การขยายพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการอนุรักษ์พันธุกรรมในหลอดทดลอง

Propagation of *Hom Kra-Dang-Nga* Rice through Tissue Culture Technic and Its Conservation *In Vitro*

อรุณี ยูโซ๊ะ

Arunee Yusoh

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Plant Science
Prince of Songkla University
2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การขยายพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการอนุรักษ์พันธุกรรมในหลอดทดลอง

ผู้เขียน นางสาวอรุณี ยูโซ๊ะ

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……..

(ศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต)

คณะกรรมการสอบ

……ประธานกรรมการ

(ดร. ไซนีย๊ะ สะมาลา)

……กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต)

……..กรรมการ

(ดร. สุรีรัตน์ เย็นช้อน)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

……..……

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และขอขอบพระคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านไว้ ณ ที่นี้

ลงชื่อ.....

(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาวอรุณี ยูโซ๊ะ)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวอรุณี ยูโซ๊ะ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การขยายพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการอนุรักษ์พันธุกรรมในหลอดทดลอง

ผู้เขียน นางสาวอรุณี ยูโซ๊ะ

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2557

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงคัพภะแก่ของข้าวหอมกระดังงาบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส Murashige and Skoog (MS) เติม 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับα-naphthaleneacetic acid (NAA) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ6-benzyladenine (BA) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 1 3 5 และ 7 เปอร์เซ็นต์และผงวุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ พบว่า น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ชักนำแคลลัสได้สูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ได้มีสีเหลืองอ่อน เกาะกันแน่นเมื่อนำใบอ่อนข้าวหอมกระดังงาไปวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมไดแคมบาที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรให้แคลลัสสูงสุด 13.33 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน แคลลัสที่ชักนำได้มีลักษณะร่วน และมีจุดสีเขียวสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ ส่วนการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์ในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมคลอรีนไดออกไซด์ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มจำนวนยอดรวมข้าวสูงสุด 11 ยอด จำนวนใบ 2.20 ใบ/ยอดที่เพาะเลี้ยง ความสูงของยอดเฉลี่ย 9.35 เซนติเมตร หลังเพาะเลี้ยง 30 วัน เมื่อย้ายต้นกล้าออกสู่สภาพธรรมชาติให้อัตราการรอดชีวิตถึง 100 เปอร์เซ็นต์ส่วนการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนในสภาพเขย่าเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ให้การสร้างยอดรวมสูงสุด 21.50 ยอด/ฟลาสก์ จำนวนใบ 20.45 ใบ/ฟลาสก์ หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน และเมื่อเลี้ยงต่อในอาหารสูตรเดิมอีก15วันเกิดรากจำนวนมาก ส่วนการเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหาร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin (KN) เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และเคซีนไฮโดรไลเซท 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารpolyvinylpyrrolidone

(PVP)เข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้สูงสุด 2.64 มิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถชักนำพืชต้นใหม่ได้ ส่วนการชะลอการเจริญเติบโตของต้นข้าวในอาหาร ½ MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุด อัตราการรอดของชิ้นส่วน 100 เปอร์เซ็นต์ สร้างยอดรวมเฉลี่ย 3.00 ยอดต่อชิ้นส่วน และให้ความยาวยอดเฉลี่ยน้อยที่สุด 0.77 เซนติเมตร ในระยะเวลา 60 วัน

Thesis Title Propagation of *Hom Kra-Dang-Nga* Rice through Tissue Culture Technic and Its Conservation *In Vitro*

Author Miss Arunee Yusoh

Mejor Program Plant Science

Academic Year 2014

ABSTRACT

Mature seeds of Hom Kra-Dang-Nga Rice were cultured on callus induction medium which was Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1 mg/l 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 1 mg/l α-naphthaleneacetic acid (NAA), 1 mg/l 6-benzyladenine (BA) and 0.7% agar. The medium was modified by supplementing with different concentrations of sucrose (1, 3, 5 and 7%). The results showed that callus formation was obtained from all of concentrations of sucrose containing medium. However, 3% sucrose containing medium gave the highest percentage of callus induction at 100% after culture for 30 days. The characteristics of callus were compact and pale yellow in color. After transfer the callus to fresh medium with the same component for 30 days, the embryogenic calli with green spots were obtained and subsequent to developing into complete plantlets. Culturing of *in vitro* young seedling leaves for 30 days on MS medium containing 0.5 mg/l dicamba gave the highest percentage of callus induction at 13.33%. The callus was friable with green spots and able to regenerate into plantlets. *In vitro* shoot tip cultured on MS liquid medium with 0.5 mg/l NAA, 1 mg/l BA and 1 mg/l ClO_2 gave the highest number of shoots at 11 shoots/cultured shoot, number of leaves at 2.20 leaves/shoot and shoot length at 9.35 cm. After transfer complete plantlets to soil, the survival rate was recorded to be 100 %. Culturing of *in vitro* shoot tip in liquid MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA, 1 mg/l BA and 3% sucrose for 30 days gave the highest percentage of multiple shoot formation at 21.50 shoots/flask, number of leaves at 20.45 leaves/flask. Cell suspension culture were initiated from 3 weeks-old

embryogenic callus in liquid MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l BA, 0.5mg/l NAA, 0.25 mg/l kinetin (KN), 1000 mg/l casein hydrolysate (CH). Polyvinylpyrrolidone (PVP) at concentration of 250 mg/l containing medium gave the highest proliferation of packed cell volume (PCV) at 2.64 ml after culture for 30 days. Unfortunately, plantlet regeneration was not obtained. For *in vitro* conservation study slow-growth of shoots at 0.77 cm was obtained on ½MS medium supplemented with 1 mg/l BA. Survival rate of shoot at 100% and a number of shoots at 3.00 shoots were obtained on this culture medium after culture for 60 days.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีด้วยความกรุณาของ ศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำสั่งสอน ทั้งทางด้านการเรียน การวิจัย ด้านคุณธรรมจริยธรรม และสอนทักษะในด้านต่างๆ ตลอดจนให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ดร. ไซนีย๊ะ สะมาลา ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และดร. สุรีรัตน์ เย็นช้อน กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่อง และให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณพ่ออับดุลเราะมาน คุณแม่นาอีหม๊ะ นายอานุวา นายนูรุดดีน พี่ชาย รอดีหย๊ะพี่สาว นายธเนศพี่เขย และน้องยามีละห์ น้องอิสมาแอล ที่ให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน และเป็นกำลังใจ จนข้าพเจ้าได้เรียนจบ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรสำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณอาจารย์ บุคลากรภาควิชาพืชศาสตร์ และอาจารย์ประจำคณะต่างๆ ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ได้อบรมสั่งสอน และให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูกที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

อรุณี ยูโซ๊ะ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพประกอบ	(12)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(14)
สรุปเนื้อหา	
บทที่ 1 บทนำต้นเรื่อง	3
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	13
บทที่ 2 การชักนำแคลลัส	15
การทดลองที่ 1 ผลของซูโครส และไดแคมบาต่อการชักนำแคลลัสจากคัพภะแก่และใบอ่อนของข้าวหอมกระดังงา	15
การทดลองที่ 2 การขยายพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาโดยการเพาะเลี้ยงปลายยอดภายใต้ระบบไบโอรีแอคเตอร์	27
การทดลองที่ 3 การขยายพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาโดยการเพาะเลี้ยงปลายยอดในสภาพเขย่าเลี้ยง	37
การทดลองที่ 4 การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น	47
การทดลองที่ 5 การอนุรักษ์พันธุกรรมโดยการชะลอการเจริญเติบโตของยอดรวมข้าวหอมกระดังงา	57
บทที่ 3 สรุป	69
เอกสารอ้างอิง	73
ภาคผนวก	79
ประวัติผู้เขียน	85

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของซูโครสต่อการชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงคัพภะแก่ของข้าวหอมกระดังงาบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	20
2	ผลของไดแคมบาต่อการชักนำแคลลัสบนอาหารสูตร MS หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	23
3	ผลของความเข้มข้นคลอรีนไดออกไซด์ต่อการเพิ่มปริมาณยอดรวมข้าวหอมกระดังโดยใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน	32
4	ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการเพิ่มปริมาณยอดรวมของข้าวหอม กระดังงาจากการเพาะเลี้ยงปลายยอดในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	41
5	การชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นจากแคลลัสของข้าวหอมกระดังงาที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร KN 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 1 กรัมต่อลิตร และ PVP ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน	52
6	ผลของสารชะลอการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารสูตร MS ต่ออัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วน จำนวนยอด ความยาวยอด และจำนวนใบหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน	63
7	ผลของสารชะลอการเจริญเติบโตของข้าวหอมกระดังงาต่ออัตรารอดชีวิตของชิ้นส่วน จำนวน ความยาวยอด และจำนวนใบหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 60 วัน	65

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	แคลลัสที่เกิดจากคัพภะแก่ของข้าวหอมกระดังงาที่วางเลี้ยงบนอาหาร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ วางเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์= 0.5 เซนติเมตร)	21
2	ลักษณะต้นข้าวที่ชักนำรากบนอาหาร MS free และย้ายลงปลูกในภาชนะในสภาพธรรมชาติ หลังจากปลูกระยะเวลา 90 วัน (บาร์= 1 เซนติเมตร)	22
3	พัฒนาการของใบอ่อนข้าวที่ตัดมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS เติม ไดแคมบา ความเข้มข้นหลังจากวางเลี้ยงในสภาพมืดเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์= 0.4 เซนติเมตร)	24
4	พัฒนาการของใบอ่อนข้าว ตัดมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS เติม ไดแคมบา 2 ความเข้มข้นหลังย้ายเลี้ยงในสภาพที่มีแสงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์=0.4 เซนติเมตร)	24
5	การเพาะเลี้ยงข้าวหอมกระดังงาภายใต้ระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบ TIB	30
6	การเจริญและเพิ่มปริมาณยอดข้าวในอาหารเหลว MS ที่ปลอดเชื้อ โดยการนึ่งฆ่าเชื้อ และการเติมสารคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้นต่างๆ หลังวางเลี้ยง 30 วัน (บาร์ = 1 เซนติเมตร)	33
7	ลักษณะต้นกล้าข้าวหอมกระดังงาย้ายลงปลูกในภาชนะในสภาพธรรมชาติ ระยะเวลา 70 วัน	34
8	ยอดอ่อนข้าวหอมกระดังงาอายุ 4 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน (บาร์ =1 เซนติเมตร)	40
9	ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการเพิ่มจำนวนยอดรวมของข้าวหอมกระดังงาในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)	42

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
10	ลักษณะต้นข้าวอายุ 2 เดือน หลังย้ายลงปลูกในภาชนะในสภาพธรรมชาติ (บาร์= 2 เซนติเมตร)	43
11	ลักษณะแคลลัสข้าวหอมกระดังงาชนิดเกาะกันแน่นที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	51
12	การเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 1 กรัมต่อลิตร และ PVP ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์	53
13	การชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นของแคลลัสข้าวหอมกระดังงาวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 1 กรัมต่อลิตร และ PVP ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ (บาร์= 2 มิลลิเมตร)	54
14	ต้นข้าวหอมกระดังงาที่วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ในอาหารเลี้ยงสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)	61
15	ลักษณะต้นข้าวหอมกระดังงาที่ผ่านการชะลอการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)	64
16	ลักษณะต้นข้าวหอมกระดังงาผ่านการชะลอการเจริญเติบโตเป็นเวลา 60 วัน (บาร์= 5 มิลลิเมตร)	66

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

BA	=	6-Benzyladenine
BAP	=	N6-benzylaminopurine
CH	=	Casein hydrolysate
CRD	=	Completely randomized design
DMRT	=	Duncan's multiple rang test
2,4-D	=	2,4-Dichiorophenoxyacetic acid
IBA	=	Indole-3-butyric acid
KN	=	Kinetin
MS	=	Murashige and Skoog
NAA	=	α-Napthalene acetic acid
PBZ	=	Paclobutrazol
PVP	=	Polyvinylpyrrolidone
TDZ	=	Thidiazuron
VW	=	Vacin & Went
%	=	เปอร์เซ็นต์
มก/ล	=	มิลลิกรัมต่อลิตร
มม	=	มิลลิเมตร

สรุปเนื้อหา

บทที่ 1

ตรวจเอกสาร

บทนำทั่วไป

ข้าวเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในวงศ์ Gramineae ชื่อวิทยาศาสตร์ *Oryza sativa* L. จีนัส *Oryza* สปีชี่ *sativa* ข้าวที่เกิดขึ้นในท้องที่ต่างๆ ของโลกแบ่งออกได้เป็น 3 พวกใหญ่ๆ คือ *O. sativa* ที่ปลูกกันทั่วไป *O. glaberrima* ที่ปลูกในแอฟริกา และข้าวป่าซึ่งเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ข้าวที่ปลูกในประเทศต่างๆ มีด้วยกันหลายชนิด (species) เช่น *O. spontanea, O. perennis, O. officinalis* และ *O. nivra* เป็นต้น (ประพาส, 2531) ข้าว *O. sativa* ยังแบ่งออกได้เป็น 3 แบบ ได้แก่ *indica* มีปลูกมากในเขตร้อน *japonica* มีปลูกมากในเขตอบอุ่น และ *Javanica* ข้าวหอมกระดังงาเป็นข้าวปลูกสกุล *O. sativa* ชนิด *indica* เป็นพืชผสมตัวเองเกือบร้อยเปอร์เซ็นต์ (รังสิต, 2537) ข้าวหอมกระดังงา เป็นพันธุ์ข้าวยอดนิยมในจังหวัดชายแดนใต้ เป็นข้าวที่ประชากรในพื้นที่นิยมบริโภค เกษตรกรจึงมีการปลูกกันอย่างกว้างขวาง และมีผลให้เกิดการซื้อขายในตลาดท้องถิ่น ตลอดจนเป็นพันธุ์ข้าวที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ ภูมิอากาศ และสภาพดินในเขตจังหวัดชายแดนภาคใต้ (นิธิศ และคณะ, 2554)

ข้าวหอมกระดังงาเป็นพันธุ์ข้าวพื้นเมืองของอำเภอตากใบ จังหวัดนราธิวาส มีลักษณะประจำพันธุ์คือ เป็นข้าวนาปี ที่มีจำนวนต้นต่อกอน้อย ลำต้นของข้าวหอมกระดังงามีสีม่วง รวงข้าวมีสีน้ำตาลอมม่วง มีอายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 120 - 150 วัน เมล็ดข้าวสารค่อนข้างเล็ก มีสีน้ำตาลเข้ม เมื่อนำมาหุงเป็นข้าวสุกแล้วจะมีความนุ่ม และกลิ่นหอมคล้ายดอกกระดังงา (ประมินทร์, 2552) ข้าวหอมกระดังงา เป็นพันธุ์ข้าวอีกชนิดหนึ่งซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีสารอาหารที่สำคัญหลายชนิดเช่น เป็นแหล่งของโปรตีน พลังงาน และที่สำคัญมีสารแอนโทไซยานินที่มีคุณสมบัติต้านมะเร็งลำไส้ ป้องกันการเกิดโรค ความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ ลดการอักเสบของผิวหนัง และทำให้เซลล์สมองทำงานได้ดี (ช่อแก้ว และคณะ, 2554) จากข้อมูลเกี่ยวกับความนิยมข้าวพันธุ์หอมกระดังงาในปัจจุบัน และลักษณะพันธุ์ดังกล่าวทำให้มีความจำเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาหาข้อมูลพื้นฐานของข้าวหอมกระดังงา เพื่อการขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนข้าวในอนาคต โดย ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และใช้ระบบ Temporary Immersion Bioreactor (TIB) สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวนั้น มีรายงานศึกษาในข้าวหลายชนิด ชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงแตกต่างกันออกไป แต่ชิ้นส่วนที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยง คือ อับละอองเกสร (พันนิภา และนพดล, 2554; จันทร์วิภา และคณะ, 2557) ใบ ปลายยอด (เมธินี และจารุวรรณ, 2556) และคัพภะ ซึ่งอาจเป็นคัพภะอ่อน หรือคัพภะแก่ สำหรับการเพาะเลี้ยงคัพภะแก่ มีรายงาน

ในข้าวหลายพันธุ์ เช่น ข้าวพันธุ์ MR232 (Rahman *et al*., 2010) ข้าวพันธุ์หอมกระดังงา (Zhang and Te-chato, 2012) ข้าวพันธุ์ดอกมะลิ 105 (Sompornpailin and Chutipaijit, 2012) ข้าวพันธุ์ Khandagiri (Mallick *et al*., 2013) ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้ ยังเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนต้นข้าวให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นวิธีการอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรม เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาต่อไปในอนาคต (รังสิต และคณะ, 2537)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จัดเป็นเทคนิคพื้นฐานที่นำมาใช้ประโยชน์ในด้านการขยายพันธุ์พืช การศึกษา และการค้นคว้าวิจัยในทุกสาขาที่เกี่ยวข้องกับพืช ส่วนใหญ่นำมาใช้ผลิต และขยายพันธุ์พืชเชิงการค้า เนื่องจากสามารถผลิตพืชให้มีคุณภาพดี สม่ำเสมอได้ปริมาณมาก ในเวลาอันรวดเร็วเมื่อเทียบกับวิธีการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศอื่นๆ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือการกระตุ้นเซลล์ หรือชิ้นส่วนพืชให้เกิดการเจริญเติบโต หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงตามความต้องการบนอาหารสังเคราะห์ภายใต้สภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น แสงสว่าง ที่สามารถควบคุมได้ในสภาพที่ปลอดเชื้อ โดยใช้สมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเป็นตัวกระตุ้นการเปลี่ยนแปลง และพัฒนาของเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเริ่มต้นขึ้นจากการศึกษาที่พบว่า เซลล์หรือเนื้อเยื่อที่แยกออกมาจากพืชมีความสามารถที่จะพัฒนาเป็นต้นพืชสมบูรณ์ขึ้นใหม่ได้ ทำให้เกิดการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ และเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ของพืชบนอาหารสังเคราะห์ จนในปัจจุบันสามารถทำการเพาะเลี้ยงอวัยวะ เซลล์ และเซลล์ไร้ผนัง หรือโปรโตพลาสต์ (protoplast) ของพืชหลายชนิดรวมทั้งการพัฒนาสูตรอาหารสังเคราะห์ต่างๆ ให้เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงในแต่ละชนิดของพืช และมีการใช้วิทยาการด้านเทคโนโลยีชีวภาพด้านต่างๆ เข้ามาร่วมเพื่อประโยชน์ในการศึกษาด้านชีวเคมี และพันธุศาสตร์ทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเข้ามามีบทบาทอย่างมากทั้งทางด้านการเกษตร การแพทย์ และการอุตสาหกรรมเทคนิค การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถแบ่งออกตามวิธีการได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการนำไปใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ เช่นการเพาะเลี้ยงคัพภะ การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ตลอดจนการเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชในหลอดทดลอง ปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นที่นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยมีวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกันไป เช่น ผลิตข้าวสาย

