บทที่ 1

บทนำ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พันธุ์ข้าวเจ้า กข 21 เป็นข้าวเจ้าที่มีคุณภาพการหุงต้มที่ดี เนื่องจากเป็นข้าวที่มีปริมาณอมิโลสต่ำ โดยที่ข้าวสารเมื่อหุงสุกจะมีลักษณะนุ่มเหนียว รสชาติคล้ายกับข้าวญี่ปุ่น จึงเป็นที่คาดหวังกันว่าจะเป็นพันธุ์ข้าวที่มีศักยภาพในการส่งออกไปขายยังตลาดข้าวประเทศญี่ปุ่น อย่างไรก็ตาม แม้ว่าข้าวเจ้าพันธุ์ กข 21 จะมีความดีเด่นในด้านการหุงต้ม แต่มีปัญหาในด้านของความต้านทานต่อแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ซึ่งเป็นแมลงศัตรูที่ระบาดทำความเสียหายต่อการปลูกข้าวเป็นประจำ ในหลายท้องที่ของประเทศ ซึ่งนอกจากทำความเสียหายแก่ต้นข้าวโดยตรงแล้วยังเป็นพาหะนำโรคข้าวที่เกิดจากเชื้อไวรัส ได้แก่ โรคใบหงิก และโรคเขียวเตี้ย (วัชระ ภูรีวิโรจน์กุล, 2534) โดยพบว่าข้าวพันธุ์นี้ค่อนข้างอ่อนแอต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

การใช้พันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล นับเป็นวิธีการที่ดีวิธีหนึ่ง เนื่องจากสะดวก ประหยัด และไม่มีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม ซึ่งแต่เดิมการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยการผสมพันธุ์และปลูกทดสอบคัดเลือกจะต้องใช้เวลาอย่างน้อย 6-8 ชั่วอายุ (generation) จึงจะได้ต้นข้าวมีความคงตัวทางพันธุกรรม (homozygosity) จะเห็นได้ว่าแม้จะเป็นวิธีการที่ดี เนื่องจากทำได้เป็นจำนวนมาก และต้นข้าวที่ได้สามารถคัดเลือกลักษณะต่างๆได้ในแต่ละชั่วอายุ แต่วิธีการดังกล่าวจะต้องใช้เวลาค่อนข้างยาวนานกว่าจะได้ต้นข้าวที่มี ความคงตัวทางพันธุกรรม

การใช้เทคนิคการเลี้ยงอับเรณู (anther culture) เป็นเทคนิคหนึ่งที่ช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้ในเวลาอันรวดเร็ว ซึ่งเทคนิคนี้สามารถเลี้ยง haploid cell ที่เกิดจากการแบ่งตัวแบบไมโอซีส (meiosis) ของไมโครสปอร์โรไซต์ (microsporocyte) ได้ไมโครสปอร์ (microspore) ไมโครสปอร์นี้สามารถเจริญเป็นแคลลัส และพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ โดยมีโอกาสเพิ่มจำนวนเป็น diploid ได้เอง (spontaneous chromosome doubling) ซึ่งมีผลทำให้ยีนทุกตำแหน่งเป็น homozygous จึงสามารถสร้างสายพันธุ์แท้

ได้ภายใน 1 ชั่วอายุ โดยที่สายพันธุ์แท้ที่ได้จะประกอบไปด้วยพันธุกรรมรูปแบบต่างๆ จากทั้งพ่อและแม่ และไม่มีการกระจายตัวอีก (fixed recombination) (Raina, 1989) ดังนั้นเทคนิคนี้ จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ได้ภายในเวลาอันรวดเร็ว

การศึกษาครั้งนี้จึงได้ใช้พันธุ์ข้าวสุพรรณบุรี90 (สพ 90) ที่ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ผสมกับพันธุ์ กข 21 ที่มีคุณภาพการหุงต้มดี แต่ไม่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดยทำการผสมแบบสลับพ่อแม่ (reciprocal cross) นำพันธุ์ผสมชั่วที่ 1 (F_1) ที่ได้มาสร้างสายพันธุ์แท้ ที่มีความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลโดยการเลี้ยบอับเรณู การวิจัยนี้นับเป็นงานวิจัยหนึ่งที่ต้องการนำเอาประโยชน์ของเทคนิคการเลี้ยงอับเรณูเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าว

วัตถุประสงค์

ศึกษาเทคนิคการเลี้ยงอับเรณูข้าว และเพื่อสร้างสายพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดยใช้เทคนิคการเลี้ยงอับเรณูจากข้าวพันธุ์ผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง กข 21 และ สพ 90

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีการเลี้ยงอับเรณูเพื่อสร้างต้น double haploid ซึ่งเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ภายใน 1 ชั่วอายุ

2. ได้ข้าวสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติคล้ายพันธุ์ข้าว กข 21 แต่มีความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเช่นเดียวกับพันธุ์ข้าว สพ 90 อย่างน้อยหนึ่งสายพันธุ์

ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาหาเทคนิคการเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ผสมระหว่าง กข 21 และ สพ 90

2. ศึกษาความแปรปรวนทางการเกษตรของต้น ที่ได้จากการเลี้ยงอับเรณู (A_0)

3. เมื่อได้ต้นที่พัฒนามาจากการเลี้ยงอับเรณู (A_0) แล้วปลูกต้น A_0 และเก็บเมล็ด A_1 (ลูก A_0) มาศึกษาหาความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

4. คัดเลือกต้นที่ต้องการและเก็บเมล็ด (A_2) เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

การตรวจเอกสาร

ข้าวจัดเป็นพืชอยู่ในวงศ์ Poaceae มีลำต้นเป็นไม้เนื้ออ่อน (herbaceous or non-woody plant) และส่วนใหญ่เป็นพืชหญ้าล้มลุกที่มีอายุอยู่ได้เพียงปีเดียว เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และมีรากเป็นระบบรากฝอย อยู่ในสกุล *Oryza* เจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อน พืชในสกุลนี้มีทั้งหมด 22 ชนิด ประกอบด้วยข้าวป่า (wild rice) 20 ชนิด และ ข้าวปลูก 2 ชนิด คือข้าวปลูกเอเชีย (*Oryza sativa* L.) ปลูกได้ใน เอเชีย แอฟริกา อเมริกาใต้ ยุโรป และออสเตรเลีย และข้าวปลูกแอฟริกา (*Oryza glaberrima* Steud.) ปลูกได้เฉพาะทางด้านตะวันตกของแอฟริกาเท่านั้น (ประพาส วีระแพทย์, 2526) สำหรับข้าวปลูกทั้งสองชนิดเป็นพืชดิพลอยด์ (diploid) มีจำนวนโครโมโซม 2n=24 (จำรัส โปร่งศิริวัฒนา , 2534)

ข้าวปลูกเอเชีย แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม โดยอาศัยความแตกต่างของลักษณะภายนอกของต้น เมล็ด และการแพร่กระจายไปตามแหล่งปลูก กลุ่มแรกเป็นข้าวจาโปนิกา (japonica) ซึ่งเป็นข้าวที่มีลักษณะต้นเตี้ย ใบแคบ สีเขียวแก่ เมล็ดสั้นกลม ร่วงยาก ปลูกในประเทศ ญี่ปุ่น เกาหลี และตอนเหนือของประเทศจีน ตลอดจนในเขตอบอุ่น กลุ่มที่สองเป็นข้าวอินดิกา (indica) มีลักษณะต้นสูง เมล็ดยาว ค่อนข้างแบน ปลูกในเขตร้อน เช่น อินเดีย ไทย ศรีลังกา บังคลาเทศ และฟิลิปปินส์ ส่วนกลุ่มที่สาม คือ ข้าวจาวานิกา (javanica) เป็นข้าวที่มีลักษณะต้นสูง ใบกว้าง สีเขียวอ่อน เมล็ดป้อมใหญ่ พบในประเทศอินโดนิเซีย เท่านั้น อย่างไรก็ตามแหล่งที่ปลูกข้าวกันมากในโลกนี้ อยู่ระหว่างเส้นรุ้งที่ 50 องศาเหนือ ถึง 35 องศาใต้ จากระดับน้ำทะเลถึงความสูง 2,500 เมตร ทั้งในดินกรดและดินเค็ม และเป็นพืชผสมตัวเอง (self pollination) มีการผสมข้าม (cross pollination) เพียง 0.5-5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น (ประพาส วีระแพทย์, 2526)

