ผลของ 2, 4-D ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวพันธุ์ กข43

Effect of 2, 4-D on Callus Induction of Rice (*Oryza sativa* L.) cv. RD43

ปุณดานัย ชิตเพชร[1], ณรงค์ วงศ์กันทรากร[1*] และ ณัฏฐา เสนีวาส[1]

Pundanai Chitphet[1], Narong Wongkantrakorn[*] and Nuttha Sanevas[1]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวและผลของ 2, 4- dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์ กข43 จากการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวพันธุ์ กข43 ด้วยสารละลาย Clorox® 15% (sodium hypochlorite 6%) พบว่าให้ผลการปลอดเชื้อ 98% และมีการงอกของเมล็ดที่ 98% จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวบนอาหาร Murashige and Skoog medium (MS) ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 25±2°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารทุกสูตรที่เติม 2, 4-D สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่ในอาหารชุดควบคุมไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น น้ำหนักสดและค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสมีการเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2, 4-D ทั้งนี้สูตรอาหาร MS ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสมากที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด 39.58 มิลลิกรัม และค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส 0.73 เซนติเมตร ในขณะที่สูตรอาหาร MS ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสมีการลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเติม 2, 4-D ความเข้มข้นสูงมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัส

ABSTRACT

This work aimed to study explant sterilization methods and effects of different concentrations of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) on the callus induction of rice cv. RD43. The mature grains of rice cv. RD43, dehusked and sterilized using 15% Clorox® (6% sodium hypochlorite), gave 98% contaminant-free and 98% seed germination. Sterilized grains were cultured on Murashige and Skoog medium (MS) supplemented with 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 and 5.0 mg L^{-1} of 2, 4-D at 25±2°C for 4 weeks and showed that calli were generated on MS medium supplemented with all tested concentrations different concentrations of 2, 4-D. No callus was generated from the MS hormone-free medium. The fresh weight and average tissue diameter of calli increased with elevated concentrations of 2, 4-D. The MS medium with 4.0 mg L^{-1} 2, 4-D gave the highest fresh weight (39.58 mg) and average tissue diameter (0.73 cm) of calli. However, MS medium with 5.0 mg L^{-1} 2, 4-D gave reduced fresh weights and average tissue diameters of calli, indicating that high concentrations of 2, 4-D could inhibit callus development.

Key words: callus induction, rice cv. RD43, 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid

* Corresponding author; e-mail address: fscinrw@ku.ac.th

[1]ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

[1]Department of Botany, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900

คำนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากเป็นทั้งอาหารหลักและสินค้าส่งออกหลักของประเทศ ประเทศไทยมีข้าวพันธุ์ปลูกหลากหลายพันธุ์ โดยเฉพาะข้าวเจ้าพันธุ์ กข43 เป็นข้าวที่ได้รับการรับรองพันธุ์จากกรมการข้าวของประเทศไทย เพื่อเป็นพันธุ์ข้าวแนะนำให้เกษตรกรปลูก และเป็นพันธุ์ข้าวที่มีค่าดัชนีน้ำตาล (glycemic index, GI) ในระดับปานกลางค่อนข้างต่ำ จึงเป็นอาหารทางเลือกเพื่อสุขภาพสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานและโรคไต ซึ่งมีความจำเป็นต้องควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด และมีข้อจำกัดในการบริโภคอาหารที่มีควรมีปริมาณน้ำตาลค่อนข้างน้อย (อังศุธรย์ และคณะ, 2560)

