บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

ข้าวจัดเป็นพืชในตระกูล (family) Poaceae สกุล (genus) Oryza ซึ่งประกอบด้วย ข้าวป่า 20 ชนิด และข้าวปลูก 2 ชนิด คือ ข้าวที่ปลูกในแถบเอเชียที่เป็น *Oryza sativa* L. และข้าวที่ปลูกในแถบแอฟริกาที่เป็น *O. glaberrima* Steud. (จำรัส, 2534) ข้าวเป็นพืชชนิดดิพลอยด์ (diploid) มีจำนวนโครโมโซม 2n=2x=24 เป็นพืชผสมตัวเอง (self-pollinated crop) เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นพันธุ์ข้าวต่าง ๆ ที่ปลูกอยู่ทั่วไปจึงมีความคงตัวทางพันธุกรรม (homogenity) สูง (ประพาส, 2531) *O.sativa* แบ่งออกเป็น 3 จำพวก โดยอาศัยความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้น เมล็ด และการแพร่กระจายของแหล่งปลูก คือ จาโปนิกา (japonica) เป็นข้าวที่มีลักษณะเตี้ย ใบแคบสีเขียวแก่ เมล็ดสั้นกลม ปลูกในเขตอบอุ่น เช่น ญี่ปุ่น จีน เกาหลี เป็นต้น อินดิคา (indica) เป็นข้าวที่มีลักษณะต้นสูง เมล็ดเรียวยาว ปลูกในเขตร้อน เช่น อินเดีย ไทย พม่า เป็นต้น และ จาวานิกา (javanica) เป็นข้าวที่มีลักษณะต้นสูง ใบกว้างสีเขียวอ่อน เมล็ดป้อมใหญ่ ปลูกในอินโดนีเซีย (สถาบันวิจัยข้าว, 2529)

การเพาะเลี้ยงอับเรณูเป็นการนำอับเรณูที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่ ซึ่งภายในมีละอองเรณู (microspore) พัฒนาอยู่ในระยะที่มีนิวเคลียสเพียงหนึ่งอัน (uninucleate) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น และแสงได้ (ประศาสตร์, 2536) เพื่อชักนำให้ไมโครสปอร์ที่อยู่ภายในอับเรณูพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ ต้นที่ได้จะมีชุดโครโมโซมครึ่งหนึ่งของต้นปกติ (haploid) ที่สามารถแสดงลักษณะต่าง ๆ ออกมาตามสภาพยีนเดี่ยวที่มีอยู่ ถึงแม้ว่าลักษณะนั้นจะถูกควบคุมด้วยยีนด้อยก็ตาม (Raina, 1989 และ Lynch *et al.,* 1991) เนื่องจากไม่มีการข่มของยีนเด่น และเมื่อมีการชักนำให้ต้นพืชที่มีโครโมโซมชุดเดียวนี้เพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นอีกเท่าหนึ่งก็จะได้ต้นพืชที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด (doubled haploid) และเป็นสายพันธุ์แท้ เนื่องจากยีนทุกตัวเข้าสู่สภาพที่เหมือนกันหรือเป็น homozygous (Raina, 1989)

การเกิดต้นแฮพลอยด์มีสาเหตุมาจากการที่ละอองเรณูซึ่งนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสมถูกชักนำให้พัฒนาไปเป็นต้นโดยผ่านกระบวนการ direct embryogenesis หรือ indirect organogenesis โดยกระบวนการ direct embryogenesis พบการแบ่งเซลล์ของละอองเรณูเกิดเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีการ

เปลี่ยนแปลงรูปร่างไปในรูปแบบเดียวกันกับการพัฒนาของไซโกติคเอ็มบริโอ (zygotic embryo) ที่มีการพัฒนาของยอดและรากไปพร้อมๆ กัน ส่วนการพัฒนาเป็นต้นอ่อนด้วยกระบวนการ indirect organogenesis พบการแบ่งเซลล์ของละอองเรณูเกิดเป็นแคลลัส (callus) แล้วจึงมีการพัฒนาของยอดและรากที่สมบูรณ์ในภายหลัง (Genovesi and Magill, 1982) เรียกกระบวนการพัฒนาของละอองเรณูไปเป็นต้นอ่อนนี้ว่า microspore androgenesis (Foroughi-Wehr and Wenzel, 1993) การเกิด microspore androgenesis เริ่มต้นจากการแบ่งเซลล์ของละอองเรณูซึ่งพบว่ามีวิถี (path-way) เกิดขึ้นได้สองวิถี คือ pathway A และ pathway B ใน pathway A นั้นละอองเรณูที่เพาะเลี้ยงจะแบ่งเซลล์ครั้งแรกแบบไม่สมมาตร (asymmetric division) ได้เซลล์ที่มี vegetative และ generative nuclei ซึ่งมีขนาดไม่เท่ากัน จากนั้น vegetative nucleus จะแบ่งตัวต่อไปในขณะที่ generative nucleus จะสลายไป ส่วนใน pathway B พบว่าละอองเรณูจะมีการแบ่งตัวแบบสมมาตร (symmetric division) ได้เซลล์ที่มีนิวเคลียสขนาดเท่ากันสองนิวเคลียสซึ่งจะแบ่งตัวต่อไปจนเป็นแคลลัสที่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ในภายหลัง (Wei and Hong, 1991)

Niizeki and Oono (1968) เป็นกลุ่มแรกที่ประสบความสำเร็จในการสร้างต้นข้าวแฮพลอยด์จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูข้าว japonica โดยใช้อาหารสูตร Blaydes (1966) ที่เติม α –Naphthaleneacetic acid (NAA) kinetin 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ yeast extract แต่อัตราการเกิดต้นแฮพลอยด์ ค่อนข้างต่ำ ต่อมา Chu (1975) ได้พบว่าสูตรอาหาร N6 (Nitsch and Nitsch, 1969) เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงอับเรณูข้าว เนื่องจากสามารถทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับสูตร Miller ที่ใช้กันอยู่เดิม การค้นพบสูตรอาหารในครั้งนี้ทำให้เทคนิคการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวพัฒนามากขึ้น

การชักนำให้เกิดต้นแฮพลอยด์จาก megaspore รายงานครั้งแรกโดย Uchimiya และคณะ (1971) โดยเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของข้าวโพด (*Zea mays* L.) และรังไข่ของ *Solamum melongna* L. ซึ่งได้สังเกตการแบ่งเซลล์แฮพลอยด์ในแคลลัสและวางสมมุติฐานว่า สามารถที่จะชักนำให้เกิดต้นแฮพอยด์ในสภาพปลอดเชื้อจาก angiosperm megagametophyte ได้ ต่อมามีพัฒนาการในการผลิตพืชแฮพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงรังไข่จากนักวิทยาศาสตร์หลายคน (*De* Beauville, 1980; San Noeum and Ahmadi, 1980; Kuo, 1981; Zhou and Yang, 1981a,b,c; Yang and Zhou, 1982)

ในปี ค.ศ. 1980 มีห้องปฏิบัติการ 2 แห่ง รายงานการชักนำให้เกิดข้าวแฮพลอยด์ จากรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสม (unpollinated ovaries culture) คือ *De* Beauville (1980) และ Zhou and Yang (1980, 1981a) เป็นผลสำเร็จ ซึ่ง Kuo (1981) ได้ผลการทดลองที่คล้ายกัน และได้ถือเป็นรากฐานของงานวิจัยทางด้านนี้ หลังจากนั้นในปี 1998 Rongbai และคณะ พบว่าอาหารสูตร N6 ที่เติม NAA 2

