การใช้สารไคโตซานร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวหอมมะลิ 105

Using a Chitosan and Plant Growth Regulators for Increasing Efficiency of Rice (KDML105) Tissue Culture

สุลักษณ์ แจ่มจำรัส[1] สนธิชัย จันทร์เปรม[2] รงรอง หอมหวล[1] มณฑา วงศ์มณีโรจน์[1] และ รัตนา เอการัมย์[1]

Surak jamjumrus[1], Sontichai Chanprame[2], Rongrong Homhual[1], Monthar Wongmaneeroj[1] and Rattana Agarum[1]

บทคัดย่อ

การฟอกฆ่าเชื้อข้าวหอมมะลิ 105 ที่แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกแล้ว โดยแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 15%(v/v) และ 7.5%(v/v) นาน 10 และ 5 นาที ตามลำดับ เก็บไว้ในที่มืด 2 วัน แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การงอกเป็นต้นกล้า 81.2% และเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนเชื้อ 14.5% เมื่อนำต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 อายุ 3 สัปดาห์ มาตัดยอดยาวประมาณ 0.3 ซม. ลงเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0 1 2 และ 3 มก./ล. ร่วมกับไคโตซานความเข้มข้น 0 10 20 และ 30 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1.5 เดือน พบว่าสูตรอาหาร MS ที่มี TDZ 2 มก./ล. ร่วมกับไคโตซาน 20 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดการแตกกอดีที่สุดเฉลี่ย 8.83 ต้น/กอ และการทดลองที่เติม TDZ 2 มก./ล. ร่วมกับไคโตซานความเข้มข้น 0 หรือ 20 มก./ล. ร่วมกับ glutamine ความเข้มข้น 0 หรือ 2.92 ก./ล. พบว่า TDZ 2 มก./ล. ร่วมกับไคโตซาน 20 มก./ล. และ glutamine 2.92 ก./ล. สามารถชักนำให้ต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 แตกกอดีที่สุด 4.20 ต้น/กอ จากนั้นนำต้นกล้าที่ได้มาชักนำให้ออกรากในสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนมีการเกิดราก 100% และเมื่อย้ายปลูกลงกระถางมีอัตราการรอดชีวิต 100% สำหรับการทดลองชักนำให้เกิดแคลลัสจากยอดของต้นกล้าข้าวที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 1 2 และ 3 มก./ล. ร่วมกับ proline 0 หรือ 1 ก./ล.พบว่า มีการเกิดแคลลัสสีเหลืองเกาะกันแน่น โดยอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 3 มก./ล. ชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด

ABSTRACT

Dehull of KDML 105 seeds were surface steilized by soaking in 15 and 7.5% (v/v) of commercial bleach (Chlorox®) for 10 and 5 minutes, respectively. Seeds were incubated for 2 days

[1] ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนา กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม, 73140

[1] CLGC, Research and Development Institute at Kamphaengsaen, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

[2] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม, 73140

Department of Agronomy, Fac. of Agricultrure at Kamphaeng Saen, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

in the dark and then we transferred to MS basal medium. It was found that the germination percentage was 81.2% with 14.5% contamination. The 0.3 cm shoot length of 3 weeks old seedlings were cut and cultured on MS medium containing TDZ at the concentration of 0, 1, 2 and 3 mg/L incorporate with 0, 10, 20 and 30 mg/L of chitosan. After 1.5 months of culture, the results showed that MS medium containing 2 mg/L TDZ and 20 mg/L chitosan gave the highest average number of tiller per plant of 8.83.The medium containing 2 mg/L TDZ in combination with 0 or 20 mg/L chitosan and 0 or 2.92 g/L glutamine were also tested. The results showed that the medium containing 2 mg/L TDZ and 20 mg/L chitisan and 2.92 g/L glutamine induced the highest average number of tiller per plant of 4.20. One hundred percent of root induction was obtained when the seedlings were transferred to MS hormone-free medium. All plantlets survived when they were transferred to pots. Callus induction from shoots of *in vitro* cultured seedling were tried on MS medium containing 1, 2 and 3 mg/L 2,4-D and 0 and 1 g/L proline. The results showed that MS medium containing 3 mg/L 2,4-D was the best for inducing yellowish compact callus.

