หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

1. วัสดุ

1.1 พืชทดลอง ใช้เมล็ดข้าวพันธุ์ กข.23 ซึ่งได้จากกองการข้าว กรมวิชาการเกษตร ข้าวพันธุ์นี้ได้จากการผสมพันธุ์ข้าว 3 สายพันธุ์ คือ กข.1, กข.7 และ IR 32 เป็นข้าวพันธุ์ดีที่ปลูกได้ทุกฤดู ทุกภาค และให้ผลผลิตสูงหากมีน้ำเพียงพอ คณะกรรมการวิจัยของกรมวิชาการเกษตรได้พิจารณาให้เผยแพร่แก่ชาวนาเพื่อปลูกแทนพันธุ์ข้าวต้นเตี้ยที่เคยปลูกและเสียหายเพราะโรคจู๋ ตั้งแต่ พ.ศ. 2524

1.2 สารเคมีในการเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใช้สารเคมีเกรด AR (analytical reagent) ของบริษัท Merck ละลายในน้ำกลั่นแก้ว

2. อุปกรณ์

2.1 เครื่องมือต่าง ๆ ซึ่งเป็นเครื่องมือมาตรฐานในการเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช เช่น ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ หม้อนึ่งอัดความดัน เครื่องวัด pH ส่วนขวดที่ใส่อาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นใช้ Erlenmeyer flask ขนาด 125 มล.

2.2 ชั้นสว่างที่เลี้ยงเนื้อเยื่อ อุณหภูมิ 24-28 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ให้แสงสว่างจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนซ์ ชนิด Philips TL 40 W/33 เหนือชั้นวางสูงขึ้นไป 30 ซม. ความเข้มแสงประมาณ 1200 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

2.3 ชั้นมืด บุด้วยกระดาษสีดำโดยรอบเพื่อป้องกันมิให้แสงสว่างเข้าได้สำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อในขั้นตอนที่ไม่ต้องการแสงสว่าง อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์เช่นเดียวกับชั้นล่าง

3. วิธีดำเนินการทดลอง

ในการศึกษาทดลองนี้เริ่มแรกต้องเตรียมแคลลัสที่จะใช้ศึกษาเสียก่อน โดยเลี้ยงและชักนำให้เกิดแคลลัสโดยใช้วิธีการและสูตรอาหารตาม Vajrabhaya และคณะ (1984 a, b) และขั้นตอนการศึกษาผลของธาตุอาหารหลักที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่ (regeneration) จากแคลลัสของข้าว ศึกษาเพิ่มเติมโดยอิงการศึกษาของ Vajrabhaya และคณะ (1984 a,b) ดังนั้นในสูตรเปรียบเทียบซึ่งใช้เป็นพื้นฐานในการทดลองนี้จึงประกอบด้วยธาตุอาหารหลักตามสูตรของ White (1963) ธาตุอาหารรองตามสูตรของ Murashige และ Skoog (1962) และเติมสารอินทรีย์อื่น ๆ ได้แก่ IAA 1 มก./ล. Kinetin 3 มก./ล. และน้ำมะพร้าว 100 มก./ล. แล้วนำแคลลัสที่ผลิตไปใช้ศึกษาความเข้มข้นและสัดส่วนของธาตุอาหารหลักคือ NO_3-N P K Ca Mg ซึ่งใช้ในสูตรของ White (1963) และเพิ่ม NH_4-N ในสูตรอาหารที่ทดลองศึกษาครั้งนี้โดยใช้วิธีเพิ่มหรือลดระดับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักคือ NH_4-N P K Ca และ Mg ระดับละ 4 เท่า แต่ NO_3-N ใช้วิธีเพิ่มระดับความเข้มข้นเป็น 3 และ 10 เท่า ของระดับความเข้มข้นตั้งต้น โดยกำหนดให้ช่วงความเข้มข้นอยู่ในช่วงใกล้เคียงกับสูตรมาตรฐานอื่น ดังแสดงในตารางที่ 1 สำหรับ Mg เพียงธาตุเดียวไม่ได้ศึกษาในระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีรายงานว่า Mg ในระดับความเข้มข้นสูงกว่า 10 mM จะมีผลต่อการเจริญเนื่องจากเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อที่เลี้ยง (Ohira et al., 1973)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักในสูตรอาหารที่นิยมใช้กันแพร่หลาย

