

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง



การทดลองเริ่มตั้งแต่วันที่ 1 กรกฎาคม 2521 ถึงวันที่ 25 ธันวาคม 2522 ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีอุปกรณ์และวิธีการทดลองดังต่อไปนี้

อุปกรณ์

1. พืชทดลองได้แก่ ข้าว (*Oryza sativa* L. ssp. indica) พันธุ์ กข 1, กข 3, กข 5, กข 7, กข 9 และ กข 11 จากกองการข้าว กรมวิชาการเกษตร ซึ่งมีลักษณะต่าง ๆ พอสรุปได้ดังต่อไปนี้

กข 1 เป็นข้าวลูกผสมระหว่างพันธุ์เหลืองทองของไทย กับพันธุ์ IR 8 จากสถาบันวิจัยข้าวระหว่างประเทศที่ฟิลิปปินส์ เริ่มออกขยายพันธุ์เมื่อปี พ.ศ. 2512 และเป็นข้าวที่ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมตามท้องถิ่นต่าง ๆ ได้ดีและให้ผลผลิตสูง จึงเป็นที่นิยมปลูกกันอย่างแพร่หลายมากกว่าพันธุ์อื่น ๆ

ลักษณะของข้าวพันธุ์ กข 1 จัดเป็นข้าวต้นเตี้ย สูงประมาณ 100 - 115 ซม. เหมาะที่ปลูกในเขตที่ควบคุมระดับน้ำได้ และปลูกได้ตลอดปี อายุเก็บเกี่ยว 125 - 135 วัน ผลผลิต 742 กก./ไร่ ระยะพักตัวประมาณ 3 สัปดาห์ เมล็ดข้าวเปลือกมีสีข้าว (สีฟาง) เมล็ดข้าวกล้องใส แข็งแกร่ง ยาว 7.0 มม. กว้าง 2.2 มม. หนา 1.8 มม. คุณภาพการสีดีคุณภาพการหุงต้มค่อนข้างแข็ง ทนต่อการปลูกสูง ในระยะแรกที่ถึงมือชาวนามีความต้านทานโรคใบสีส้มซึ่งเกิดจากเชื้อ yellow orange leaf virus ค่อนข้างดี แต่ปัจจุบันความต้านทานของโรคดังกล่าวลดลง ไม่ต้านทานโรคขอบใบแห้ง โดยเฉพาะถ้าใส่ปุ๋ยไนโตรเจน

สูงจะเป็นโรคขอบใบแห้งได้ง่าย, ไม่ต้านทานเชื้อราโรคสีน้ำตาล, บั้ว แต่ค่อนข้างต้านทานโรคไหม้

กข 3 เป็นข้าวลูกผสมระหว่างพันธุ์เหลืองทองของไทยกับ IR8 จากสถาบันวิจัยข้าวระหว่างประเทศที่ฟิลิปปินส์ ซึ่งเป็นพี่น้องกับ กข 1 แต่ต่างจาก กข 1 คือมีใบชงยาวกว่ามาก ในการใช้ปุ๋ยอัตราต่ำ ๆ จะให้ผลผลิตสูงกว่า กข 1 และเจริญเติบโตในระยะแรก ๆ ไร่เร็วกว่า แต่มีความต้านทานโรคขอบใบแห้งน้อยกว่า กข 1

ลักษณะของข้าวพันธุ์ กข 3 จัดเป็นข้าวต้นเตี้ย สูงประมาณ 90 - 100 ซม. เหมาะที่จะปลูกในเขตที่ควบคุมระดับน้ำได้ ปลูกได้ตลอดปีอายุเก็บเกี่ยว 120 - 130 วัน ผลผลิต 667 กก./ไร่ ระยะพักตัวประมาณ 3 สัปดาห์ เมล็ดข้าวเปลือกสีเหลือง เมล็ดข้าวกลองยาว 7.2 มม. กว้าง 2.2 มม. หนา 1.8 มม. คุณภาพการหุงต้มค่อนข้างแข็ง ค่อนข้างต้านทานต่อโรคไหม้ แต่ไม่ต้านทานต่อโรคใบสีส้ม, โรคขอบใบแห้ง, เชื้อราโรคสีน้ำตาลและบั้ว โดยเฉพาะในที่ที่มีปุ๋ยไนโตรเจนสูง จะเป็นโรคขอบใบแห้งได้ง่าย นอกจากนี้ยังค่อนข้างเป็นโรคใบสีส้มได้ง่าย