ปัจจุบันกระแสนิยมบริโภคข้าวเพื่อสุขภาพของผู้บริโภคได้รับความนิยมมากขึ้นทั้งในประเทศและต่างประเทศ แต่ด้วยการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศทำให้ข้าวพันธุ์ กข43 มีผลผลิตลดลงและมีไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด การเพิ่มผลผลิตให้กับข้าวสามารถทำได้โดยการปรับปรุงพันธุ์และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเทคนิคที่มีความสำคัญต่อการศึกษาทางด้านพื้นฐานและประยุกต์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ อย่างไรก็ตามการศึกษาขั้นพื้นฐานทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวพันธุ์ กข43 เช่น การฟอกฆ่าเชื้อและการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์ กข43 ยังไม่พบการรายงาน ซึ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวสามารถฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดของข้าวที่แกะเปลือกออกแล้วด้วยสารละลาย Clorox® ได้ (สมดังใจ และคณะ, 2554; ยงศักดิ์ และ อัญชลี, 2558) และการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าว สามารถใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (auxin) ชนิด 2, 4-D เพียงชนิดเดียวหรือร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่นได้ (Katiyar *et al*., 1999; Karthikeyan *et al*., 2009; Upadhyaya *et al*., 2015)

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงได้ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชและผลของ 2, 4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์ กข43 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดแคลลัส และนำผลที่ได้จากการศึกษาไปประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภคต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช

นำเมล็ดข้าวพันธุ์ กข43 ที่แกะเปลือกออก มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่างกัน 4 วิธี ดังนี้

วิธีที่ 1 แช่เมล็ดข้าวแกะเปลือกในสารละลาย Clorox® 5% เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย Clorox® 15% เป็นเวลา 30 นาที

วิธีที่ 2 แช่เมล็ดข้าวแกะเปลือกในสารละลาย Clorox® 5% เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย Clorox® 30% เป็นเวลา 30 นาที

วิธีที่ 3 ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวแกะเปลือกด้วยสารละลาย Clorox® 15% เป็นเวลา 30 นาที

วิธีที่ 4 ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวแกะเปลือกด้วยสารละลาย Clorox® 30% เป็นเวลา 30 นาที

ทุกวิธีเติมสารลดแรงตึงผิว Tween-20 ประมาณ 2-3 หยด ฟอกฆ่าเชื้อด้วยเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที (revolutions per minute, rpm) และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

จากนั้นนำเมล็ดข้าวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในจานเพาะเลี้ยงสูตรละ 10 จาน จานละ 10 เมล็ด วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design,

CRD) เพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อศึกษาการปลอดเชื้อและการงอกของเมล็ดข้าว

การชักนำให้เกิดแคลลัส (callus induction)

นำเมล็ดข้าวพันธุ์ กข43 ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่เหมาะสมจากการทดลองแรก มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

สูตรอาหารที่ 1 MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ชุดควบคุม)

สูตรอาหารที่ 2 MS เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 3 MS เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 4 MS เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 5 MS เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ 6 MS เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) สูตรละ 15 ขวด ขวดละ 1 เมล็ด เพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

การบันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูล (data collection and analysis)

บันทึกผลของ 2, 4-D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวพันธ์ กข43 โดยเก็บบันทึกข้อมูลการชักนำให้เกิดแคลลัส ดังนี้ การชักนำให้เกิดแคลลัส (Callus Induction Frequency, CIF), ชนิดของแคลลัส (callus type), สีของแคลลัส (color of callus), น้ำหนักสดของแคลลัส (fresh weight of callus), ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส (Average Tissue Diameter, ATD) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. การชักนำให้เกิดแคลลัส โดยการนับจำนวนเมล็ดข้าวที่เกิดแคลลัส แล้วนำมาคำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{การเกิดแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนพืชที่มีการเกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนพืชทั้งหมดที่เพาะเลี้ยง}} \times 100\%$$

(Tariq, 2008; Upadhyaya *et al*., 2015)

2. ชนิดของแคลลัส จำแนกโดยลักษณะและพื้นผิวของแคลลัส แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ดังนี้

3.2.1 compact callus มีลักษณะเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนหนาแน่น