สูตรอาหาร	ความเข้มข้นของอิออนธาตุอาหารหลัก (mM)								
	K^+	Na^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	NH_4^+	NO_3^-	$H_2PO_4^-$	Cl^-	SO_4^{2-}
White (1963)	1.66	2.94	1.27	2.92	-	3.33	0.12	0.87	4.33
B5	25.00	1.10	1.00	1.00	2.00	25.00	1.10	2.00	2.00
R-2	40.00	2.00	1.00	1.00	5.00	40.00	2.00	2.00	3.50
Y3	40.00	2.26	2.00	1.00	10.00	20.00	2.26	34.00	1.00
MS (1962)	20.04	-	2.99	1.50	20.61	39.40	1.25	5.98	1.50
SH	24.73	-	1.36	1.62	2.61	24.73	2.61	2.72	1.62

หมายเหตุ White (1963) จาก Huang และ Murashige (1976) ศึกษาในมะเขือเทศ

B5, R-2 จาก Ohira et al.(1973) ศึกษาในข้าว

Y3 จาก Eeuwen (1976) ศึกษาในมะพร้าว

MS (1962) จาก Murashige และ Skoog (1962) ศึกษาในยาสูบ

SH จาก Schenk และ Hildebrandt (1972) ศึกษาในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ (เช่น ข้าว แคร์รอท ยาสูบ และถั่วเหลือง เป็นต้น)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1 การทำอาหารให้ปลอดเชื้อ

อาหารสำหรับใช้ในงานวิจัยนี้ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดัน 1.1 กก./ตร.ซม. 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3.2 การชักนำให้เกิดแคลลัส (callus induction)

นำเมล็ดที่เจริญเต็มที่ของข้าวพันธุ์ กข.23 มาฆ่าเชื้อที่ผิวเปลือกเมล็ดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที ผึ่งเมล็ดให้แห้งประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสีเอาเปลือกออกเหลือเมล็ดข้าวสารที่มีเอมบริโอติดอยู่ ฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดข้าวสารด้วย Clorox (sodium hypochlorite 5.25%) ความเข้มข้น 20 15 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ตามลำดับ ความเข้มข้นละ 20 นาที และใส่ tween-20 ซึ่งเป็น wetting agent 2-3 หยด ต่อ 100 มล. ของสารละลาย Clorox ทุกครั้ง จากนั้นล้างเมล็ดข้าวสารด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วอีก 2-3 ครั้ง นำเมล็ดข้าวสารไปเลี้ยงในอาหารวุ้นซึ่งมีส่วนประกอบของธาตุอาหารสำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัส (ตารางที่ 2) ตาม Vajrabhaya et al.(1983) ซึ่งบรรจุในขวดแก้วฝาเกลียวขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 ซม. สูง 7 ซม. มีอาหารวุ้นประมาณ 12.5 มล.ต่อขวด ขวดละ 4 เมล็ด เลี้ยงในที่มืด 14 วัน แล้วนำออกมาเลี้ยงในที่ที่ได้รับแสงสว่างวันละ 16 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาดังกล่าว จึงนำเมล็ดข้าวที่งอกและมีแคลลัสเจริญอยู่ด้วยออกจากภาชนะที่เลี้ยงเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 สูตรอาหารสำหรับชักนำให้เกิดแคลลัส (Vajrabhaya et al, 1983)

สารประกอบ	มก./ล.
ธาตุอาหารหลัก (Murashige and Skoog, 1962)	
NH_4NO_3	1,690.0
KNO_3	1,900.0
$CaCl_2.2H_2O$	440.0
$MgSO_4.7H_2O$	370.0
KH_2PO_4	170.0
ธาตุอาหารรอง (Murashige and Skoog, 1962)	
H_3BO_3	6.200
$MnSO_4.4H_2O$	22.300
$ZnSO_4.4H_2O$	8.600
KI	0.830
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.250
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Na_2EDTA	37.300
$FeSO_4.7H_2O$	27.800
สารอินทรีย์อื่น ๆ	
myo-inositol	100.0
thiamine.HCl	0.4
kinetin	0.3
2,4-D	1.0
baccharose	30,000.0
bacto-agar	8,000.0
pH = 5.6 (ปรับด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl)	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่จากแคลลัส (plant regeneration from callus) ในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารต่าง ๆ กัน

