shoot regeneration system. None of the mature plants represented the phenotypic variation or sterility.

Six Thai rice cultivars with different genetic background were placed on the medium containing 4 mg/l TDZ. All cultivars responded well on the medium. There was no significant differences (p = 0.05) on multiple shoot induction among cultivars. Shoot apical meristem from seven additional Thai rice could also respond on the medium containing 4 mg/l TDZ. Shoot apical meristem regenerated to rice plantlets that were readily transferred into soil within 5-8 weeks.

The shoot apical meristem regeneration system could be used for recommended rice cultivars. This fast and simple system is an alternative method to use in the effective rice transformation system.

รหัสทะเบียนวิจัย 45–35–403-002

[1] ผู้อำนวยการศูนย์สารสนเทศ

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่องข้าวพันธุ์รับรองโดยใช้ระบบเพาะเลี้ยงยอดอ่อนเริ่มจากการทดสอบการใช้อาหาร Murashige and Skoog (MS) ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ 2,4 – dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ thidiazuron (*N*-phenyl-*N'*-1,2,3- thiadiazol-5-ylurea, TDZ) ที่ความเข้มข้น 0, 1.0, 2.0, 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร ในการเหนี่ยวนำเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (shoot apical meristem) ให้เพิ่มจำนวนยอด (multiple shoots) โดยเปรียบเทียบการตอบสนองของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่ตัดแยกและไม่ได้ตัดแยกออกจากต้นอ่อน ผลการทดลองพบว่าชิ้นส่วนข้าวเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ขนาด สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดได้ อย่างไรก็ตาม เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่ไม่ได้ตัดแยกออกจากยอดอ่อนสามารถเกิดการเพิ่มจำนวนยอดได้ดีกว่า เนื่องจากไม่พบการเกิดสีน้ำตาลคล้ำของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่ไม่ได้ตัดแยกออกจากยอดอ่อน จากการทดลองเปรียบเทียบสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ต่อการเพิ่มจำนวนยอด พบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดได้โดยไม่ผ่านการพัฒนาเป็นแคลลัส อาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดที่เหมาะสมควรมีเพียงสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เป็นส่วนผสมเท่านั้น เนื่องจากอาหารที่มี 2,4-D จะทำให้เนื้อเยื่อเจริญพัฒนาเป็นแคลลัส

จากผลการทดลองเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้น 0, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 และ 8.0 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อหาความเข้มข้นของ TDZ ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอด พบว่า อาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดที่มี TDZ 6.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 8 ยอด/เนื้อเยื่อเจริญ แต่ไม่แตกต่างกับอาหารที่มี TDZ 4.0 และ 8.0 มิลลิกรัม/ลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (α = 0.05) แต่ต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี TDZ 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร มีลำต้นใหญ่และสมบูรณ์กว่า ต้นข้าวที่ได้มีลักษณะปกติ ไม่พบการเกิด albino และสามารถเกิดรากได้เป็นปกติ

เมื่อทดสอบการตอบสนองของข้าวพันธุ์รับรองของไทยจำนวน 6 พันธุ์ ที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมแตกต่างกัน บนอาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดที่มี TDZ 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าข้าวพันธุ์รับรองทั้ง 6 พันธุ์ สามารถเกิดการเพิ่มจำนวนยอดได้ ในจำนวนที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (α=0.05) นอกจากนี้ ได้ทำการทดสอบการตอบสนองของข้าวพันธุ์รับรองของไทยอีก 7 พันธุ์ พบว่าทุกพันธุ์สามารถเกิดการเพิ่มจำนวนยอดได้ โดยใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดจนเป็นต้นข้าวที่มีรากสมบูรณ์ สามารถย้ายลงปลูกในดินได้ ภายในระยะเวลาเพียง 5 - 8 สัปดาห์

วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวพันธุ์รับรองโดยใช้ระบบเพาะเลี้ยงยอดอ่อน สามารถใช้ได้กับข้าวพันธุ์รับรองทั่วไป เป็นวิธีการที่รวดเร็วและไม่ซับซ้อน เป็นอีกระบบหนึ่งที่จะสามารถใช้ร่วมกับการถ่ายยีนเข้าสู่พืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำนำ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อประเทศไทย ข้าวไทยจัดว่ามีคุณภาพดี เป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศ ถึงแม้ว่าประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกข้าวอันดับหนึ่งของโลก แต่อย่างไรก็ตาม ผลผลิตข้าวเฉลี่ยของประเทศไทยต่ำกว่าผลผลิตข้าวเฉลี่ยของโลก ถึง 265 กิโลกรัม ต่อไร่ (สุเทพ, 2543) การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงในการนำมาใช้เพื่อการปรับปรุงพัฒนาพันธุ์ข้าว โดยสามารถสร้างพันธุ์ข้าวชนิดใหม่หรือพืชดัดแปรพันธุกรรม (transgenic plant) จากการถ่ายฝากสารพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการสู่ข้าว เพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวที่คงลักษณะเดิมทุกประการ ยกเว้นการมีลักษณะพิเศษเพิ่มเติมจากสารพันธุกรรมที่ถ่ายฝากเข้าไปเท่านั้น เทคนิคพันธุวิศวกรรมจึงมีศักยภาพสูงในการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์ข้าวให้มีลักษณะที่ต้องการ เช่น การเพิ่มผลผลิต ต้านทานโรค และแมลงศัตรูข้าว และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม มีคุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้น ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของแป้งในเมล็ดข้าวเพื่อประโยชน์ทางอุตสาหกรรมและการแปรรูป เป็นต้น

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตศูนย์กลางของการผันแปรของข้าว มีความหลากหลายทั้ง ข้าวป่าและข้าวปลูก ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันออกไป (สงกรานต์ และฉวีวรรณ, 2539) จึงเป็นโอกาสดีของประเทศไทยที่จะนำความหลากหลายทางชีวภาพนี้มาใช้ประโยชน์ โดยประเทศไทยได้เข้าร่วมในโครงการความร่วมมือนานาชาติ เพื่อการหาลำดับเบสของจีโนมข้าว ซึ่งผลลัพธ์หนึ่งจากโครงการ ดังกล่าวคือ ชิ้นส่วนและโครงสร้างของยีนที่ควบคุมลักษณะของข้าวที่ต้องการ เช่น พบ Strong หรือ specific promoter และพบยีนควบคุมความต้านทานน้ำท่วมของข้าว (อภิชาติ, 2543) การพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการถ่ายฝากยีนเข้าสู่ต้นข้าวให้มีประสิทธิภาพสูง รวดเร็วและไม่ซับซ้อน เป็นสิ่งที่มีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อรองรับการทำนายหรือการทดสอบโครงสร้างและหน้าที่ของยีนข้าว ตลอดจนการรองรับการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์ข้าวให้มีคุณลักษณะตามที่ต้องการ การถ่ายฝากยีน เข้าสู่ข้าวโดยใช้วิธีการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ไร้ผนัง (protoplast DNA uptake) และการถ่ายฝากยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (microprojectile bombardment) นั้น (Bhaskaran *et al*., 1990, Christou *et al*., 1991, Datta *et al*., 1992, Peng *et al*., 1995 & Rathore *et al*., 1993) สามารถก่อให้เกิดต้นข้าวดัดแปรพันธุกรรม (transgenic rice) ได้ แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อจำกัดในการชักนำให้เกิดต้นข้าว จากแคลลัส (callus) หรือเซลล์ไร้ผนัง (protoplasts) ซึ่งจำเพาะต่อข้าวบางพันธุ์เท่านั้น (genotype-specific) และนอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้พัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ (regeneration) โดยไม่ผ่านการพัฒนาเป็นแคลลัส ยังก่อให้เกิดความแปรปรวน (somaclonal variation) ทำให้ต้นข้าวที่เกิดขึ้นมีลักษณะผิดไปจากเดิม หรือเกิด albino