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยการเลี้ยงอับเรณู

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการเลี้ยงอับเรณูเพื่อผลิตต้น double haploid เป็นเทคโนโลยีสมัยใหม่ที่นิยมกันมากในปัจจุบัน เทคโนโลยีการเลี้ยงอับเรณูนี้นอกจากจะลดระยะเวลาในการคัดเลือกสายพันธุ์บริสุทธิ์ (pure line) แล้วยังมีโอกาสได้ลักษณะใหม่ๆ เกิด

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เพิ่มขึ้นด้วย การเลี้ยงอับเรณูข้าวโดยนำพันธุ์ผสมชั่วที่ 1 (F_1) มาเลี้ยง ซึ่งสามารถผลิตสายพันธุ์ใหม่ที่มีความคงตัวทางพันธุกรรม (homozygosity) ภายในชั่วอายุเดียว ซึ่งถ้าใช้วิธีการปกติ (conventional breeding) จะต้องใช้เวลา 7-8 ชั่วอายุ (Hu, 1985 และ Chung, 1988)

การเลี้ยงอับเรณู (Anther Culture)

พืชแรกที่ประสบความสำเร็จในการผลิต haploid โดยการเลี้ยงอับเรณูคือ ***Datura inmoxia*** โดย Guha และ Maheshwari ในปี 1964 ซึ่งต่อมา Niizeki และ Oono ในปี 1968 ได้นำเทคนิคนี้มาใช้กับข้าว และประสบความสำเร็จ จากนั้นนักวิทยาศาสตร์กลุ่มอื่นจึงได้นำไปศึกษากับยาสูบ เช่น Bourgin และ Nitsch ในฝรั่งเศส Nakata และ Tanaga ในญี่ปุ่น ต่อมาห้องปฏิบัติการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทั่วโลกจึงเริ่มงานวิจัยกับพืชอื่นๆ อีกเป็นจำนวนมาก (Niizeki, 1983)

การเลี้ยงอับเรณูข้าว เป็นเทคนิคการเลี้ยงไมโครสปอร์ (microspore) ในระยะที่มีหนึ่งนิวเคลียส (uninucleate cell) ไมโครสปอร์ เหล่านี้ มีโครโมโซมชุดเดียว โดยการชักนำอับเรณูเหล่านี้ให้เกิดการแบ่งเซลล์เป็น haploid callus จากนั้นก็พัฒนาให้เกิดเป็นต้น ซึ่งอาจมีจำนวนชุดโครโมโซมเป็นชุดเดียว (haploid) หรือสองชุด (double haploid) วิธีการนี้จะได้ต้นพืชที่มีชุดโครโมโซมเป็น homozygous double haploid (Raina, 1989)

สำหรับเทคนิคการเลี้ยงอับเรณูข้าวนี้ Niizeki and Oono (1968) รายงานว่าสามารถเลี้ยงอับเรณูข้าวกลุ่มจาโปนิกาได้สำเร็จ โดยใช้อาหารสูตร Blaydes ที่เติม NAA kinetin และ yeast extract แต่อัตราการเกิดต้นยังต่ำมาก ต่อมา Chu คณะ (1978) ได้พัฒนาอาหารสูตร N_6 ที่เหมาะต่อการเลี้ยงอับเรณูข้าว ซึ่งการค้นพบสูตรอาหารในครั้งนี้ส่งผลให้มีการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับการเลี้ยงอับเรณูข้าวและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเลี้ยงอับเรณูข้าวอย่างกว้างขวางมากขึ้น รวมทั้งได้มีการใช้เทคนิคการเลี้ยงอับเรณูเพื่อถ่ายทอดลักษณะความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูข้าว โดย Chung (1988) ได้เลี้ยงอับเรณูข้าวที่ได้จากการผสมพันธุ์สามทางระหว่าง Samnam byeo/HR1702-65-3-4//Milyang 64

ได้เป็นพันธุ์ Milyang 90 ซึ่งแสดงความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลศัตรูข้าว ต่อมา Zhang และคณะ (1991) ได้ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคขอบใบแห้งโดยการเลี้ยงอับเรณูในข้าวพันธุ์ผสมชั่วที่ 1 พบว่า ต้นข้าวที่ได้จากการเลี้ยงอับเรณู H_2 ประกอบด้วยสายพันธุ์ต้านทาน 62.9 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์อ่อนแอ 32.7 เปอร์เซ็นต์ และสายพันธุ์กระจายตัว 4.5 เปอร์เซนต์ และพบว่าลักษณะต้านทานโรคขอบใบแห้งดังกล่าวสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้

ข้อได้เปรียบของการเลี้ยงอับเรณูคือ สามารถผลิตต้น double haploid ซึ่งเป็นพันธุ์แท้ซึ่งแสดงลักษณะต่างๆ ของยีนออกมา แม้ยีนที่ควบคุมลักษณะนั้นๆ จะเป็นยีนด้อยก็ตามซึ่งช่วยให้โครงการปรับปรุงพันธุ์ทำได้ในเวลาอันรวดเร็ว (Hakim et al., 1991)

จำนวนชุดโครโมโซมที่ได้จากการเลี้ยงอับเรณู

ในการเลี้ยงอับเรณูอาจได้ต้นข้าวที่มีโครโมโซมแตกต่างกันตั้งแต่ ชุดเดียว ถึง 5 ชุด Niizekii และ Oono (1968) รายงานว่าต้นข้าวที่ได้มีจำนวนโครโมโซมชุดเดียว และสองชุด ส่วน Oono(1981) รายงานว่าต้นข้าวจากการเลี้ยงอับเรณูมีทั้งต้น haploid diploid triploid และ aneuploid การที่ต้นที่ได้จากการเลี้ยงอับเรณูมีชุดของโครโมโซมแตกต่างกันขึ้นกับหลายปัจจัย ได้แก่ ระยะการพัฒนาของอับเรณูขณะที่นำมาเลี้ยง การให้ความเย็น (cold treatment) ก่อนเลี้ยง อาหารที่ใช้เลี้ยง ตลอดจนพันธุกรรม (Chung, 1988) จากรายงานต่าง ๆ สรุปได้ว่า การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของต้นข้าวที่ได้จากการเลี้ยงอับเรณูสามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ (spontaneous) มีประมาณตั้งแต่ 2 ถึง 60.7 เปอร์เซ็นต์ (Chung, 1988 ; Reifers and Freire, 1990 ; Rout and Sarma, 1991 ; Guiderdoni et al., 1992 ; Alemanno and Guiderdoni, 1994)

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเลี้ยงอับเรณูข้าว

ความสำเร็จในการเลี้ยงอับเรณูข้าวขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างซึ่งรวมทั้งพันธุกรรม สภาพแวดล้อมที่ปลูกของต้นที่ให้อับเรณู ระยะการเจริญของอับเรณู การให้ความเย็นก่อนการเลี้ยง และอาหารที่ใช้เลี้ยง