นำเมล็ดข้าวที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้อ 3.1 มาตัดส่วนของเมล็ด รากยอดแรกเกิดและ non-embryogenic callus ออก คัดเฉพาะ embryogenic callus และนำไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตรต่าง ๆ เพื่อศึกษาผลของธาตุอาหารหลักที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่จากแคลลัส ดังนี้

3.3.1 การศึกษาผลของ NO_3-N NH_4-N P และ K

ในการศึกษาผลของ NO_3-N NH_4-N P และ K ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ กัน ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่จากแคลลัสในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของธาตุเหล่านี้ต่าง ๆ กันจำนวน 135 สูตร (ตารางที่ 3) เป็นสูตรเปรียบเทียบ 1 สูตร และสูตรทดลอง 134 สูตร บรรจุอาหารแต่ละสูตรลงในขวดแก้ว Erlenmeyer flask ขนาด 125 มล. ขวดละ 33 มล. แต่ละสูตรใช้แคลลัส 18-54 แคลลัส โดยเลี้ยงขวดละ 6 แคลลัส (ภาพที่ 1)

สูตรเปรียบเทียบคือสูตรอาหารที่ประกอบด้วยธาตุอาหารหลักของ White (1963) ธาตุอาหารรองของ Murashige และ Skoog (1962) ที่เติม IAA 1 มล./ล. Kinetin 3 มก./ล. และน้ำมะพร้าว 100 มล./ล. (ตารางที่ 4 อิงตาม Vajrabhaya et al. (1984 a,b)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

013634
1179214 29

ตารางที่ 3 สูตรทดลองที่มีความเข้มข้นของ NO_3-N NH_4-N P และ K ระดับต่าง ๆ (จำนวน 135 สูตร)

ความเข้มข้นของ NO_3^-, $H_2PO_4^-$ และ K^+ (จำนวนเท่า = x)			ความเข้มข้นของ NH_4^+ (จำนวนเท่า = x)				
			0	1 x	4 x	16 x	64 x
K^+	$H_2PO_4^-$	NO_3^-	สูตรที่				
1 x	1 x	1 x	1	28	55	82	109
		3 x	2	29	56	83	110
		10 x	3	30	57	84	111
	4 x	1 x	4	31	58	85	112
		3 x	5	32	59	86	113
		10 x	6	33	60	87	114
	16 x	1 x	7	34	61	88	115
		3 x	8	35	62	89	116
		10 x	9	36	63	90	117
4 x	1 x	1 x	10	37	64	91	118
		3 x	11	38	65	92	119
		10 x	12	39	66	93	120
	4 x	1 x	13	40	67	94	121
		3 x	14	41	68	95	122
		10 x	15	42	69	96	123
	16 x	1 x	16	43	70	97	124
		3 x	17	44	71	98	125
		10 x	18	45	72	99	126
16 x	1 x	1 x	19	46	73	100	127
		3 x	20	47	74	101	128
		10 x	21	48	75	102	129
	4 x	1 x	22	49	76	103	130
		3 x	23	50	77	104	131
		10 x	24	51	78	105	132
	16 x	1 x	25	52	79	106	133
		3 x	26	53	80	107	134
		10 x	27	54	81	108	135

หมายเหตุ สูตรที่ 1 คือสูตรเปรียบเทียบ และสูตรที่ 2-135 คือสูตรทดลอง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 1 วิธีการเลี้ยงแคลลัสจากเอมบริโอข้าวพันธุ์ กข.23 เพื่อชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่ ในสูตรทดลองต่าง ๆ บนชั้นสว่างในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 สูตรเปรียบเทียบ ซึ่งเป็น regeneration medium ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

สารประกอบ	มก./ล.	mM
ธาตุอาหารหลัก (White, 1963)		
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	300.0	1.27
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	720.0	2.92
KCl	65.0	0.87
KNO_3	80.0	0.79
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	16.5	0.12
Na_2SO_4	200.0	1.41
ธาตุอาหารรอง (Murashige and Skoog, 1962)		
H_3BO_3	6.200	
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.300	
$ZnSO_4 \cdot 4H_2O$	8.600	
KI	0.830	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.250	
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025	
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025	
Na_2EDTA	37.300	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.800	
สารอินทรีย์อื่น ๆ (Vajrabhaya et al., 1984)		
kinetin	3.0	
IAA	1.0	
bacto-agar	8,000.0	
coconut water	100.0	
pH = 5.6 (ปรับด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl)		