3.2.2 friable callus มีลักษณะเกาะกลุ่มกันหลวม ๆ สามารถแยกออกจากกันง่าย

3.2.3 mixed callus มีทั้ง compact callus และ friable callus อยู่ร่วมกัน

3. สีของแคลลัส จำแนกโดยบริเวณพื้นที่ที่เป็นสีต่าง ๆ ของแคลลัส

4. น้ำหนักสด ชั่งน้ำหนักสดของแคลลัส และนำมาหาค่าเฉลี่ย

5. ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัส หาได้จากการวัดขนาดของแคลลัสด้านที่ยาวที่สุดและด้านที่กว้างที่สุดที่ตั้งฉากกับด้านที่ยาวที่สุด และนำมาคำนวณโดยใช้สูตร

$$ATD = \frac{L + W}{2}$$

ATD = ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัส (Average Tissue Diameter)

L = ความยาวของด้านที่ยาวที่สุดของแคลลัส

W = ความยาวของด้านที่กว้างที่สุดซึ่งตั้งฉากกับด้านยาวของแคลลัส

(Taylor *et al*., 1992)

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม RStudio software (version 1.2.1335) “agricolae” package ในการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Analysis of variance (ANOVA) โดยเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี Duncan’s multiple range test (DMRT)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช

จากการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช พบว่าทั้ง 4 วิธี ให้ผลการปลอดเชื้อและการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข43 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Table 1) จากการศึกษาของ Verma *et al.* (2017) ได้รายงานว่า การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชด้วยสารละลาย Clorox® ที่ความเข้มข้นน้อยเกินไปจะทำให้มีการปนเปื้อนมาก แต่การใช้สารละลาย Clorox® ที่ความเข้มข้นมากเกินไปจะส่งผลให้ชิ้นส่วนพืชตายได้ ซึ่งการใช้ Clorox® 15% และ 30% อยู่ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวพันธุ์ กข43 ดังนั้นในการทดลองนี้ การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย Clorox® 15% จึงมีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการทดลองต่อไป เนื่องจากให้ผลการปลอดเชื้อและการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข43 สูง และเป็นวิธีที่ใช้เวลาและสารน้อย

Table 1 Effect of different 2, 4-D concentrations on callus induction frequency.

Treatments	5% Clorox® soaking time (hr.)	Clorox® concentration	Sterilization (%)	Seed germination (%)
1	6	15%	99.00	100.00
2	6	30%	98.00	99.00
3	0	15%	98.00	98.00
4	0	30%	97.00	100.00

การชักนำให้เกิดแคลลัส

จากการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข43 บนสูตรอาหารที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า 2, 4-D มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์ กข43 โดยอาหารทุกสูตรที่เติม 2, 4-D สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่สูตรอาหารที่ไม่มีการเติม 2, 4-D (ชุดควบคุม) ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ สูตรอาหารที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้น้อยที่สุด

(86.67%) และสูตรอาหารที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการชักนำให้เกิดแคลลัส 100.00% ทุกสูตร (Table 2) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Katiyar *et al.* (1999) และ Iqbal Khan *et al.* (2000) ที่รายงานว่าสามารถใช้ 2, 4-D ในการชักนำแคลลัสข้าว และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2, 4-D จะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการเกิดแคลลัส 2, 4-D เป็นสารในกลุ่มออกซินซึ่งสามารถทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนกลับเป็นเนื้อเยื่อเจริญ (dedifferentiation) และมีผลต่อการเริ่มการแบ่งเซลล์ (George *et al.*, 2008)

Table 2 Effect of different 2, 4-D concentrations on callus induction frequency.