1. พันธุกรรม

พันธุกรรมนับเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการเลี้ยงอับเรณูข้าวซึ่งจากการทดลองที่ผ่านมาพบว่าไม่เพียงแต่พันธุกรรมของข้าวแต่ละกลุ่มที่อยู่ในสกุลเดียวกันเท่านั้น ที่ตอบสนองต่อการเลี้ยงแตกต่างกัน แต่ยังพบว่าพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวแต่ละพันธุ์ในกลุ่มเดียวกัน ก็ตอบสนองต่อการเลี้ยงแตกต่างกันด้วยเช่นกัน โดยทั่วไปแล้วข้าวกลุ่มจาโปนิกาตอบสนองได้ดีกว่าข้าวกลุ่มอินดิกา (Karim et al., 1985 ; Chung, 1988 ; Guiderdoni et al., 1989 ; Zhu Deyao and Pan Xigan 1990 ; Hakim et al., 1991 ; และ Ayres et al., 1995)

สำหรับการเลี้ยงอับเรณูข้าวแอฟริกา *O. glaberrima* Woo and Huang (1980) พบว่า มีอัตราการเกิดแคลลัส 43 เปอร์เซ็นต์ และลดลงเป็น 3-5 เปอร์เซ็นต์ในพันธุ์ผสมระหว่าง *O. glaberrima* กับ *O. sativa* แต่จำนวนต้นข้าวที่ได้ไม่แตกต่างจากการเลี้ยงอับเรณูของข้าว *O. glaberrima* คือ 16-72 เปอร์เซ็นต์

Miah และคณะ ในปี 1985 รายงานว่า ความสามารถในการชักนำให้เกิดแคลลัสนั้นควบคุมโดย recessive gene ซึ่งเกิดจากบล๊อกเดียว (single block) ของยีน และพบว่าในกลุ่มจาโปนิกาชักนำแคลลัสได้ดีกว่าอินดิกา (อ้างถึงโดย Raina, 1989) ซึ่งตรงกับรายงานของ Ibrahim (1994) ที่รายงานว่า การเลี้ยงอับเรณูในข้าวกลุ่มจาโปนิกา ให้อัตราการเกิดแคลลัสสูงกว่าข้าวกลุ่มอินดิกา และพันธุ์ผสมชั่วที่ 1 ระหว่างข้าวจาโปนิกากับอินดิกา และความสามารถในการเกิดแคลลัส ระหว่างพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่ และลูกผสม ขึ้นอยู่กับสมรรถนะในการผสมของพ่อแม่ (combining ability) และความสามารถในการ

ถ่ายทอดทางพันธุกรรม ส่วน Quimio and Zapata (1990) ได้ศึกษาถึงอิทธิพลของลักษณะทางพันธุกรรมที่มีผลต่อการเกิดแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้นข้าว พบว่าความสามารถในการเกิดแคลลัสขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรม และปฏิกิริยาระหว่างพันธุกรรมและสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง ส่วนความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นข้าว ขึ้นกับลักษณะทางพันธุกรรม และระดับความเข้มข้นของ abscisic acid (ABA) ในอาหารโดยไม่ขึ้นกับองค์ประกอบของโซโตพลาสซึมของต้นแม่ ซึ่งการเกิดแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้นข้าวนี้ ถูกควบคุมด้วยยีนด้อยมากกว่า 1 คู่ และความสามารถในการชักนำให้เกิดแคลลัสกับการพัฒนาให้เกิดต้นเขียวอาจจะควบคุมโดยยีนชุดเดียวกันก็ได้ Juqiang และคณะ (1996) พบว่าการชักนำให้เกิดแคลลัส มีผลมาจากอิทธิพลมาจากผลบวกทางพันธุกรรม (additive effects) โดยไม่มีอิทธิพลทางแม่ (maternal effects) เข้ามาเกี่ยวข้อง ส่วนการพัฒนาไปเป็นต้นจะมีอิทธิพลทางแม่ Chen and Chen (1993) รายงานว่าความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะการเกิดแคลลัสเกิดจากความแปรปรวนของปฏิกิริยาผลบวกของยีนซึ่งมีอิทธิพลมากที่สุดและความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะการพัฒนาเป็นต้นข้าวเกิดจากการข่มของยีนในตำแหน่งเดียวกันมากกว่าความแปรปรวนของปฏิกิริยาของยีนแบบผลบวก และนอกจากนี้ ความแปรปรวนจากสิ่งแวดล้อมมีอิทธิพลต่อความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะการเกิดแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้นข้าวด้วย แต่ไม่พบอิทธิพลต่อความแปรปรวนเนื่องจากปฏิกิริยาของการข่มของยีนต่างตำแหน่ง

Ouyang และคณะ (1983) ได้กล่าวถึงลักษณะทางพันธุกรรมที่มีผลต่อการเลี้ยงอับเรณูในข้าวสาลีว่า การตอบสนองต่อการเลี้ยงอับเรณูไปเป็นแคลลัส และพัฒนาเป็นต้นข้าวนั้น ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่และสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ แต่ประสิทธิภาพในการถ่ายทอดลักษณะการตอบสนองต่อการเลี้ยงอับเรณูของรุ่นลูก จะขึ้นอยู่กับส่วนของไซโตพลาสซึมของต้นแม่ ส่วนเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจะขึ้นอยู่กับพันธุกรรม

2. สภาพแวดล้อมที่ปลูกต้นที่ให้อับเรณู (Dornor plant)

ผลผลิตของการเลี้ยงอับเรณูมีความแตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่ปลูกต้นที่จะให้อับเรณู (Zhang (1989) ได้ศึกษาถึงผลของการเลี้ยงอับเรณูเมื่อปลูกต้นที่จะให้อับเรณูในสภาพที่มีปุ๋ยไนโตรเจนและความเข้มของแสงต่างๆ กัน พบว่าถ้าอับเรณูมาจากต้นที่ปลูกในที่มีธาตุไนโตรเจนสูง การเกิดแคลลัส และการพัฒนาแคลลัสให้เป็นต้นสีเขียวจะมีมาก ในขณะเดียวกันถ้าปลูกต้นที่ให้อับเรณูในที่มีแสงน้อย การเกิดแคลลัสจะน้อยตาม Raina (1989) ได้อ้างถึงงานของ Hu และคณะ ในปี 1978 ซึ่งพบว่าอุณหภูมิและแสงแดดระหว่างที่ข้าวออกดอกมีผลชัดเจนต่อความสำเร็จในการเลี้ยงอับเรณูมาก เช่นถ้าปลูกต้นที่ให้อับเรณู อยู่ในอุณหภูมิต่ำ (16-18°C) และมีเมฆมาก หรืออุณหภูมิสูง (26-30°C) การเกิดแคลลัสมีน้อย

อย่างไรก็ดีสำหรับข้าวอินดิกาซึ่งปลูกในเขตร้อนนั้นสภาพทางสรีระวิทยาของต้นที่ให้อับเรณูอาจต่างออกไปได้ ตัวอย่างในข้าว Basmati 370 นั้น ต้นข้าวที่ปลูกที่อุณหภูมิ 23.3-34.2 องศาเซลเซียส จะให้ผลดีกว่า Zhang (1989) รายงานว่า ต้นข้าวที่ปลูกในไร่นาให้ผลตอบสนองต่อการเลี้ยงอับเรณูดีกว่าต้นข้าวที่ปลูกในกระถาง