ในทางทฤษฎีแล้ว การใช้เนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (shoot apical meristem) เป็นชิ้นส่วนพืชเพาะเลี้ยง (explant) สามารถทำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้โดยไม่จำเพาะกับพันธุ์พืช (genotype-independent) และเกิดความแปรปรวน (somaclonal variation) น้อย (Murashige, 1974) แต่อย่างไรก็ตาม การถ่ายฝากยีนสู่เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดอาจก่อให้เกิดปัญหา chimera ในต้นพืชดัดแปรพันธุกรรมได้ (Lowe *et al*., 1995) การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulator) เพื่อ ชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดจากเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดสามารถเพิ่มเสถียรภาพของพืชดัดแปรพันธุกรรมได้ (Zhong *et al*., 1996) นอกจากนี้ การชักนำการเพิ่มจำนวนยอดจากเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่ไม่ได้ ตัดแยกออกจากต้นอ่อน (intact seedlings) ในระบบ *In vitro* เป็นอีกระบบหนึ่งที่จะสามารถใช้ร่วมกับการถ่ายฝากยีนเข้าสู่พืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ เป็นวิธีที่ไม่จำเพาะต่อพันธุ์ (genotype-independent) อีกทั้งเป็นวิธีที่รวดเร็วและไม่ซับซ้อน เนื่องจากไม่ต้องเสียเวลากับการตัดแยกชิ้นส่วนพืชเพาะเลี้ยง (Gupta และ Conger, 1998)

การศึกษาทดลองวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ใช้ได้กับพันธุ์ข้าวรับรองทั่วไปเป็นสิ่งที่มีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อใช้ร่วมกับการถ่ายฝากยีนที่มีประสิทธิภาพ และพัฒนาเป็นต้นแบบในการสร้างต้นข้าว ดัดแปรพันธุกรรมได้อย่างรวดเร็ว เพื่อรองรับการทำนายหรือการทดสอบโครงสร้างและหน้าที่ของยีนข้าว ตลอดจนการรองรับการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์ข้าวด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เมล็ดข้าวซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของข้าวพันธุ์รับรองต่างกลุ่มกันออกไปตามความแตกต่างของพันธุกรรม (หทัยรัตน์, 2542) เช่น พันธุ์เผือกน้ำ43 แพร่ 1 R-258 ข้าวหอมปทุมธานี 1 ข้าวเหนียวสันป่าตอง ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวชัยนาท 1
2. สารเคมีในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
3. จานพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้ว (petri dish)
4. เครื่องแก้ว เช่น ขวดแก้วรูปกรวย บีกเกอร์ กระบอกตวง เป็นต้น
5. สารเคมีฆ่าเชื้อ เช่น Clorox, ethyl alcohol
6. ปากคีบ กรรไกร ถุงมือยาง
7. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง เครื่องชั่ง หม้อนึ่งความดันไอ ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ กล้องถ่ายรูป ชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดิน กระดาษ ปุ๋ย

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนและวิธีดำเนินการ ประกอบด้วยการทดลอง 3 การทดลอง ดังนี้

<u>การทดลองที่ 1</u> **การเปรียบเทียบการตอบสนองของชิ้นส่วนข้าวเพาะเลี้ยง (explant) และสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ต่อการเพิ่มจำนวนยอด**

มีวิธีดำเนินการดังนี้

กรรมวิธี ประกอบด้วย การหาชนิดของชิ้นส่วนข้าวและหาปริมาณพร้อมทั้งสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญ 2,4-D และ TDZ ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอด

- ชิ้นส่วนพืช ใช้เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดซึ่งตัดแยกออกจากต้นอ่อน และไม่ได้ตัดแยกออกจากต้นอ่อน

- สารควบคุมการเจริญ ใช้ อาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอด สูตรMS ดัดแปลง (ผนวก1) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ปริมาณ 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ TDZ 0, 1.0, 2.0, 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร

ขั้นตอนการทดลองดังนี้

- การเตรียมชิ้นส่วนข้าวเพาะเลี้ยง

นำเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 มาแกะเปลือกออก และขจัดสิ่งปนเปื้อนออกจากผิวโดยแช่ใน 95% Ethanol 1 นาที แล้วย้ายเมล็ดข้าวลงไปแช่ใน 40% Clorox (60% w/v Sodium Hypochloride) เขย่าบนเครื่องเขย่านาน 30 นาที จึงนำเมล็ดข้าวมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่ง ฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำเมล็ดข้าวที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วนี้ไปเตรียมเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด

- การเตรียมเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (shoot apical meristem) ซึ่งตัดแยกออกจากต้นอ่อน (seedling)

นำเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะต้นอ่อนสูตร MS ดัดแปลง เป็นเวลา 3 วัน เมื่อยอดอ่อนเริ่มงอกออกมา จึงตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาดประมาณ 3 - 5 มิลลิเมตร ออกจากยอดอ่อน แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดสูตรต่างๆ ตามกรรมวิธีข้างต้น ต่อไป

- การเตรียมเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดโดยไม่ตัดแยกออกจากต้นอ่อน

นำเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วไปเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดโดยตรง

- ในการทดลองใช้ชิ้นส่วนพืชเพาะเลี้ยงแต่ละชนิด จำนวนจานละ 25 ชิ้น เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (25^{o}C) และให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกการเกิดแคลลัส (callus) และจำนวนยอด (shoot) ที่เกิดขึ้น

<u>การทดลองที่ 2</u> **การเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ในการชักนำการเพิ่มจำนวนยอด**

มีวิธีดำเนินการทดลองดังนี้

กรรมวิธีการทดลอง ประกอบด้วย

- ชิ้นส่วนของข้าวเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมจากผลการทดลองที่ 1 และ
- อาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอด MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ในอัตราส่วนต่างๆ ที่ 0, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, และ 8.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomize Complete Block Design (RCB) ทำการทดลองทั้งสิ้น 6 ซ้ำ
- บันทึกว่ามีการเกิดแคลลัส (callus) ขึ้นหรือไม่ และบันทึกจำนวนยอดที่เกิดขึ้นจากเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด และจำนวนต้นข้าวที่เกิดราก
- วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยแปลงข้อมูลจำนวนยอดที่เกิดขึ้นจากเนื้อเยื่อเจริญ ปลายยอดซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำการเพิ่มจำนวนยอดสูตรต่างๆ โดยใช้ log (x+1) แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) และใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดที่พัฒนาขึ้นจากเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด

ขั้นตอนการทดลองมีดังนี้

นำชิ้นส่วนข้าวเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมจากผลการทดลองที่ 1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร ชักนำการเพิ่มจำนวนยอดสูตร MS ดัดแปลง ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ในอัตราส่วนต่างๆ ตามกรรมวิธีข้างต้น จากนั้นย้ายยอดข้าวที่เกิดขึ้นลงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง เพื่อชักนำให้เกิดราก หากเนื้อเยื่อเจริญที่เพาะเลี้ยงมียอดข้าวเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก ให้แยกยอดข้าวออกเป็นกลุ่มเล็กๆ หรือเป็นยอดเดี่ยวก่อนแล้วจึงย้ายลงบนอาหารชักนำการเกิดราก เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (25° C) และให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ตรวจและบันทึกผลการทดลอง

<u>การทดลองที่ 3</u> **การทดสอบการตอบสนองข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่จัดอยู่ในกลุ่มที่มีพันธุกรรมแตกต่างกัน บนสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอด**

วิธีดำเนินการทดลองมีดังนี้

กรรมวิธีการทดลอง ประกอบด้วย

- ชิ้นส่วนข้าวเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมจากผลการทดลองที่ 1 ของข้าว 6 พันธุ์ ได้แก่ เฉี้ยงพัทลุง ข้าวเจ้าหอมคลองหลวง กข10 ตะเภาแก้ว R-258 กข25 และใช้พันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ (check)

- สูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดต่อการเพิ่มจำนวนยอดจากการทดลองที่ 2 โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomize Complete Block Design (RCBD) ทำการทดลองทั้งสิ้น 3 ซ้ำ

- บันทึกจำนวนยอดอ่อนที่เกิดขึ้นจากเนื้อเยื่อเจริญแต่ละชิ้น และบันทึกจำนวนต้นข้าวที่เกิดราก

- วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนยอด/เนื้อเยื่อเจริญปลายยอด โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ขั้นตอนการทดลองมีดังนี้

นำชิ้นส่วนข้าวเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมจากผลการทดลองที่ 1 ของข้าวแต่ละพันธุ์มาเพาะเลี้ยงตามกรรมวิธีบนอาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดสูตรที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 ตัด endosperm รากและปลายยอดอ่อนออกเมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ประมาณ 3 วัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 ต่อไปอีก 3 สัปดาห์ แล้วจึงย้ายยอดอ่อนที่เกิดขึ้นลงเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลง เพื่อชักนำให้เกิดราก หากเนื้อเยื่อเจริญที่เพาะเลี้ยงมียอดข้าวเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก ให้แยกยอดข้าวออกเป็นกลุ่มเล็กๆ หรือเป็นยอดเดี่ยวก่อนแล้วจึงย้ายลงบนอาหารชักนำการเกิดราก ทุกขั้นตอนทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (25° C) และให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ตรวจและบันทึกผลการทดลอง