Key words: shoot tip, tissue culture , rice (KDML105). growth regulators, chitosan, vitamine

e-mail address: rdisrj@ku.ac.th

คำนำ

ข้าวนอกจากจะเป็นอาหารหลักของคนไทยแล้วยังเป็นสินค้าส่งออกทางการเกษตรที่สำคัญของประเทศ จากข้อมูล ปี 2552 ประเทศไทยส่งออกข้าว 8.5 ล้านตันมูลค่า 4,650 ล้านดอลลาร์ (ศูนย์วิจัยกสิกร, 2555) แต่ก็ยังพบปัญหาชาวนาขาดทุนจากการปลูกข้าวทุกปีอย่างต่อเนื่อง รัฐบาลจึงให้การสนับสนุนงานวิจัยเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ข้าว โดยเฉพาะพันธุ์ข้าวที่มีผลผลิตและคุณภาพสูงสามารถปลูกในพื้นที่ปลูกต่าง ๆ ทั่วประเทศ ร่วมด้วยการใช้เทคโนโลยีและระบบการจัดการที่ดีและเหมาะสม ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยเฉพาะการใช้เทคโนโลยีชีวภาพเข้าช่วยนั้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวเป็นเทคนิคพื้นฐานที่จำเป็นอย่างยิ่ง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวให้ประสบความสำเร็จนอกจากจะขึ้นอยู่กับสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมแล้ว ยังขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารเร่งการเจริญเติบโต และอาจมีการใช้สารกระตุ้นชนิดต่าง ๆ เข้าร่วมด้วย จากรายงานของ Chandrkrachang (2002) กล่าวว่า สารไคโตซานเป็นสารโพลิเมอร์ธรรมชาติสกัดได้จากเปลือกกุ้ง กระดองปู และแกนหมึก ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของราก และยังพบว่าสารไคโตซานสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ใช้เคลือบเมล็ดพืช ใบไม้ ผลไม้และพืชผักส่งออก และสามารถกระตุ้นให้พืชต้านทานเชื้อราและไวรัสได้ Nge *et al*. (2006) เพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้โดยการเติมสารไคโตซานที่สกัดจากเปลือกกุ้งความเข้มข้น 10-15 ppm มีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ได้ดี นอกจากนี้ยังช่วยกระตุ้นการสร้างคลอโรฟิลล์ทำให้ใบพืชมีสีเขียว พืชแข็งแรง โตไว (ธนาชัย, 2555) ซึ่งเทคนิคที่ศึกษาจะสามารถนำไปพัฒนางานวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมมะลิ 105 ให้มีคุณสมบัติและคุณภาพสูงขึ้น เช่น พันธุ์ข้าวที่มีการสร้างสารอาหารที่มีประโยชน์หรือพันธุ์ข้าวทนเค็มหรือทนแล้ง เป็นต้น ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของข้าวหอมมะลิ

105 ในสภาพปลอดเชื้อ โดยเฉพาะการใช้สารไคโตซานร่วมกับสารเร่งการเจริญเติบโต TDZ และกรดอะมิโน glutamine เพื่อพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสม สำหรับเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวหอมมะลิ 105 ให้สามารถผลิตต้นกล้าที่แข็งแรงมีคุณภาพและขนาดสม่ำเสมอ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ศึกษาเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อข้าวหอมมะลิ 105

นำเมล็ดข้าวหอมมะลิ 105 มาแกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก แล้วห่อเมล็ดด้วยผ้าขาวบางก่อนนำมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 15%(v/v) และ 7.5%(v/v) ที่เติมสารจับใบ (tween 20) แช่นานประมาณ 10 นาที และ 5 นาที ตามลำดับ จากนั้นล้างคลอร็อกซ์ออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง เมื่อฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วเก็บเมล็ดข้าวหอมมะลิ 105 ที่ห่อด้วยผ้าขาวบางไว้ในขวดปิดฝาที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในที่มืดเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (1962) วางไว้ที่ห้องควบคุมอุณหภูมิ 28°ซ ในที่มืดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงย้ายมาไว้ในที่มีแสงความเข้ม 16 μmol m^{-2} S^{-1} นาน 2 สัปดาห์ เพื่อศึกษาการงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นกล้าหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 3 สัปดาห์