3. ระยะการเจริญของอับเรณู

ในการเลี้ยงอับเรณูของข้าวนั้นพบว่าความสำเร็จขึ้นกับช่วงการเจริญของอับเรณูเป็นอย่างมาก นักวิทยาศาสตร์หลายท่านรายงานตรงกันว่า ระยะของอับเรณูที่มีไมโครสปอร์ในระยะนิวเคลียสเดียวช่วงกลางถึงช่วงปลายเป็นช่วงที่ให้ผลดีที่สุด (mid to late uninucleate stage) (Reinert and Bajaj, 1976 ; Genovesi and Magill, 1979 ; และ Raina. 1989) นักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างระยะของอับเรณูและความยาวจากข้อใบธงถึงข้อของใบที่ถัดลง พบว่ามีความสำคัญคือ ระยะของอับเรณูที่เหมาะสมนี้ต้นข้าวมีความยาวระหว่างข้อของใบธงถึงข้อของใบที่ถัดลงมาประมาณ 4 - 8 เซนติเมตร ซึ่งระยะดังกล่าวการพัฒนาของไมโครสปอร์จะอยู่ในระยะกลาง และช่วงแรกของระยะ binucleate (Zapata et al ., 1983)

Chung (1988) ได้นำไมโครสปอร์ ในระยะแรก ระยะกลาง และ ระยะปลาย มาเลี้ยง พบว่าไมโครสปอร์ในระยะกลางจะเกิดแคลลัสได้จำนวนมากที่สุด แต่ไมโครสปอร์ในระยะปลายจะมีต้นเขียวลดลง และจะเกิดต้นเผือกจำนวนมากขึ้น Ayres และคณะ (1995) แนะนำว่าไมโครสปอร์ที่เหมาะสมในการเลี้ยง อยู่ในระยะแรกถึงระยะกลาง Mercy and Zapata (1987) พบว่า ระยะการพัฒนาของไมโครสปอร์ในระยะที่มีนิวเคลียสเดียวให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสดีที่สุด สำหรับ Reiffers and Freire (1990) พบว่าระยะของไมโครสปอร์ที่เหมาะสมแก่การเลี้ยงอับเรณู ของข้าวพันธุ์ผสม ระหว่างจาโปนิกากับอินดิกา คือระยะที่มีไมโครสปอร์อยู่ในระยะกลาง ซึ่งระยะนี้จะมีข้อของใบธงถึงข้อของใบที่ถัดลงมา 3-6 เซนติเมตร

ระยะการพัฒนาของละอองเรณู เริ่มจาก microspore mather cell มีระยะต่างๆ Sunderland and Dunwell (1977) และ Nitsch (1983) ดังนี้

1. ระยะ tetrad เป็นระยะที่ไมโครสปอร์ 4 เซลล์ อยู่ติดกัน เกิดจากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสของไมโครสปอร์โรไซต์

2. ระยะ early uninucleate เป็นระยะที่ผนังชั้นนอก (exine) และผนังชั้นใน (intine) เริ่มปรากฏและมองเห็นช่อง ได้ชัดเจน นิวเคลียสมีขนาดเล็กบริเวณกลางเซลล์ มีไซโตพลาสซึม แต่ไม่มีแวคคิวโอล

3. ระยะ mid uninucleate เป็นระยะที่แวคคิวโอล เริ่มขยายใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ แล้วค่อยๆดันนิวเคลียสจากบริเวณกลางเซลล์ให้เคลื่อนไปทางด้านข้างของเยื่อหุ้มเซลล์ นิวเคลียสมีขนาดใหญ่และเข้มข้นขึ้น นิวคลีโอลัส ยังมีขนาดเล็ก

4. ระยะ late uninucleate เป็นระยะที่แวคคิวโอลปรากฏขนาดใหญ่ชัดเจน และดันนิวเคลียสไปจนชิดขอบเยื่อหุ้มเซลล์ นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ นิวคลีโอลัสขยายใหญ่ขึ้น

5. ระยะ binucleate ระยะนี้นิวเคลียส ของไมโครสปอร์แบ่งตัวแบบไมโตซีสแล้ว ได้เป็น 2 นิวเคลียส ประกอบด้วย vegetative nucleus และ generative nucleus ซึ่งช่วงนี้เป็นช่วงที่ไมโครสปอร์พัฒนาไปเป็น male gametophyte (pollen) แล้ว

Raina (1989) ได้สรุปถึงผลของการเลี้ยงอับเรณูในระยะต่าง ๆ ดังนี้

1. อับเรณูในระยะ tetrad ไม่ตอบสนองต่อการเลี้ยงเลย
2. อับเรณูในระยะ early uninucleate จะตอบสนองต่อการเลี้ยงเพียงเล็กน้อย
3. อับเรณูในระยะ mid to late uninucleate จะตอบสนองต่อการเลี้ยงดีที่สุด
4. อับเรณูในระยะ binucleate จะไม่ตอบสนองต่อการเลี้ยง

4. การให้ความเย็นก่อนเลี้ยง (Cold pretreatment)

ปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งในการเลี้ยงอับเรณูข้าวคือการให้ความเย็นแก่อับเรณูก่อนเลี้ยง โดยพบว่าสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการเลี้ยงอับเรณูให้สูงขึ้น ขั้นตอนนี้จึงสำคัญและจำเป็นในการเลี้ยงอับเรณูข้าว (Chung, 1988 และ Raina, 1989) การให้ความเย็นก่อนเลี้ยงนี้ มีวิธีการต่างๆและให้ผลต่างๆ กัน Genovesi and Magill (1979) นำช่อดอกข้าวจาโปนิกาผ่านความเย็นที่อุณหภูมิ 10-13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-14 วัน พบว่า สามารถเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด Chung (1988) พบว่าการเลี้ยงอับเรณูข้าวพันธุ์ Milyang 23 โดยนำช่อดอกข้าวผ่านความเย็นที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน จะให้ผลตอบสนองต่อการเลี้ยงได้ดีที่สุด ในขณะที่ Zapata และคณะ (1983) รายงานว่าการผ่านความเย็นที่ 8 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 วันสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 10.3 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับสภาพปกติที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสเพียง 5.3 เปอร์เซ็นต์

อย่างไรก็ดี Chung (1988) ได้สรุปว่า การให้ดอกข้าวผ่านความเย็น ที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 วัน นั้นมีประสิทธิภาพดีต่อการพัฒนาเป็นต้นสีเขียว แต่ถ้าใช้เวลามากกว่า 20 วัน อัตราของต้นเผือก (albino) จะสูงขึ้น

5. อาหารเลี้ยงอับเรณูข้าว

การชักนำให้อับเรณูเจริญเป็นแคลลัส จำเป็นต้องเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมระหว่างองค์ประกอบของสารอนินทรีย์ สารอินทรีย์ และสารควบคุมการเจริญ Chu (1978) รายงานว่าอาหารสูตร N_6 ให้ผลดีที่สุดในการชักนำให้อับเรณูสร้างแคลลัส และพบว่าอัตราการเจริญและการแบ่งเซลล์ของอับเรณูขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของสารอนินทรีย์ในอาหารสังเคราะห์ การดัดแปลงสูตรอาหาร N_6 ให้มีความเข้มข้นของ $(NH_4)_2 SO_4$ ลดลง แต่มีความเข้มข้นของ KNO_3 เพิ่มขึ้น ทำให้อับเรณูตอบสนองต่อการเลี้ยงได้ดีขึ้น Chu ได้อธิบายว่า สำหรับข้าวกลุ่มอินดิกามีความต้องการแอมโมเนียมต่างจากจาโปนิกา Raina (1989) ได้อ้างถึงงานของ Chen ที่รายงานในปี 1983 ซึ่งสรุปได้ว่าในข้าวจาโปนิกา ความเข้มข้นของ NH_4 ที่เหมาะสมคือ 7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนพันธุ์ผสมของจาโปนิกาและอินดิกานั้นคือ 4.76 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่ข้าวอินดิกาต้องการเพียง 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่านั้น ซึ่ง Chung (1988) ได้ศึกษาสูตรอาหารพื้นฐาน N_6 ดัดแปลง คือสูตร N_6Y_1 โดยลดความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีอยู่เดิม 463 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 231.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สูตรอาหารพื้นฐานนี้เหมาะต่อการชักนำให้อับเรณูข้าวให้สร้างแคลลัสได้ดีขึ้น และสามารถพัฒนาเป็นต้นได้สูงขึ้น Raina and Zapata 1993 (อ้างถึงโดย Raina, 1993) ได้ดัดแปลงสูตรอาหาร N_6 โดยไม่มีการใส่ $(NH4)_2 SO_4$ และเพิ่ม KNO_3 จาก 2830 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 3150 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถชักนำให้แคลลัสเกิดเป็นต้นได้สูงขึ้น

ความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่างออกซิน (Auxin) และไซโตไคนิน (Cytokinin) มีความสำคัญและมีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส และพัฒนาเป็นต้นข้าวได้เช่นกัน ซึ่งได้มีการศึกษาการใช้ ฮอร์โมนพืชหลายชนิดทั้งการใช้เดี่ยวๆ และใช้ร่วมกันในอัตราส่วนต่างๆ กัน Chen(1986) รายงานการใช้ 2,4-D (2,4 - dichlorophenoxy acetic acid) 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมในการชักนำให้อับเรณูสร้างแคลลัสและพัฒนาเป็นต้น และพบว่าความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เพิ่มขึ้นเป็น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรจะทำให้อัตราการเกิดแคลลัสของอับเรณูสูงขึ้น แต่การพัฒนาเป็นต้นสีเขียวจะลดลง และได้เสนอว่าการใช้

2,4-D ร่วมกับสารควบคุมการเจริญอื่น ๆ ในกลุ่มออกซิน หรือไซโตไคนิน จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยเฉพาะอย่างยิ่งใช้ไคเนติน (kinetin) ร่วมกับสารในกลุ่มออกซิน จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างแคลลัสของอับเรณูแล้วยังส่งผลให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นได้ดีกว่าอาหารที่ปราศจากไคเนติน Rout and Sarma (1991) ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้นพืชสีเขียวในการเลี้ยงอับเรณูของข้าวลูกผสม *O. sativa* x *O. rufipogon* โดยการเติม 2,4-D, NAA (1-naphthaleneacetic acid) และไคเนติน ในอาหารสองสูตร (Potato-2 และ N_6) ในอัตราส่วนต่างๆ กัน ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการชักนำแคลลัสและการพัฒนาไปเป็นต้นข้าวสีเขียวนั้นจะมีความถี่สูงสุดเมื่อเลือกใช้สารเร่งการเจริญในอัตราส่วนที่เหมาะสม กล่าวคือ 2,4-D และ NAA ที่ใช้นั้นมีผลเสริมกันในสูตรอาหารทั้งสองสูตรทั้งในการชักนำแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้นข้าวสีเขียว การชักนำแคลลัสเกิดได้ดีที่สุดในสูตร Potato-2 ที่เติม 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนติน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับข้าวกลุ่มอินดิกานั้น ถ้ามี 2,4-D และ NAA อยู่ในอาหารสูตรชักนำแคลลัสพบว่าอัตราการรอดชีวิตของเรณูที่กำลังแบ่งตัวจะเพิ่มขึ้น ในด้านการพัฒนาไปเป็นต้นข้าวสมบูรณ์ พบว่าในอาหารสูตร N_6 นั้นแม้จะมีต้นข้าวมากแต่ก็ได้ต้นที่เป็นต้นเผือกมากด้วยเช่นกัน ดังนั้นในการเลี้ยงอับเรณูข้าวนั้น การใช้ออกซินทั้งสองร่วมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสมในอาหารสูตร Potato-2 น่าจะให้ผลดีที่สุดทั้งการชักนำแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้นสีเขียว ยิ่งกว่านั้นยังพบว่าต้นที่พัฒนามาจากการเลี้ยงอับเรณูข้าวส่วนใหญ่เป็น spontaneous double haploid 60.7 เปอร์เซ็นต์ haploid 35.7 เปอร์เซ็นต์ polyploid 1.7 เปอร์เซ็นต์ และ aneuploid 1.7 เปอร์เซ็นต์

Quimio and Zapata (1990) ใช้อาหารสูตร E-24 ร่วมกับน้ำสกัดมะเขือเทศ 20 เปอร์เซ็นต์ 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP (6-benzylaminopurine) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงอับเรณูข้าวพันธุ์ Taipei 309 Taipei 177 Basmati 370 และ IR36 พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 32.58 31.66 1.30 และ 1.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อใช้อาหาร N_6 ร่วมกับ 2,4-D 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงอับเรณูข้าวพันธุ์ต่างๆ ดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ถึง 42.78 28.34 2.04 และ 0.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดแคลลัสได้ดีขึ้นในข้าวบางพันธุ์

ความสามารถในการชักนำแคลลัสและพัฒนาไปเป็นต้น นอกจากจะขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างลักษณะทางพันธุกรรม และสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง เพื่อให้เกิดแคลลัสแล้ว ยังขึ้นอยู่กับสูตรอาหารที่พัฒนาให้แคลลัสเกิดเป็นต้นได้ดีอีกด้วย Raina และคณะ (1989) พบว่าสูตรอาหาร MSN ที่เติม 2,4-D 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไคเนติน 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส (sucrose) 40 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากกว่าสูตร SK-1 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ เหมือน MSN แต่แคลลัสที่ได้จากสูตร SK-1 สามารถพัฒนาเป็นต้นได้มากกว่าสูตร MSN ซึ่งในสูตร MSN พัฒนาเป็นต้นได้ 11.1 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สูตร SK-1 สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ 33.7 เปอร์เซ็นต์ Ayres และคณะ (1995) ได้ย้ายแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงอับเรณูข้าวไปเลี้ยงบนอาหารสำหรับพัฒนาให้เกิดต้นจำนวน 4 สูตร พบว่า สูตร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และ inositol 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นได้มากที่สุด Ibrahim และคณะ (1994) พบว่า การทำ preculture บนสูตรอาหารที่มี ABA (abscisic acid) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อนย้ายไปเลี้ยงบนอาหารเพื่อชักนำให้เกิดต้น พบว่า สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นสีเขียวได้มากขึ้น เนื่องจาก ABA มีผลชักนำให้เกิด embryogenic callus และ ช่วยยืดเวลาการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของแคลลัสให้ยาวนานขึ้น

น้ำตาลก็มีความสำคัญต่อการเลี้ยงอับเรณูข้าวเช่นเดียวกับธาตุอาหารและสารควบคุมการเจริญ การเติมน้ำตาลลงในอาหารเลี้ยงอับเรณูข้าว เพื่อให้อับเรณูข้าวใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และเป็นตัวปรับแรงดันออสโมซีส Chaleff และ Stolarz (1981) กล่าวว่าบทบาทของน้ำตาลในอาหารที่ใช้เลี้ยงอับเรณูข้าวน่าจะเป็นตัวปรับแรงดันออสโมซีสและช่วยในการเคลื่อนย้ายธาตุอาหารต่างๆ เข้าสู่เซลล์มากว่าใช้เป็นแหล่งคาร์บอน Orshinsky และคณะ (1990) ได้เลี้ยงอับเรณูของข้าวสาลีในสูตรอาหาร N_6 ที่มีน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลมอลโตส (maltose)พบว่าการใช้น้ำตาลมอลโตสชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีและพัฒนาเป็นต้นสีเขียวได้มากกว่าใช้น้ำตาลซูโครส Raina (1993) เสนอให้ใช้น้ำตาลมอลโตส 5-10% แทนน้ำตาลซูโครสในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูง และส่งผล