นอกจากนี้ ทำการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลการตอบสนองของข้าวพันธุ์รับรองพันธุ์ต่างๆ โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่เหมาะสมจากผลการทดลองที่ 1 ของข้าวพันธุ์รับรองอีก 7 พันธุ์ ได้แก่ ชัยนาท1 กข 23 เหนียวสันป่าตอง ปิ่นแก้ว56 เล็บนกปัตตานี ซิวแม่จัน และเผือกน้ำ บนอาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดสูตรที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 ตัด endosperm รากและปลายยอดอ่อนออกเมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ประมาณ 3 วัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 ต่อไปอีก 3 สัปดาห์ แล้วจึงย้ายยอดอ่อนที่เกิดขึ้นลงเพาะเลี้ยงในอาหารชักสูตร MS ดัดแปลง เพื่อชักนำให้เกิดรากทุกขั้นตอนทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (25°C) และให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกจำนวนยอด/เนื้อเยื่อเจริญปลายยอด และจำนวนต้นข้าวที่เกิดราก

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

ระยะเวลาของโครงการ 1 ปี (ตุลาคม 2544 – กันยายน 2545)

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ 1

ผลการทดลองเปรียบเทียบการตอบสนองของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่ตัดแยกและไม่ได้ตัดแยกออกจากต้นอ่อน พบว่าชิ้นส่วนพืชเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชนิด สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่ตัดแยกออกจากยอดอ่อนบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปรากฏว่า เนื้อเยื่อเจริญดังกล่าว เกิดเป็นสีน้ำตาลคล้ำ (browning) ทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตและทำให้เนื้อเยื่อของข้าวตาย (รูปที่ 1) ดังนั้นเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่ไม่ได้ตัดแยก ออกจากยอดอ่อนจึงสามารถเกิดการเพิ่มจำนวนยอดได้ดีกว่า เนื่องจากไม่พบการเกิดสีน้ำตาลคล้ำของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่ไม่ได้ตัดแยกออกจากยอดอ่อน

รูปที่ 1 แสดงการเกิดสีน้ำตาลคล้ำ (browning) บนอาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่ตัดแยกออดจากยอดอ่อน

จากการทดลองเปรียบเทียบสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ต่อการเพิ่มจำนวนยอด พบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดได้โดยไม่ผ่านการพัฒนาเป็นแคลลัส (รูปที่ 2ก) สำหรับอาหารที่มีส่วนผสมของ 2,4-D และ TDZ ในทุกอัตราส่วน สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดได้เช่นเดียวกัน แต่ยอดอ่อนที่เกิดขึ้นมีแนวโน้มที่พัฒนามาจากแคลลัส (รูปที่ 2ข) ดังนั้น อาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดที่เหมาะสมจึงควรมีเพียงสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เป็นส่วนผสมเท่านั้น เนื่องจากอาหารที่มี 2,4-D จะทำให้เนื้อเยื่อเจริญพัฒนาเป็นแคลลัส

รูปที่ 2ก แสดงการเกิดยอดหลายๆ ยอดได้โดยไม่ผ่านการพัฒนาแคลลัส บนสูตรอาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดที่มี TDZ

รูปที่ 2ข แสดงการเกิดแคลลัส บนสูตรอาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดที่มี 2,4-D และ TDZ

ผลการทดลองที่ 2

จากการเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เพื่อหาความเข้มข้นของ TDZ ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอด พบว่า อาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดที่มี TDZ 6.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 8 ยอด/เนื้อเยื่อเจริญ แต่ไม่แตกต่างกับอาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดที่มี TDZ 4.0 และ 8.0 มิลลิกรัม/ลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Duncan's Multiple Range Test , $\propto$ = 0.05) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนยอดที่เกิดจากเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดบนอาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ในอัตราส่วนต่าง ๆ