มิลลิกรัมต่อลิตร และ DMSO 0.6-0.8 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดแคลลัสจากรังไข่ของข้าวที่ 3.8 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตร N6 ที่เติม 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) หรือ 2,4-D ร่วมกับ NAA ให้ผลที่ดีและเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส ส่วนอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้นสีเขียว (green plant regeneration) คือ อาหารสูตร N6 หรือ MS ที่เติม NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร Indole-3-acetic acid (IAA) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดต้นสีเขียวได้ถึง 77.3 เปอร์เซ็นต์ Rongbai และคณะ (1999) ยังพบว่าต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่จาก 10 สายพันธุ์ มีลักษณะทางการเกษตรที่แตกต่างกัน โดยประชากรจากการเพาะเลี้ยงรังไข่รุ่นที่ 1 (H_1) ได้ต้น แฮพลอยด์ ดับเบิลแฮพลอยด์ หรือ แฮพลอยด์-ดับเบิลแฮพลอยด์รวมกัน โดยต้นที่เป็นแฮพลอยด์พบว่า ความสูงต้น ความยาวของช่อดอก ความยาวของเมล็ด ความกว้างของดอก จำนวนดอก และจำนวนดอกที่ผสมติด จะลดลงอย่างมาก ส่วนต้นที่เป็นดับเบิลแฮพลอยด์จากลูกผสมระหว่าง UPRI 95-121 x UPRI 95-165 ต้นเป็นปกติ อัตราการผสมติดอยู่ในช่วง 69.6 ถึง 97.7 เปอร์เซ็นต์ อัตราการกระจายตัวทางพันธุกรรมในประชากรรุ่นที่ 1 (H_1) อยู่ที่ 1:1 โดยดูจากลักษณะสีของเยื่อหุ้มผล (pericarp) 5 ลักษณะ

สำหรับข้าว พบว่าเฉพาะเกสรตัวเมียและเกสรตัวผู้ที่สามารถตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวได้สูงโดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงอวัยวะทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน แต่การตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงจะต่ำลงมากเมื่อนำเกสรตัวผู้ออกและเกสรตัวเมียที่เลี้ยงแยกกัน (Zhou and Yang, 1981a,c) นอกจากนี้ Zhou and Yang (1981b) ยังได้พบความแตกต่างทาง genotype ของแคลลัสจากไข่ที่ไม่ได้รับการผสมที่ขึ้นกับระยะการพัฒนาของรังไข่ โดยพบว่าระยะ uninucleate ถึง mature embryo sag stages (Zhou and Yang,1981a; Kuo, 1981; Huang *et al*.,1982) เป็นระยะที่มีการตอบสนองต่อการเลี้ยงได้ดีกว่าระยะอื่น ๆ และ ระยะ mature embryo sag เป็นระยะที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงไข่ของข้าว (San Noeum, 1976, 1979; *De* Beauville, 1980; Wang and Kuang, 1981)

การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการขยายของเซลล์สืบพันธุ์โดยไม่มีผลที่จะกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์อื่น เป็นจุดที่ต้องนำมาพิจารณาในการเพาะเลี้ยงรังไข่ (Cagnet-Sitbon, 1980; Huang *et al*.,1982; Kuo, 1981; Zhou *et al*., 1983) Zhou and Yang (1981b,c) ศึกษาความต้องการ สารควบคุมการเจริญเติบโตของ gynogenesis และรายงานว่าถ้าขาด 2-methyl, 4-chlorophenoxyacetic acid (MCPA) รังไข่จะไม่ขยายและไม่เกิดแคลลัส แต่หากเพิ่ม MCPA จาก 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 8.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้รังไข่บวมและขยายขนาด (swelling) และระดับของ auxin ที่สูงมากกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร กระตุ้นให้เกิดแคลลัสจากผนังรังไข่มากกว่าเกิดจาก embryo sac นอกจากนี้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ 3-6 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงรังไข่ของข้าว แต่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ถ้ามากถึง 9 เปอร์เซ็นต์จะไม่เหมะสมกับการเลี้ยงรังไข่ของข้าว (Zhou *et al*.,1983) เมื่อเทียบกับการเลี้ยงอับเรณู การเลี้ยงรังไข่มีข้อจำกัดในแง่ของจำนวนรังไข่ที่มีเพียง 1 อัน เท่านั้น ขณะที่อับเรณูมีจำนวน microspore จำนวนมากกว่ามาก