ให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น ปกติสีเขียวได้มากขึ้น Xie และคณะ (1994) รายงานว่าการใช้น้ำตาลมอลโตส 6% ร่วมกับ 2,4-D และ NAA ในสูตรอาหารชักนำแคลลัส ส่งผลต่อการพัฒนาให้ต้นสีเขียวได้มาก Vajrabhaya และคณะ (1984) รายงานว่าสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นเขียวที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสปริมาณสูงกว่า 30 และ 60 กรัมต่อลิตรทำให้เกิดจุดเขียวและต้นสีเขียวลดลง โดยเฉพาะการใช้อาหารร่วมกับน้ำมะพร้าวทำให้จุดเขียวลดลง 4-4.6 เท่า

อย่างไรก็ตามความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่างน้ำตาลและวุ้นผงก็มีผลเช่นเดียวกัน การเลี้ยงอับเรณูข้าวสามารถเลี้ยงได้ทั้งอาหารแข็งและอาหารเหลว Chung (1988) ได้รายงานว่า อาหารเหลวสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากกว่าอาหารแข็ง แต่อาหารแข็งจะสามารถชักนำให้เกิดต้นข้าวได้ดีกว่าอาหารเหลว

อายุและขนาดของแคลลัสเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการพัฒนาไปเป็นต้นจากการเลี้ยงอับเรณูข้าว ซึ่ง Guiderdoni และคณะ (1992) รายงานว่าแคลลัสที่เกิดขึ้นภายหลังจากการเลี้ยงอับเรณูข้าว 5-6 สัปดาห์ จะเป็นแคลลัสที่มีคุณภาพสูงในการพัฒนาให้เป็นต้นสีเขียว ถ้าหลังจาก 6 สัปดาห์ไปแล้ว ความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นสีเขียวลดลงและเป็นต้นเผือกมากขึ้น

ต้นเผือก (Albino)

การเลี้ยงอับเรณูและได้ต้นข้าวที่ไม่มีคลอโรฟิลล์หรือที่เรียกว่า ต้นเผือก นับเป็นปัญหาสำคัญ ซึ่ง Dunwell ในปี 1985 กล่าวไว้ว่า จำนวนการเกิดต้นเผือกนี้แตกต่างกันไปในพืชชนิดเดียวกันและต่างชนิดกัน เช่น อาจพบเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ ในข้าวโพด หรือพบมากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ในหญ้าไรย์ (rye grass) และพบว่าโดยทั่วไปพวกที่เป็นพันธุ์ในเขตอบอุ่นเกิดต้นเผือกมากกว่าของเขตร้อน (อ้างถึงโดย Raina, 1989) อย่างไรก็ตาม Sun and Zheng (1990) รายงานว่า การเกิดต้นเผือกพบประมาณ 5-80 เปอร์เซนต์ Zapata และคณะ (1983) พบว่าต้นเผือกมีทั้งต้นที่เป็น true albino และ viridesent albino ซึ่งต้นที่เป็น viridesent albino สามารถชักนำให้เป็นต้นปกติได้ Alemano and Guiderdoni

(1994) พบว่า การเกิดต้นเผือกไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะต้น double haploid เท่านั้น แต่ต้น haploid triploid และ tetraploid ก็สามารถเกิดต้นเผือกได้

สาเหตุการเกิดต้นเผือกนี้อาจมาจากสาเหตุหลายประการ Sun และคณะ (1979) รายงานว่า แม้ว่าต้นเผือกนั้นจะยังพบ proplastid อยู่แต่ไม่มี ribosome และ fraction-1-protein Wang และคณะ (1978) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการเกิดต้นเผือกในการเลี้ยงอับเรณูข้าว พบสาเหตุที่เกี่ยวกับการเกิดต้นเผือกหลายประการ เช่น ปัจจัยทางพันธุกรรม ผลของอุณหภูมิ ผลของอาหาร เป็นต้น ซึ่งอัตราการเกิดต้นเผือกนั้นมีความแตกต่างกันมากจาก 5 เปอร์เซ็นต์ ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดและสายพันธุ์ข้าว อย่างไรก็ดี พบว่าต้นเผือกจากการเลี้ยงอับเรณูของพันธุ์ป่าสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ หรือใน *O. nivara* ก็ให้ผลในการเกิดต้นเขียวต่ำมาก ซึ่งมีการสรุปว่าถ้าพันธุ์ผสมนั้นมีไซโตพลาสซึมของพันธุ์ป่าจะทำให้ได้ต้นเผือกในอัตราสูง

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลอง

พันธุ์ข้าวเจ้า **กข 21** เป็นข้าวเจ้ากลุ่มอินดิกาที่ไม่ไวต่อช่วงแสง ได้มาจากการผสมพันธุ์สามทางระหว่างพันธุ์ข้าว ขาวดอกมะลิ 105 นางมลเอส-4 และ ไออาร์ 26 (KDML105/NMS-4//IR26) เป็นพันธุ์ข้าวที่ให้ผลผลิตสูง สามารถปลูกได้ทั้งในฤดูนาปีและฤดูนาปรัง มีความสูงของต้นประมาณ 100-125 เซนติเมตร อายุประมาณ 115-130 วัน ลักษณะที่สำคัญคือ เป็นข้าวที่มีคุณภาพในการหุงต้มดี เนื่องจากมีปริมาณอมิโลสต่ำ ดังนั้นข้าวสารเมื่อหุงสุกจะมีลักษณะนุ่มเหนียว (สถาบันวิจัยข้าว, 2530) คล้ายกับข้าวญี่ปุ่นจึงเป็นที่คาดหวังว่าจะเป็นข้าวที่มีศักยภาพในการส่งออกไปขายยังตลาดข้าวประเทศญี่ปุ่น อย่างไรก็ตามพันธุ์ข้าว กข 21 นี้ค่อนข้างอ่อนแอต่อการทำลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens* Stål) ซึ่งเป็นแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญในพื้นที่การปลูกข้าวของประเทศไทย (วัชระ ภูรีวิโรจน์กุล, 2534)

พันธุ์ข้าวเจ้า**สุพรรณบุรี 90** เป็นข้าวเจ้ากลุ่มอินดิกาที่ไม่ไวต่อช่วงแสง ได้จากการผสมพันธุ์ข้าวระหว่างข้าวพันธุ์ผสมชั่วที่ 1 ของ กข 21 และ ไออาร์ 4422-98-3-6-1 กับข้าวพันธุ์ผสมชั่วที่ 1 ของ กข 11 และ กข 23 (RD21/IR4422-98-3-6-1//RD11/RD23) มีความสูง 120 เซนติเมตร อายุประมาณ 120 วัน เป็นข้าวให้ผลผลิตสูง สามารถปลูกได้ทั้งฤดูนาปี และนาปรัง ที่สำคัญคือ มีความต้านทานต่อแมลงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โรคใบหงิก และใบสีส้ม และยังมีความต้านทานต่อโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้งได้ดีอีกด้วย (ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี, 2533) แต่คุณภาพการหุงต้มของพันธุ์ข้าวสพ 90 เป็นข้าวที่ค่อนข้างร่วนแข็งเมื่อหุงสุก เนื่องจากมีปริมาณอมิโลสสูง (สถาบันวิจัยข้าว, 2530)

พันธุ์ข้าวเจ้า กข 23 เป็นข้าวเจ้าที่ไม่ไวต่อช่วงแสง มีความสูง 115-120 วัน อายุประมาณ 120-130 วัน ให้ผลผลิตสูง ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งและโรคฮู๋ ในสภาพธรรมชาติ และต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