กข 5 เป็นข้าวลูกผสมระหว่างพันธุ์พวงนาค 16 ของไทยและพันธุ์ซิกาคิสของอินโดนีเซีย กข 5 จัดเป็นข้าวต้นสูง เหมาะที่จะปลูกในฤดูนาปี และมีความต้านทานโรคโดยทั่วไปดีกว่า และให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์พื้นเมือง

ลักษณะของข้าวพันธุ์ กข 5 ลำต้นสีม่วง สูงประมาณ 135 ซม. ปลูกได้ตลอดปี รวงยาว อายุเก็บเกี่ยว 140 - 150 วัน ผลผลิต 568 กก./ไร่ ระยะพักตัวประมาณ 6 สัปดาห์ เมล็ดข้าวเปลือกสีขาว (สีฟาง) ก้นจุก เมล็ดข้าวกลองยาว 7.15 มม. กว้าง 2.2 มม. หนา 1.8 มม. คุณภาพการหุงต้มดีมาก ไม่แข็ง ค่อนข้างต้านทานต่อโรคไหม้, โรคใบสีส้มและโรคขอบใบแห้ง แต่ไม่ต้านทานต่อเชื้อราโรคสีน้ำตาล และบั้ว

กข 7 เป็นข้าวลูกผสมระหว่างข้าวพันธุ์ที่ 3 พันธุ์ คือ พันธุ์เการวง 88 ของไทย, พันธุ์ C4 - 63 ของฟิลิปปินส์ และพันธุ์ชิกากาคิสของอินโดนีเซีย เริ่มแนะนำให้ชาวนาใช้ทำพันธุ์เมื่อปี 2518 คุณภาพในการหุงต้ม อ่อนนุ่มกว่า กข 1 และครองยาวกว่า กข 1 ซึ่งเหมาะที่จะปลูกในภาคใต้มากกว่า กข 1 เพราะว่าชาวนาภาคใต้นิยมใช้แกระเก็บเกี่ยว

ลักษณะของข้าวพันธุ์ กข 7 จัดเป็นข้าวต้นเตี้ย สูงประมาณ 100 - 115 ซม. ปลูกได้ตลอดปี เหมาะที่จะปลูกในเขตที่ควบคุมระดับน้ำได้ ครองยาว อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 120 - 130 วัน ผลผลิต 672 กก./ไร่ ระยะพักตัว ประมาณ 1 สัปดาห์ เมล็ดข้าวเปลือกสีขาว (สีฟาง) เมล็ดข้าวกลองยาว 7.3 มม. กว้าง 2.3 มม. หนา 1.8 มม. เมล็ดข้าวสารใส แข็งแกร่ง คุณภาพการชั้ดสีดี คุณภาพการหุงต้มอ่อนนุ่ม ทอบนองตอปุ๋ยสูง คอนข้างต้านทานต่อโรคใบสีส้ม ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง แต่ไม่ต้านทานต่อโรคไหม้, เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและบัว

กข 9 เป็นข้าวลูกผสมระหว่างข้าว 3 พันธุ์ คือ พันธุ์ CNT 3176 พันธุ์ กข 2 ของไทย และพันธุ์ W 1256 ของอินเดียน คุณสมบัติพิเศษคือต้านทานต่อการทำลายของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล มีอายุสั้นเหมาะสำหรับการปลูกข้าวนาปรัง นอกจากนี้ยังต้านทานต่อบัวและหนอนกอได้พอสมควร

ลักษณะของข้าวพันธุ์ กข 9 จัดเป็นข้าวต้นเตี้ยสูงประมาณ 100 - 120 ซม. เหมาะที่จะปลูกในที่ควบคุมระดับน้ำได้ ปลูกได้ตลอดปี อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 115 - 125 วัน ผลผลิต 657 กก./ไร่ อายุพักตัวประมาณ 5 สัปดาห์ เมล็ดข้าวเปลือกสีขาว (สีฟาง) เมล็ดข้าวกลองยาว 7.3 มม. กว้าง 2.3 มม. หนา 1.8 มม. คุณภาพการหุงต้มคอนข้างแข็ง ทอบนองตอปุ๋ยอัตราค่าดี คอนข้างต้านทานต่อโรคไหม้ และโรคใบสีส้ม ไม่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและบัวได้ปานกลาง