2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแตกกอของข้าวหอมมะลิ 105

2.1 ศึกษาผลของ TDZ และไคโตซานที่มีต่อการแตกกอในสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 ที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาตัดยอดขนาดประมาณ 0.3 ซม. นำยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0 1 2 และ 3 มก./ล. ร่วมกับไคโตซานความเข้มข้น 0 10 20 และ 30 มก./ล. เติมน้ำตาล 30 กรัม เป็นเวลา 1.5 เดือน วางไว้ที่ห้องควบคุมอุณหภูมิ 28°ซ มีแสงความเข้ม 16 μmol m^{-2} S^{-1} วางแผนทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยมีการทดลองทั้งหมด 16 สูตรอาหาร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ยอด

2.2 ศึกษาผลของ TDZ ไคโตซาน และกรดอะมิโน glutamine ที่มีต่อการแตกกอในสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 จากการทดลองที่ 1 มาตัดยอดขนาดประมาณ 0.3 ซม. นำยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี TDZ 2 มก./ล. ร่วมกับไคโตซานความเข้มข้น 0 หรือ 20 มก./ล. (จากการทดลองที่ 2) ร่วมกับ glutamine ความเข้มข้น 0 และ 2.92 ก./ล. เติมน้ำตาล 30 กรัม เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน วางไว้ที่ห้องควบคุมอุณหภูมิ 28°ซ มีแสงความเข้ม 16 μmol m^{-2} S^{-1} วางแผนทดลองแบบ CRD โดยมีการทดลองทั้งหมด 4 สูตรอาหาร ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ยอด

3. ศึกษาผลของ 2,4-D และ proline ที่มีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากยอดข้าวหอมมะลิ 105

นำต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 จากการทดลองที่ 1 มาตัดยอดขนาดประมาณ 0.3 ซม. นำยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 2 และ 3 มก./ล. ร่วมกับ proline ความเข้มข้น 0 1 ก./ล. เติมน้ำตาล 30 กรัม เป็นเวลา 2 เดือน วางไว้ที่ห้องควบคุมอุณหภูมิ 28°ซ ในสภาพมืด วางแผนทดลองแบบ CRD โดยมีการทดลองทั้งหมด 7 สูตรอาหาร ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ยอด

4. การชักนำให้เกิดรากจากต้นข้าวหอมมะลิ 105 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการย้ายปลูก

นำต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 ที่ได้จากการทดลองที่ 2.2 ย้ายมาลงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต ชักนำให้เกิดรากมากพอที่จะย้ายปลูกในโรงเรือน โดยชักนำรากในอาหารดังกล่าว 1 เดือน นำต้นกล้าที่ชักนำรากได้ย้ายปลูกในสภาพโรงเรือนที่มีความเข้มแสง 31 μmol m^{-2} S^{-1}อุณหภูมิ 32-35°ซ เพื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิต

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษาเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวหอมมะลิ 105

หลังจากแกะเปลือกหุ้มเมล็ดข้าวหอมมะลิ 105 และฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยใช้สารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 15%(v/v) และ 7.5%(v/v) ที่เติมสารจับใบ (tween 20) เป็นเวลาประมาณ 10 นาที และ 5 นาที ตามลำดับ และเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 วัน ในขวดที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว พบการเกิดจุดกำเนิดยอดที่เมล็ดข้าว จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารเร่งการเจริญเติบโตนาน 3 สัปดาห์ พบว่าเมล็ดข้าวหอมมะลิ 105 มีเปอร์เซ็นต์การงอก 81.2% และเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนเชื้อ 14.5% สอดคล้องกับงานวิจัยของรงรองและคณะ (2553) ที่ได้นำเมล็ดธัญพืช 3 ชนิด คือ ข้าวหอมมะลิ 105 ข้าวสาลีพันธุ์อินทรี 1 และข้าวสาลีพันธุ์การค้า มาฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้สารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 20%(v/v) และ 10%(v/v) พบว่า ข้าวหอมมะลิ 105 มีเปอร์เซ็นต์การงอกเป็นต้นกล้าสูงสุดเท่ากับ 98.26%