หลังจากที่เลี้ยงอับเรณูของข้าวได้สำเร็จได้มีรายงานความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงอับเรณูของพืชชนิดอื่น ๆ ได้อีกเป็นจำนวนมาก (Nizeki and Oono, 1968) การศึกษาผลการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสมระหว่างจาปอนิกาและข้าวอินดิกาในเวลาต่อมาพบว่าความสามารถในการเพาะเลี้ยงอับเรณูที่พิจารณาจากตัวแปร 4 ชนิด ได้แก่ ความถี่ในการชักนำให้เกิดแคลลัส (callus induction frequency, CI) ความถี่ในการพัฒนาเป็นต้นสีเขียวของแคลลัส (green plantlet differentiation frequency, GPD) ความถี่ในการพัฒนาเป็นต้นเผือกของแคลลัส (albino plantlet differentiation frequency, APD) และความถี่ของการได้ต้นสีเขียวในการเพาะเลี้ยงต่อจำนวนอับเรณูทั้งหมดที่เพาะเลี้ยง (green plantlet yield frequency, GPY) เป็นลักษณะที่ถูกควบคุมจากยีนหลายตำแหน่ง โดยพบว่าลักษณะการเกิดแคลลัสเป็นผลจากการทำงานร่วมกันของยีนในแบบบวกสะสม (additive gene effect) มากกว่าแบบไม่ใช่ผลบวกสะสม (non-additive gene effect) ในขณะที่การพัฒนาเป็นต้นมีสาเหตุหลักมาจากการทำงานร่วมกันของยีนในแบบบวกสะสมเป็นส่วนใหญ่ (Zhang and Qifeng, 1993; He *et al*., 1998; Kwon *et al*., 2001; Kwon *et al*., 2002) ด้วยเหตุนี้ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงอับละลองเรณูในข้าวพันธุ์หนึ่งๆ จึงมีผลเนื่องมาจากจีโนไทป์ของพันธุ์ข้าวเอง ตลอดจนวิธีการและสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงซึ่งมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น (Henry *et al*., 1994) ดังรายงานของ Sugimoto and Takeoka (1998) ซึ่งพบว่าผลของการแสดงออกของยีนในการชักนำให้แคลลัสของข้าวพัฒนาไปเป็นต้นมีความผันแปรตามชนิดของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (อ้างจาก สุพรรณญิกา, 2549)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูและรังไข่ของข้าว

2.1.1 ปัจจัยทางด้านพันธุกรรม

การพัฒนาเป็นยอด และ/หรือ ราก จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขึ้นอยู่กับชนิดของพืช พืชบางชนิดอาจจะเกิดเป็นรากหรือยอดได้ง่าย ในขณะเดียวกันพืชอีกชนิดหนึ่งเกิดขึ้นได้ยากแม้จะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม อีกทั้งกระบวนการเกิดเป็นยอด และ/หรือ ราก จะผ่านกระบวนการ organogenesis หรือ embryogenesis ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชด้วย (ไพบูลย์, 2524) การเพาะเลี้ยงอับเรณูพันธุกรรมของต้นตัวอย่าง (donor plant) มีความสำคัญต่อการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูและรังไข่ ปัจจัยอื่นที่มีอิทธิพลต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูและรังไข่มากอีกอย่างหนึ่ง คือ ความอุดมสมบูรณ์ของต้นที่ให้

โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ต้นที่ให้ที่มีลักษณะไวต่อช่วงแสง พบว่าการปลูกในช่วงแสงที่แตกต่างกันมีผลต่อการเจริญเติบโตมาก นอกจากนี้ต้นที่ให้อับเรณูและรังไข่ควรมีความสมบูรณ์มากที่สุด ดังการทดลองของ Zhang และคณะ (1995) ซึ่งรายงานว่า สภาพทางสรีรวิทยาของต้นตัวอย่างมีอิทธิพลต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู นอกเหนือปัจจัยทางพันธุกรรม ซึ่ง Meifang, (1992) เห็นว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวควรเลือกต้นที่ให้จากแปลงที่มีความสมบูรณ์เต็มที่ซึ่งทำให้ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูได้สูง