พันธุ์แท้ ผลิตพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรค หรือแมลง ผลิตข้าวทนเค็ม ทนต่อสภาพความเป็นกรด-ด่าง ทนต่อความแห้งแล้ง เป็นต้น (สุรินทร์ และคณะ, 2537)

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สามารถผลิตต้นพันธุ์พืชปริมาณมากในระยะเวลาอันรวดเร็วต้นพืชที่ผลิตได้จะปลอดโรค และลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ คือมีลักษณะตรงตามพันธุ์ ด้วยการใช้เทคนิคของการเพาะเลี้ยงจากชิ้นส่วนพืชให้พัฒนาเป็นต้นโดยตรง ต้นพืชที่ผลิตได้จะมีขนาดสม่ำเสมอจึงให้ผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้คราวละมากๆ พร้อมกันหรือในเวลาเดียวกัน (ศูนย์ส่งเสริม และพัฒนาอาชีพการเกษตร, 2557) การเพาะเลี้ยงข้าวนั้นสามารถใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นหลายชนิด เช่น คัพภะ ปลายยอด ใบอ่อน อับละอองเกสร เป็นต้น

การเพาะเลี้ยงคัพภะข้าว

การชักนำให้เกิดแคลลัสเป็นเทคนิคหนึ่งของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับเร่งการผลิต และปรับปรุงพันธุ์พืช หรือแก้ปัญหาในกระบวนการทางชีวภาพของพืช แคลลัสเป็นเนื้อเยื่อพื้นฐานของระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่น การขยายพันธุ์เพื่อชักนำให้เกิดต้นพืชปริมาณมาก ใช้ในกระบวนการผลิตเซลล์ไร้ผนังหรือโปรโตพลาสต์ การผลิตสารชีวเคมีจากเซลล์พืช การผลิตพืชให้ต้านทานต่อโรค แมลง ศัตรูพืชและทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม รวมทั้งการใช้เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรม Revathi และ Arumugam (2011) รายงานการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวที่สุกแก่ 5 สายพันธุ์ คือ ASD16 ADT43 Basmati370 Pusa Basmati และ Pokkali บนอาหาร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (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 Libin และคณะ (2012) ประสบความสำเร็จในการชักนำแคลลัสจากเมล็ดข้าวหอมพันธุ์ Sarawak Biris บนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด 97 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสมีลักษณะเป็นปมสีครีม มีขนาดค่อนข้างใหญ่ และสามารถพัฒนาไปเป็นต้นข้าวได้ในอาหารสูตร MS ที่เติมสาร

ควบคุมการเจริญเติบโต α- Naphthalene acetic acid (NAA) ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kinetin (KN) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถ ชักนำให้เกิดต้นข้าวที่สมบูรณ์ได้ถึง 55.6 เปอร์เซ็นต์ Zuraida และคณะ (2011) รายงานการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวสุกแก่พันธุ์ MR219 บนอาหาร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงในสภาพที่มีแสง ระยะเวลา 4 สัปดาห์ สามารถชักนำแคลลัสได้ 78 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่ สูตรเดิมเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถชักนำโซมาติคเอ็มบริโอได้ถึง 81 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อย้ายโซมาติคเอ็มบริโอไปเลี้ยงบนอาหาร MS เติม KN เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ สามารถชักนำต้นข้าวได้ 9 ต้นต่อจำนวนเอ็มบริโอ 3 กรัม Mannan และคณะ (2013) รายงานการนำเมล็ดข้าวสุกแก่ของข้าวสองสายพันธุ์คือ Kalijira และ Chinigura มาชักนำแคลลัสบนอาหาร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงในสภาพที่มีแสงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าข้าวพันธุ์ Kalijira สามารถชักนำแคลลัสได้ 97.22 เปอร์เซ็นต์ และข้าวพันธุ์ Chinigura ชักนำแคลลัสได้ 94.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย้ายแคลลัสข้าวทั้งสองสายพันธุ์มาเลี้ยงบนอาหาร MS เติม Benzylaminopurine (BAP) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Indole -3- butyric acid (IBA) เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในเวลา 3 สัปดาห์ ข้าวพันธุ์ Kalijira สามารถชักนำยอดได้ 91.67 เปอร์เซ็นต์ และข้าวสายพันธุ์ Chinigura ชักนำยอดได้ 83.33 เปอร์เซ็นต์ Zhang และ Te-chato (2012) รายงานว่าการนำเมล็ดข้าวสุกแก่ของข้าวพื้นเมืองหอมกระดังงามาเลี้ยงบนอาหาร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ KN เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 56.3 เปอร์เซ็นต์

การเพาะเลี้ยงปลายยอด

การเพาะเลี้ยงยอดอ่อน สามารถทำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้โดยไม่จำเพาะกับพันธุ์ และเกิดความแปรปรวนน้อย การเพาะเลี้ยงยอดอ่อนข้าวเป็นการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวอีกวิธีหนึ่งซึ่งใช้อาหาร MS ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0 1.0 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำการสร้างยอดรวม (สุลักษณ์ และคณะ, 2556) เมธินี และจารุวรรณ (2556) เพาะเลี้ยงปลายยอดขนาดประมาณ 5 มิลลิเมตร บนอาหารสูตร MS เติม TDZ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดของข้าวพันธุ์เผือกน้ำ 43 แพร่ 1 R-258 ข้าวหอมปทุมธานี 1 ข้าวเหนียวสันป่าตอง ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวชัยนาทสร้างยอดรวมได้โดยไม่ผ่านการพัฒนาเป็นแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติม TDZ เข้มข้น 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนยอดที่สร้างสูงสุดเฉลี่ย 8 ยอด/ปลายยอด

การเพาะเลี้ยงปลายยอดโดยใช้ระบบ Temporary Immersion Bioreactor (TIB)

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้พัฒนาไปอย่างกว้างขวางในหลายด้านทั้งเพื่อประโยชน์ด้านงานวิจัยและการผลิตเพื่อการค้า ระบบ Temporary Immersion System (TIS) ซึ่งเป็นการรวมข้อดีของระบบการเลี้ยงทั้งแบบอาหารกึ่งแข็ง และอาหารเหลวเข้าด้วยกันทำให้ต้นพืชมีความสมบูรณ์ และสามารถเพิ่มปริมาณได้รวดเร็ว เป็นอีกระบบหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจนำมาศึกษาทดลองเนื่องจากมีข้อดีหลายประการเช่น การปฏิบัติงานในส่วนของการเปลี่ยนอาหารทำได้สะดวก และการทำความสะอาดภาชนะที่ใช้แล้วทำได้ง่าย อีกทั้งสามารถเปลี่ยนขนาดภาชนะเพาะเลี้ยงให้ใหญ่ขึ้นได้ นอกจากนี้สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนพืชได้เป็นจำนวนมากในเวลาที่สั้นลงส่งผลให้สามารถลดค่าใช้จ่ายในส่วนของค่าแรง ซึ่งสำหรับงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชค่าแรงถือเป็นต้นทุนที่สูงที่สุดประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนทั้งหมด ลดการใช้พื้นที่สำหรับขั้นตอนการเพิ่มปริมาณลงได้มากหากพืชสามารถเพิ่มปริมาณในแนวตั้งได้จะทำให้ใช้พื้นที่น้อยกว่าการเพิ่มปริมาณพืชในแนวราบ ซึ่งจะทำให้ต้นทุนการผลิตต่อหน่วยต่ำลง (รุ่งอรุณ และคณะ, 2553; Scherer *et al.,* 2013)

ในทางทฤษฎี การเพาะเลี้ยงยอดอ่อนสามารถทำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้โดยไม่จำเพาะกับพันธุ์ และเกิดความแปรปรวนน้อย การเพาะเลี้ยงยอดอ่อนข้าวเป็นการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวอีกวิธีหนึ่ง ซึ่งใช้อาหารเหลว MS ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มของออกซิน และไซโตไคนิน เพื่อชักนำให้เกิดการสร้างยอดรวม (สุลักษณ์ และคณะ, 2556) นำมาวางเลี้ยงในสภาพเขย่าเลี้ยงหรือเลี้ยงในสภาพนิ่ง การขยายพันธุ์พืชโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการที่ผลิตพืชได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อลดต้นทุนการผลิต จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ การใช้ไบโอรีแอคเตอร์ และคลอรีนไดออกไซด์เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัสในอาหารเลี้ยง ในการขยายพันธุ์พืชในหลอดทดลองโดยไบโอรีแอคเตอร์ สามารถลดต้นทุนการผลิตได้จริง และสามารถ

เพิ่มจำนวนของต้นพืชได้มากกว่าการเลี้ยงบนอาหารแข็ง และการเขย่าเลี้ยงในอาหารเหลว (วุฒิชัย และสมปอง, 2557)

การเก็บรักษาพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ปัจจุบันพืชพันธุ์หลายชนิดที่มีอยู่ตามธรรมชาติได้สูญพันธุ์ไป บางชนิดกำลังจะสูญพันธุ์ หรือมีปริมาณลดลง และจะขาดแคลนในอนาคต เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมหรือเกิดจากการทำลายของมนุษย์เอง จึงมีความจำเป็นต้องมีการเก็บรักษาพันธุ์พืช โดยทั่วไปมักเก็บรักษาไว้ในรูปของเมล็ดพันธุ์ ซึ่งมีข้อจำกัดคือ ต้องปลูกพืชอย่างต่อเนื่องเพื่อสร้างเมล็ดที่ยังคงความมีชีวิต เมื่อนำมาเก็บรักษาไว้ในระยะเวลานาน อีกทั้งเมล็ดของพืชบางชนิดมีอายุสั้น และติดเมล็ดน้อยหรือไม่ติดเมล็ด เพื่อลดข้อจำกัดของวิธีการใช้เมล็ดในการเก็บรักษาพันธุ์พืช จึงได้นำวิธีการเก็บรักษาพันธุ์พืชในสภาพการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองมาใช้ เพราะสามารถเก็บรักษาได้ในหลายลักษณะของชิ้นส่วนพืช เช่น เมล็ด ยอด ราก เอ็มบริโอ แคลลัส และเซลล์ไร้ผนัง และสามารถคงความมีชีวิตไว้ได้เป็นระยะยาว เช่นการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส และอีกวิธีหนึ่ง คือ การปรับสภาพของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้มีส่วนผสมของสารชะลอการเจริญเติบโตบางชนิด และมีสารทำให้เกิดความเครียดของน้ำภายในเซลล์พืชที่อยู่ในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เซลล์พืชมีการเจริญเติบโตในอัตราที่ช้ามากๆ เพื่อเป็นการประหยัดแรงงาน เวลา และอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการย้ายเลี้ยงบ่อยๆ การเก็บรักษาพันธุ์พืชโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีประโยชน์คือ ใช้พื้นที่เก็บรักษาน้อย พืชที่เก็บรักษาปลอดภัยจากแมลง และเชื้อโรค ไม่ต้องย้ายเลี้ยงบ่อย เนื่องจากถูกจำกัดการเจริญเติบโต สามารถเพิ่มปริมาณได้เมื่อต้องการ และสะดวกในการขนส่งหรือแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพืช (บุญยืน, 2554 อ้างโดย เปรมฤดี, 2557)

การเก็บรักษาพันธุ์พืชในระยะสั้น

การเก็บรักษาพันธุ์พืชในระยะสั้น ปานกลาง หรือด้วยวิธีชะลอการเจริญเติบโตทำได้หลายวิธีตามรายงานของ รังสฤษฏ์ (2545) ได้แก่การลดอุณหภูมิ (reduce temperature) โดย

การลดอุณหภูมิที่เลี้ยงเนื้อเยื่อลง 5-20 องศาเซลเซียส ตรวจดูการเจริญเติบโตและเปลี่ยนอาหารหลังเก็บรักษาไว้ 1-2 ปี การลดปริมาณสารอาหาร (reduce medium) โดยลดความเข้มข้นของสารอาหารที่ใช้ในการชะลอการเจริญเติบโตลงเหลือครึ่งหนึ่ง หรือหนึ่งในสี่ส่วน ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของพืช การลดความชื้น โดยการใช้สารยับยั้งกระบวนการออสโมซีส (osmotic inhibitor) ชะลอการเจริญเติบโต ซึ่งเหมาะกับการเก็บรักษายอด เช่น การใช้แมนนิทอล จะทำให้การดูดซึมธาตุอาหารต่างๆ ของพืชลดลง การใช้สารชะลอการเจริญเติบโต เช่น การใช้ไซโคลเซล กรดแอบไซซิค พาโคลบิวทราโซล สารดังกล่าวช่วยในการลดการหายใจของพืช ส่งผลให้พืชเจริญเติบโตช้า การเก็บอนุรักษ์โดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้าช่วย สามารถอนุรักษ์พันธุ์ได้ตั้งแต่ระดับเซลล์ เนื้อเยื่ออวัยวะ และต้นอ่อน โดยเก็บและเลี้ยงไว้ในหลอดแก้ว วิธีนี้นิยมใช้กันมากเนื่องจากใช้พื้นที่แรงงานและการดูแลรักษาน้อย ลดการเสี่ยงอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ การทำลายของศัตรูพืช และการดูแลรักษาที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้ยังสะดวกในการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์พืชระหว่างประเทศ เนื่องจากมีขนาดเล็ก สะดวกในการขนส่งและปลอดศัตรูพืช (กิ่งกาญจน์ และคณะ, 2548)

กิ่งกาญจน์ และคณะ (2548) เก็บรักษาเชื้อพันธุ์กล้วยไม้ดินสกุล *Spathoglottis* ทั้ง 4 ชนิด คือ *S. pubescens* Lindl (เอื้องดินลาว) *S. affinis* de Vriese (เอื้องหัวข้าวเหนียว) *S. eburnea* Gagnep (บานดึก) และ *S. plicata* (ว่านจุก) แล้วทำการผสมเกสรด้วยการผสมกันเองในดอกไม้สกุล *Spathoglottis* ทั้ง 4 ชนิด เมื่อเกิดฝัก (pod) ปล่อยให้ฝักเจริญเป็นเวลานานประมาณ 1 – 2 เดือน นำฝักแก่มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW จนเกิดโปรโตคอร์มเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มจนได้ต้นอ่อน นำต้นอ่อนกล้วยไม้มาเพาะเลี้ยงในอาหารชะลอการเจริญเติบโต 2 ประเภท คือ (1) ศึกษาการลดปริมาณสารอาหารที่เพาะเลี้ยง คือ อนุรักษ์บนอาหาร 1/2 VW 1/3 VW และ 1/4 VW (2) ศึกษาการใช้สารยับยั้งออสโมซิสที่เติมในอาหาร คือ แมนนิทอล เข้มข้น 15 และ 30 กรัมต่อลิตร ผลการทดลอง พบว่า กล้วยไม้ดินสกุล *Spathoglottis* ทั้ง 4 ชนิด สามารถอนุรักษ์บนอาหารสูตร 1/4 VW ได้นาน 7 - 8 เดือน โดยไม่ต้องย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่ และการใช้สารยับยั้งออสโมซิส แมนนิทอล เข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร พบว่า สามารถอนุรักษ์กล้วยไม้ดิน *S. pubescens* และ *S. eburnea* ได้นาน 5 เดือนโดยไม่ต้องย้ายเลี้ยง ส่วนกล้วยไม้ดิน *S. affinis* สามารถอนุรักษ์ได้นาน 4 เดือน และกล้วยไม้ *S. plicata* อนุรักษ์ได้นาน 3 เดือน สำหรับ แมนนิทอลความเข้มข้นสูง 30 กรัมต่อลิตร ทำให้ต้นกล้วยไม้ใบเหลือง ขอบใบไหม้และตายภายในเวลา 1 เดือนหลังจากเพาะเลี้ยง

วรรณดา และคณะ (2557) เก็บรักษาพันธุ์หอมน้ำในสภาพปลอดเชื้อโดยนำเนื้อเยื่อส่วนหัวปลูกเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ระดับความเข้มข้นต่างกัน 2 ระดับ คือ ½MS และ MS ระดับความเข้มข้นปกติ ร่วมกับการเติมสารชะลอการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ paclobutrazol ความเข้มข้น 0 5 10 และ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ แมนนิทอลที่ระดับความเข้มข้น 0 10 20 30 และ 40 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 เดือนโดยไม่เปลี่ยนอาหาร พบว่าอาหารสังเคราะห์ระดับความเข้มข้น ½MS มีผลชักนำให้เกิดหัวย่อยได้มากกว่าการใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS ระดับความเข้มข้นปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. เพื่อใช้เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงเป็นเครื่องมือในการอนุรักษ์พันธุกรรมข้าวหอมกระดังงาในหลอดทดลอง เพื่อใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในอนาคต

บทที่ 2

การทดลองที่ 1

ผลของซูโครส และไดแคมบาต่อการชักนำแคลลัสจากคัพภะแก่และใบอ่อนของข้าวหอมกระดังงา

บทนำ

ข้าวหอมกระดังงาเป็นพันธุ์ข้าวพื้นเมืองของอำเภอตากใบ จังหวัดนราธิวาส ปัจจุบันกำลังได้รับความนิยมจากผู้บริโภคเป็นจำนวนมาก เนื่องจากข้าวหอมกระดังงา เป็นพันธุ์ข้าวอีกชนิดหนึ่งซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการสูงมีสารอาหารที่สำคัญหลายชนิดเช่น เป็นแหล่งของโปรตีนพลังงาน และที่สำคัญมีสารแอนโทไซยานินที่มีคุณสมบัติต้านมะเร็งลำไส้ (ช่อแก้ว และคณะ, 2554) ป้องกันการเกิดโรค ความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ (พัชราภรณ์ และคณะ, 2556) มีลักษณะประจำพันธุ์คือ เป็นข้าวนาปี ที่ปลูกได้เฉพาะในช่วงนาปีเท่านั้น เป็นพันธุ์ข้าวที่มีจำนวนต้นต่อกอน้อย เมื่อรวงข้าวแก่จัดลำต้นจะล้มกระจัดกระจายไปคนละทิศทาง ทำให้มีความยากลำบากต่อการเก็บเกี่ยว ซึ่งไม่เหมือนกับข้าวพันธุ์อื่นๆ ที่มีลำต้นแข็งแรง ไม่ล้มง่ายลำต้นของข้าวหอมกระดังงามีสีม่วง รวงข้าวมีสีน้ำตาลอมม่วง มีอายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 120-150 วัน เมล็ดข้าวสารค่อนข้างเล็ก มีสีน้ำตาลเข้ม เมื่อนำมาหุงเป็นข้าวสุกแล้วจะมีความนุ่ม และกลิ่นหอมคล้ายดอกกระดังงา (ประมินทร์, 2552) จากข้อมูลเกี่ยวกับความนิยมในปัจจุบันและลักษณะพันธุ์ดังกล่าวทำให้มีความจำเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาหาข้อมูลพื้นฐานของข้าวหอมกระดังงา เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในอนาคต สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวมีการใช้เทคโนโลยีขั้นสูงด้านการตัดต่อยีน การถ่ายยีนเพื่อให้ได้ต้นพันธุ์ที่ดี เช่น ต้นมีความแข็งแรง ทนแล้ง ทนดินกรด ทนดินเค็ม เป็นต้น อย่างไรก็ตาม เทคนิคพื้นฐานที่ต้องมีการศึกษาก่อนเข้าสู่กระบวนการตัดต่อยีน คือ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวใช้ชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงแตกต่างกันออกไป แต่ชิ้นส่วนที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยงคือ คัพภะ ซึ่งอาจเป็นคัพภะอ่อน หรือคัพภะแก่ สำหรับการเพาะเลี้ยงคัพภะแก่มีรายงานในข้าวหลายพันธุ์ เช่น ข้าวหอมพันธุ์ดอกมะลิ105 (Sompornpailin and Chutipaijit, 2012) ข้าวพันธุ์ Khandagiri (Mallick *et al*., 2013) ซึ่งสามารถเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมไว้ในหลอดทดลอง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในพืชหายาก หรือพืชพื้นเมืองอย่างข้าวหอมกระดังงาเป็นต้น อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นแหล่งพันธุกรรม เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาต่อไปในอนาคต (รังสิต, 2537)

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วน

นำเมล็ดข้าวหอมกระดังงามาแกะเปลือก นำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที แช่เมล็ดในคลอร๊อกซ์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 4-5 ครั้ง นำเมล็ดมาวางบนกระดาษทิชชู ซับให้แห้งแล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เตรียมไว้

1. ผลของซูโครสต่อการชักนำแคลลัสจากคัพภะแก่

นำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เติม 2, 4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1 3 5 และ 7 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีแสง 14 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจสอบอัตราการสร้างแคลลัส ประเภท และลักษณะของแคลลัสที่ปรากฏ เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของน้ำตาลโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design: CRD) แต่ละความเข้มข้นของน้ำตาล ทำ 4 ซ้ำ แต่ละขวดที่เพาะเลี้ยงเมล็ด 4 เมล็ดคิดเป็น 1 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

การชักนำโซมาติคเอ็มบริโอ

นำแคลลัสที่ได้มาวางเลี้ยงบนอาหาร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีแสง 14 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เกิดจุดสีเขียว และพัฒนาเป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์

2. ผลของไดแคมบาต่อการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนข้าวในหลอดทดลอง

นำใบอ่อนต้นข้าวหอมกระดังงา ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า มาตัดให้ได้ขนาดความยาว 0.5 มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ในสภาพมืดเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และย้ายไปเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 14 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นระยะเวลาอีก 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส ขนาดแคลลัส และเปอร์เซ็นต์การสร้างจุดสีเขียว เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของไดแคมบาโดยวางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละความเข้มข้นของไดแคมบาทำ 4 ซ้ำ แต่ละขวดที่เพาะเลี้ยงแคลลัส 4 แคลลัส คิดเป็น 1 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองเปรียบเทียบความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการชักนำแคลลัสจาก
คัพภะแก่ พบว่า หลังวางเลี้ยงบนอาหาร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆ วางเลี้ยงระยะเวลา 4 สัปดาห์ สามารถชักนำแคลลัสได้ทุกความเข้มข้น (ภาพที่ 2.1) สำหรับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้การสร้างแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ ให้เส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสเฉลี่ย 0.98 เซนติเมตร (ตารางที่ 2.1) แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้พร้อมเกิดจุดสีเขียวและราก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zuraida และคณะ (2011) ทดลองใช้น้ำตาลซูโครส 1 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ กับข้าวสองสายพันธุ์ MR 219 และMR 232 พบว่า น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ ในสายพันธุ์ MR 219 สูงถึง 48 เปอร์เซ็นต์ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ali และคณะ (2004) ทดลองใช้น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2 3 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ในข้าวพันธุ์ Xiushui 11 พบว่าน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำแคลลัสได้สูงถึง 67.2 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นไปได้ว่าน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสในข้าวหลายชนิด เนื่องจากน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์พืช รองลงมาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ขนาดของ

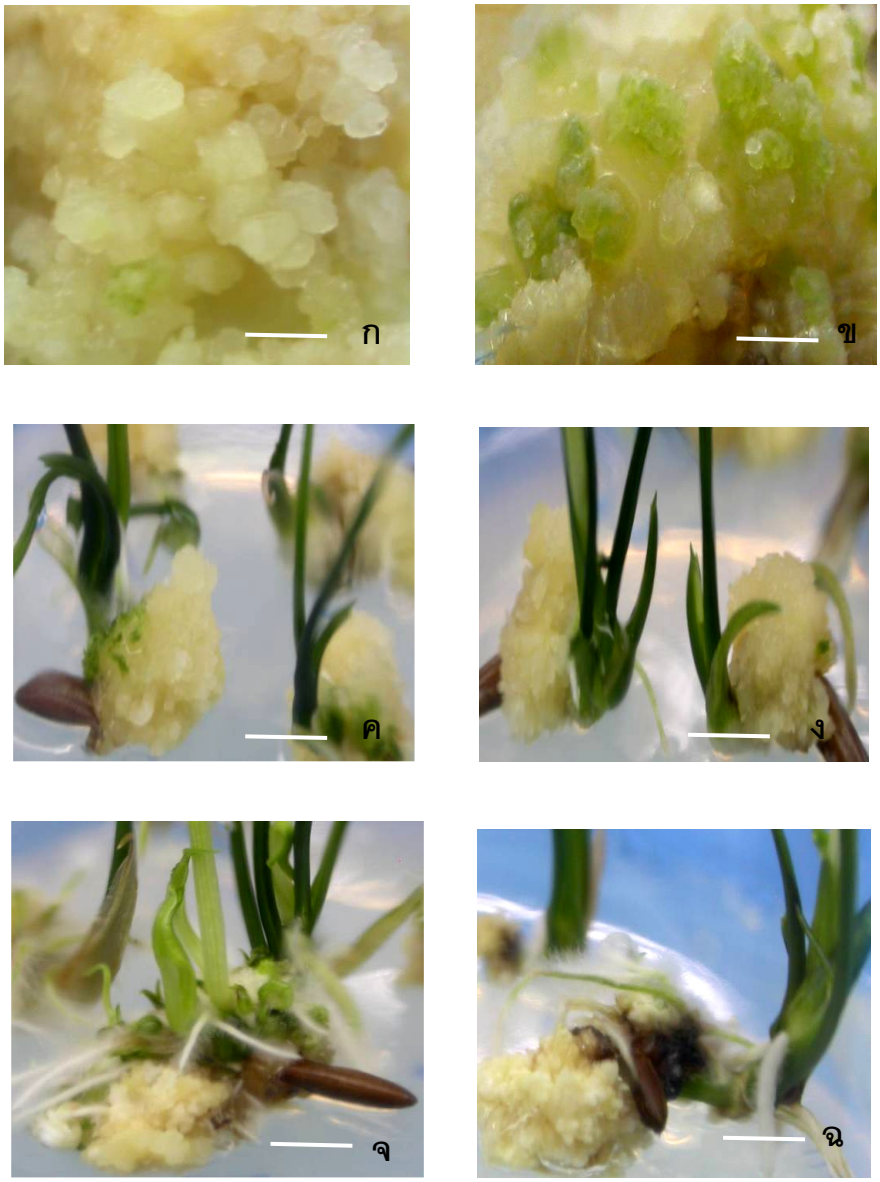
แคลลัสเฉลี่ย 0.74 เซนติเมตร ให้ต้นที่สมบูรณ์ แต่ไม่มีราก สำหรับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ ให้การเพิ่มปริมาณแคลลัสต่ำแต่ให้อัตราการเกิดจุดสีเขียวสูงถึง 6.63 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนยอด 2.87 ยอด/แคลลัส และให้แคลลัสสีเหลืองอ่อนประเภทร่วนเปราะ ส่วนน้ำตาลซูโครส 7 เปอร์เซ็นต์ ให้ต้นที่แคระไม่สมบูรณ์ ไม่มีการพัฒนาให้จุดสีเขียว และตายในที่สุด (ตารางที่ 2.1 และภาพที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 ผลของซูโครสต่อการชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงคัพภะแก่ของข้าวหอมกระดังงาบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (%)	การสร้างแคลลัส (%)	ขนาดแคลลัส (ซม)	จำนวนยอด/แคลลัส	การสร้างจุดสีเขียว (%)
1	100	0.74ab	2.19ab	4.06ab
3	100	0.98a	2.31ab	7.31a
5	100	0.57bc	2.87a	6.63a
7	100	0.31c	1.44b	1.63b
F-test		*	*	*
C.V. (%)		65.86	30	74.67

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



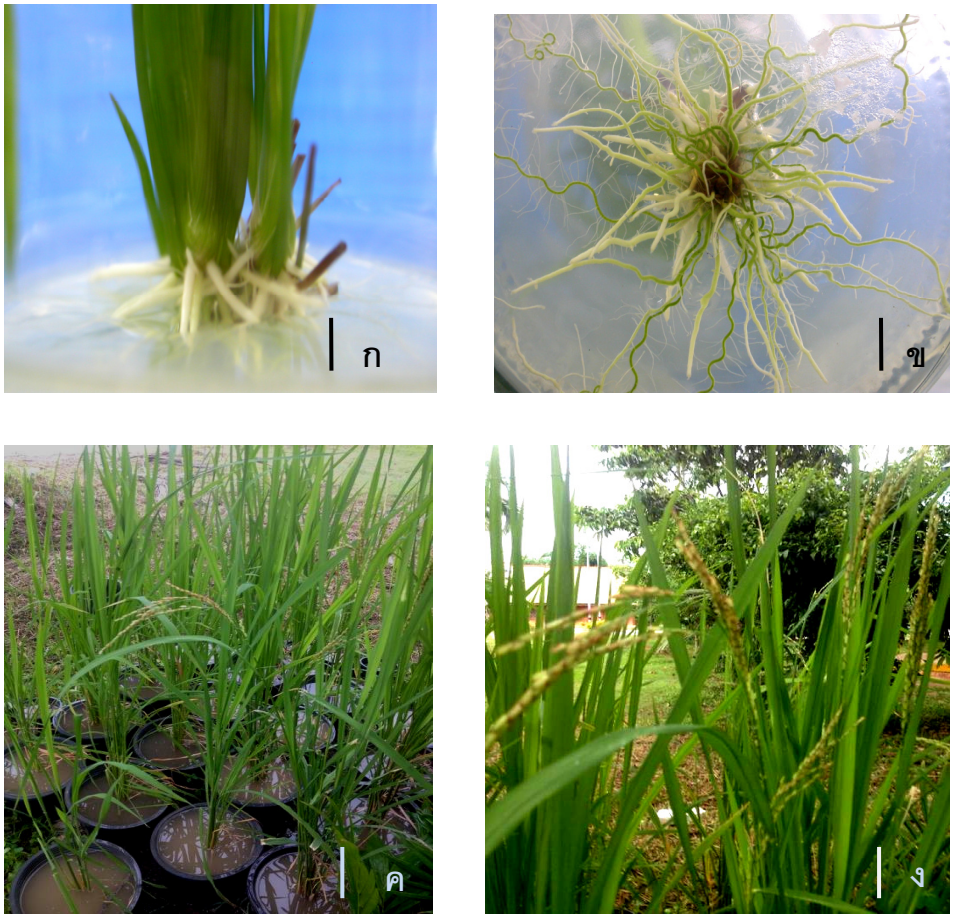
ภาพที่ 2.1 แคลลัสที่เกิดจากคัพภะแก่ของข้าวหอมกระดังงาที่วางเลี้ยงบนอาหาร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ วางเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์= 0.5 เซนติเมตร)

ก: แคลลัสพัฒนาเป็นโซมาติคเอมบริโอ ข: เกิดเป็นจุดสีเขียวในสัปดาห์ที่ 4

ค: น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ง: น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์

จ: น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ฉ: น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์

นำยอดขนาด 1-2 เซนติเมตร ได้จากการทดลองที่ 1 มาวางเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังวางเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ต้นกล้าข้าวออกรากและพัฒนาเกิดต้นข้าวเป็นที่สมบูรณ์ ให้อัตรารอดชีวิตหลังจากอนุบาลลงดินปลูก 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 ลักษณะต้นข้าวที่ชักนำรากบนอาหาร MS free และย้ายลงปลูกในภาชนะในสภาพธรรมชาติ หลังจากปลูกระยะเวลา 90 วัน (บาร์= 1 เซนติเมตร)

ก: พัฒนาการของรากบนอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังวางเลี้ยง 4 สัปดาห์

ข: รากที่สมบูรณ์

ค: ต้นข้าวเริ่มออกรวงหลังจากอนุบาลลงดินปลูก 90 วัน

ง: ลักษณะรวงข้าวอ่อนเพิ่มจำนวนมากขึ้นหลังจากปลูกในสภาพธรรมชาติหลังจากอนุบาลลงดินปลูก 100 วัน

ผลของไดแคมบาต่อการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนข้าวในหลอดทดลอง

จากการทดลองเปรียบเทียบความเข้มข้นของไดแคมบา ต่อการชักนำแคลลัสจากใบอ่อนข้าวหอมกระดังงา พบว่า ไดแคมบาเข้มข้น 0.5 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมในสูตรอาหาร MS ให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 13.33 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (ตารางที่ 2.2 และภาพที่ 2.3) ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ ชยานิจ และคณะ (2551) ที่ชักนำแคลลัสจากใบอ่อนปาล์มน้ำมันในอาหารสูตร MS และ Y3 เติมไดแคมบา เข้มข้น 10-15 ไมโครโมลาร์ เมื่อวางเลี้ยงนาน 6 เดือนสามารถชักนำแคลลัสได้ 21.98–22.83 เปอร์เซ็นต์ ทำนองเดียวกับรายงานของ Chehmalee และ Te-chato (2008) ที่สามารถเพิ่ม ปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมันได้สูง เมื่อใช้อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS เติมไดแคมบาเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากไดแคมบา จะช่วยส่งเสริมกิจกรรมการแบ่งเซลล์ได้ดีในชั้นอิพิเดอร์มิสพาเรนไคมา ชั้นของเนื้อเยื่อเจริญ และชั้นของเนื้อเยื่อเจริญมัดของท่อน้ำท่ออาหาร สำหรับแคลลัสที่เกิดจากการชักนำจากใบอ่อนข้าวหอมกระดังงาบน อาหารเติมไดแคมบา 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีลักษณะร่วนและมีจุดสีเขียว สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ แต่ต้นที่ได้มีลักษณะผิดปกติ ลำต้นแคระแกร็น และ ใบหงิก (ภาพที่ 2.4ก) ส่วนแคลลัสที่ชักนำในอาหารสูตรที่เติมไดแคมบา 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การสร้างแคลลัสที่เกาะกันแน่น ไม่มีการสร้างยอด (ภาพที่ 2.4ข) สำหรับสูตรอาหารที่เติมไดแคมบา 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถพัฒนาเกิดเป็นต้นได้ และชิ้นส่วน ลักษณะที่ปรากฏจะตายในที่สุด

ตารางที่ 2.2 ผลของไดแคมบาต่อการชักนำแคลลัสบนอาหารสูตร MS หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