2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแตกกอของข้าวหอมมะลิ 105

2.1 ศึกษาผลของ TDZ และไคโตซานที่มีต่อการแตกกอในสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 ที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาตัดยอดขนาดประมาณ 0.3 ซม. นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0 1 2 และ 3 มก./ล. ร่วมกับไคโตซานความเข้มข้น 0 10 20 และ 30 มก./ล. เติมน้ำตาล 30 กรัม เป็นเวลา 1.5 เดือน พบว่า ในอาหารทุกสูตรส่วนยอดของข้าวหอมมะลิ 105 มีการยืดตัวและแตกกอเพิ่มเกิดเป็นกระจุกต้นกล้าเล็ก ๆ สามารถแตกกอได้เฉลี่ยตั้งแต่ 1.16-8.83 ต้น/กอ โดยเฉพาะสูตรอาหารที่มี TDZ 2 มก./ล. ร่วมกับไคโตซาน 20 มก./ล. ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 8.83 ต้น/กอ รงรอง และคณะ (2555) กล่าวว่า การนำเมล็ดข้าวหอมมะลิ 105 มาเพาะเลี้ยงสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ 2 มก./ล. ร่วมกับสารไคโตซาน 5 มก./ล. เกิดต้นเฉลี่ย 11.14 ต้น/เมล็ด ลักษณะของต้นกล้ามีสีเขียวเข้ม ในการทดลองนี้อาหารสูตร MS ที่เติมไคโตซานความเข้มข้น 10 20 และ 30 มก./ล. โดยไม่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต ทำให้ข้าวมีลำต้นใหญ่ ยืด มีการแตกกอน้อยเฉลี่ยตั้งแต่ 1.16-2.5 ต้น/กอ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสูตรที่มีการเติม TDZ ทั้ง 3 ความเข้มข้น (Table 1) การใช้สาร TDZ ความเข้มข้น 1-2 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดการแตกกอเพิ่มมากขึ้น เมื่อเติมไคโตซานความเข้มข้น 10 และ 20 มก./ล. มีแนวโน้มชักนำให้ต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 มีสีเขียวเข้ม แข็งแรง และแตกกอเพิ่มขึ้นกว่าการที่ใช้ TDZ เพียงอย่างเดียว แต่เมื่อเพิ่มไคโตซาน 30 มก./ล. ร่วมกับสารเร่งการเจริญเติบโตกลับทำให้ต้นข้าวเหี่ยวเฉา และการแตกกอลดลง (Figure 1) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Nge *et al.* (2006) ที่พบว่าความเข้มข้นของสารไคโตซานสกัดจากเปลือกกุ้ง ประมาณ 10-15 มก./ล มีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ได้ดี

Table 1 Shoot initiation of KDML105 cultured on MS medium supplemented with TDZ 0, 1, 2 and 3 mg/L and chitosan (0 - 30 mg/L) for 1.5 months.

TDZ \ Chitosan	Average number of shoot initiation*			
	0 mg/L	10 mg/L	20 mg/L	30 mg/L
0 mg/L	1.16[d]	1.6[b]	2.16[b]	2.5[b]
1 mg/L	4.16[c]	6.33[a]	7.33[a]	4.83[a]
2 mg/L	7[a]	6.5[a]	8.83[a]	5[a]
3 mg/L	5.16[b]	6.33[a]	7.5[a]	5.66[a]

*Means in the same column with different letter are signiticantly different at the 95% level by DMRT

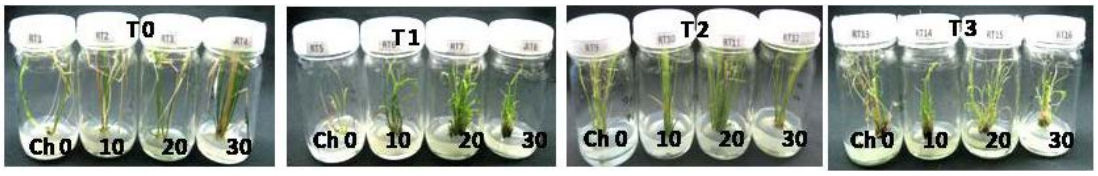


Figure 1 Shoot initiation of KDML105 cultured on MS medium supplemented with TDZ 0,1, 2 and 3 mg/L and chitosan (0 - 30 mg/l) for 1.5 months