2.1.2 สภาพแวดล้อมในการปลูก

สภาพแวดล้อมในการปลูก เช่น ปริมาณน้ำ อุณหภูมิ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความเข้มของแสงและความยาวนานของแสง มีผลมากต่อความสมบูรณ์ของต้นตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Zhang และคณะ (1995) ที่กล่าวว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูจากต้นตัวอย่างที่ปลูกในแสงที่มีความเข้มต่ำ อัตราการเกิดต้นเผือกจะไม่เพิ่มขึ้น แต่กระตุ้นให้เกิดความแตกต่างในการพัฒนาเป็นต้นแทน ซึ่งรายงานของ Oldeman และคณะ(1987) ได้กล่าวไว้ว่า การที่ต้นที่ให้ได้รับความเข้มแสงสูงในช่วงการย้ายปลูกและมีการเจริญทางด้านลำต้น (vegetative growth) ที่ยาวนานมีผลต่อความสมบูรณ์ของต้น โดยเฉพาะในช่วงการเจริญทางด้านเซลล์สืบพันธุ์ทำให้มีจำนวนช่อดอกต่อตารางเมตรมากขึ้น แสดงว่าระดับของแสงที่ข้าวได้รับในระยะการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นมีความสำคัญมากในระยะการเจริญทางด้านสืบพันธุ์ (อ้างจากยี่โถ, 2540)

จากการทดลอง พันธุ์ CT9993 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวไร่ที่มีลักษณะไม่ตอบสนองต่อช่วงแสง พบว่าการปลูกในช่วงวันสั้นหรือช่วงวันยาว เปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดแคลลัสไม่ต่างกันมาก ซึ่งเท่ากับ 21.09 และ 19.23 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนในพันธุ์ KDML105 ซึ่งเป็นข้าวที่ไวต่อช่วงแสงสั้น ออกดอกก็ต่อเมื่อได้รับแสงต่ำกว่า 11 ชั่วโมง 52 นาที (วาสนา, 2523) ดังนั้นเมื่อทำการทดลองปลูกในวันปลูกที่ต่างกัน พบว่า จำนวนวันออกดอกในแต่ละวันปลูกและจำนวนชั่วโมงสะสมของแสงแดดจ้ามีความแตกต่างจากวันปลูกที่เป็นชุดเปรียบเทียบอีกด้วย ซึ่งทั้งสองลักษณะเป็นไปในทางเดียวกับเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดแคลลัสในพันธุ์ KDML105 นี้ ดังได้เห็นจากวันปลูกก่อนช่วงแสงสั้น (1 ตุลาคม) 6 5 4 และ 2 เดือน มีจำนวนวันออกรวง 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 188 156 130 และ 115 วัน ตามลำดับ และจำนวนชั่วโมงสะสมของแสงแดดเท่ากับ 1037.7 741.0 559.5 และ 485.1 ชม. ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มไปในทางเดียวกับ เปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดแคลลัส ซึ่งจะเท่ากับ 84.44 81.25 73.33 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ยี่โถ, 2540)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.3 การเตรียมอับเรณูและรังไข่โดยผ่านความเย็นก่อนการเพาะเลี้ยง

การนำดอกข้าวมาผ่านความเย็นช่วงเวลาหนึ่งก่อนนำอับเรณูมาเพาะเลี้ยง เป็นวิธีการที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงให้สูงขึ้นได้ ซึ่งอุณหภูมิต่ำมีผลต่อการพัฒนาของอับเรณูดังนี้

1. ทำให้การทำงานของ spindle fiber ในระหว่างการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีสเปลี่ยนแปลงไป มีผลทำให้ได้นิวเคลียส 2 อันที่มีขนาดเท่ากัน (identical nuclei) แทนที่จะเป็น vegetative nucleus และ generative nucleus ซึ่งมีขนาดไม่เท่ากัน (Zapata *et al*., 1983; Chen, 1986; Raina, 1989)

2. ทำให้อัตราการหายใจ การเผาผลาญสารอาหารภายในอับเรณู รวมทั้งการเสื่อมของ somatic cell ของผนังอับเรณู (anther wall) ลดลง ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของละอองเรณูเพิ่มขึ้น (Zhou *et al*., 1983; Rout and Sarma, 1991)