2, 4-D concentration (mg L^{-1})	Callus induction frequency (%)
0	0.00
1.0	86.67
2.0	100.00
3.0	100.00
4.0	100.00
5.0	100.00

ชนิดของแคลลัส

จากการทดลองพบว่า แคลลัสที่เกิดขึ้นส่วนมากมีลักษณะเป็นแคลลัสชนิด compact callus โดยมีจำนวนมากที่สุดในสูตรอาหารที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2, 4-D แคลลัสชนิด compact callus จะมีจำนวนลดลง แต่แคลลัสชนิด friable callus มีจำนวนเพิ่มขึ้น (Table 3) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ สมดังใจ และคณะ (2554) ที่พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ 2, 4-D สูงขึ้นจะชักนำให้เกิดแคลลัสชนิด friable callus มากขึ้น ซึ่งแคลลัสชนิด compact callus และ friable callus มีการนำไปใช้ประโยชน์ที่แตกต่างกัน โดยแคลลัสชนิด friable callus มักไม่เปลี่ยนเป็นอวัยวะ เหมาะสำหรับนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ส่วนแคลลัสชนิด compact callus มักเจริญต่อไปเป็นอวัยวะและพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้และ Salomé *et al.* (1985) รายงานว่าแคลลัสชนิด friable callus เป็นชิ้นส่วนที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ (protoplast isolation)

Table 3 Effect of different 2, 4-D concentrations on callus types.

2, 4-D concentration (mg L^{-1})	Number of callus				Total culture
	Compact callus	Friable callus	Mixed callus	No callus	
0	0	0	0	15	15
1.0	11	0	2	2	15
2.0	10	1	4	0	15
3.0	8	2	5	0	15
4.0	8	3	4	0	15
5.0	5	1	9	0	15

Mixed callus = compact and friable callus

สีของแคลลัส

สีของแคลลัสที่ได้สามารถจำแนกออกได้ทั้งหมด 3 สี คือ สีขาว, สีเหลือง และ สีน้ำตาล (Figure 1) โดยแคลลัสส่วนมากเป็นสีน้ำตาล และมีจำนวนมากที่สุดในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีแคลลัสสีน้ำตาล 14 แคลลัส จากทั้งหมด 15 แคลลัส (Table 4) โดยสมดังใจ และคณะ (2554) ได้ระบุว่าเนื้อเยื่อแคลลัสที่มีสีเหลืองจะสามารถเจริญและพัฒนาต่อไปได้ แคลลัสสีขาวจะไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ และการที่เนื้อเยื่อแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำ แสดงว่าเนื้อเยื่อถูกทำลายหรือถูกยับยั้งการเจริญเติบโต และเนื้อเยื่อนั้นจะตายในที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาของ Karthikeyan *et al.* (2009) ที่รายงานว่าความเข้มข้นของ 2, 4-D ที่สูงมากเกินไปส่งผลยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อ และเป็นสาเหตุของการเปลี่ยนสีเนื้อเยื่อเป็นสีน้ำตาลของแคลลัส

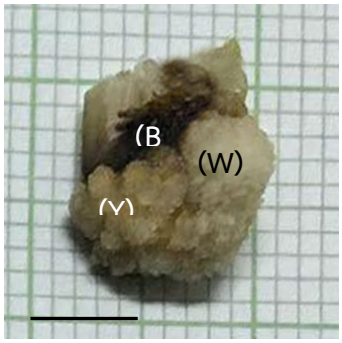

Figure 1 Callus was induced from mature seed of rice cv. RD43 after 4 weeks of incubation on MS medium supplemented with 4.0 mg L^{-1} 2, 4-D. W=White, Y=Yellow, B=Brown (scale bar = 0.5 cm.).

Table 4 Effect of different 2, 4-D concentrations on color of rice cv. RD43 callus.