2.2 ศึกษาผลของ TDZ ไคโตซาน และกรดอะมิโน glutamine ที่มีต่อการแตกกอในสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 จากการทดลองที่ 1 มาตัดยอดขนาดประมาณ 0.3 ซม. นำยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี TDZ 2 มก./ล. ร่วมกับไคโตซานความเข้มข้น 0 หรือ 20 มก./ล. และ glutamine ความเข้มข้น 0 หรือ 2.92 ก./ล. เติมน้ำตาล 30 กรัม เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ยอดของข้าวหอมมะลิ 105 มีการแตกกอเป็นกระจุกต้นกล้าเล็ก ๆ ในทุกสูตรอาหาร สูตรอาหาร MS ที่มีไคโตซานความเข้มข้น 20 มก./ล. และ glutamine ความเข้มข้น 2.92 ก./ล. แตกกอเฉลี่ยสูงสุด 4.20 ต้น/กอ ถวัลย์ศักดิ์ และคณะ (2551) ได้นำแคลลัสที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเอมบริโอเจนนิคแคลลัสของต้นทานตะวันพันธุ์กวางสีมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ MS ที่เติม glutamine 5 มก./ล. พบว่า MS ที่เติม glutamine 5 มก./ล.สามารถเพิ่มปริมาณเอมบริโอเจนนิคแคลลัสได้ดีในสภาพที่มีแสง แสดงให้เห็นว่า glutamine มีส่วนช่วยกระตุ้นให้การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชบางชนิดที่เพาะเลี้ยงดีขึ้น ส่วนสูตรอาหาร MS ที่มีไคโตซานความเข้มข้น 20 มก./ล.แตกกอเฉลี่ย 4.13 ต้น/กอ และสูตรที่เติม glutamine ความเข้มข้น 0, 2.92 ก./ล. แตกกอเฉลี่ย 3.50 และ 3.73 ต้น/กอ ตามลำดับ (Table 2) การใช้ไคโตซานร่วมกับ glutamine หรือใช้สารชนิดใดตัวหนึ่งเติมลงในอาหารเพาเลี้ยง สามารถช่วยให้ใบข้าวมีสีเขียวเข้มขึ้น อาจมีแนวโน้มช่วยกระตุ้นการแตกหน่อ และความแข็งแรงของต้นข้าวหอมมะลิ 105 มากกว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตเพียงอย่างเดียว (Figure 2) อย่างไรก็ตามพืชแต่ละชนิดมีความต้องการ วิตามิน เกลือแร่ และกรดอะมิโน แตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับพืชแต่ละชนิด

Table 2 Shoot initiation of KDML 105 cultured on MS medium containing 2 mg/L TDZ and combination of chitosan (0 - 20 mg/L) and glutamine (0 and 2.92 g/L) for 1 month

Media	No. of averaged shoot initiation *
1. TDZ 2 mg/L+ chitosan 0 mg/L + glutamine 0 g/L (TG4)	3.50[b]
2. TDZ 2 mg/L+ chitosan 0 mg/L + glutamine 2.92 g/L (TG3)	3.73[ab]
3. TDZ 2 mg/L+ chitosan 20 mg/L + glutamine 0 g/L (TG1)	4.13[a]
4. TDZ 2 mg/L+ chitosan 20 mg/L + glutamine 2.92 g/L (TG2)	4.20[a]

* Means in the same column with different letter are signiticantly different at the 95% level by DMRT

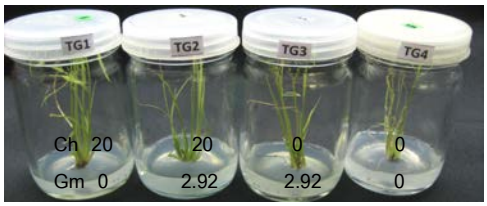


Figure 2 Shoot initiation of KDML105 cultured on MS medium with TDZ 2 mg/L and combination of chitosan (0, 20 mg/L) and glutamine (0 and 2.92 g/L) for 1 month

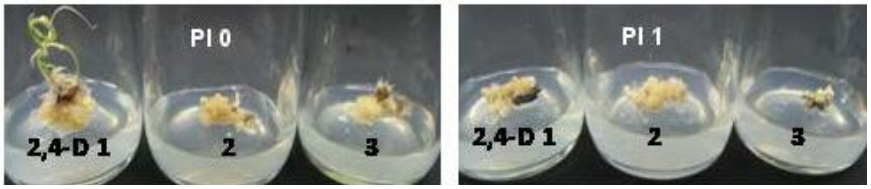
3. ศึกษาผลของ 2,4-D และ proline ที่มีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากยอดข้าวหอมมะลิ 105

นำต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 จากการทดลองที่ 1 มาตัดยอดขนาดประมาณ 0.3 ซม. นำยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ MS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 1 2 และ 3 มก./ล. ร่วมกับ proline เข้มข้น 0 และ 1 ก./ล. เติมน้ำตาล 30 กรัม วางไว้ที่ห้องควบคุมอุณหภูมิ 28ºซ ในสภาพมืด เป็นเวลา 1-2 เดือน พบว่า ยอดข้าวเกิดเป็นยอดสีขาวหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ บริเวณโคนของต้นอ่อนมีการพัฒนาเป็นแคลลัสในอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 1 2 และ 3 มก./ล. แคลลัสที่ได้มีลักษณะสีเหลืองเกาะกันแน่น โดยสูตรอาหารที่มี 2,4-D 3 มก./ล. ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด 58.3% (Table 3) จากการทดลองของ รงรอง และคณะ (2553) พบว่า ปลายยอดของอ้อยพันธุ์ KPS 00 -105 , KPS 01-1-25 และ KPS 00 -148 มีการพัฒนาเกิดแคลลัสที่มีลักษณะสีขาวอมเหลืองในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 3 มก./ล และน้ำมะพร้าว 10% ส่วนการทดลองในครั้งนี้อาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 1 และ 2 มก./ล. ร่วมกับ proline 1 ก./ล. ลักษณะแคลลัสที่ได้เป็นสีเหลืองเกาะกันหลวม ๆ ส่วนอาหารที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ proline 1 ก./ล. แคลลัสที่ได้จะเปลี่ยนเป็นมีสีขาวปนน้ำตาลและตายในที่สุด (Figure 3)

Table 3 Callus initiation of KDML 105 cultured on MS medium containing 1, 2 and 3 mg/L 2,4-D and combination of proline (0 ,1 g/L) for 2 months

Media	% callus initiation	Callus size (cm.)
MS	0[d]	0
MS+2,4-D 1 mg/L	41.6[ab]	1
MS+2,4-D 2 mg/L	50[ab]	0.66
MS+2,4-D 3 mg/L	58.3[a]	0.7
MS+2,4-D 1 mg/L+ proline 1 g/L	50[ab]	0.86
MS+2,4-D 2 mg/L+ proline 1 g/L	50[ab]	1.08
MS+2,4-D 3 mg/L+ proline 1 g/L	25[c]	0.3

* Means in the same column with different letter are signiticantly different at the 95% level by DMRT



a b

Figure 3 Callus initiation of KDML105 cultured on MS medium containing 2,4-D 1, 2 and 3 mg/L and combination of proline 0 g/L (a) and 1 g/L (b) for 2 months

4. การชักนำให้เกิดรากจากต้นข้าวหอมมะลิ 105 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการย้ายปลูก

นำต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 ทั้งหมดที่ได้จากการทดลองที่ 2.2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล 30 ก./ล. ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 เกิดรากได้ 100% ลักษณะรากเป็นรากฝอยสีขาวยาวจำนวนมาก และเมื่อนำต้นกล้าที่ชักนำให้เกิดรากเหล่านั้นย้ายปลูกในสภาพโรงเรือนเพื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิตเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า ต้นกล้าข้าวหอมมะลิที่ได้จากทุกสูตรอาหารมีอัตราการรอดชีวิต 100% จากงานทดลองของ รงรองและคณะ (2553) ได้เพาะเลี้ยงต้นกล้าขาวหอมมะลิในอาหารสูตร MS และนำมาย้ายปลูกลงในอาหารเหลวสูตร MS และ Hoakland พบว่า ต้นกล้าข้าวหอมมะลิมีสีเขียวและเจริญเติบโตได้ดีในสภาพโรงเรือนทั้ง 2 สูตรอาหาร