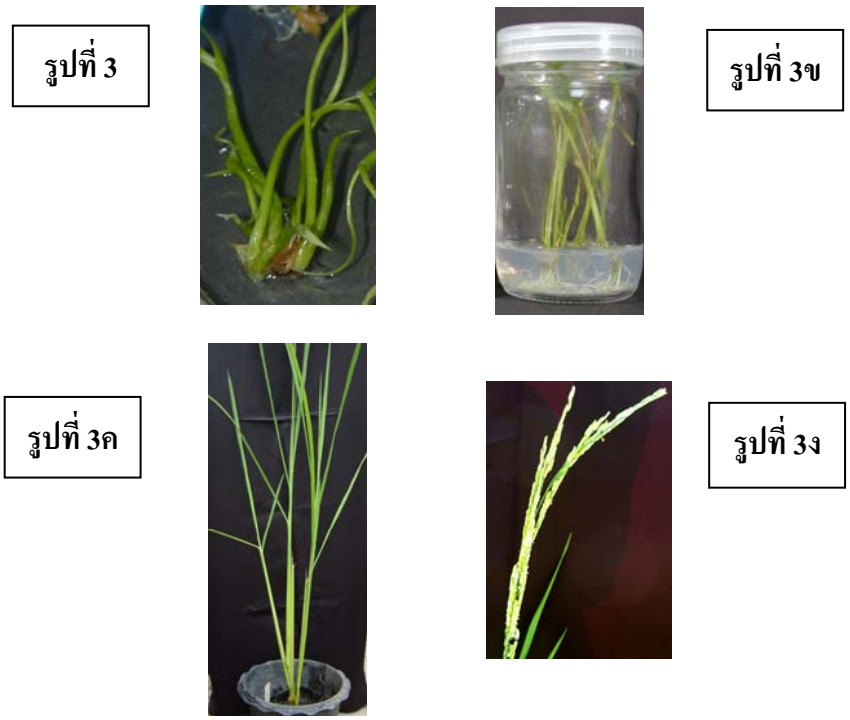
ความเข้มข้นของ TDZ (มิลลิกรัม/ลิตร)	**จำนวนยอดเฉลี่ย/เนื้อเยื่อเจริญปลายยอด**[1/]
0.0	1 d
1.0	5 c
2.0	6 bc
4.0	7 ab
6.0	8 a
8.0	7 ab

CV 9.8 %

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่ต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

อย่างไรก็ตาม ต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดที่มี TDZ 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร มีลำต้นใหญ่และสมบูรณ์กว่าต้นข้าวที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดที่มี TDZ 4.0 และ 8.0 มิลลิกรัม/ลิตร ต้นข้าวที่ได้มีลักษณะปกติ ไม่พบการเกิด albino และสามารถเกิดรากได้เป็นปกติเมื่อย้ายลงบนอาหารชักนำการเกิดราก ซึ่งไม่มีสารควบคุมความเจริญเติบโต นอกจากนี้ต้นข้าวที่ได้สามารถออกดอกและไม่เป็นหมัน (รูปที่ 3)

รูปที่ 3 ลักษณะการเจริญเติบโตของต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดบนอาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดที่มี TDZ 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร (ก) ยอดข้าวหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดที่มี TDZ 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ 3 สัปดาห์ (ข) ต้นข้าวสามารถเกิดรากได้บนอาหารชักนำการเกิดราก (ค) ต้นข้าวเจริญเติบโตเป็นปกติในดิน (ง) เมล็ดข้าวจากต้นข้าวเพาะเลี้ยงโดยระบบยอดอ่อนบนอาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดที่มี TDZ 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร



นอกจากนี้พบว่า หลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่ไม่ได้ตัดแยกออกจากยอดอ่อนบนอาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดที่มี TDZ เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นตัดส่วนของ endosperm รากและปลายยอดอ่อนออก แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดต่อไปจะเกิดการเพิ่มจำนวนยอดได้ดีขึ้น

ผลการทดลองที่ 3

ผลการทดลองการตอบสนองของข้าวพันธุ์รับรองของไทย 6 พันธุ์ ที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมแตกต่างกัน ได้แก่ เฉี้ยงพัทลุง ข้าวเจ้าหอมคลองหลวง กข10 ตะเภาแก้ว R258 และ กข25 บนอาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดที่มี TDZ 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าข้าวพันธุ์รับรองทั้ง 6 พันธุ์ สามารถเกิดการเพิ่มจำนวนยอดได้ในจำนวนที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Duncan's Multiple Range Test , α = 0.05) และไม่แตกต่างกับการเกิดการเพิ่มจำนวนยอดของข้าวขาวดอกมะลิ 105 (Duncan's Multiple Range Test , α = 0.05) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนยอดข้าวที่พัฒนาจากเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดบนอาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดที่มี TDZ 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร ของข้าวพันธุ์รับรองของไทย 6 พันธุ์ ที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมแตกต่างกัน