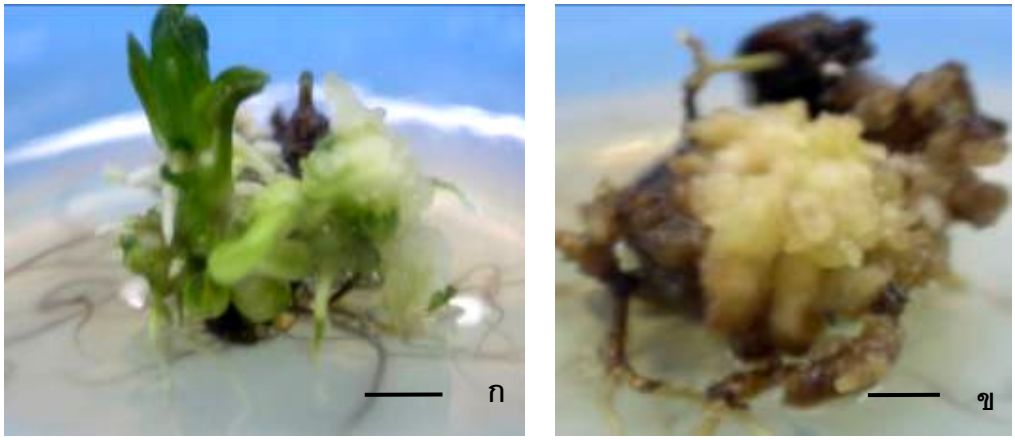
ไดแคมบา (มก/ล)	การสร้างแคลลัส (%)	ประเภทของแคลลัส
0.5	13.33	ร่วน
1	6.66	-
1.5	13.33	เกาะกันแน่น

ภาพที่ 2.3 พัฒนาการของใบอ่อนข้าวที่ตัดมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS เติม ไดแคมบา 3 ความเข้มข้น หลังจากวางเลี้ยงในสภาพมืดเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์= 0.4 เซนติเมตร)

ก: ไดแคมบา เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข: ไดแคมบา เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค: ไดแคมบา เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 2.4 พัฒนาการของใบอ่อนข้าว ตัดมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS เติม ไดแคมบา 2 ความเข้มข้น หลังย้ายเลี้ยงในสภาพที่มีแสงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์= 0.4 เซนติเมตร)

ก: ไดแคมบา เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข: ไดแคมบา เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สรุปผล

คัพภะแก่ข้าวหอมกระดังงาให้การสร้างแคลลัสได้ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วยซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แคลลัสมีขนาดเฉลี่ยสูงสุด 0.98 เซนติเมตร อัตราการเกิดจุดสีเขียว 7.31 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำใบอ่อนข้าวหอมกระดังงาไปวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมไดแคมบาที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 13.33 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน แคลลัสที่ชักนำได้มีลักษณะร่วน และมีจุดสีเขียวสามารถพัฒนาเป็นต้นได้

การทดลองที่ 2

การขยายพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาโดยการเพาะเลี้ยงปลายยอดภายใต้ระบบไบโอรีแอคเตอร์

บทนำ

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้พัฒนาไปอย่างกว้างขวางในหลายด้านทั้งเพื่อประโยชน์ด้านงานวิจัย และการผลิตเพื่อการค้า ระบบ Temporary Immersion System (TIS) ซึ่งเป็นการรวมข้อดีของระบบการเลี้ยงทั้งแบบอาหารกึ่งแข็ง และอาหารเหลวเข้าด้วยกันทำให้ต้นพืชมีความสมบูรณ์ และสามารถเพิ่มปริมาณได้รวดเร็ว เป็นอีกระบบหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจนำมาศึกษาทดลองเนื่องจากมีข้อดีหลายประการเช่น การปฏิบัติงานในส่วนของการเปลี่ยนอาหารทำได้สะดวก และการทำความสะอาดภาชนะที่ใช้แล้วทำได้ง่าย อีกทั้งสามารถเปลี่ยนขนาดภาชนะเพาะเลี้ยงให้ใหญ่ขึ้น นอกจากนี้สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนพืชได้เป็นจำนวนมากในเวลาที่สั้นลง ส่งผลให้สามารถลดค่าใช้จ่ายในส่วนของค่าแรงงาน ซึ่งสำหรับงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชค่าแรงถือเป็นต้นทุนที่สูงที่สุดประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนทั้งหมด ลดการใช้พื้นที่สำหรับการเพิ่มปริมาณลงได้มากหากพืชสามารถเพิ่มปริมาณในแนวตั้งได้ จะทำให้ใช้ต้นทุนการผลิตต่อหน่วยต่ำลง (รุ่งอรุณ และคณะ, 2553; Scherer *et al.*, 2013)

ในทางทฤษฎี การเพาะเลี้ยงยอดอ่อนสามารถทำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้โดยไม่จำเพาะกับพันธุ์ และเกิดความแปรปรวนน้อย การเพาะเลี้ยงยอดอ่อนข้าวเป็นการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวอีกวิธีหนึ่ง ซึ่งใช้อาหารเหลว MS ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มของออกซิน และไซโตไคนินเพื่อชักนำให้เกิดการสร้างยอดรวม (สุลักษณ์ และคณะ, 2556) นำมาวางเลี้ยงในสภาพเขย่าเลี้ยงหรือเลี้ยงในสภาพนิ่ง การขยายพันธุ์พืชโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการที่ผลิตพืชได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อลดต้นทุนการผลิต จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ การใช้ไบโอรีแอคเตอร์ และคลอรีนไดออกไซด์เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัสในอาหารเลี้ยง ในการขยายพันธุ์พืชในหลอดทดลองโดยไบโอรีแอคเตอร์สามารถลดต้นทุนการผลิตได้จริง และสามารถเพิ่มจำนวนของต้นพืชได้มากกว่าการเลี้ยงบนอาหารแข็ง และการเขย่าเลี้ยงในอาหารเหลว (วุฒิชัย และสมปอง, 2557)

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วน

ในการศึกษานี้ใช้ยอดอ่อนข้าวหอมกระดังงาอายุ 30 วัน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะแก่บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตัดแยกยอดรวมออกเป็นยอดเดี่ยวๆ ตัดใบตอนบนทิ้งให้เหลือปลายยอดสูง 0.5 เซนติเมตร ลอกกาบใบด้านนอกออกจนมีขนาด 0.5 เซนติเมตร ย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ ขนาด 100 มิลลิลิตร วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที ย้ายเลี้ยงทุก 20 วัน เพื่อเพิ่มปริมาณยอดจำนวนมากใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น ในการทดลองขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงปลายยอดภายใต้ระบบไบโอรีแอคเตอร์ (ภาพที่ 2.5)

ภาพที่ 2.5 การเพาะเลี้ยงข้าวหอมกระดังงาภายใต้ระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบ TIB

วิธีการศึกษา

นำต้นข้าวหอมกระดังงาที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ในอาหารเหลว MS บนเครื่องเขย่า มาแยกเป็นยอดเดี่ยวๆ ลอกกาบใบแก่ออก ตัดแยกเฉพาะยอดอ่อนให้มีขนาด 0.5 เซนติเมตร วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ อาหารไม่เติมและเติมคลอรีนไดออกไซด์ เข้มข้น 1 15 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงภายใต้ระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบ TIB ในสภาพที่มีแสง 14 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 30 วัน บันทึกการสร้างยอดรวม ความสูงของยอด (วัดจากโคนต้นไปถึงปลายใบที่สูงที่สุด สุ่มมา 5 ยอด เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล) และจำนวนใบ แต่ละซ้ำเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของคลอรีนไดออกไซด์ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละหน่วยการทดลองทำ 5 ซ้ำ แต่ละฟลาสก์ที่เพาะเลี้ยงปลายยอด 2 ยอด คิดเป็น 1 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ผลและวิจารณ์

1. ผลของความเข้มข้นของคลอรีนไดออกไซด์ต่อการเพิ่มปริมาณยอดในสภาพปลอดเชื้อ

นำชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อมาวางเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่ไม่เติมและเติมคลอรีนไดออกไซด์ ความเข้ม 1 15 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน พบว่า ทุกความเข้มข้นของคลอรีนไดออกไซด์ ที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง ไม่มีการปนเปื้อน และสามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ สำหรับความเข้มข้นของคลอรีนไดออกไซด์ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุดให้จำนวนยอดรวม 11 ยอด จำนวนใบ 2.20 ใบ และความสูงของยอดเฉลี่ย 9.35 เซนติเมตร (ตารางที่ 2.3 และภาพที่ 2.6) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Cardoso และ Silva (2012) ซึ่งทดลองขยายพันธุ์และเพิ่มจำนวนยอดเยอร์บีร่าในอาหารเหลวสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้น 0.0025 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนยอดได้สูงสุด 5.63 ยอด และให้ความยาวยอดสูงสุด 6.92 เซนติเมตร ในส่วนของข้าวหอมกระดังงาในการศึกษานี้ใช้ความเข้มของคลอรีนไดออกไซด์ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุด รองลงมาความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวยอดรวม 12.6 ยอด ความสูงของยอด 9.51 เซนติเมตร จำนวนใบ 2.52 ใบต่อยอด แลตาม

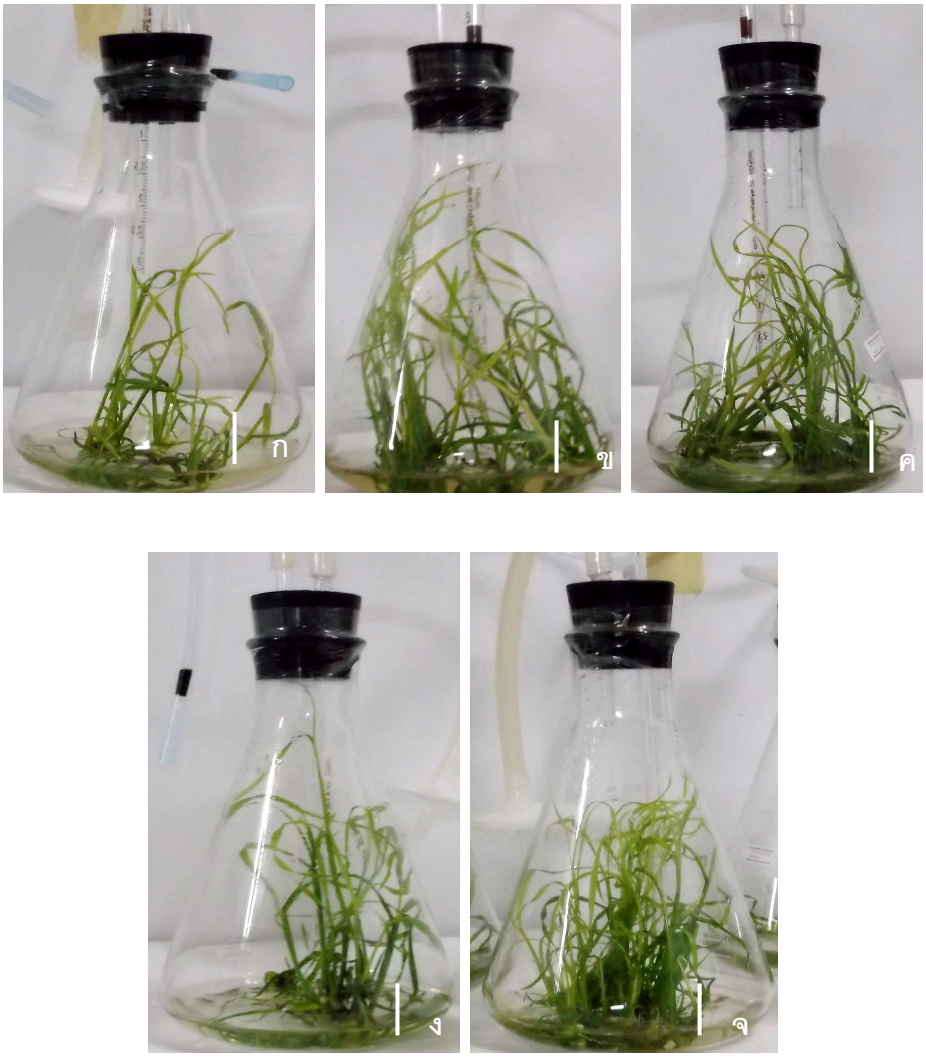
ด้วยความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดรวม 9.40 ยอด และความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดรวม 6.60 ยอด และตามด้วยชุดควบคุม (อาหารผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ) ให้ยอดน้อยที่สุด 6.40 ยอด อาจเป็นไปได้ว่าการฆ่าเชื้อในอาหารสังเคราะห์โดยไม่ผ่านความร้อนทำให้สารอาหารที่มีอยู่ไม่เกิดการสูญสลาย และสารที่เติมเพื่อทำให้ปลอดเชื้อเป็นสารที่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ และยังช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นพืชได้ด้วย ในการศึกษานี้ ใช้คลอรีนไดออกไซด์เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของคลอรีนไดออกไซด์ที่ใช้ในข้าวหอมกระดังงาให้ผลในการสร้างยอดรวม และความยาวยอดที่สูงกว่า อาจเป็นไปได้ว่าพืชแต่ละชนิดมีความอ่อนไหวต่อความเข้มข้นของคลอรีนไดออกไซด์ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามทุกความเข้มข้นของคลอรีนไดออกไซด์ทำให้ใบข้าวมีลักษณะสีเขียวเข้ม ดังนั้นการขยายพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาในอาหารเหลวที่เติมคลอรีนไดออกไซด์เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยอด ความสูงของยอดได้ดี เมื่อนำต้นกล้าออกปลูกในสภาพธรรมชาติ อัตรารอดชีวิตของต้นกล้าหลังย้ายปลูกลงดิน 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2.7)

ตารางที่ 2.3 ผลของความเข้มข้นคลอรีนไดออกไซด์ต่อการเพิ่มปริมาณยอดรวมข้าวหอมกระดังงา โดยใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

ความเข้มข้นของ ClO_2 (มก/ล)	อัตราการรอดชีวิ้นส่วนปลอดเชื้อ (%)	จำนวนยอดรวม	จำนวนใบ/ยอด	ความสูงยอดเฉลี่ย (ซม)
0 (อาหารนึ่งฆ่าเชื้อ)	100	6.40b	2.77	5.69b
1	100	11ab	2.20	9.35a
15	100	9.40ab	2.72	7.64ab
20	100	6.60b	2.17	5.81b
25	100	12.6a	2.52	9.51a
F-test		*	ns	*
C.V. (%)		45.52	19.43	30.61

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.6 การเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณยอดข้าวในอาหารเหลว MS ที่ปลอดเชื้อ โดยการนึ่งฆ่าเชื้อ และการเติมสารคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้นต่างๆ หลังวางเลี้ยง 30 วัน (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ก: ยอดข้าวที่เพิ่มปริมาณในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อ

ข: คลอรีนไดออกไซด์ เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค: คลอรีนไดออกไซด์ เข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง: คลอรีนไดออกไซด์ เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

จ: คลอรีนไดออกไซด์ เข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร

ต้นกล้าที่ชักนำได้ส่วนมากมีการสร้างรากด้วย ดังนั้นสามารถตัดแยกเป็นต้นเดี่ยวๆ แล้วอนุบาลลงดินปลูกได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการชักนำรากก่อน อัตรารอดชีวิตของต้นกล้าหลังย้ายปลูกลงดิน 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายปลูกเป็นเวลา 70 วัน ต้นโตเต็มที่พร้อมที่จะเข้าสู่ระยะการเจริญทางด้านสืบพันธุ์ต่อไป (ภาพที่ 2.7)

ภาพที่ 2.7 ลักษณะต้นกล้าข้าวหอมกระดังงาย้ายลงปลูกในภาชนะในสภาพธรรมชาติ ระยะเวลา 70 วัน

สรุป

การเพิ่มปริมาณยอดรวมในอาหารเหลวโดยใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบTIB เติมสารคลอรีนไดออกไซด์เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุด อัตราการสร้างยอดรวม 11 ยอด ความสูง 9.35 เซนติเมตร และจำนวนใบ 2.20 ใบ/ยอด หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

3. ผลของแหล่งชิ้นส่วนยอดต่อการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนไดออกไซด์

วิธีการศึกษา

นำชิ้นส่วนที่ไม่ปลอดเชื้อ (ยอดที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพนอกหลอดทดลอง) มาแยกเป็นยอดเดี่ยวๆ ลอกกาบใบแก่ออก ตัดแยกเฉพาะยอดอ่อนให้มีขนาด 0.5 เซนติเมตร วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการเติมคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้น 1 15 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงภายใต้ระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบ TIB ในสภาพที่มีแสง 14 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 30 วัน บันทึกการสร้างยอดรวม ความสูงของยอด (โดยวัดจากโคนต้นไปถึงปลายใบที่สูงที่สุด) จำนวนใบ แต่ละซ้ำสุ่มมา 5 ยอด เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของคลอรีนไดออกไซด์ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละหน่วยการทดลองทำ 5 ซ้ำ แต่ละฟลาสก์ที่เพาะเลี้ยงปลายยอด 2 ยอด คิดเป็น 1 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ผลและวิจารณ์