3. ชักนำให้เกิดกลไกการพัฒนาไปเป็นต้นของละอองเรณูเนื่องจากอุณหภูมิต่ำมีผลต่อการแสดงออกของยีนและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเซลสืบพันธุ์ (gametogenesis) จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการพัฒนาของละอองเรณูจาก gametophyte ไปเป็น sporophyte (Chen, 1986; Raina, 1989)

4. กระตุ้นให้ละอองเรณูเกิดการแบ่งเซลล์ได้รวดเร็วภายหลังจากการเพาะเลี้ยง และเซลล์มีการพัฒนาไปพร้อม ๆ กัน (Zapata *et al*., 1983; Raina, 1989; Rout *et al*., 1991) ซึ่งช่วยชักนำให้เกิด proembryo เร็วขึ้น (Zapata *et al*., 1983)

2.1.4 องค์ประกอบของสูตรอาหารพื้นฐาน

Chu และคณะ (1975) ได้พัฒนาสูตรอาหารพื้นฐาน N6 โดยอาศัยหลักการที่ว่าปริมาณของ NH_4^+ ในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการชักนำไมโครสปอร์ของข้าวให้เกิดการแบ่งตัวเป็นแคลลัส และการลดปริมาณ NH_4^+ จะส่งเสริมการเกิดแคลลัสในข้าวอินดิกาได้ดี ต่อมามีการดัดแปลงอาหารสูตร N6 โดยปรับความเข้มข้นของ NH_4^+ และสารอนินทรีย์บางชนิดทำให้การเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ต่างๆ มีความถี่ในการเกิดแคลลัสเพิ่มขึ้น เช่น สูตร SK-1 (Raina et al., 1989) และสูตร Chu (Chu *et al*., 1977) เป็นต้น ส่วนการชักนำให้แคลลัสเกิดการพัฒนาไปเป็นต้นนิยมใช้สูตรอาหารพื้นฐาน MS ดัดแปลงที่เติมแร่ธาตุต่างๆ ที่ส่งเสริมการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัส (Nizeki, 1997) จีโนไทป์มีผลต่อการตอบสนองต่อสูตรอาหารพื้นฐานดังการทดลองของ Mandal and Gupta, (1977) ซึ่งเพาะเลี้ยง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อับเรณูของข้าวลูกผสมระหว่าง *Oryza sativa* L. cv pankaj กับ *O. rufipogon* Grift. บนอาหารสูตร N6 He2 He5 R3 และสูตร N6 ดัดแปลง พบว่าอับเรณูที่เพาะเลี้ยงตอบสนองต่อสูตร He2 มากที่สุดและตอบสนองต่อสูตร R3 น้อยที่สุด

2.1.5 สารควบคุมการเจริญเติบโต

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทั่วไป สารควบคุมการเจริญเติบโต (hormone) ในพืชมีบทบาทอย่างมากกับกระบวนการ morphogenesis ซึ่งอาจเกิดจาก morphogenesis ถูกควบคุมด้วยระดับและชนิดของฮอร์โมนที่อยู่ภายในชิ้นส่วนพืช ซึ่งฮอร์โมนในชิ้นส่วนพืชมีความแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณขึ้นกับชนิดพืช ชนิดของเนื้อเยื่อ และสภาพของเนื้อเยื่อ แม้ในต้นพืชเดียวกัน เนื้อเยื่อต่างชนิดกันยังมีระดับและชนิดของฮอร์โมนแตกต่างกันออกไป เช่น ในรังไข่ หรืออับเรณู จะมีปริมาณ auxin ค่อนข้างสูง ถ้าในเนื้อเยื่อมีปริมาณฮอร์โมนสูงอยู่แล้ว ในอาหารอาจต้องลดปริมาณฮอร์โมนให้น้อยลง เพื่อให้การเจริญของเนื้อเยื่อเป็นไปอย่างสมบูรณ์ (ไพบูลย์, 2524)

ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าว Sohn และคณะ (1987) รายงานว่าการใช้ NAA kinetin 2,4-D และ ABA ร่วมกันในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส และสูตรชักนำให้เกิดต้น ให้ผลดีกว่าการใช้ 2,4-D เพียงอย่างเดียว Choi และคณะ (1986) กล่าวว่า ไม่เพียงการ auxin จะมีผลต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูในช่วงการชักนำให้เกิดแคลลัสเท่านั้น ยังมีผลต่อการชักนำให้เกิดต้นด้วย ซึ่งโดยทั่วไป 2,4-D จะกระตุ้นให้อับเรณูตอบสนองมากกว่าการใช้ NAA แต่ในบางพันธุ์จะแสดงถึงการตอบสนองที่จำเพาะกับ NAA (NAA specific reaction) Ball และคณะ (1993) กล่าวว่าการเติม IAA จะชักนำให้เกิด direct embryogenesis ในขณะที่ 2,4-D จะส่งเสริมการเกิดและการแบ่งตัวของแคลลัส ส่วนการเติม NAA มักกระตุ้นให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นได้ในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส

การเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวนิยมเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม auxin ลงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส โดยอาจเติม 2,4-D NAA หรือ 2,4,5-T เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งหรือ 2 ชนิดร่วมกัน หรืออาจเติม auxin ร่วมกับ cytokinin ในอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการส่งเสริมให้เกิดแคลลัสหรือกระบวนการ embryogenesis ของไมโครสปอร์ (Croughan and Chen, 1991; Wei and Hong, 1991; Mori, 1997) ในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวอินดิกามักใช้ความเข้มข้นของ 2,4-D หรือ NAA ต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงข้าวจาปอนิกา และการใช้ 2,4-D ความเข้มข้นต่ำร่วมกับ NAA และ kinetin ความเข้มข้นสูงจะสามารถกระตุ้นการพัฒนาของไมโครสปอร์แบบให้เป็นต้นสมบูรณ์โดยไม่ต้องผ่านระยะการเป็นแคลลัสได้ (Lynch *et al*., 1991)

2.1.6 อายุและขนาดของแคลลัส

อายุและขนาดของแคลลัสที่ได้อับเรณูและรังไข่ของข้าวเป็นปัจจัยประการหนึ่งที่มีผลต่อการพัฒนาจากแคลลัสไปเป็นต้น โดยพบว่าความสมารถในการพัฒนาไปเป็นต้นจะลดลงเมื่ออายุของแคลลัสเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าแคลลัสที่มีขนาดเล็กกว่า 1 มิลลิเมตร ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ (Wei and Hong, 1991) Ching (1982) พบว่าแคลลัสที่มีอายุ 10-15 วันสามารถพัฒนาเป็นต้นได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าแคลลัสมีอายุมากกว่า 50 วัน จะพัฒนาเป็นต้นได้น้อยหรือไม่พัฒนาเป็นต้นเลย สอดคล้องกับการทดลองของ Chen และคณะ (2001) ซึ่งพบว่าเมื่อนำแคลลัสที่มีขนาด 2 มิลลิเมตร ที่มีอายุ 35 45 และ 55 วัน ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ 7.7 10.6 และ 16.7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแคลลัสลัสที่มีอายุมากกว่า 65 วันขึ้นไปไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้เลย