2, 4-D concentration (mg L^{-1})	Number of callus					Total culture
	W+B	Y+B	W+Y+B	B	No callus	
0	0	0	0	0	15	15
1.0	1	2	5	5	2	15
2.0	1	0	8	6	0	15
3.0	2	3	2	8	0	15
4.0	1	2	8	4	0	15
5.0	0	0	1	14	0	15

W=White, Y=Yellow, B=Brown

น้ำหนักสดและค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส

น้ำหนักสดและค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ 2, 4-D ที่เติมในอาหารเพิ่มมากขึ้นโดยน้ำหนักสดของแคลลัสมากที่สุดในอาหารที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ 39.58 มิลลิกรัม และ 0.73 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมาคืออาหารที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ 31.70 มิลลิกรัม และ 0.66 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยทั้ง 2 ความเข้มข้น

ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม ส่วนของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด 8.41 และ 20.74 มิลลิกรัม ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.38 และ 0.55 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่น้ำหนักสดและค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสจะมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ 16.33 มิลลิกรัม และ 0.52 เซนติเมตร ตามลำดับ

น้ำหนักสดและค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ 2, 4-D ที่เติมในอาหารเพิ่มมากขึ้น เนื่องจาก 2, 4-D เป็นสารในกลุ่มออกซินมีความสามารถในการเพิ่มการยืดตัวของผนังเซลล์ ทำให้เซลล์ขยายขนาดขึ้นได้ (George *et al.*, 2008) ส่วนน้ำหนักสดและค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแนวโน้มลดลง สอดคล้องกับผลการทดลองของ Michiba *et al.* (2001) ที่ได้รายงานว่าเมื่อมีความเข้มข้นของ 2, 4-D มากเกินไปจะส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัสและ 2, 4-D ความเข้มข้นสูง ส่งผลให้ไม่เกิดการสร้างอวัยวะ ยับยั้งการสังเคราะห์ด้วยแสง และสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์และได้ (Pierik, 1987)

Table 5 Effect of different 2, 4-D concentrations on fresh weight and average tissue diameter of rice cv. RD43 callus.

2, 4-D concentration (mg L^{-1})	Mean fresh weight of callus (mg)	Average tissue diameter (cm)
0	0.00 d	0.00 d
1.0	8.41 cd	0.38 c
2.0	20.74 b	0.55 b
3.0	31.70 a	0.66 a
4.0	39.58 a	0.73 a
5.0	16.33 bc	0.52 b

Mean values followed by different letters in each column indicating significant differences according to Duncan's Multiple Range Test ($p<0.05$)

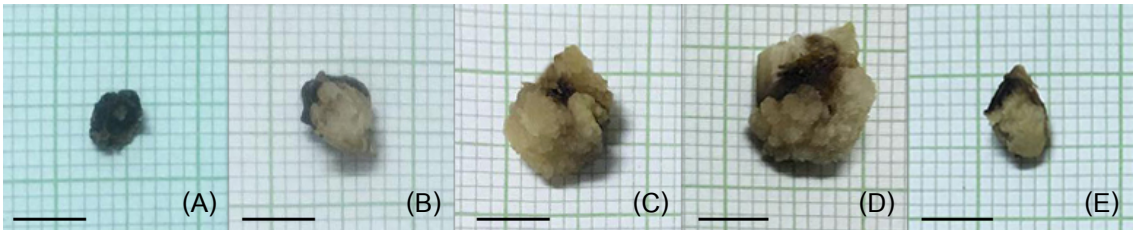

Figure 2 Callus of rice cv. RD43 after 4 weeks of incubation on MS media supplemented with 2, 4-D (A) 1.0 mg L^{-1}, (B) 2.0 mg L^{-1}, (C) 3.0 mg L^{-1}, (D) 4.0 mg L^{-1} and (E) 5.0 mg L^{-1} (scale bar = 0.5 cm.)