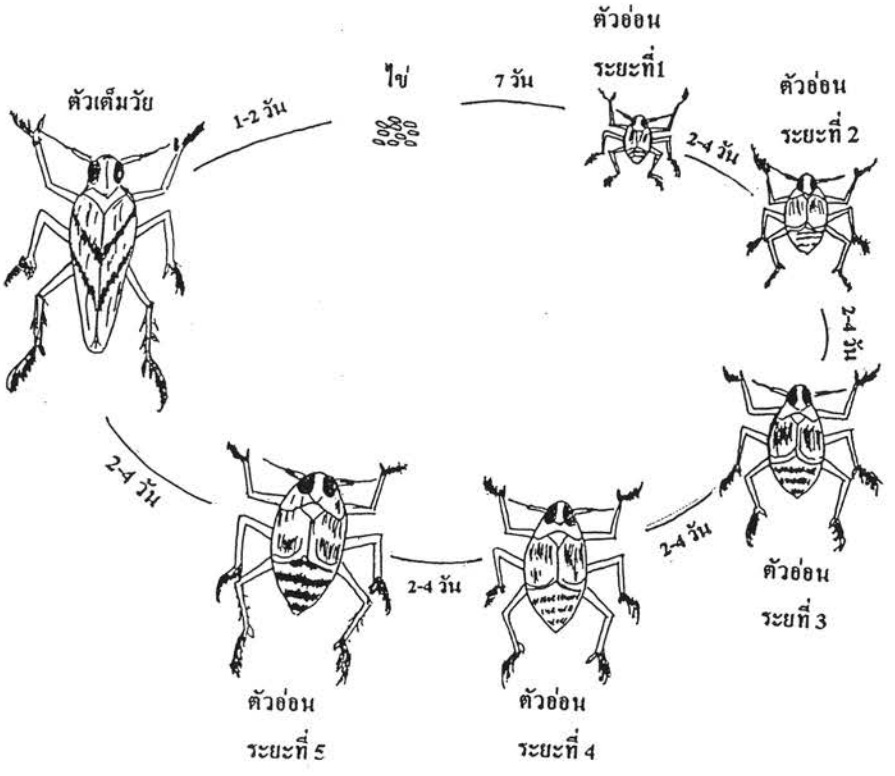
ข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 (TN1) เป็นข้าวพันธุ์ผสมต้นเตี้ยของไต้หวัน ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่าง Dee-geo woo-gen กับ Tsai Yuan Chung

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (brown planthopper) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Nilaparvata lugens* Stål มีเขตแพร่กระจายทั่วไปในแหล่งที่มีการปลูกข้าว เช่น ญี่ปุ่น เกาหลี จีน ไต้หวัน มาเลเซีย อินโดนีเซีย อินเดีย ศรีลังกา ฟิลิปปินส์ นิวกินี ฟิจิ และประเทศไทย (Feakin, 1970) สำหรับประเทศไทยมีรายงาน เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลทำความเสียหายกับต้นข้าวเป็นครั้งแรก เมื่อปี พ.ศ. 2516 ที่อำเภอไทรน้อย จังหวัดนนทบุรี (ประพาส และคณะ, 2518)

ชีพจักรของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีการเจริญเติบโต 3 ระยะ คือ ระยะไข่ ระยะตัวอ่อน และระยะตัวเต็มวัย หลังการผสมพันธุ์ตัวเมียจะใช้อวัยวะวางไข่ (ovipositor) ที่แหลมคมแทงเข้าไปที่บริเวณกาบใบเหนือระดับน้ำของต้นข้าว หรือเส้นกลางใบเพื่อวางไข่ ไข่มีลักษณะสีโปร่งใสเรียงตัวอยู่เป็นกลุ่มๆ มีระยะไข่ (egg stage) ประมาณ 8-9 วัน (Feakin, 1970) ไข่มีลักษณะคล้ายกล้วยหอม มีฝาปิดไข่ (egg cap) ยื่นออกมาจากเนื้อเยื่อของผิวกาบใบ กลุ่มไข่กลุ่มหนึ่ง ๆ จะมีไข่ประมาณ 1 ถึง 27 ฟอง ตัวเมียสามารถวางไข่ได้ประมาณ 244 ฟอง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Bae and Pathak, 1970) จากไข่เป็นระยะตัวอ่อน ใช้ระยะเวลาประมาณ 7 วัน ตัวอ่อนมีการลอกคราบ 5 ครั้งแล้วจึงเจริญเป็นตัวเต็มวัย แต่ละระยะของการลอกคาบของตัวอ่อนใช้เวลาประมาณ 2-4 วัน ระยะที่เป็นตัวอ่อนประมาณ 12-13 วัน (Feakin, 1970) และระยะตัวเต็มวัย ประมาณ 8-9 วัน (ภาพที่ 1) รวมระยะชีพจักรทั้งสิ้น 1 เดือน



ภาพที่ 1 ชีพจักรของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ลักษณะการทำลายและการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเป็นแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญ และมีการทำลายรุนแรงในแหล่งที่ทำนาปรังและปลูกข้าวต้นเตี้ย รวมทั้งมีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนในอัตราสูง อากาศค่อนข้างร้อน ซึ่งเหมาะสมกับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่จะขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว Pathak (1968) รายงานว่า เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจะดูดกินน้ำเลี้ยงของต้นข้าว ที่บริเวณกาบใบเหนือผิวน้ำ หรือ บริเวณเส้นกลางใบของต้นข้าว ต้นข้าวในแปลงที่ถูกเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลทำลายอย่างรุนแรงจะมีอาการเหี่ยว และแห้งตายคล้ายถูกน้ำร้อนลวกเป็นพื้นที่วงกว้างเรียกว่า hopperburn ภายใน 15 วัน นอกจากนี้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลยังเป็นพาหะนำโรคที่สำคัญมาสู่ต้นข้าว เช่น พาหะนำเชื้อไวรัสทำให้เกิดโรคใบหงิก (ragged stunt)และเชื้อมายโคพลาสม่า ทำให้เกิดโรคเขียวเตี้ย (grassy stunt) Sogawa (1971) พบว่า ตัวอ่อน และตัวเต็มวัยใช้ส่วนของปากที่เรียกว่า stylet แทงเข้าไปดูดกินน้ำเลี้ยงจากท่อน้ำท่ออาหาร ขับน้ำลายออกมาหุ้ม stylet อย่างรวดเร็ว น้ำลายที่หุ้ม stylet จะแข็งตัวเป็น salivary sheath ซึ่งติดอยู่ที่เนื้อเยื่อของต้นข้าว ทำให้ท่อน้ำท่ออาหารอุดตัน และรอยแผลที่เกิดจาก stylet นี้ทำให้เชื้อราและแบคทีเรียเข้าไปทำลายต้นข้าวได้ Wongsiri และคณะ(1971) พบว่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสามารถทำให้ผลผลิตเสียหายได้ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ วีรวุฒิ กตัญญูกูล (2526) พบว่าตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล จำนวน 5-10 ตัวต่อกอ (30 วันหลังปักดำ) เป็นระดับที่ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในประเทศไทย

ลักษณะของความต้านทาน

ความต้านทาน (Resistance) เป็นลักษณะของพืชซึ่งสามารถถ่ายทอดได้ทางพันธุกรรมโดยพืชต้านทานจะได้รับความเสียหายจากการทำลายของโรค หรือแมลงน้อยที่สุด หรือไม่ได้รับความเสียหายเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ไม่ต้านทานซึ่งปลูกในสภาพแวดล้อม เวลา และพื้นที่เดียวกัน