2.2 การเพิ่มจำนวนโครโมโซมแบบทวีคูณ

การชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมนั้น ทำได้โดยการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมีที่มีคุณสมบัติเป็น antimitotic agent ชนิดต่างๆ เช่น colchicine nitrous oxide podophyllin oryzalin trifluralin และ amiprophosmethyl เช่น การทดลองของ Ramulu และคณะ (1991) ซึ่งใช้ colchicines ความเข้มข้น 0.5-5.0 ไมโครโมล oryzalin และ amiprophosmethy ความเข้มข้น 15-31 ไมโครโมล ในการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของมันฝรั่ง นอกจากนี้การเพิ่มจำนวนโครโมโซมยังถูกเหนี่ยวนำได้ด้วยสภาพทางกายภาพบางประการ เช่น อุณหภูมิ เป็นต้น อย่างไรก็ตามพบว่าโดยทั่วไปนิยมใช้สารโคลชิซิน (clochicine) ในการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของต้นแฮพพลอย์ (Rao and Suprasanna, 1996; Sopory and Munshi, 1996; Chen *et al* .,2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โคลชิซิน เป็นสารประเภทอัลคาลอยด์ (alkaloid) สกัดจากเมล็ด ดอก ใบ และหัว ของ autum crocus (*Colchicum autummnale*) ลักษณะเป็นผลึกสีเหลือง มีคุณสมบัติเป็นเบสอ่อน ๆ หรือเป็นกลาง ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม แอลกอฮอล์ และน้ำเย็น (Hussein and Narsa, 1974) โคลชิซินมีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งการสร้างและกาทำงานของเส้นใยสปินเดิล (spindle fibre inhibitor) โดยพบว่าโคลชิซินจะเข้าไปจับกับโปรตีนทูบูลิน (tubulin) ทำให้โปรตีนเหล่านี้ไม่สามารถจัดเรียงตัวต่อกันเป็นไมโครทูบูล (microtubule) ได้ ส่งผลให้การสร้างและการทำงานของเส้นใยสปินเดิลถูกขัดขวาง การเคลื่อนที่ของโครโมโซมเข้าสู่ขั้วเซลล์จึงไม่สามารถเกิดขึ้นได้อย่างปกติ เป็นผลทำให้มีการรวมตัวกันใหม่ (restitution) ของโครโมโซมเกิดเป็นนิวเคลียสที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเท่าตัว โดยทั่วไปการใช้

สารโคลชิซินเพื่อชักนำเพื่อให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมนิยมใช้ในรูปของสารละลายที่ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.006-3 เปอร์เซ็นต์ และมักเติม dimethyl sulphoxide (DMOS) 1-4 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทำหน้าที่เป็น wetting agent ที่ช่วยให้โคลชิซินถูกดูดซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชได้มากขึ้น (Arzari and Darvey, 2001)

รัตน์ดา (2538) ทดลองนำหน่อของต้นข้าวแฮพลอย์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งที่เติมสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.01 และ 0.03 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 และ 5 วัน พบว่าหน่อที่เลี้ยงในอาหารที่มีโคลชิซิน 0.03 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 วัน สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมแบบทวีคูณได้สูงสุด 50 เปอร์เซ็นต์

Chen และคณะ (2001) แบ่งหน่อของต้นข้าวแฮพลอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ Taipei 309 เป็นสองกลุ่ม กลุ่มที่หนึ่งนำไปแช่ในสารละลายโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่เหลือแช่ในสารละลาย oryzalin ความเข้มข้น 25 ไมโครโมล พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นดับเบิลแฮพลอยด์จากหน่อข้าวที่แช่สารละลาย oryzalin และหน่อข้าวที่แช่ในสารละลายโคลชิซิน มีค่าเท่ากับ 31.0 และ 11.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Morais และคณะ (1991) เสนอว่าในการใช้สารโคลชิซินเพื่อชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมแบบทวีคูณมีสิ่งที่ต้องคำนึง ได้แก่ ชนิดของพืช ชิ้นส่วนของพืชที่ได้รับสาร ระดับความเข้มข้นของสาร ระยะเวลาในการให้สาร และวิธีการให้ เนื่องจากพืชแต่ละชนิด ตลอดจนส่วนต่างๆ ของพืชที่ได้รับสารมีการตอบสนองต่อระดับความเข้มข้น ระยะเวลาในการให้สาร และวิธีการให้สารได้แตกต่างกัน สอดคล้องกับการทดลองของ Sun และคณะ (1994) ซึ่งนำต้นกล้าของ *Sorghum vesicolor* มาแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้นต่างๆ โดยเปรียบเทียบผลการแช่เฉพาะส่วนปลายยอด ปลายราก และการแช่ทั้งต้น พบว่าการแช่ต้นกล้าทั้งต้นในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ มีการเกิดต้นพอลิพลอยด์สูงสุด 8.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการแช่ปลายยอดหรือปลายรากในสารที่มีความเข้มข้น 0.2 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นพอลิพลอยด์สูงสุด 6.7 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved