

การปรับปรุงวิธีการทำที่ เกิดต้นหมงจากแคลลัสข้าวพันธุ์ กข. 23



นางสาว สุดารัตน์ นิติวัดนะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาพฤกษศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2538

ISBN 974-582-109-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 1065.4646

IMPROVING METHODS FOR PLANT REGENERATION  
FROM CALLUS OF RICE CV. RD23

Miss Sudarat Nitiwatana

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science

Department of Botany

Graduate School

Chulalongkorn University

1995

ISBN 974-582-109-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์      การปรับปรุงวิธีการทำให้ เกิดต้นใหม่จากแคลลัสข้าวพันธุ์ กข. 23  
โดย                              นางสาวสุดารัตน์ นิตีวัฒน์  
ภาควิชา                              พฤกษศาสตร์  
อาจารย์ที่ปรึกษา              ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชรารักษ์  
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม      รองศาสตราจารย์มนตรี กานติ วัชรารักษ์



บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

*[Signature]*  
..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ อุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

*[Signature]*  
..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา บุญ-หลง)

*[Signature]*  
..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชรารักษ์)

*[Signature]*  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(รองศาสตราจารย์มนตรี กานติ วัชรารักษ์)

*[Signature]*  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เตือนใจ ไร่สกุล)



สตาร์ตัน นิติวัดณะ : การปรับปรุงวิธีการทำให้เกิดต้นใหม่จากแคลลัสข้าวพันธุ์ กข.23  
(IMPROVING METHODS FOR PLANT REGENERATION FROM CALLUS OF  
RICE CV. RD23) อ. ที่ปรึกษา : ศ.ดร. ถาวร วัชรากัญ รศ. มณฑกานติ วัชรากัญ, 83  
หน้า. ISBN 974-582-109-8

การปรับปรุงวิธีการทำให้เกิดต้นใหม่จากแคลลัสข้าวพันธุ์ กข.23 โดยศึกษาการใช้สาร  
อินทรีย์เสริมในสูตรอาหาร 2 ระยะคือ สูตรอาหารชักนำแคลลัส และสูตรชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่  
จากผลการทดลองพบว่า การใช้เนื้อมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าวอ่อน 100 มิลลิลิตรต่อ  
ลิตร ในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตรดัดแปลง MN6 (1988) ที่เติม 2,4-D 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP  
0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 32 กรัมต่อลิตร และวุ้นผง 8 กรัมต่อลิตร แคลลัสที่ได้เมื่อนำไป  
เลี้ยงในสูตรชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ต่อไปจะให้จำนวนหน่อดีที่สุด

สูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ที่ดีที่สุดคือ สูตรที่ใช้เนื้อมะเขือเทศ 150 กรัมต่อลิตร  
หรือ เนื้อมะเขือเทศ 150 กรัมต่อลิตร ร่วมกับนํ้าปลาสูตร 5-2-2 2.0 มิลลิลิตรต่อลิตร ในสูตรดัดแปลง  
MN6 ที่เติม NAA 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 6.4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 16 กรัมต่อลิตร และ  
วุ้นผง 16 กรัมต่อลิตร แคลลัสที่เจริญไปเป็นหน่อมีสูงถึง 42.9 เปอร์เซ็นต์ ยิ่งกว่านั้นการค้นพบนี้ยัง  
สามารถลดขั้นตอนการเลี้ยงแคลลัสข้าว กข.23 ให้เกิดเป็นหน่อจากเดิมที่ใช้สองขั้นตอนเหลือเพียงขั้น  
ตอนเดียว และลดเวลาจากเดิม 9 สัปดาห์ เหลือเป็น 6 สัปดาห์ นับตั้งแต่ชักนำแคลลัสจากเอ็มบริโอที่  
เจริญเต็มที่ของข้าวจนกระทั่งเกิดหน่อที่มีความสูง 0.5 เซนติเมตร ขึ้นไป

นอกจากนี้ ได้ศึกษาปัจจัยอื่น เช่นการใช้ gelrite แทนวุ้นผง ซึ่งให้ผลคล้ายกัน แต่การใช้  
แป้งข้าวโพดแทนวุ้น ให้ผลไม่เป็นที่พอใจ เมื่อเปรียบเทียบภาชนะที่ใช้เลี้ยงแคลลัสระหว่างการใส่  
Petri dish ขนาด 100 x 15 มิลลิเมตร ปิดด้วย parafilm กับขวดแก้วกลมขนาด 40 x 75 มิลลิเมตร  
พร้อมฝาพลาสติกสีขาวแบบเกลียว ให้ผลไม่แตกต่างกัน

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์.....  
สาขาวิชา.....พฤกษศาสตร์.....  
ปีการศึกษา.....2537.....

ลายมือชื่อนิติต.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



## C 325522; MAJOR BOTANY

KEY WORD: ORGANIC ADDITIVE / PLANT REGENERATION / SOLIDIFYING AGENT / TISSUE CULTURE

SUDARAT NITIWATANA : IMPROVING METHODS FOR PLANT REGENERATION FROM CALLUS OF RICE CV. RD23. THESIS ADVISORS : PROF. THAVORN VAJRABHAYA, Ph.D. ASSO. PROF. MONTAKAN VAJRABHAYA 83 pp. ISBN 974-582-109-8

The improvement of plant regeneration from callus of RD23 rice cultivar by adding organic additives in the media was studied. The callus induction and plant regeneration media were studied separately. The results showed best callus induction were on the medium containing 100 g/l potato homogenate and 100 ml/l coconut water in the modified MN<sub>6</sub> (1988) with 0.8 mg/l 2,4-D, 0.4 mg/l BAP, 32 g/l sucrose, and 8 g/l agar powder. The calli transferred from this medium onto the regeneration medium produced more shoots than those from other callus induction media.

The best plant regeneration medium was the one with either adding 150 g/l tomato homogenate or 150 g/l tomato homogenate combined with 2 ml/l 5-2-2 fish fertilizer to the modified MN<sub>6</sub> with 0.8 mg/l BAP, 6.4 mg/l BAP, 16 g/l sucrose, and 16 g/l agar powder. These enabled 42.9 percent of calli to produced shoots. Moreover, from this finding it was possible to change the former practice of two step regeneration method for RD23, a difficult cultivar, down to one step. Thus, the duration of culture was reduced from nine to six weeks (starting from embryo callus to 0.5 cm shoot length).

The experiments on replacing agar with gelrite in regeneration media showed similar results, but the corn starch gave unsatisfactory results. The comparison between 100 x 15 mm Petri dishes sealed with parafilm and 40 x 75 mm cylindrical shaped bottles with white plastic screw cap produced no different results.

ภาควิชา..... BOTANY

สาขาวิชา..... BOTANY

ปีการศึกษา..... 2537

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงอย่างสมบูรณ์ด้วยความกรุณาช่วยเหลือเป็นอย่างดีจาก ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชรภักย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์มนตรี วัชรภักย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดระยะเวลาของการวิจัย ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา บุญ-หลง และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เตือนใจ รัตสกุล ที่ช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ทวีศักดิ์ บุญเกิด อาจารย์ทรงศักดิ์ สารานุกรมสุขคุณประทีป มีศิลป์ ที่ได้ช่วยกรุณาให้ความรู้เกี่ยวกับโปรแกรมคอมพิวเตอร์ และช่วยในการถ่ายภาพ ขอขอบพระคุณ อาจารย์ประจำภาควิชาพฤกษศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ทุกคน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณ คณะกรรมการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (กพวท) และบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ทุนการศึกษาและทุนสนับสนุนการวิจัย

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ สาขาเทคโนโลยีทางชีวภาพและพฤกษศาสตร์ทุกคน ที่ให้กำลังใจและความช่วยเหลือด้านต่างๆ

สุดท้ายนี้ผู้เขียนขออุทิศความดีของวิทยานิพนธ์เล่มนี้แด่ คุณพ่อสุริยาชัยวัฒน์ นิติวัดณะ ที่ได้ล่วงลับไปแล้ว และคุณแม่ และน้องชาย ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจเสมอมา

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	องค์ประกอบของสูตรอาหารทดลองต่างๆ..... 12
2	ความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่าง NAA และ BAP กับสารอินทรีย์เสริม (หมายเลข 1-16 คือ สูตรอาหารที่ต่างกัน)..... 19
3	ชนิดและปริมาณสารอินทรีย์เสริมในสูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส และสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ (หมายเลข 1-28 คือ สูตรอาหารที่ต่างกัน) 23
4	ผลของ NAA และ BAP ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ที่มีต่อจำนวนแคลลัสที่เกิด greenspot จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อ และจำนวนหน่อที่เกิดทั้งหมด..... 28
5	ผลของ 2,4-D และ BAP ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ที่มีต่อจำนวนแคลลัสที่เกิด greenspot จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อ และจำนวนหน่อที่เกิดทั้งหมด..... 29
6	ผลของการเติมสารอินทรีย์เสริมต่างๆ ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ที่มีต่อจำนวนแคลลัสที่เกิด greenspot จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อ และจำนวนหน่อที่เกิดทั้งหมด..... 31
7	ผลของ NAA กับ BAP และการเติมสารอินทรีย์เสริม ในอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ สูตร B ที่มีต่อจำนวนแคลลัสที่เกิด greenspot จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อ และจำนวนหน่อที่เกิดทั้งหมด..... 32
8	ผลของภาวะที่เลี้ยงแคลลัส ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ที่เติมน้ำสกัดมันฝรั่งหรือเนื้อมะเขือเทศสุก ที่มีต่อจำนวนแคลลัสที่เกิด greenspot จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อ และจำนวนหน่อที่เกิดทั้งหมด..... 35
9	ผลของ NAA และ BAP ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ สูตรที่ 2 ที่มีต่อจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อ และจำนวนหน่อที่เกิดทั้งหมด..... 36

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
10	ผลของการเติมสารอินทรีย์เสริมต่าง ๆ แทนน้ำสกัดมันฝรั่งในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตร A ที่มีต่อจำนวนแคลลัสที่เกิด greenspot จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อ และจำนวนหน่อที่เกิดทั้งหมด ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดขึ้นใหม่ สูตร B ที่มี NAA 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมสารอินทรีย์เสริมต่างกัน.....	38
11	ผลของ NAA และ BAP ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดขึ้นใหม่ สูตร B ที่เติมน้ำสกัดมันฝรั่ง 150 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อจำนวนแคลลัสที่เกิด greenspot จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อ และจำนวนหน่อที่เกิดทั้งหมด.....	40
12	ผลของ NAA และ BAP ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดขึ้นใหม่ สูตร B ที่เติมน้ำมะเขือเทศ 150 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อจำนวนแคลลัสที่เกิด greenspot จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อ และจำนวนหน่อที่เกิดทั้งหมด.....	41
13	ผลของ NAA และ BAP ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดขึ้นใหม่ สูตร B ที่เติมน้ำสกัดมันฝรั่งร่วมกับน้ำมะเขือเทศ อย่างละ 75 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อจำนวนแคลลัสที่เกิด greenspot จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อ และจำนวนหน่อที่เกิดหน่อทั้งหมด.....	42
14	ผลของการเติมยูปลาที่ความเข้มข้นต่างกันในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดขึ้นใหม่ ที่เติมสารอินทรีย์เสริมต่างกัน ที่มีต่อจำนวนแคลลัสที่เกิด greenspot จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อ และจำนวนหน่อที่เกิดทั้งหมด.....	45
15	ผลของ gelrite และน้ำตาลซูโครส ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดขึ้นใหม่ ที่มีต่อจำนวนแคลลัสที่เกิด greenspot จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อ และจำนวนหน่อที่เกิดทั้งหมด.....	46
16	ผลของแป้งข้าวโพด และน้ำตาลซูโครส ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดขึ้นใหม่ ที่มีต่อจำนวนแคลลัสที่เกิด greenspot จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อ และจำนวนหน่อที่เกิดทั้งหมด.....	47



สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว.....	17
2 การเปรียบเทียบภาวะที่เลี้ยงแคล์สระหว่างขวดแก้วกลมขนาด 40 x 75 มิลลิเมตร และ Petri dish ขนาด 100 x 15 มิลลิเมตร.....	21
3 ลักษณะของการชักนำแคล์สข้าว กข.23 ให้เจริญเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่..	27
4 การเกิดเป็นหน่อในอาหารที่เติมสารอินทรีย์เสริมในสูตรอาหารชักนำแคล์ส ให้เกิดต้นใหม่.....	33
5 การเจริญของ greensepot หน่อและต้นที่มี NAA 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 6.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเติมสารอินทรีย์เสริมต่างกันหลังจากเลี้ยง 3 สัปดาห์.....	43



คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxy acetic acid
NAA	=	$\alpha$ -naphthaleneacetic acid
BAP	=	6-benzylaminopurine
FE	=	fish emulsion fertilizer
coconut water	=	น้ำมะพร้าวอ่อนที่มีเนื้อหนา 3.0 มิลลิเมตร
potato extract	=	น้ำสกัดมันฝรั่ง
potato homogenate	=	เนื้อมันฝรั่ง
tomato homogenate	=	เนื้อมะเขือเทศ



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ญ
<b>บทที่</b>	
1. บทนำ.....	1
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.....	11
3. ผลการทดลอง.....	26
4. วิเคราะห์ผลการทดลอง.....	48
5. สรุปผลการทดลอง.....	62
รายการอ้างอิง.....	64
ภาคผนวก.....	73
ประวัติผู้เขียน.....	83