จากการทดลองเปรียบเทียบความเข้มข้นของคลอรีนไดออกไซด์ ต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนที่ไม่ปลอดเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนยอด พบว่า ทุกความเข้มข้นของคลอรีนไดออกไซด์หลังวางเลี้ยงชิ้นส่วน ระยะเวลา 3 วัน อาหารเหลวมีลักษณะเป็นสีขุ่น และเปลี่ยนเป็นสีเขียว สีชมพู เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนของเชื้อรา และแบคทีเรียจากชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยง อาจเป็นไปได้ว่า คลอรีนไดออกไซด์ที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยงมีความเข้มข้นน้อยเกินไป ทำให้ชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงไม่สามารถที่จะลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราที่ติดเข้าไปกับชิ้นส่วนได้ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา สามารถเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืชภายใน ผ่านทางท่อน้ำ ท่ออาหารของพืช ส่งผลให้เนื้อเยื่อหยุดการเจริญเติบโต และตายในที่สุด กมลพร และคณะ (2552) อ้างโดย เยาวมาลย์ (2555) พบว่า การปนเปื้อนของเชื้อในหลอดทดลอง มีการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อย่างรวดเร็ว เพราะสภาพแวดล้อมภายในหลอดทดลองมีความเหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อ อีกทั้งอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประกอบด้วยธาตุอาหารต่างๆ และน้ำตาลในระดับค่อนข้างสูง

คือ 3 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เชื้อจุลินทรีย์พวกเชื้อรา และแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วพร้อมทั้งปล่อยสารพิษที่เกิดจากกระบวนการเมทาบอลิซึม ทำให้เนื้อเยื่อพืชตายได้

สรุป

การเพาะเลี้ยงปลายยอดข้าวที่ไม่ปลอดเชื้อ ในอาหารเหลวเติมคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้นน้อย ไม่สามารถที่จะลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราได้

การทดลองที่ 3

การขยายพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาโดยการเพาะเลี้ยงปลายยอดในสภาพเขย่าเลี้ยง

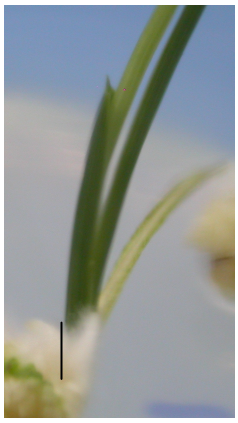
บทนำ

ลักษณะโดยทั่วไป ข้าวหอมกระดังงาเป็นพันธุ์ข้าวที่ไวต่อช่วงแสง มีลักษณะทรงกอตั้ง ลำต้นค่อนข้างแข็ง ความยาวลำต้น 131 เซนติเมตร เป็นพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรคและแมลง เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ ภูมิอากาศ และสภาพของดินในเขตจังหวัดชายแดนใต้ เกษตรกรในพื้นที่จึงมีการปลูกกันอย่างกว้างขวาง และมีผลให้เกิดการซื้อขายในตลาดท้องถิ่น ตลอดจนในจังหวัดใกล้เคียง (นิธิศ และคณะ, 2554) ลักษณะเด่น คือ เป็นข้าวเจ้ามีสี และมีกลิ่นหอมคล้ายดอกกระดังงา เป็นที่นิยมปลูกของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดนราธิวาส และจังหวัดใกล้เคียง มีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยมีปริมาณแคลเซียม ธาตุเหล็ก มากในข้าวกล้อง และมีปริมาณสังกะสีมากในข้าวกล้องงอก (กรมการข้าวกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2557) จากข้อมูลเกี่ยวกับความนิยมข้าวพันธุ์หอมกระดังงาในปัจจุบัน และลักษณะพันธุ์ดังกล่าวทำให้มีความจำเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาหาข้อมูลพื้นฐานของข้าวหอมกระดังงา เพื่อการขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนข้าวในอนาคตโดยการเลี้ยงปลายยอดในสภาพเขย่าเลี้ยง

ในทางทฤษฎี การเพาะเลี้ยงยอดอ่อน สามารถทำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้โดยไม่จำเพาะกับพันธุ์ และเกิดความแปรปรวนน้อย การเพาะเลี้ยงยอดอ่อนข้าว เป็นการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวอีกวิธีหนึ่ง ซึ่งใช้อาหาร MS ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0 1.0 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดการสร้างยอดรวม (สุลักษณ์ และคณะ, 2556) จิระศักดิ์ และคณะ (2555) เพาะเลี้ยงปลายยอดปาล์มน้ำมันในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติม BAP ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 200 วัน สามารถชักนำยอดได้ 1.5 ยอด เส้นผ่านศูนย์กลางปลายยอดอ่อน 0.5 เซนติเมตร จำนวนใบย่อย 17.4 ใบ ความยาวใบ 1.2 เซนติเมตร จิระศักดิ์ และคณะ (2553) เพิ่มปริมาณยอดของปาล์มน้ำมันโดยใช้ชิ้นส่วนปลายยอดวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า โดยมีการเปรียบเทียบผลของอาหารแข็ง และอาหารเหลว สูตร OPM ที่มีต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนปลายยอดในสภาพปลอดเชื้อ เลี้ยงนาน 190 วัน พบว่า อาหารเหลวทำให้มีจำนวนใบมากที่สุด 6.4±6.9 ใบ ซึ่ง หลังจากนั้นได้นำยอดที่เกิดขึ้นในอาหารเหลว จำนวน 20 ตัวอย่าง เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW นาน 147 วัน พบว่า มีการเพิ่มปริมาณยอดเฉลี่ย 18±14.16 ยอดต่อชิ้นส่วน

วิธีการศึกษา

นำยอดข้าวหอมกระดังงาอายุ 3 สัปดาห์ (ภาพที่ 2.8) ที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาลอกกาบใบแก่ทิ้ง ตัดปลายยอดให้ได้ขนาด 5 มิลลิเมตร และผ่ายอดตามยาวผ่านเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดออกเป็น 2 ชิ้น จากนั้นนำมาวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 1 3 5 และ 7 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27±2 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีแสง 14ชั่วโมงต่อวันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกการสร้างยอดรวมของแต่ละชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส โดยใช้แผนการทดลอง CRD ตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT แต่ละความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสทำ 4 ซ้ำๆ ละ 8 ฟลาสก์ แต่ละฟลาสก์เพาะเลี้ยง 2 ยอด แต่ละยอดผ่าตามยาวเป็น 2 ชิ้น



ภาพที่ 2.8 ยอดอ่อนข้าวหอมกระดังงาอายุ 4 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน (บาร์ =1 เซนติเมตร)

ผลและวิจารณ์

จากการเลี้ยงยอดอ่อนในอาหารเหลวสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสในความเข้มข้นต่างๆ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า สามารถเพิ่มจำนวนยอดรวมได้ (ตารางที่ 2.4) จากการทดลองพบว่า ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลดีที่สุด

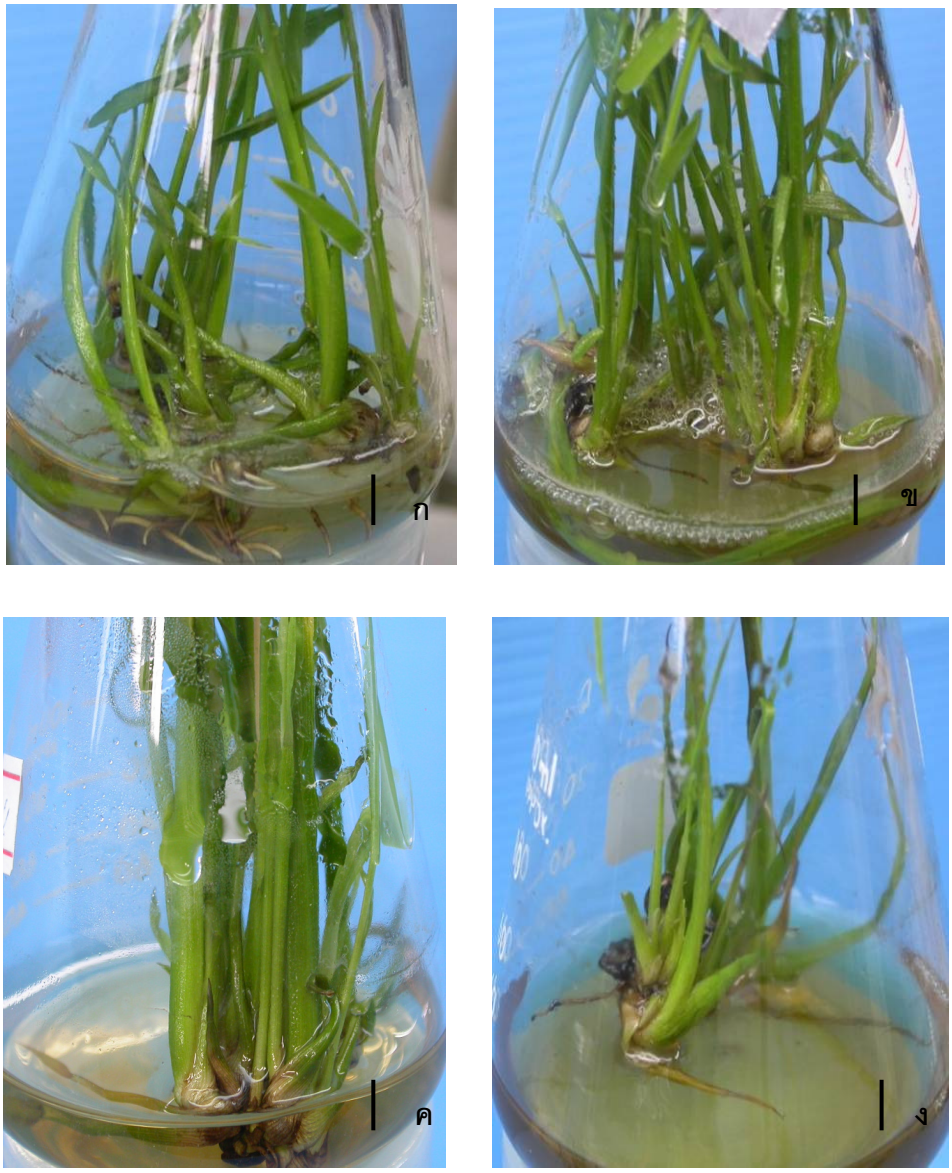
สามารถชักนำยอดรวมได้สูงถึง 21.50 ยอด (ภาพที่ 2.19) จำนวนใบ 20.45 ใบต่อฟลาสก์ อัตราการรอดชีวิต 87.50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนยอดรวม 19.25 ยอด จำนวนใบ 19.34 ใบต่อฟลาสก์อัตราการรอดชีวิต 96.81 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนยอดรวม 17.38 ยอด จำนวนใบ 15.92 ใบต่อฟลาสก์ และตามด้วยความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนยอดน้อยที่สุด 6.87 ยอด การเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสสูงขึ้นทำให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดลดลง (ตารางที่ 2.4)

ตารางที่ 2.4 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการเพิ่มปริมาณยอดรวมของข้าวหอมกระดังงาจากการเพาะเลี้ยงปลายยอดในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

น้ำตาลซูโครส (%)	อัตรารอดชีวิตของยอด (%)	จำนวนยอดรวม/ฟลาสก์	จำนวนใบ/ฟลาสก์
1	87.50	17.38a	15.92a
3	87.50	21.50a	20.45a
5	96.81	19.25a	19.34a
7	81.25	6.87b	5.19b
F-test		**	**
C.V. (%)		43.42	36.08

** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.9 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการเพิ่มจำนวนยอดรวมของข้าวหอมกระดังงาในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์= 1 เซนติเมตร)

ก: น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ข: น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์

ค: น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

ง: น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์

ต้นกล้าที่ชักนำได้ส่วนมากมีการสร้างรากด้วย ดังนั้นสามารถตัดแยกเป็นต้นเดี่ยวๆ แล้วอนุบาลลงดินปลูกได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการชักนำรากก่อน ทำให้ประหยัดเวลา และขั้นตอนการชักนำรากได้อัตรารอดชีวิตของต้นกล้าหลังย้ายปลูกลงดิน 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายปลูกเป็นเวลา 60 วัน ต้นโตเต็มที่พร้อมที่จะเข้าสู่ระยะการเจริญทางด้านสืบพันธุ์ต่อไป (ภาพที่ 2.10)

ภาพที่ 2.10 ลักษณะต้นข้าวอายุ 2 เดือน หลังย้ายลงปลูกในภาชนะในสภาพธรรมชาติ (บาร์= 2 เซนติเมตร)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโดยใช้ระบบเพาะเลี้ยงปลายยอดเป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ เป็นวิธีที่ไม่จำเพาะต่อพันธุ์ (genotype-independent) สามารถใช้ได้กับพันธุ์ข้าวทั่วไป อีกทั้งเป็นวิธีที่รวดเร็วและไม่ซับซ้อน และสามารถพัฒนาเป็นต้นแบบในการสร้างต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมได้อย่างรวดเร็ว เพื่อการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์ข้าวด้วยเทคนิคทางพันธุ

วิศวกรรม เมธินี และจารุวรรณ (2556) เพาะเลี้ยงปลายยอดข้าวในอาหารเหลววางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า พบว่า สามารถเพิ่มจำนวนยอดรวมได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากในอาหารเหลวช่วยให้มีการแลกเปลี่ยนแก๊สกับบรรยากาศเพื่อการเจริญเติบโตของยอดได้ดีกว่า แก้ปัญหาความต่างศักย์ของความเข้มข้นของธาตุอาหารที่ชิ้นส่วนพืชสัมผัสอยู่ (สมปอง, 2539) จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงปลายยอดของข้าวหอมกระดังงาในครั้งนี้ พบว่า การวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสในความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถเพิ่มจำนวนยอดรวมได้สูงถึง 21.50 ยอด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ekhlas (2014) ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงกล้วยสายพันธุ์ Grand Naine บนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มจำนวนยอดได้สูงสุด 7.83 ยอดต่อชิ้นส่วน เนื่องจากซูโครสเป็นคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นแหล่งของคาร์บอนมีผลโดยตรงต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง อย่างไรก็ตาม การเพิ่มปริมาณน้ำตาลซูโครสสูงขึ้นจะทำให้ เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดลดลงเนื่องมาจากการใช้น้ำตาลซูโครสเข้มข้นสูงมีผลต่อค่าออสโมติคัมในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ทำให้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงเกิดสภาพเครียดน้ำภายในเซลล์ พืชจะหยุดการสร้างยอดรวมส่งผลให้เพิ่มจำนวนราก ทำให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดลดลง อย่างไรก็ตาม Chae (2013) ทำการเพาะเลี้ยงสมุนไพร *Echinacea angustifolia* บนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำยอดรวมได้ 80 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นผลมาจากพืชแต่ละชนิดมีความต้องการปริมาณของน้ำตาลซูโครสที่แตกต่างกัน ดังนั้นการเพาะเลี้ยงข้าวหอมกระดังงาให้ได้จำนวนยอดสูงสุดจะต้องเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ จึงเหมาะสมต่อการชักนำยอด เพ็ญจันทร์ (2546) อ้างโดย ศิรินธร (2551) ศึกษาผลของชนิด และความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเจริญของยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดมังคุดโดยใช้น้ำตาลชนิดและความเข้มข้นต่างๆ พบว่า การเพาะเลี้ยงเมล็ดมังคุดบนอาหารเติมซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนยอดรวมสูงสุด 15.72 ยอดต่อเมล็ด Neto และ Otani (2003) อ้างโดย ศิรินธร (2551) รายงานว่าน้ำตาลซูโครสมีความเหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทั่วไป เพราะน้ำตาลซูโครสให้ค่าออสโมติกโพเทนเชียลที่ต่ำกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ และมีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมื่อเปรียบเทียบในระดับความเข้มข้นเดียวกัน นอกจากนี้ยังสามารถรักษาระดับความเป็นกรดด่างได้ใกล้เคียงกับค่าความเป็นกรดและด่างก่อนและหลังนึ่งฆ่าเชื้ออาหาร เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลชนิดอื่นๆ ประกอบกับน้ำตาลซูโครสสามารถหาซื้อได้ง่ายในท้องตลาด และมีราคาถูกเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการ

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยเฉพาะในการขยายพันธุ์พืชเพื่อการค้าได้เป็นอย่างดี แต่การใช้ซูโครสให้ได้ผลดีนั้นต้องพิจารณาถึงชนิดของพืชและความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย

สรุป

การเพาะเลี้ยงปลายยอดในอาหารเหลว MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ชักนำยอดรวมได้สูงถึง 21.50 ยอดที่เพาะเลี้ยง หลังวางเลี้ยง 4 สัปดาห์

การทดลองที่ 4

การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น

บทนำ

เซลล์ซัสเพนชั่นเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลวในสภาพเขย่าเลี้ยง ภายในเซลล์ซัสเพนชั่นประกอบด้วยเซลล์เดี่ยวๆ กลุ่มขนาดเล็ก และกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ โดยทั่วไปการเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นเป็นการเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาเมแทบอลิซึม โดยเฉพาะเกี่ยวกับการสร้างสารทุติยภูมิ การสร้างเอนไซม์ หรือเพื่อการผลิตต้นอ่อน และโปรโตพลาสต์ โดยรูปแบบการเพาะเลี้ยงจะเลี้ยงในสภาพเขย่าเลี้ยงที่ความเร็ว 80-120 รอบต่อนาที ส่วนใหญ่เนื้อเยื่อที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้คือ friable callus การเพาะเลี้ยงแบบนี้จะทำให้เนื้อเยื่อของพืช สามารถสัมผัสอาหารได้ทุกทิศทาง

เซลล์ซัสเพนชั่นเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาพเขย่าเลี้ยง ในอาหารเหลว เพื่อให้เซลล์ที่แบ่งตัวใหม่แยกออกจากเซลล์แม่เดิมอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้ขนาดของเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงมีขนาดไม่โต และใกล้เคียงกันมีการควบคุมสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เซลล์ที่ได้รับการเพาะเลี้ยงในสภาพดังกล่าวมีการเจริญเติบโต และมีการแบ่งเซลล์ที่รวดเร็วสามารถที่จะย้ายเลี้ยงได้เร็วขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแคลลัส โดยทั่วไปแล้วการเริ่มต้นเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยใช้แคลลัสชนิด friable callus มีระยะการเจริญอยู่ในช่วง log phase ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์กำลังเจริญเติบโต มีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูง

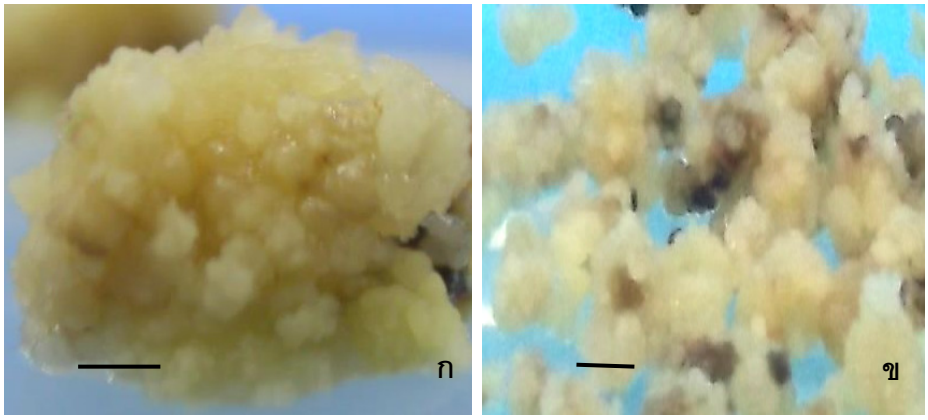
อนุรักษ์ และคณะ (2556) รายงานการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวเหนียวสายพันธุ์ขาวโป่งไคร้บนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสได้ทุกสูตรอาหาร แต่อาหารสูตรที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสขนาดใหญ่เฉลี่ย 257.21 ตารางมิลลิเมตร คือ สูตรอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นชักนำเซลล์แขวนลอยของข้าวเหนียวสายพันธุ์ขาวโป่งไคร้ในอาหารเหลวสูตร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 1 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร พบว่า มีค่าน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งสูงสุด คือ 0.8065 และ 0.0809 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ และเซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 9-18 วัน การศึกษาความมีชีวิตของเซลล์แขวนลอยโดยการย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีไดอะซิเตต แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนต์ พบว่า เซลล์ที่มีชีวิตจะปรากฏสีเขียวเรืองแสง ส่วนเซลล์ที่ตายแล้วจะไม่มีการเรืองแสงสีเขียว จากข้อมูลที่ได้สามารถนำเซลล์แขวนลอยไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ อย่างมากมาย เช่น ในการแยก หรือสกัด

เอนไซม์ และสารเคมีที่เป็นประโยชน์เพื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์ และการแสดงออกของยีน เพื่อการผลิตเอ็มบริออยด์ (คัพภะ) ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ เพาะเลี้ยงเพื่อชักนำเป็นพืชต้นใหม่ และใช้ในการถ่ายยีนเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืช ตลอดจนอนุรักษ์พันธุกรรมได้

ผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของข้าวขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น การใช้สารยับยั้งการเกิดออกซิเดชั่น polyvinylpyrrolidone (PVP) เป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญช่วยลดการเกิดสารประกอบฟีโนล ที่ปล่อยมาจากเซลล์พืชทำให้อาหารเป็นสีน้ำตาลเข้มเป็นพิษ และมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ และชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยง (รังสิมา และคณะ, 2548)

วิธีการศึกษา

นำแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสมีลักษณะเกาะตัวกันแน่น (compact callus) (ภาพที่ 2.12ก) ย้ายมาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และเคซีนไฮโดรไลเซท 1 กรัมต่อลิตร วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีแสงต่ออีกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ได้แคลลัสที่มีลักษณะร่วนเกาะกันแบบหลวมๆ (friable callus) (ภาพที่ 2.12ข) นำแคลลัสดังกล่าว มาชั่งให้ได้น้ำหนัก 0.5 กรัม ใส่ลงในอาหารเหลวสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และเคซีนไฮโดรไลเซท 1 กรัมต่อลิตร เติมสาร PVPเข้มข้น 0 250 500 และ 750 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 27±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน วัดปริมาตรตะกอนเซลล์ทุกๆ 3 วันบันทึกการเปลี่ยนแปลงของอาหารเหลวเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ PVP โดยใช้แผนการทดลอง CRD ตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT ทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 4 ฟลาสก์



ภาพที่ 2.11 ลักษณะแคลลัสข้าวหอมกระดังงาชนิดเกาะกันแน่นที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก: ลักษณะแคลลัสเกาะตัวกันอย่างแน่น (บาร์ = 0.3 เซนติเมตร)

ข: แคลลัสเมื่อย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และเคซีนไฮโดรไลเซท 1 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ = 2 มิลลิเมตร)

ผลและวิจารณ์

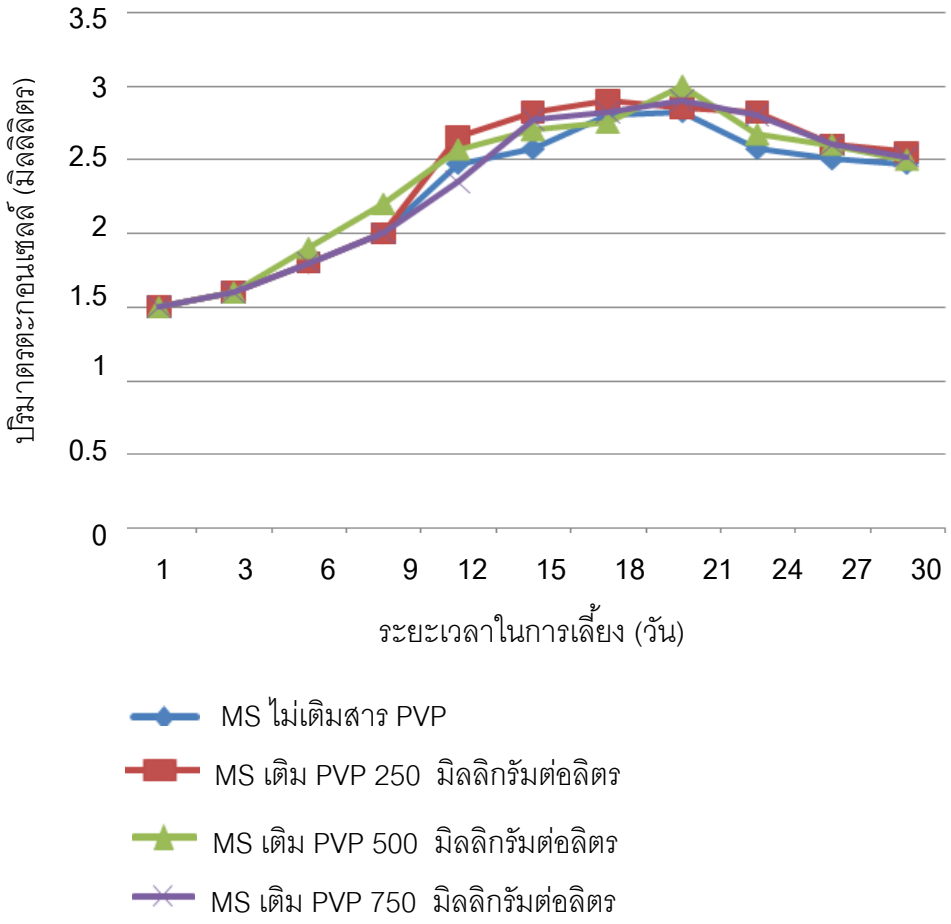
แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 1 กรัมต่อลิตร และเติมสาร PVP ความเข้มข้น 4 ระดับ 0 250 500 750 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 27±2 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีแสง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ทุกความเข้มข้นของสาร PVP สามารถลดการสร้างสารประกอบฟีโนลได้ เซลล์มีการสร้างสีน้ำตาลลดลง (ตารางที่ 2.6) รวมทั้งอาหารที่เพาะเลี้ยงก็มีสีน้ำตาลลดลงด้วยเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 2.14) เซลล์ที่เลี้ยงบางเซลล์ในเซลล์ซัสเพนชั่นซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ไม่เติมสาร PVP มีลักษณะเป็นสีน้ำตาล และอาหารก็เริ่มขุ่นหลังจากวางเลี้ยง 3 สัปดาห์ สูตรอาหารเหลวที่ เติมสาร PVP 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เซลล์ที่มีลักษณะเป็นเซลล์

เดี่ยวๆ สีเหลืองอ่อน ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 2.64 มิลลิลิตร ในสูตรอาหารเหลวที่ เติม PVP 700 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เซลล์มีลักษณะเกาะกันเป็นก้อน และรองลงมาคือสูตรอาหารที่ไม่เติม PVP ให้สร้างแคลลัสน้อยที่สุด 2.52 มิลลิลิตร ระยะเวลาการเพิ่มจำนวนของเซลล์ข้าวหอมกระดังงาที่เพาะเลี้ยงในอาหารทุกสูตรที่ได้จากการศึกษานี้พบว่า ระยะ log phase อยู่ในช่วงวันที่ 6 ถึงวันที่ 12 (ภาพที่ 2.13)

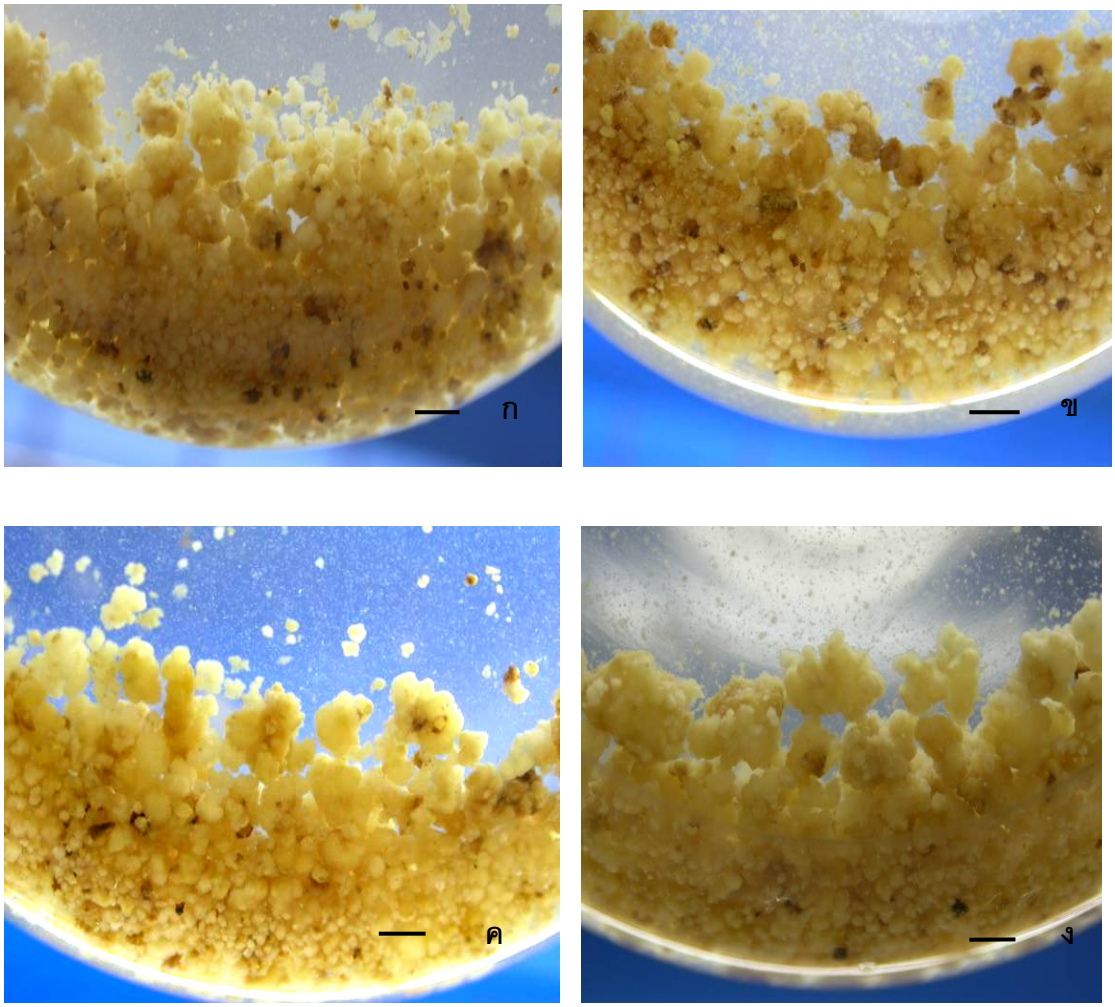
ตารางที่ 2.5 การชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นจากแคลลัสของข้าวหอมกระดังงาที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร KN 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 1 กรัมต่อลิตร และPVP ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน

PVP (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	สีของอาหาร	ปริมาตรตะกอนเซลล์ (มิลลิลิตร)
Control	ร่วน	เหลืองอ่อน	2.52
250	ร่วน	เหลืองอ่อน	2.64
500	ร่วน	เหลืองอ่อน	2.59
750	ร่วนและเกาะกันแน่น	เหลืองอ่อน	2.59
F-test			ns
C.V. (%)			10.93

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



ภาพที่ 2.12 การเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 1 กรัมต่อลิตร และ PVP ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 2.13 การชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นของแคลลัสข้าวหอมกระดังงาวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 1 กรัมต่อลิตร และ PVP ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ (บาร์= 2 มิลลิเมตร)

ก: Control ไม่เติมสาร PVP

ข: PVP 250 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค: PVP 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง: PVP 750 มิลลิกรัมต่อลิตร

ผลและวิจารณ์

เซลล์ซัสเพนชั่นชักนำได้โดยการย้ายแคลลัสประเภท friable ที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงส่วนต่างๆ ของพืชไปเลี้ยงในอาหารเหลวใหม่สูตรเดิม แล้วย้ายเลี้ยงเป็นช่วงระยะเวลาที่แน่นอน (สมปอง, 2539) เซลล์ซัสเพนชั่นเมื่อเขย่าเลี้ยงได้ประมาณ 2-3 สัปดาห์ จะได้เซลล์ซัสเพนชั่นซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์เดี่ยว กลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก และกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่รวมกันอยู่ ในการศึกษานี้นำแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 1 กรัมต่อลิตร ย้ายไปเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารเหลวสูตรเดิม และเติมสาร PVP ทุกความเข้มข้นสามารถลดการสร้างสารประกอบฟีโนลได้ เซลล์มีการสร้างสีน้ำตาลลดลง รวมทั้งอาหารที่เพาะเลี้ยงมีสีน้ำตาลลดลงด้วยเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 2.14) เซลล์ที่เลี้ยงบางเซลล์ในซัสเพนชั่นซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ไม่เติมสาร PVP มีลักษณะเป็นสีน้ำตาล และอาหารเริ่มขุ่นหลังจากวางเลี้ยง 3 สัปดาห์ โดยอาหารเหลวที่ เติมสาร PVP 250 มิลลิกรัมต่อลิตรให้เซลล์ที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ สีเหลืองอ่อนให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 2.64 มิลลิลิตร สอดคล้องกับงานวิจัยของ กรมวิชาการเกษตร (2551) รายงานการชักนำแคลลัสของปาล์มน้ำมันโดยการเติมสารยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นว่า PVP 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าเฉลี่ยการสร้างแคลลัสสูงถึง71.30 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดการเกิดสารประกอบฟีนอลที่ปล่อยออกมาจากชิ้นส่วนพืช ซึ่งมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ปาล์มน้ำมันที่เพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม การเติม PVP ความเข้มข้นสูง 700 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เซลล์ที่เกาะกันมากมีลักษณะเป็นก้อนขนาดใหญ่ และระยะเวลาการเพิ่มจำนวนของเซลล์ข้าวหอมกระดังงาที่เพาะเลี้ยงในอาหารทุกสูตรที่ได้จากการศึกษานี้ พบว่า ระยะ log phase อยู่ในช่วงวันที่ 6 ถึงวันที่ 12 เมื่อนำเซลล์ซัสเพนชั่นไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า ไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ อาจเป็นไปได้ว่าสูตรอาหารดังกล่าวเป็นสูตรอาหารที่ไม่เหมาะสมที่จะชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ได้

สรุป

เซลล์ซัสเพนชั่นที่ชักนำในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 1 กรัมต่อลิตร และเติมสาร PVP ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์เฉลี่ยสูงสุด 2.64 มิลลิลิตร มีระยะ log phase อยู่ในช่วงวันที่ 6 ถึงวันที่ 12

การทดลองที่ 5

การอนุรักษ์พันธุกรรมโดยการชะลอการเจริญเติบโตของยอดรวมข้าวหอมกระดังงา

บทนำ

ปัจจุบันพืชหลายชนิดที่มีอยู่ตามธรรมชาติได้สูญพันธุ์ไป บางชนิดกำลังจะสูญพันธุ์หรือมีปริมาณลดลง และจะขาดแคลนในอนาคต เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมหรือเกิดจากการทำลายของมนุษย์เอง จึงมีความจำเป็นต้องมีการเก็บรักษาพันธุ์พืช โดยทั่วไปมักเก็บรักษาไว้ในรูปของเมล็ดพันธุ์ ซึ่งมีข้อจำกัดคือ ต้องปลูกพืชอย่างต่อเนื่องเพื่อสร้างเมล็ดที่ยังคงความมีชีวิต เมื่อนำมาเก็บรักษาไว้ในระยะเวลานาน อีกทั้งเมล็ดของพืชบางชนิดมีอายุสั้น และติดเมล็ดน้อยหรือไม่ติดเมล็ด เพื่อลดข้อจำกัดของวิธีการใช้เมล็ดในการเก็บรักษาพันธุ์พืช จึงได้นำวิธีการเก็บรักษาพันธุ์พืชในสภาพการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองมาใช้ เพราะสามารถเก็บรักษาได้ในหลายลักษณะของชิ้นส่วนพืช เช่น เมล็ด ยอด ราก เอ็มบริโอ แคลลัส และเซลล์ไร้ผนัง และสามารถคงความมีชีวิตไว้ได้เป็นระยะยาว เช่น การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส และอีกวิธีหนึ่ง คือ การปรับสภาพของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้มีส่วนผสมของสารชะลอการเจริญเติบโตบางชนิด และมีสารทำให้เกิดความเครียดของน้ำภายในเซลล์พืชที่อยู่ในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เซลล์พืชมีการเจริญเติบโตในอัตราที่ช้ามากๆ เพื่อเป็นการประหยัดแรงงาน เวลา และอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการย้ายเลี้ยงบ่อยๆ การเก็บรักษาพันธุ์พืชโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีประโยชน์คือ ใช้พื้นที่เก็บรักษาน้อย พืชที่เก็บรักษาปลอดภัยจากแมลง และเชื้อโรค ไม่ต้องย้ายเลี้ยงบ่อย เนื่องจากถูกจำกัดการเจริญเติบโต สามารถเพิ่มปริมาณได้เมื่อต้องการ และสะดวกในการขนส่งหรือแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพืช (เปรมฤดี, 2557; บุญยืน, 2554)

การเก็บรักษาพันธุ์พืชในระยะสั้น

การเก็บรักษาพันธุ์พืชในระยะสั้น ปานกลาง หรือด้วยวิธีชะลอการเจริญเติบโตทำได้หลายวิธีตามรายงานของ รังสฤษฎ์ (2545) อ้างโดย เปรมฤดี (2557) ได้แก่การลดอุณหภูมิ (reduce temperature) โดยการลดอุณหภูมิที่เลี้ยงเนื้อเยื่อลง 5-20 องศาเซลเซียสตรวจดูการเจริญเติบโต และเปลี่ยนอาหารหลังเก็บรักษาไว้ 1-2 ปี การลดปริมาณสารอาหารโดยลดความเข้มข้นของสารอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงลงครึ่งหนึ่ง หรือหนึ่งในสี่ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของพืช การลดความเป็นประโยชน์ของน้ำ โดยการใช้สารยับยั้งกระบวนการออสโมซิสชะลอการเจริญเติบโตซึ่งเหมาะกับการเก็บรักษายอด เช่น การใช้แมนนิทอลจะทำให้การดูดซึมธาตุอาหารต่างๆ ของพืชลดลง

นอกจากนี้อาจใช้สารชะลอการเจริญเติบโต เช่น การใช้ไซโคลเซล กรดแอบไซซิค พาโคลบิวทราโซล สารดังกล่าวช่วยในการลดการหายใจของพืช ส่งผลให้พืชเจริญเติบโตช้า การเก็บอนุรักษ์โดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้าช่วยสามารถอนุรักษ์พันธุ์ได้ตั้งแต่ระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ และต้นอ่อนโดยเก็บ และเลี้ยงไว้ในหลอดแก้ว วิธีนี้นิยมใช้กันมากเนื่องจากใช้พื้นที่แรงงาน และการดูแลรักษาน้อย ลดการเสี่ยงอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศการทำลายของศัตรูพืชและการดูแลรักษาที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้ยังสะดวกในการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์พืชระหว่างประเทศ เนื่องจากมีขนาดเล็กสะดวกในการขนส่ง และปลอดศัตรูพืช (กิ่งกาญจน์ และคณะ, 2547)

วิธีการ

นำต้นข้าวหอมกระดังงาในอาหารเหลว MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากการทดลองที่ 3 (ภาพที่ 2.15) ที่วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า มาแยกเป็นยอดเดี่ยว ๆ ลอกกาบใบแก่ออก ตัดแยกเฉพาะปลายยอด 1-2 วางเลี้ยงบนอาหารแข็ง สูตร ½ MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ หรือเติม PBZ เข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 14 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน บันทึกอัตราการสร้างยอดรวม จำนวนใบ ความสูงของยอดรวมโดยวัดจากโคนต้นไปถึงปลายใบที่สูงที่สุด เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ PBZ และน้ำตาลซอร์บิทอลโดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละความเข้มข้นของ PBZ และน้ำตาลซอร์บิทอล ทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 4 ขวด แต่ละขวดเพาะเลี้ยง 1 ยอด

ภาพที่ 2.14 ต้นข้าวหอมกระดังงาที่วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ในอาหารเลี้ยงสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ผลและวิจารณ์

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมข้าวในระยะสั้น โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารชะลอการเจริญเติบโตของข้าวหอมกระดังงา พบว่า หลังวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ½MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถชะลอการเจริญเติบโตดีที่สุดในเวลา 30 วัน ให้ความยาวยอด 1.07 เซนติเมตร จำนวนยอด 2 ยอด ซึ่งให้ผลที่ต่ำกว่าชุดควบคุม (ความยาวยอด 1.33 เซนติเมตร) จำนวนใบเฉลี่ย 1.62 ใบ รองลงมาน้ำตาลซอร์บิทอล ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ให้ความยาวยอด 1.25 เซนติเมตร จำนวนยอดเฉลี่ย 1.25 ยอด/ชิ้นส่วน และจำนวนใบเฉลี่ย 2.50 ใบ ส่วนสาร PBZ ทุกความเข้มข้นให้ผลชะลอการเจริญเติบโตที่มากกว่าทรีตเมนต์อื่นๆ (ตารางที่ 2.7 และ ภาพที่ 2.15) และลักษณะของใบมีขนาดเล็กสีเขียวเข้ม สั้น และหนา

หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน บนอาหารแข็งสูตร ½MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดควบคุม) ให้ผลดีที่สุด อัตราการรอดของชิ้นส่วน 100 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนยอด 3 ยอด ให้ความยาวยอดน้อยที่สุด 0.73 เซนติเมตร จำนวนใบ 4.25 ใบ (ภาพที่ 2.16) ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ วรรณดา และคณะ (2552) อนุรักษ์พันธุ์หอมน้ำ โดยนำเนื้อเยื่อส่วนหัวเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2 MS และอาหาร MS พบว่า อาหาร ½ MS มีผลชักนำให้เกิดหัว

ย่อยได้มากกว่าการใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS โดยมีจำนวนหัวย่อยเฉลี่ย 3.0±0.22 หัว ชิ้นเนื้อเยื่อมีลักษณะปกติ และพบว่าอาหาร ½ MS salt เติม mannitol ระดับความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดสูงสุด 90 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของข้าวหอมกระดังงา รองลงมาเป็นน้ำตาลซอร์บิทอล ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ อัตราการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ ให้ความยาวยอด 0.77 เซนติเมตร ให้จำนวนยอด 3.25 ยอด/ชิ้นส่วน และตามด้วยน้ำตาลซอร์บิทอล ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ อัตราการรอดชีวิต 75 เปอร์เซ็นต์ ให้ความยาวยอด 1.75 เซนติเมตร ให้จำนวนยอด 5 ยอด ส่วน PBZ ทุกความเข้มข้นให้ผลชะลอการเจริญเติบโตที่มากกว่าทรีตเมนต์อื่นๆ แต่ให้อัตราการรอดชีวิตสูงกว่าทุกๆ ความเข้มข้นของซอร์บิทอลถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดมากที่สุด จากการทดลองนี้ ชุดควบคุมให้ผลดีที่สุด สามารถชะลอการเจริญเติบโตได้ดี มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตถึง 100% (ตารางที่ 2.8) ที่เป็นเช่นนี้ อาจเป็นไปได้ว่า การลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง พืชจะนำธาตุอาหารไปใช้น้อยกว่าปกติทำให้พืชสามารถชะลอการเจริญเติบได้ อย่างไรก็ตาม ทุกความเข้มข้นของ PBZ และน้ำตาลซอร์บิทอลไม่สามารถชะลอการเจริญเติบโตได้ดีเท่าที่ควร ดังนั้นการชะลอการเจริญเติบโตของข้าวหอมพันธุ์กระดังงาในอาหารแข็งสูตรชุดควบคุมมีความเหมาะสมในการชะลอการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด

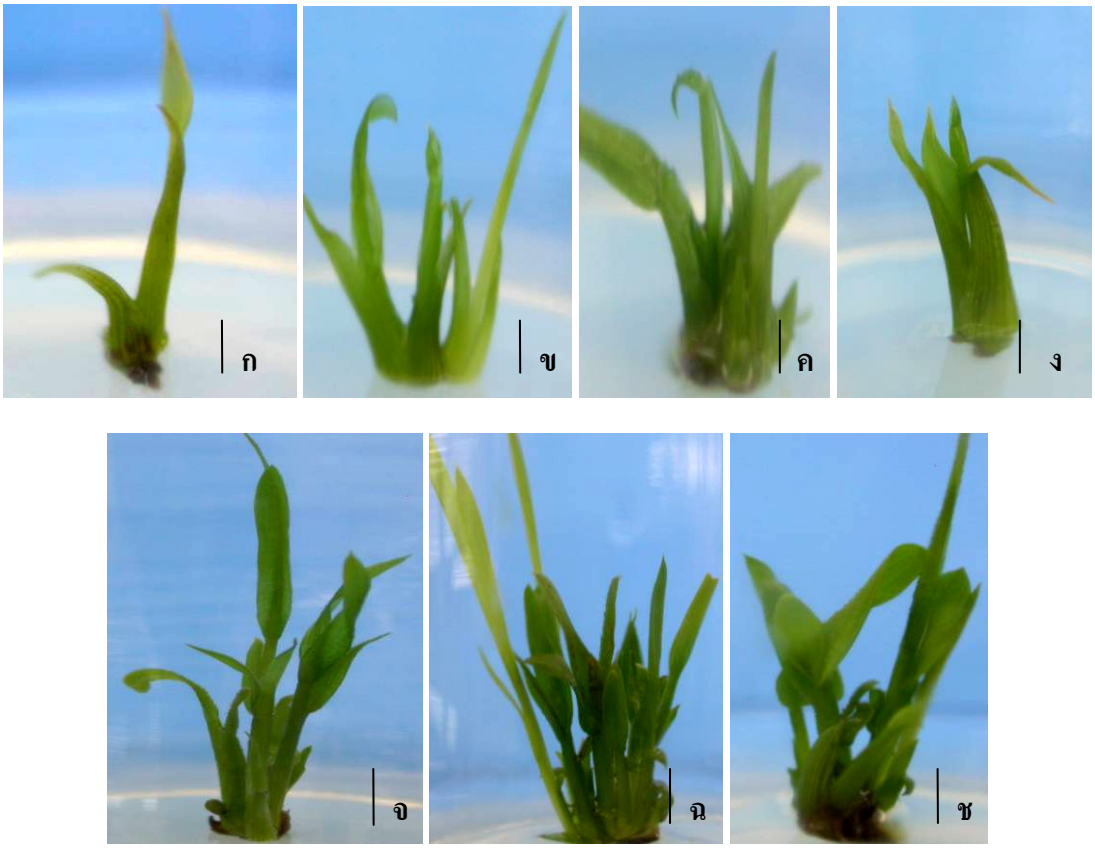
ตารางที่ 2.6 ผลของสารชะลอการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารสูตร MS ต่ออัตราการรอดชีวิตของชิ้น ส่วน จำนวนยอด ความยาวยอด และจำนวนใบหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน

สูตรอาหาร	อัตราการรอดของชิ้นส่วน (%)	ความยาวยอด (ซม)	จำนวนใบ/ยอด	จำนวนยอด/ชิ้นส่วน
½ MS +BA 1 มก/ล	100	1.33	2.00	1.00 c
½ MS+ BA 1 มก/ล+ Sor (1%)	100	1.38	2.50	2.00 bc
½ MS+ BA 1 มก/ล+ Sor (3%)	100	1.07	1.62	2.00 bc
½ MS+ BA 1 มก/ล+ Sor (5%)	100	1.25	2.50	1.25 c
½ MS+ BA 1 มก/ล+ PBZ (1 มก/ล)	100	1.91	1.61	4.50 ab
½ MS+ BA 1 มก/ล+ PBZ (3 มก/ล)	100	1.70	2.30	5.75 a
½ MS+ BA 1 มก/ล+ PBZ (5 มก/ล)	100	1.64	2.45	4.25 ab
F-test		ns	ns	*
C.V. (%)		39.83	33.11	56.66

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.15 ลักษณะต้นข้าวหอมกระดังงาที่ผ่านการชะลอการเจริญเติบโตเป็นเวลา 30 วัน (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

ก: ยอดข้าวบนอาหารสูตร ½ MS

ข: ยอดข้าวบนอาหารสูตร ½ MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ค: ยอดข้าวบนอาหารสูตร ½ MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์

ง: ยอดข้าวบนอาหารสูตร ½ MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอลเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

จ: ยอดข้าวบนอาหารสูตร ½ MS เติม PBZ เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ฉ: ยอดข้าวบนอาหารสูตร ½ MS เติม PBZ เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ช: ยอดข้าวบนอาหารสูตร ½ MS เติม PBZ เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

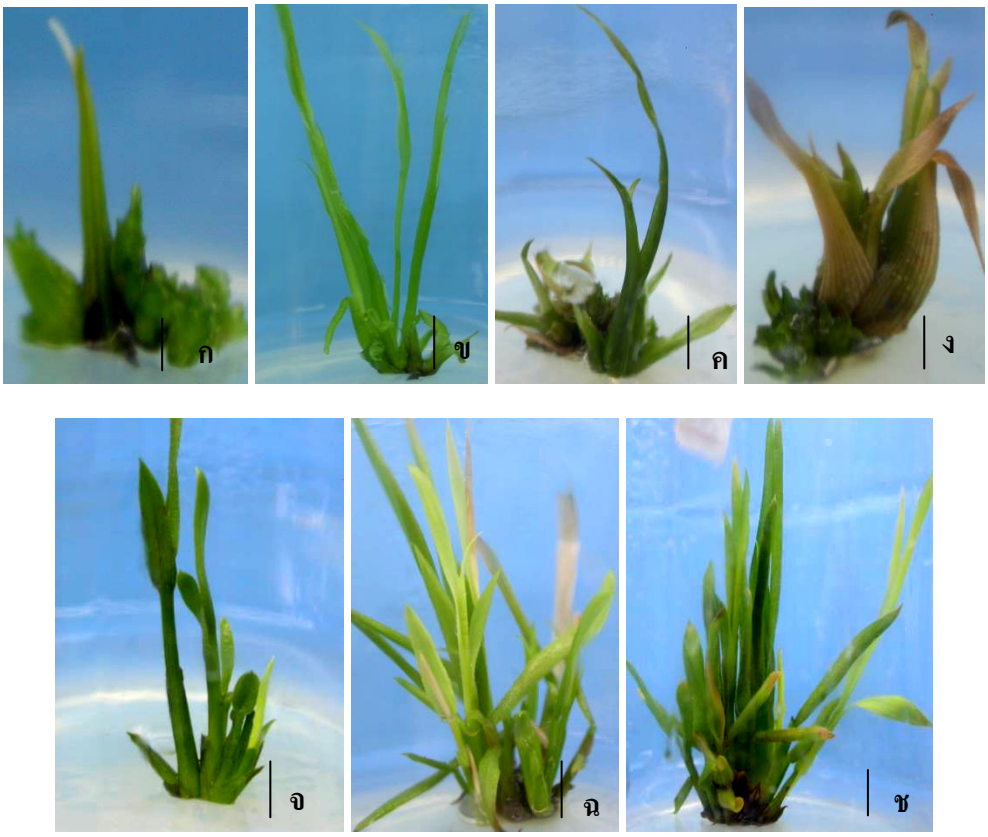
ตารางที่ 2.7 ผลของสารชะลอการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารสูตร MS ต่ออัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วน จำนวนยอด ความยาวยอด และจำนวนใบหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 60 วัน

สูตรอาหาร	อัตราการรอดของชิ้นส่วน (%)	ความสูงยอด(ซม)	จำนวนใบ/ยอด	จำนวนยอด/ชิ้นส่วน
½ MS+ BA 1 มก/ล	100	0.73 a	4.25 b	3.00 b
½ MS+ BA 1 มก/ล+ Sor (1%)	75	1.75 ab	7.75 ab	5.00 ab
½ MS+ BA 1 มก/ล+ Sor (3%)	25	1.04 ab	4.75 b	3.50 b
½ MS+ BA 1 มก/ล+ Sor (5%)	50	0.77 a	3.75 b	3.25 b
½ MS+ BA 1 มก/ล+ PBZ (1 มก/ล)	100	2.23 ab	14.25 ab	7.50 b
½ MS+ BA 1 มก/ล+ PBZ (3 มก/ล)	100	2.18 ab	21.00 a	8.50 a
½ MS+ BA 1 มก/ล+ PBZ (5 มก/ล)	100	2.41 b	18.25 a	7.50 ab
F-test		**	**	*
C.V. (%)		43.71	59.20	58.79

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.16 ลักษณะต้นข้าวหอมกระดังงาผ่านการชะลอการเจริญเติบโตเป็นเวลา 60 วัน (บาร์= 5 มิลลิเมตร)

ก: ยอดข้าวบนอาหารสูตร ½ MS (control)

ข: ยอดข้าวบนอาหารสูตร ½ MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ค: ยอดข้าวบนอาหารสูตร ½ MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์

ง: ลักษณะยอดข้าวเล็กๆที่พัฒนาบนอาหารสูตร ½ MS เติมน้ำตาลซอร์บิทอล เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

จ: ยอดข้าวบนอาหารสูตร ½ MS เติม PBZ เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ฉ: ลักษณะยอดข้าวที่เพิ่มขึ้นบนอาหารสูตร ½ MS เติม PBZ เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ช: ยอดข้าวบนอาหารสูตร ½ MS เติม PBZ เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สรุป

การชะลอการเจริญเติบโตของข้าวหอมกระดังงาเป็นไปได้ดีที่สุด หลังเก็บรักษาในอาหารแข็งสูตร ½ MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60 วัน โดยมีความยาวยอดน้อยที่สุด 0.73 เซนติเมตร อัตราการรอดของชิ้นส่วนเฉลี่ย 100 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนยอดรวมเฉลี่ย 3.00 ยอด จำนวนใบเฉลี่ย 4.25 ใบ

บทที่ 3

สรุป

สรุป

อาหารแข็งสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ชักนำแคลลัสได้สูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ ขนาดแคลลัสเฉลี่ย 0.98 เซนติเมตร เกิดจุดสีเขียว 7.31 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสมีลักษณะสีเหลืองเกาะกันแน่น (compact callus) หลังวางเลี้ยง 4 สัปดาห์

การชักนำแคลลัสจากใบอ่อนข้าวหอมกระดังงาบนอาหารแข็ง MS เติมไดแคมบา ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงระยะเวลา 30 วัน พบว่า ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส 13.33 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ชักนำได้มีลักษณะร่วน และมีจุดสีเขียวสามารถพัฒนาเป็นต้นได้

จากการทดลองเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารคลอรีนไดออกไซด์ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงภายใต้ระบบไบโอรีแอคเตอร์ พบว่า คลอรีนไดออกไซด์ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มยอดรวมสูงสุด 11 ยอด จำนวนใบ 2.20 ใบต่อยอดที่เพาะเลี้ยง ความสูงของยอดเฉลี่ย 9.35 เซนติเมตร หลังเพาะเลี้ยง 30 วัน ทุกความเข้มข้นของคลอรีนไดออกไซด์ ไม่มีการปนเปื้อนในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงยอดอ่อน หลังจากย้ายต้นกล้าออกสู่สภาพธรรมชาติให้อัตราการรอดชีวิตถึง 100 เปอร์เซ็นต์

การเพาะเลี้ยงปลายยอดในสภาพเขย่าเลี้ยง ในอาหารเหลว MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ชักนำยอดรวมได้สูงถึง 21.25 ยอดที่เพาะเลี้ยง จำนวนใบ 20.45 ใบ หลังวางเลี้ยง 4 สัปดาห์

เซลล์ซัสเพนชั่นที่ชักนำในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซท 1 กรัมต่อลิตร และเติมสาร PVP ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัม

ต่อลิตร ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์เฉลี่ยสูงสุด 2.64 มิลลิลิตร มีระยะ log phase อยู่ในช่วงวันที่ 6 ถึงวันที่ 12

การชะลอการเจริญเติบโตของข้าวหอมกระดังงาเป็นไปได้ดีที่สุด หลังเก็บรักษาในอาหารแข็งสูตร ½ MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60 วัน โดยมีความยาวยอดน้อยที่สุด 0.73 เซนติเมตร อัตราการรอดของชิ้นส่วนเฉลี่ย 100 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนยอดรวมเฉลี่ย 3.00 ยอด จำนวนใบเฉลี่ย 4.25 ใบ

เอกสารอ้างอิง

กิ่งกาญจน์ พิชญกุล, สมทรง โชติชื่น และปาริฉัตร สังข์สะอาด. 2548. ศึกษาเทคโนโลยีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กล้วยไม้ดิน *Spathoglottis*. เข้าถึงได้จาก http://www.doa.go.th/biotech/pdf-ktk/ktk(25).pdf [เข้าถึงเมื่อ 20/11/57].

กรมการข้าวกระทวงเกษตรและสหกรณ์. 2557. เข้าถึงได้จาก http://www.ricethailand.go.th/home/index.php?option...id [เข้าถึงเมื่อ 24/1/57].

กรมวิชาการเกษตร. 2551. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน.เข้าถึงได้จาก http://www.lib.doa.go.th [เข้าถึงเมื่อ 24/1/57].

กมลพร ปานง่อม, วรรณา มังกิตะ และสุคนทิพย์ บุญวงศ์. 2552. รายงานผลการวิจัย เรื่องการขยายพันธุ์ฮ่อม (*Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze) ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เข้าถึงได้จาก http://www.librae.mju.ac.th/wtms_document.aspx?bID=385 [เข้าถึงเมื่อ 23/12/57].

จันทร์วิภา บุญอินทร์, ประภา ศรีพิจิตต์, สนธิชัย จันทร์เปรม, และศาลักษณ์ พรรณศิริ. 2557. การเพาะเลี้ยยงอับละอองเกสรของขาวหอม (*Oryza sativa* L.)ลูกผสมชั่วที่ 1และลูกชั่วที่ 2 เพื่อการผลิตต้น doubled haploid ที่มีลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสง. เข้าถึงได้จาก http://kucon.lib.ku. ac.th/FullText/KC4301008.pdf [เข้าถึงเมื่อ 23/12/57].

จิระศักดิ์ วิชาสวัสดิ์, ศิริชัย อุ่นศรีส่ง, ประสาทพร กออวยชัย และปณิดา กันถาด. 2555. รายงานผลการวิจัยเรื่องการศึกษาขบวนการออร์แกโนเจเนซีสของปาล์มน้ำมันในสภาพปลอดเชื้อ. เข้าถึงได้จาก http://www.librae.mju.ac.th/wtms_document_download.aspx?id=MTA5NjM [เข้าถึงเมื่อ 25/12/57].

จิระศักดิ์ วิชาสวัสดิ์, ศิริชัย อุ่นศรีส่ง, ประสาทพร กออวยชัย, สมพร มีแสงแก้ว และ ปณิดา กันถาด. 2553. รายงานผลการวิจัย เรื่องการเกิดโซมาติคเอ็มบริโอของปาล์ม น้ำมันพันธุ์การค้าในสภาพปลอดเชื้อ เข้าถึงได้จาก http://librae.mju.ac.th/goverment/20111119104834_librae/7573.pdf [เมื่อ 25/12/57].

ชยานิจ ดิษฐบรรจง, กษิดิศ ดิษฐบรรจง, อมรรัตน์ วงศ์ศรี และอรุณี ใจเถิง. 2551. การชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนต่างๆ ของปาล์มน้ำมัน. บทคัดย่อ รายงานผลงานวิจัยและพัฒนาด้านพืชและเทคโนโลยีการเกษตร. การทดลองปีงบประมาณ 2551. หน้า 159-162.

ช่อแก้ว อนิลบล, ปรเมศ บรรเทิง, จิรวัฒน์ สนิทชน และ พัชริน ส่งศรี. 2554. การศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินในข้าวเหนียวดำโดยใช้วิธี HPLC และ spectrophotometric. ว. แก่นเกษตร 39: 353-357.

นิธิศ แสงอรุณ, ราตรี รัตนสำเนียง, บุญนะ หนูคง, จรัญ ทับทิมทอง, กัณธิกานต์ ปลอดปล้อง, จรูญ ศรีสุวรรณ, สำเริง แซ่ตัน, ขวัญใจ คชภักดี, รุจิรา ปรีชา, ชนสิริน กลิ่นมณี, สุเทพ ฤทธิ์แสวง, รชนิศ พานิชกิจ, สายัณห์ หนูเอก, วัฒนา โพธิ์ศิริ, กัญญา เชื้อพันธ์, สุนันทา วงศ์ปิยชน และ เกรียงไกร พันธุ์วรรณ์. 2554. พันธุ์ข้าวยอดนิยมชายแดนใต้ ซีบูกันตัง(PTNC09001) หอมกระดังงา(PTNC09002-59) ช่อลุง(PTNC99024-97). เข้าถึงได้จาก http://www.anchan.lib.ku.ac.th/agnet/bitstream/001/2954/1/brrd53002001c.p [เข้าถึงเมื่อ 23/12/57].

บุญยืน กิจวิจารณ์. 2554. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. ขอนแก่น: คลังนานาวิทยา.

ประพาส วีระแพทย์. 2531. ข้าวเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว. เข้าถึงได้จาก http://www. Kasetloongkim [เข้าถึงเมื่อ 17/10/54].

ประมินทร์ หะยะมิน. 2552. การสร้างเครื่องตำข้าวซ้อมมือ. ว. มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ 1: 3-3.

เปรมฤดี ดำยศ. 2557. การขยายพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุกรรมกระจูด [*Lepironia articulate* (Retz.) Domin] ในพื้นที่ชุมมน้ำพรุควนเล็ง จังหวัดนครศรีธรรมราช. วิทยานิพนธ์ ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาการจัดการทรัพยากรทะเลและชายฝั่งมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พัชราภรณ์ รัตนธรรม, ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์ และ อรพิน เกิดชูชื่น. 2556. สารประกอบฟีนอลิก แอนโทไซยานิน และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของข้าวกล้องสีงอก. ว. เกษตรศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์ 44: 441-444.

พันนิภา ยาใจ และ นพดล สมนา. 2554. การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูข้าวเพื่อสร้างสายพันธุ์แท้ให้ต้านทานแมลงบั่ว. สัมมนาวิชาการกลุ่มศูนย์วิจัยข้าวภาคเหนือตอนบนและภาคเหนือตอนล่าง เข้าถึงได้จากhttp.//www.brrd.in.th/main/images/stories/northconference/fulltext3.pdf. [เข้าถึงเมื่อ 23/12/57].

เมธินี ศรีวัฒนกุล และจารุวรรณ จาติเสถียร. 2556. การพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวพันธุ์รับรองโดยใช้ระบบเพาะเลี้ยงยอดอ่อน. เข้าถึงได้จาก http://www. doa.go.th [เข้าถึงเมื่อ 24/4/56].

เยาวมาลย์ น้อยใหม่. 2555. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวลูกผสมพันธุ์ฉลองขวัญ. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

รังสิต เส็งหะพันธุ์, กาญจนา กล้าแข็ง, พรรณณี รอดแรงบุญ, เบญจมาศ ศิลาย้อย, เลิศลักษณ์ เงินศิริ, สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, เผดิม ระติสุนทร และประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2537. การชักนำให้เกิดการกลายในข้าวโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตอนที่ 1. ว. เกษตรศาสตร์ (สาขาวิทยาศาสตร์) 28: 381-389.

รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. 2545. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: หลักการและเทคนิค. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รังสิมา อัมพวัน, นพมณี โทปุญญานนท์, ชุติมา คงจรูญ และพาวิน มะโนชัย. 2548. การปรับเปลี่ยนระบบการพัฒนาพันธุ์และการขยายพันธุ์ลำไยโดยการใช้เทคโนโลยีขั้นสูง. รายงานผลงานวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปี 2540-2541 หน้า 1-53.

รุ่งอรุณ สมแก้ว, ยุพา ปานแก้ว, ลดาวัลย์ พวงจิตร และสมบัติ โคกกระเทียม. 2553. การผลิตกล้ายูคาลิปตัสคามาลดูเลนซี ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยระบบ Temporary Immersion แบบขวดคู่. เข้าถึงได้จาก http://kucon.lib.ku.ac.th/Fulltext/KC4801064.pdf [เข้าถึงเมื่อ 23/12/57].

วุฒิชัย ศรีช่วย และสมปอง เตชะโต. 2557. ผลของคลอรีนไดออกไซด์ต่อการทำให้ปลอดเชื้อในการเพาะเลี้ยงสับปะรดภูแลด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์. ว. แก่นเกษตร 3: 75-80.

วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย, กาญจนรี พงษ์ฉวี และรัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์. 2557. การเก็บรักษาพันธุ์หอมน้ำ*Crinum thaianum* Schulzeในสภาพปลอดเชื้อ เข้าถึงได้จาก http://www.fisheries.go.th/aquaorna/web2/images/download/concrinum.pdf [เข้าถึงเมื่อ 17/10/57].

ศิรินธร คงประพฤติ. 2551. ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำแคลลัส การเจริญของยอด และการออกดอกของกุหลาบพันธุ์มายวาเลนไทน์ในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร. 2557. กล้วยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. เข้าถึงได้จาก http://www.aopdt01.doae.go.th/KMgo.th [เข้าถึงเมื่อ 28/1/57].

สมปอง เตชะโต. 2539. บทปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. สงขลา : ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เผดิม ระติสุนทร, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, เลิศลักษณ์ เงินศิริ และพรรณณี รอดแรงบุญ. 2537. การเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในสภาพปลอดเชื้อ. ว. เกษตรศาสตร์ (สาขาวิทยาศาสตร์) 28: 92-98.

สุลักษณ์ แจ่มจำรัส, สนธิชัย จันทร์เปรม, รงรอง หอมหวล, มณฑา วงศ์มณีโรจน์, และรัตนา เอการัมย์. 2556. การใช้สารไคโตซาน ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวหอมมะลิ 105. การประชุมวิชาการแห่งชาติครั้งที่ 9 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน 6 - 7 ธันวาคม 2555 หน้า 2189-2197.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม, รัญญิการ์ โปราหา, ราริ ช้อนทอง, อรสา จันทิมา, และทอง พงษ์เจริญกิต. 2556. การชักนำแคลลัสและการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวเหนียวสายพันธุ์ขาวโป่งไคร้. การประชุมวิชาการแห่งชาติครั้งที่ 9 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน 6-7 ธันวาคม 2556 หน้า 2182-2188.

Ali, S., Zhong, X. Q. and Yin, Z. X. 2004. Assessment of various factors involved in the tissue culture system of rice. Rice Science 11: 345-349.

Cardoso, J.C. and Silva, J. A.T. 2012. Micropropagation of gerbera using chlorine dioxide (ClO_2) to sterilize the culture medium. Journal *In Vitro* Cellular and Developmental Biology - Plant 48: 362–368.

Chantanumat, P. and Kasinkasaempong, Y. 2008. Used temporary immersion bioreactor for robusta coffee propagation via somatic embryogenesis method. Agricultural Sciences Journal 39: 353-356.

Chae, S. C. 2013. Influence of carbon sources on shoot organogenesis in *Echinacea angustifolia* DC. Life Science Journal 10: 3.

Chehmalee, S. and Te-chato, S. 2008. Induction of somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured zygotic embryo of oil palm. Journal of Agricultural Technology 4: 137-146.

Ekhlas , A . M. 2014. Effect of sucrose and glucose concentrations on micropropagation of *Musa* sp. cv. Grand naine. Journal of Applied and Industrial Sciences 2: 58-62.

Kongbangkerd, A. and Yanaphan, W. 2005. Effects of light sucrose and plant growth retardants on *in vitro* microrhizome induction of *Curcuma longa* L. Journal of Nursing Science 2: 73 – 86.

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.

Mallick, S. R., Gautam, D. and Rout, G. R. 2013. *In vitro* somatic embryogenesis of high yielding varieties of rice (*Oryza sativa* L.). African Journal of Biotechnology 12: 6113-6118.

Mannan, M. A., Sarker, T. C., Akhter, M. T., Kabir, A. H. and Alam, M. F. 2013. Indirect plant regeneration in aromatic rice (*Oryza sativa* L.) var Kalijira and Chinigura. Acta Agriculture Slovenica 101: 231–238.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. Arevised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Rahman, Z. A., Roowi, S., Zaliha, w. w. s. and Subramaniam, S. 2010. Regeneration of malaysian indica rice (*Oryza sativa*) variety mr232 via optimised somatic embryogenesis system. Journal of Phytology 3: 30-38.

Revathi, S. and Arumugam, P. M. 2011. *In vitro* callus induction in rice *Oryza sativa* L. Plant Biology 1: 13-15.

Scherer, R.F., Garcia, A. C., Fraga, H. P.D. F., Vesco, L. L.D., Steinmacher, D. A. and Guerra, M. P. 2013. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a highperformance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). Scientia Horticulturae 151: 38–45.

Sompornpailin, K. and Chutipaijit, S. 2012. Enhancement of plant regeneration efficiency from mature grains of thai *indica* rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML105). Pakistan Journal of Botany 44: 1385-1390.

Zhang, Y.X. and Te-chato, S. 2012. Callus induction and plantlet regeneration from mature embryos of *indica* rice (*Oryza sativa* L.) cultivar Hom Kra Dang Ngah. Journal of Agricultural Technogy 8: 24-23.

Zuraida, A. R., Naziah, B., Zamri, Z. and Sreeramanan, S. 2011. Efficient plant regeneration of Malaysian *indica* rice MR 219 and 232 via somatic embryogenesis system. Acta Physiology Plant Journal 33: 1913–192.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1. องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS)

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร(มิลลิกรัมต่อลิตร)
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	1,650.000
KNO_3	1,900.000
KH_2PO_4	170.000
$CaCl_2.2H_2O$	440.000
$MgSO_4.7H_2O$	370.000
ธาตุอาหารรอง	
KI	0.830
H_3BO_3	6.200
$MnSO_4.H_2O$	16.900
$ZnSO_4.7H_2O$	10.600
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.250
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	27.800
Na_2EDTA	37.300
สารอินทรีย์	
Myo-inositol	100.000
Nicotinic acid	0.500
Pyridoxine HCl	0.500
Thaiamine HCl	0.100
Glycine	2.000
Sucrose	30,000.00
วุ้น	7,500.00
pH	5.7

ผลงานตีพิมพ์

ผลของซูโครสและไดแคมบาต่อการชักนำแคลลัสจากคัพภะแก่และใบอ่อนของข้าวหอมกระดังงา

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวอรุณี ยูโซ๊ะ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5510620039

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชศาสตร์) เกียรตินิยมอันดับสอง	มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์	2555

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างเรียน)

1. วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ
2. ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
3. สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Yusoh, A. and Te-chato, S. 2014. Effect of sucrose and dicamba on callus induction from mature seeds and young leaves culture of Hom Kra-Dang-Nga Rice *(Indica)*. Songklanakarin Journal of Plant Science 1(3): 02-04.