พันธุ์ข้าว	จำนวนต้นเฉลี่ย/เนื้อเยื่อเจริญปลายยอด[1/]
เฉี้ยงพัทลุง	6 a
ข้าวเจ้าหอมคลองหลวง	5 a
กข10	5 a
ตะเภาแก้ว	5 a
R258	4 a
กข25	4 a
ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (check)	5 a

CV 20.4 %

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่ต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

นอกจากนี้ ข้าวพันธุ์รับรองของไทยอีก 7 พันธุ์ ได้แก่ ชัยนาท1 กข 23 เหนียวสันป่าตอง ปิ่นแก้ว 56 เล็บนกปัตตานี ซิวแม่จัน และเผือกน้ำ สามารถเกิดการเพิ่มจำนวนยอดได้เช่นเดียวกัน เฉลี่ย 4, 6, 5, 7, 5, 4 และ 7 ต้น/เนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ตามลำดับ โดยใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดจนเป็นต้นข้าวที่มีรากสมบูรณ์ สามารถย้ายลงปลูกในดินได้ ภายในระยะเวลาเพียง 5 - 8 สัปดาห์

สรุปผลการทดลอง

การทดลองประสบความสำเร็จในการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวพันธุ์รับรองโดยใช้ระบบเพาะเลี้ยงยอดอ่อน โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดบนอาหารชักนำการเพิ่มจำนวนยอดสูตรซึ่งมีส่วนประกอบของอาหาร ได้แก่ MS inorganic salt sucrose 30 กรัม/ลิตร myo-inositol 100 มิลลิกรัม/ลิตร pyridoxine 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร nicotinic acid 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร TDZ 4 มิลลิกรัม/ลิตร 0.3% phytagel, pH 5.7 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน แล้วตัดส่วนของ endosperm รากและปลายยอดอ่อนออก เพาะเลี้ยงต่อไปอีก 3 สัปดาห์ แล้วจึงย้ายยอดอ่อนลงเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำการเกิดรากที่มีส่วนประกอบของอาหาร ได้แก่ MS inorganic salt sucrose 30 กรัม/ลิตร myo-inositol 100 มิลลิกรัม/ลิตร pyridoxine 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร nicotinic acid 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร 0.3% phytagel, pH 5.7 ทุกขั้นตอนทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (25°C) และให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน สามารถย้ายต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงลงปลูกในดินได้ภายในระยะเวลาเพียง 5 - 8 สัปดาห์

วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวพันธุ์รับรองของไทยโดยใช้ระบบเพาะเลี้ยงยอดอ่อนอย่างมีประสิทธิภาพ เป็นวิธีที่ไม่จำเพาะต่อพันธุ์ (genotype-independent) สามารถใช้ได้กับพันธุ์ข้าวรับรองทั่วไป อีกทั้งเป็นวิธีที่ รวดเร็วและไม่ซับซ้อน เพื่อใช้ร่วมกับการถ่ายฝากยีนที่มีประสิทธิภาพและพัฒนาเป็นต้นแบบในการสร้างต้นข้าวดัดแปรพันธุกรรมได้อย่างรวดเร็ว เพื่อรองรับการทำนายหรือการทดสอบโครงสร้างและหน้าที่ของยีนข้าว ตลอดจนการรองรับการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์ข้าวด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมต่อไป

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยข้าว และสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ซึ่งช่วยอนุเคราะห์พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

สงกรานต์ จิตราการ และ ฉวีวรรณ วุฒิญาโณ . 2539. ทรัพยากรเชื้อพันธุ์ข้าวในประเทศไทย. ความหลากหลายแห่งชีวิต โครงการจัดตั้งศูนย์ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ หน้า 56 - 70

สุเทพ ลิ้มทองสกุล 2543 สถาบันวิจัยข้าว : สถานภาพ ขีดความสามารถและแนวทางความร่วมมือในการวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ. เอกสารประกอบการสัมมนาทางวิชาการข้าวแห่งชาติ : การวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ วันที่ 31 สิงหาคม -1 กันยายน 2543 ณ โรงแรมสีดารีสอร์ท จังหวัดนครนายก 100 หน้า