สรุป

การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวพันธุ์ กข43 ด้วยสารละลาย Clorox® 15% มีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากให้ผลการปลอดเชื้อและการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข43 สูง และเป็นวิธีที่ใช้เวลาและสารน้อย

2, 4-D มีผลในการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์ กข43 โดยอาหารที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสมากที่สุด เนื่องจากมีการชักนำให้เกิดแคลลัส 100%, แคลลัสที่ได้ส่วนมากเป็น compact callus มีสีเหลืองและขาวซึ่งเหมาะสำหรับการนำไปชักนำให้เกิดอวัยวะใหม่ และเป็นสูตรอาหารที่ให้น้ำหนักสดและค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางที่มากที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาครั้งนี้ขอขอบพระคุณทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) Development and Promotion of Science and Technology Talents Project (DPST)

เอกสารอ้างอิง

ยงศักดิ์ ขจรผดุงกิตติ และ อัญชลี จาละ. 2558. อิทธิพลของ BA, IAA, 2, 4-D และ Kinetin ต่อการขยายพันธุ์ต้นแก้วมังกรจากไฮโปรคอทิลและใบจริงในสภาพปลอดเชื้อ. **Thai Journal of Science and Technology** 4 (2): 147-154.

สมดังใจ สายสิงห์ทอง, สงวนศักดิ์ ธนาพรพูนพงษ์ และ สุชาดา เวียรศิลป์. 2554. ผลของผงถ่าน กัมมันต์ และ 2, 4-D ต่อการเกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1. **วารสารเกษตร** 27(3): 175-185.

อังศุธรย์ วสุสัณห์, สุนันทา วงศ์ปิยชน, ศรีวัฒนา ทรงจิตสมบูรณ์, วัชรี สุขวิวัฒน์, ปราณี มณีนิล และ สุพรรณิการ์ ปักเคธาติ. 2560. ข้าวพันธุ์กข43 ข้าวดัชนีน้ำตาลปานกลางสำหรับตลาดข้าวเฉพาะ. **วารสารวิชาการข้าว** 8 (2): 45-53.

George, E.F., M.A. Hall and G.J. De Klerk. 2008. **Plant Propagation by Tissue Culture.** 3rd ed. Springer, Netherlands.

Iqbal Khan, Z., A. Hussain and M. Sadiq. 2000. Role of plant growth regulators (auxin and cytokinin) in callus induction in rice (*Oryza sativa* L.) cv. DM-25. **Pakistan Journal of Biological Sciences** 3 (1): 157-159.

Karthikeyan, A., S.T.K. Pandian and M. Ramesh. 2009. High frequency plant regeneration from embryogenic callus of a popular *indica* rice (*Oryza sativa* L.). **Physiology and Molecular Biology of Plants** 15 (4): 371-375.

Katiyar, S.K., G. Chandel, P. Singh and R. Pratibha. 1999. Genetic variation and effect of 2, 4-D in *in-vitro* plant regeneration in *indica* rice cultivars. ***Oryza*** 36: 254-256.

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

Pierik, R.L.M. 1987. ***In vitro*** **Culture of Higher Plants.** The Hague: Martinus Nijhoff Publishers,.

Salomé, M., S. Pais, M. Margarida Oliveira and J. Barroso. 1985. Use of petiole segments of *Actinidia chinensis* (kiwi) for plant differentiation and production of friable calli for protoplast isolation. **Symposium on *In vitro* Problems Related to Mass Propagation of Horticultural Plants** 212: 687-690.

Tariq, M., G. Ali, F. Hadi, S. Ahmad, N. Ali and A.A. Shah. 2008. Callus induction and *in vitro* plant regeneration of rice (*Oryza sativa* L.). **Pakistan Journal of Biological Sciences** 1 (2): 255-259.

Taylor, R.J. and G.A. Secor. 1992. Average tissue diameter as a non-destructive determinant of potato protoplast-derived callus growth. **Environmental and Experimental Botany** 32 (1): 43-48.

Upadhyaya, G., M. Sen and A. Roy.2015. *In vitro* callus induction and plant regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) var.'Sita','Rupali'and 'Swarna Masuri'. **Asian Journal of Plant Science and Research** 5 (5): 24-27.

Verma, S.K., K. Kingsley, I. Irizarry, M. Bergen, R.N. Kharwar and J.F. White Jr. 2017. Seed-vectored endophytic bacteria modulate development of rice seedlings. **Journal of Applied Microbiology** 122 (6): 1680-1691.