กข 11 เป็นข้าวลูกผสมระหว่างพันธุ์ IR 661 จากสถาบันวิจัยข้าวระหว่างประเทศที่ฟิลิปปินส์ และข้าวพันธุ์ข้าวหอมมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวเจ้าพันธุ์ดีของไทย กข 11 มีลักษณะเด่น คือ เมล็ดข้าวเรียวยาวกว่าพันธุ์ กข อื่น ๆ ตามมาตรฐานจักเป็นข้าว 100% ชั้นหนึ่ง

ลักษณะของข้าว กข 11 จักเป็นข้าวต้นเตี้ยสูงประมาณ 110 ซม. เหมาะที่จะปลูกในที่ควบคุมระดับน้ำได้ ปลูกได้ตลอดปี อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 135 วัน ผลผลิต 698 กก./ไร่ ระยะพักตัวประมาณ 4 สัปดาห์ เมล็ดข้าวเปลือกสีขาวยาวขนาดยาว เมล็ดข้าวกลองยาว 7.52 มม. กว้าง 3.36 มม. หนา 1.82 มม. คุณภาพหุงต้มค่อนข้างแข็ง ไม่มีกลิ่นหอม ทอบนองตอปุ๋ยดี ค่อนข้างต้านทานต่อโรคไหม้ ไม่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง, เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและข้าว

2. เครื่องแก้วต่าง ๆ ไคแก่ หลอดแก้วพร้อมฝาจากเกลียว, ฟลาซก์, บีเปตต์, ขวดสีชาขนาด 1 ลิตร, บีกเกอร์, งานแก้วพร้อมฝาปิด, กระจกทวง, แท่งแก้ว, สไลด์ และกระจกปิดสไลด์

3. สารเคมีต่าง ๆ

3.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับฆ่าเชื้อ ไคแก่ เอทิลแอลกอฮอล์, เมทิล-แอลกอฮอล์, คลอโรกซ์ และทวิน 20

3.2 สารเคมีที่ช่วยเร่งการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลง ไคแก่ 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxy acetic acid), NAA (Naphthalene acetic acid) kinetin (6-furfuryl amino purine) และน้ำมะพร้าว

3.3 สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงอับเรณู

3.3.1 สูตร N<sub>6</sub> medium (7)

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

463 mg/l

$\text{KNO}_3$	2830	mg/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	400	mg/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	185	mg/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	166	mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4.4	mg/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5	mg/l
$\text{H}_3\text{BO}_3$	1.6	mg/l
KI	0.8	mg/l

Iron ใช้ 5 mg/l ของสารละลาย  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

5.57 gm และ  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  7.45 gm. ในน้ำ 1 ลิตร

Glycine	2.0	mg/l
Thiamine-HCl	1.0	mg/l
Pyridoxine-HCl	0.5	mg/l
Nicotinic acid	0.5	mg/l
Sucrose	15,000-60,000	mg/l
Agar	10,000	mg/l
2, 4-D	2	mg/l
pH	5.8	

006637

### 3.3.2 สูตร Murashige and Skoog Medium (16)

$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1,650	mg/l
$\text{KNO}_3$	1,900	mg/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	mg/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	mg/l
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2	mg/l

MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	22.3	mg/1
ZnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	8.6	mg/1
KI	0.83	mg/1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	mg/1
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	mg/1
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	mg/1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	mg/1
C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	37.3	mg/1
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	mg/1
Glycine	2	mg/1
Nicotinic acid	0.5	mg/1
Pyridoxine (B )	0.5	mg/1
Thiamine (B <sub>1</sub> )	0.1	mg/1
Sucrose	3,000	mg/1
Agar	10,000	mg/1
NAA	1	mg/1
Kinetin	4	mg/1
pH	5.6	/

3.4 สารเคมีที่ใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษา microsporogenesis  
ได้แก่ aceto-carmin

4. เครื่องมือผ่าตัด ได้แก่ มีด, ปากคีบ, เข็ม, กรรไกร

5. เครื่องวัด pH, เครื่องวัดแสง, เครื่องชั่งไฟฟ้า, หม้อน้ำสำหรับ  
ฆ่าเชื้อ, ตู้ถ่ายเชื้อ, กล้องจุลทรรศน์ และกล้องถ่ายภาพ

6. ห้องปฏิบัติการ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ และมีชั้นสำหรับวางหลอดแก้ว ซึ่งมีความเข้มแสง 2000 ลักซ์ จากหลอดไฟเป็นเวลา 10 ชั่วโมงต่อวัน หรือมีหลอดควีน อุณหภูมิประมาณ  $25^{\circ} - 27^{\circ}$  ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ 34.5%