หทัยรัตน์ อุไรรงค์ , ณัฐหทัย เอพาณิช , หิรัญ หิรัญประดิษฐ์ , สงกรานต์ จิตราการ และวิชัย หิรัญยูปกรณ์. 2542. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์รับรอง รายงานการประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ประจำปี 2542 วันที่ 3-5 มีนาคม 2542 ณ โรงแรมคุ้มสุวรรณ จังหวัดสุพรรณบุรี 59 หน้า

อภิชาติ วรรณวิจิตร, วินิตชาญ รื่นใจชน, ดวงใจ เตชะยิ่งไพบูลย์, วินธัย กมลสุขยืนยง, มณฑป จำปาเรือง, ธรรมนูญ จตุรพาหุ , สามารถ วันชะนะ , สุวิทย์ วุฒิสุทธิเมธาวี , ธีรยุทธ ตู้จินดา และสมวงษ์ ตระกูลรุ่ง . 2543. จากลำดับเบสสู่ลำดับยีน. เอกสารประกอบการสัมมนาทางวิชาการข้าวแห่งชาติ : การวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ วันที่ 31 สิงหาคม - 1 กันยายน 2543 ณ โรงแรมสีดารีสอร์ท จังหวัดนครนายก 100 หน้า

Bhaskaran S, Smith RH. 1990 Regeneration in cereal tissue culture: a review. Crop Sci 30 (6) : 1328-1337

Christou P, Ford TL, Kofron M. 1991 Production of transgenic rice *(Oryza sativa L.)* plants from agronomically important Indica and Japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. Bio / technology 9 : 957-962.

Datta SK, Datta K, Soltanifar S, Donn G, Potrykus I. 1992. Herbicide - resistant Indica rice plants from IRRI breeding line IR72 after PEG- mediated transformation of protoplasts. Plant Mol Biol 20 : 619-629

Gupta SD and Conger BV. 1998. *In vitro* differentiation of multiple shoot clumps from intact seedlings of switchgrass. In Vitro Cell Dev Biol 34: 196-202

Lowe K, Bowen B, Hoerster G, Ross M, Bond D, Pierce D and Gordon KB. 1995. Germline transformation of maize following manipulation of chimeric shoot meristems. Biotechnology 13 : 667-682

Murashige T .1974. Plant Propagation through tissue culture. Ann Rev Plant Physiol 25: 135-166

Peng J, Wen F, Lister RL, Hodges TK. 1995. Inheritance of *gus* A and *neo* genes in transgenic rice. Plant Mol Biol 27: 91 - 104

Rathore KS, Chowdhury VK, Hodges TK. 1993. Use of *bar* as a selectable marker gene and for the production of herbicide - resistant rice plants from protoplasts. Plant Mol Biol 21: 871-884.

Zhang S, Zhong H, Sticklen MB. 1996. Production of multiple shoots from apical meristems of oat (*Avena satava* L.). J Plant Physiol 148: 667-671

Zhong H, Srinivasan C, Sticklen MB. 1992. In vitro morphogenesis of corn (*Zea mays* L.). I.Differentiation of mutiple shoot clumps and somatic embryos from shoot tips. Planta 187: 483-489

Zhong H, Sun B, Warkentin D, Zhang S, Wu R, Wu T and Sticklen MB. 1996. The competence of maize shoot meristems for integrative transformation and inherited expression of transgenes. Plant Physiol 110: 1097-1107

ภาคผนวก

ผนวก 1 อาหารสูตร MS ดัดแปลง

ส่วนประกอบของอาหารสูตร MS ดัดแปลง ได้แก่

- MS inorganic salt (Murashige and Skoog 1962)
- sucrose 30 กรัม/ลิตร
- myo-inositol 100 มิลลิกรัม/ลิตร
- pyridoxine 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร
- nicotinic acid 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร

ขั้นตอนการเตรียมมีดังนี้

ผสมส่วนประกอบของอาหารสูตร MS ดัดแปลงข้างต้น เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรที่ต้องการ ปรับ pH เป็น 5.7 เติม phytagel 0.3% (w/v) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ โดยใช้ความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) เป็นเวลา 15 นาที เทอาหาร 25 ml ลงในจานพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้ว (petri dish) ขนาด 90 x 15 mm

ผนวก 2

รูปแสดงการงอกของยอดอ่อนจากเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 3 วัน