Painter (1951) ได้แบ่งกลไกความต้านทานของพืชต่อแมลงศัตรูไว้ 3 พวก ด้วยกัน

1. Non-preference แมลงจะมีการเลือกเข้าทำลาย กินอาหาร เจริญเติบโต หรือแพร่พันธุ์เฉพาะพันธุ์ที่ชอบ ส่วนพันธุ์ที่ไม่ชอบก็จะไม่เข้าทำลายหรือแพร่พันธุ์ ลักษณะความชอบนี้อาจเกิดจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพันธุ์พืช เช่น ต้นแข็งมาก ใบมีขน เป็นต้น

2. Antibiosis พันธุ์พืชต้านทานมักมีสารบางอย่าง ซึ่งอาจเป็นพิษหรือไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการแพร่พันธุ์ของแมลง

3. Tolerance พันธุ์พืชต้านทานสามารถให้ผลผลิตได้ดี ถึงแม้จะถูกแมลงเข้าทำลายก็ตาม แต่แมลงก็สามารถเจริญเติบโตและแพร่พันธุ์ได้ดีเช่นเดียวกับการเข้าทำลายพันธุ์ข้าวไม่ต้านทาน

พันธุกรรมความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

แมลงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ระบาดในหลายๆ ประเทศ รวมทั้งประเทศไทยครั้งแรกได้มีรายงานว่าเป็นแมลงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลชีวชนิดที่ 1 (biotype 1) (Pathak and Khush, 1979 ; Pongprasert and Weerapat, 1979.) เมื่อเริ่มมีการระบาดของแมลงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลชีวชนิดที่ 1 IRRI ได้นำพันธุ์ข้าวต้านทานพันธุ์แรก ได้แก่ พันธุ์ข้าว IR26 มาใช้ประสบผลสำเร็จเป็นอย่างมากในระยะนั้น IR26 มียีนต้านทาน Bph1 ในเวลาต่อมามีพันธุ์ข้าว IR28 IR29 IR30 ซึ่งมียีนต้านทาน Bph1 ได้มาจากพันธุ์ข้าว TKM6 ซึ่งโดยปกติจะไม่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล แต่เมื่อนำไปผสมพันธุ์แล้วสามารถคัดเลือกลูกผสมจากการกระจายตัวที่มีความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ ทั้งนี้เนื่องจาก TKM6 นั้นมียีนอีกตัวหนึ่ง ซึ่งเป็น inhibitor ปกปิดไม่ให้ลักษณะต้านทานของ Bph1 แสดงออก พันธุ์ข้าวเหล่านี้โดยเฉพาะอย่างยิ่ง IR26 มีการปลูกกันอย่างกว้างขวางเป็นสาเหตุของการพัฒนาของชีวชนิดที่ 2 ขึ้นในหลายๆ ประเทศ ชีวชนิด

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่ 2 นี้ สามารถเข้าทำลายพันธุ์ข้าว IR26 และพันธุ์ข้าวซึ่งมียีนต้านทาน Bph1 จึงมีการนำเอาพันธุ์ข้าว IR36 ซึ่งยีนมีต้านทาน bph 2 มาใช้ในการแก้ไข พันธุ์ข้าว IR36 มีความต้านทานต่อชีวชนิด 1 และ 2 โดยได้ยีนต้านทาน bph 2 มาจากพันธุ์ข้าว CR94-13 หลังจากมีการใช้พันธุ์ข้าวดังกล่าวปลูกกันอย่างแพร่หลาย ก็พบว่า มีการพัฒนาของชีวชนิดที่ 3 ขึ้นในหลายประเทศ พบว่า IR36 ค่อนข้างมีความต้านทานต่อชีวชนิดที่ 3 ดีกว่าพันธุ์ข้าว IR42 แสดงให้เห็นว่า IR36 อาจมี minor gene อื่นๆ เข้ามาร่วมเกี่ยวข้องอยู่ด้วย ต่อมาได้มีการนำพันธุ์ข้าว IR56 IR58 IR60 IR62 IR66 ซึ่งมีความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลทั้ง 3 ชีวชนิดมาใช้ ลักษณะต้านทานในพันธุ์ข้าวต่าง ๆ ควบคุมโดย gene Bph3 หรือ bph4 หรือควบคุมด้วยกันมากกว่า 1 คู่ (Khush, 1979)

แหล่งพันธุกรรมความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่มีการศึกษาแล้ว ได้แก่ TKM6 (Bph1) Mudgo (Bph1) ASD7 (bph2) CR94-13 (bph2) ซึ่งได้จาก Ptb18/Ptb21//IR8 Ptb18 (bph2) ส่วน Ptb21 จากการศึกษา พบว่า ลักษณะความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลควบคุมโดย dominant gene 1 คู่ และ recessive gene 1 คู่ โดยอาจจะเป็น Bph1+bph4 หรือ bph2+Bph3 ก็ได้ สำหรับ Ptb33 พบว่า ลักษณะความต้านทานควบคุมโดย gene 2 คู่

นอกจากนี้แล้วยังมีรายงานการพบยีนความต้านทานอื่นๆ อีก ได้แก่ Rathu Heenati (Bph3) Babawee (bph4) ARC10550 (bph5) Swemalata (Bph6) T12 (bph7) Chiensaebae (bph8) และ Pokkaki (Bph9) อีกด้วย

แหล่งพันธุกรรมความต้านทานนอกจากในพันธุ์ข้าวปลูกแล้ว ยังพบว่าข้าวป่าหลาย accessions ของ *O. **minuta*** ในประเทศฟิลิปปินส์ *O. **punctata*** ในประเทศไทย แทนซาเนีย *O. **Officinalis*** ในประเทศ อินโดนิเซีย และ *O. **australiensis*** ในประเทศออสเตรเลีย มีความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

สำหรับในประเทศไทย พันธุ์ข้าวต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลพันธุ์แรกที่ออกมาใช้แก้ไขปัญหาของเกษตรกร ได้แก่ พันธุ์ข้าว กข 9 (ได้มาจากการผสมพันธุ์ระหว่าง LY34/TN1//W1256///RD2) ได้โดยพันธุกรรมต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมาจากข้าว

พันธุ์ W1256 ออกขยายพันธุ์ในปี พ.ศ. 2518 และในปี พ.ศ. 2524 ได้มีการพิจารณาพันธุ์ข้าว กข 21 (ได้มาจากการผสมพันธุ์สามทางระหว่าง KDML105/NMS-4//IR26) เป็นข้าวที่มีคุณภาพการหุงต้มดี เนื่องจากมีปริมาณอมิโลสต่ำ ดังนั้นข้าวสารเมื่อหุงสุกจะมีลักษณะนุ่มเหนียว ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในขณะนั้น และพันธุ์ข้าว กข 23 ได้มาจากการผสมพันธุ์สามทางระหว่าง RD7/IR32//RD1 ให้เกษตรกรปลูกเพื่อแก้ไขปัญหาของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลทำให้ปัญหาการระบาดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในประเทศไทยได้หมดไป พันธุ์ข้าว กข 23 ได้ยีนต้านทานมาจาก IR32 (Bph1 และ/หรือ bph2) แต่ในปี พ.ศ. 2531-2532 มีการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเกิดขึ้นใหม่พบว่า กข 21 ไม่ต้านทานต่อประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นใหม่ ในปี 2534 ได้มีการแนะนำพันธุ์ข้าวสพ 90เพื่อใช้แก้ไขปัญหาเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ระบาดในปัจจุบัน พันธุ์ข้าวสพ 90 ได้มาจากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ผสมชั่วที่ 1 ของ RD21/IR4422-98-3-6-1 และ RD11/RD23 อย่างไรก็ตามพันธุ์ข้าวสพ 90 แม้ว่าจะมีข้อดีในความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล แต่คุณภาพการหุงต้มมักไม่ค่อยเป็นที่นิยมมากนัก เนื่องจากข้าวสุกมีลักษณะร่วนแข็ง (สถาบันวิจัยข้าว, 2530)