สรุป

การฟอกฆ่าเชื้อข้าวหอมมะลิ 105 โดยใช้สารละลายคลอร็อกซ์ที่มีความเข้มข้น 15%(v/v) และ 7.5%(v/v) นาน 10 และ 5 นาที ตามลำดับเก็บไว้ในที่มืด 2 วัน นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS มีเปอร์เซ็นต์การงอก 81.2% และเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนเชื้อ 14.5% เมื่อนำต้นกล้าอายุ 3 สัปดาห์ มาตัดยอดยาวประมาณ 0.3 ซม. แล้วเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารเพื่อชักนำให้เกิดต้น พบว่า สูตรอาหาร MS ที่มี TDZ 2 มก./ล. ร่วมกับไคโตซาน 20 มก./ล. มีการแตกกอดีที่สุด เฉลี่ย 8.83 ต้น/กอ ส่วนการใช้ TDZ 2 มก./ล. ร่วมกับไคโตซาน 20 มก./ล. และ glutamine 2.92 ก./ล.เป็นเวลา 1 เดือน มีการแตกกอดีที่สุด 4.20 ต้น/กอ ต้นกล้าเหล่านี้สามารถออกรากได้ดีในสูตรอาหาร MS ที่ปราศจากสารเร่งการเจริญเติบโต และเมื่อย้ายปลูกมีอัตราการรอดชีวิต 100% สำหรับสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสลักษณะสีเหลืองเกาะกันแน่นจากส่วนยอดของต้นกล้าคือ สูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนากำแพงแสน และฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง ที่สนับสนุนทุนในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ถวัลย์ศักดิ์ เผ่าสังข์, ชเนษฎ์ ม้าลำพอง และ รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2551. การเจริญและพัฒนาเอมบริโอเจนนิคแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของทานตะวันพันธุ์กวางสีในสภาพปลอดเชื้อ, หน้า 52-63. *ใน* **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 สาขาพืช** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ธนาชัย. 2555. **ไคโตซาน-พืชทุกชนิด**. แหล่งที่มา: http://nicethaishop.com/ page7.html

รงรอง หอมหวล, มณฑา วงศ์มณีโรจน์, เนตรชนก เกียรติ์นนทพัทธ์, สุลักษณ์ แจ่มจำรัส, รัตนา เอการัมย์, พีรพงษ์ แสงวนางศ์กูล, ชูศักดิ์ คุณุไทย และ ชวนพิศ อรุณรังสิกุล. 2555. การใช้สารไคโตซานร่วมกับสารเร่งการเจริญเติบโตเพิ่มประสิทธิการสร้างสารสำคัญทางโภชนาการในการเพาะเลี้ยงข้าวหอมมะลิ 105, น. 146 - 147 *ใน* **การประชุมสัมมนาทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออกครั้งที่** 5 .

รงรอง หอมหวล, มณฑา วงศ์มณีโรจน์, เนตรชนก เกียรติ์นนทพัทธ์, ลักขณา เบ็ญจวรรณ์, ศิริพร วิหคโต, เจริญ ขุนพรม และ ชวนพิศ อรุณรังสิกุล. 2553. **การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตต้นกล้าและสร้างสารสำคัญทางโภชนาการในธัญพืชไทยโดยเทคโนโลยีชีวภาพ**. รายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2552.

รงรอง หอมหวล, เววิติ เลิศฤทัยโยธิน, รัตนา เอการัมย์ และ ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล. 2553. การคัดเลือกแคลลัสอ้อยทนแล้งโดยใช้สาร polyethylene glycol ในสภาพปลอดเชื้อ,หน้า 427-428. *ใน* **การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 7**, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

ศูนย์วิจัยกสิกร. 2555. **คาดส่งออกข้าวไทยปี 52 เหลือแค่ 8.5 ล้านตัน**. แหล่งที่มา: http://www.bangkokbiznews. com/home .

Chandrkrachang, S. 2002. The applications of chitin and chitosan in Thailand, *In* K. Suchiva, S. Chandrkrachang, P. Methacanon, M. G. Peter (Eds.). **Adv. in Chitin Sci**. 5: 458-462.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant** 15:473-497

Nge, K. L., N. New, S. Chandrkrachang and W. F. Stevens. 2006. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. **Plant Sci**.170: 1185-1190.