7. เครื่องปลูก ไกล่ กิโนบฆ่าเชื้อโรคพร้อมกระถางกินเา

### วิธีการทดลอง

#### 1. การศึกษาการพัฒนาของเรณูของข้าว

ปลูกข้าวพันธุ์ กข 1, กข 3, กข 5, กข 7, กข 9 และ กข 11 ในกระถางขนาด 12 นิ้ว เป็นเวลา 90 - 110 วัน เมื่อต้นข้าวเริ่มตั้งท้องทำการคัดเลือกช่อกอกของข้าวก่อนที่จะไต่ออกมาจากกามใบตรงประมาณ 3 วัน เพื่อทำการศึกษาขบวนการสร้างเรณูจาก microsporocyte (microsporangogenesis) โดยวิธี squash และย้อมสี aceto-carmines ศึกษาลักษณะภายในของเรณูด้วยกล้องจุลทรรศน์และถ่ายภาพ

#### 2. การเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวให้เกิดแคลลัส

คัดเลือกช่อกอกของข้าวพันธุ์ กข 1, กข 3, กข 5, กข 7, กข 9 และ กข 11 ที่มีอายุประมาณ 3 วันก่อน heading นำมาพอกฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิของกลีบคอกควยสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 10% ประมาณ 10 นาที ล้างควยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว คัดเลือกอับเรณูของคอกข้าวที่อยู่ในระยะ mid uninucleate microspore มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร  $N_6 + 2, 4-D$  2 mg/1 นำไปเก็บไว้ในห้องมืด อุณหภูมิ  $26^{\circ} \pm 1^{\circ}$  ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ 34.5% เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยงอับเรณูได้ประมาณ 2 - 8 สัปดาห์ สังเกตและบันทึกผลการเกิดแคลลัส

### 3. การศึกษาอิทธิพลต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเกิดแคลลัสจากอับเรณูของข้าว

#### 3.1 อิทธิพลของน้ำตาลซูโครสต่อการเกิดแคลลัส

เพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ กข 1, กข 3, กข 5, กข 7, กข 9 และ กข 11 ตามวิธีตั้งข้อ 2 โดยใช้อาหารสูตร  $N_6 + 2, 4-D$  2 mg/1 ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสต่าง ๆ กัน คือ 0%, 1.5%, 3% และ 6% ตามลำดับ

#### 3.2 อิทธิพลของน้ำมะพร้าวต่อการเกิดแคลลัส

ทำการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ กข 1, กข 3, กข 5, กข 7, กข 9 และ กข 11 ตามวิธีตั้งข้อ 2 โดยใช้สูตรอาหารต่าง ๆ กันดังนี้

$N_6$  medium + น้ำตาลซูโครส 3% + 2, 4-D 2 mg/1

$N_6$  medium + น้ำตาลซูโครส 3% + น้ำมะพร้าว 15%

$N_6$  medium + น้ำตาลซูโครส 3% + 2, 4-D 2 mg/1

+ น้ำมะพร้าว 15%

### 4. การศึกษาการเกิดต้นและรากจากแคลลัส

นำแคลลัสของข้าวแต่ละพันธุ์ที่ได้จากการทดลองในข้อ 2 และ 3 ซึ่งมีขนาดประมาณ 3 - 5 มม. ไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่ทำให้เกิดต้นและราก โดยใช้อาหารสูตร  $MS + NAA$  1 mg/1 + kinetin 4 mg/1 นำไปเก็บไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง อุณหภูมิ  $27 \pm 1$  °ซ. และมีช่วงมืดประมาณ 8 ชั่วโมง อุณหภูมิ  $24 \pm 1$  °ซ. ประมาณ 2 - 4 สัปดาห์ สังเกตและบันทึกผลการเกิดต้นและราก

### 5. การย้ายต้นอ่อนของข้าวไปปลูกในดิน

นำต้นอ่อนของข้าวที่มีขนาดสูงประมาณ 10 - 15 ซม. ซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 4 ออกจากหลอดแก้ว ล้างวันที่ติดอยู่บริเวณรากออกให้หมด นำไปปลูกในดินที่อบฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นนำไปไว้ในที่ค่อนข้างร่มและมีความชื้นสูง ประมาณ 7 - 10 วัน จึงนำไปปลูกกลางแจ้ง เพื่อศึกษาลักษณะของต้นข้าวต่อไป