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สูตรทดลองคือสูตรอาหารที่มีส่วนประกอบของธาตุอาหารเช่นเดียวกับสูตรเปรียบเทียบ (ตารางที่ 3) แต่มีความเข้มข้นของ P และ K เท่ากับหรือมากกว่าสูตรเปรียบเทียบ 4 หรือ 16 เท่า มีความเข้มข้นของ NO_3-N เท่ากับหรือมากกว่าสูตรเปรียบเทียบ 3 หรือ 10 เท่า เมื่อไม่เติมหรือเติม NH_4-N ที่ความเข้มข้นตั้งต้น 0.8 mM หรือที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 4 16 และ 64 เท่า สำหรับความเข้มข้น (mM) และปริมาณ (มก./ล.) ของธาตุอาหารและสารประกอบที่ใช้เตรียมอาหารเพื่อศึกษาในการทดลองนี้แสดงไว้ในตารางที่ 5

3.3.2 การศึกษาผลของ Ca และ Mg

ในการศึกษาผลของ Ca และ Mg ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่จากแคลลัสในขั้นตอนนี้อาศัยผลการวิจัยที่ได้จากในข้อ 3.3.1 ที่ดีที่สุดอันดับ 1, 2 และ 3 มาเป็นสูตรหลักแล้วเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ Ca และ Mg โดยในกรณีของ Ca ใช้ความเข้มข้นคงเดิม และเพิ่มหรือลดจากเดิม 4 เท่า ส่วนกรณีของ Mg ใช้ความเข้มข้นคงเดิม และลดลงจากเดิม 4 เท่า ดังนั้นในการทดลองในขั้นนี้จึงมีสูตรทดลอง 29 สูตร และสูตรเปรียบเทียบอีก 1 สูตร ดังแสดงไว้ในตารางที่ 6 การเลี้ยงแคลลัสเช่นเดียวกันในข้อ 3.3.1 โดยใช้แคลลัสสูตรทดลองละ 30-60 แคลลัส สำหรับความเข้มข้น (mM) และปริมาณ (มก./ล.) ของธาตุอาหารและสารประกอบที่ใช้เตรียมอาหารเพื่อศึกษาในการทดลองนี้แสดงไว้ในตารางที่ 7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของ NO_3-N NH_4-N P และ K และปริมาณของสารประกอบที่ใช้ในสูตรทดลอง

ธาตุอาหาร	ปริมาณธาตุที่ใช้	ความเข้มข้นของสารประกอบ (mM)	ปริมาณอนุมูล (มก./ล.)	จำนวนเท่า	สารประกอบที่ใช้	ปริมาณสารประกอบ (มก./ล.)
NO_3-N	46.6	3.33	206.61	1	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	300.0
					KNO_3	80.0
	133.2	9.51	589.81	3	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	300.0
					KNO_3	80.0
					*$NaNO_3$	525.3
	479.4	34.23	2,122.61	10	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	300.0
					KNO_3	80.0
					$NaNO_3$	2,626.5
NH_4-N	0	0	0	0	-	0.0
	11.2	0.8	14.44	1	*$(NH_4)_2SO_4$	52.9
	44.8	3.2	57.72	4	$(NH_4)_2SO_4$	211.4
	179.2	12.8	230.89	16	$(NH_4)_2SO_4$	845.7
	717.1	51.2	923.58	64	$(NH_4)_2SO_4$	3,382.8
P	3.7	0.12	11.60	1	*$NaH_2PO_4.H_2O$	16.5
	14.8	0.48	46.39	4	$NaH_2PO_4.H_2O$	66.0
	59.2	1.92	185.56	16	$NaH_2PO_4.H_2O$	264.0
K	65.0	1.66	65.03	1	*KCl	65.0
					(KNO_3)	(80.0)
	259.5	6.64	259.59	4	KCl	436.0
					(KNO_3)	(80.0)
	1,038.3	26.56	1,038.38	16	KCl	1,921.0
					(KNO_3)	(80.0)

หมายเหตุ * คือสารประกอบที่ใช้ปรับความเข้มข้นในสูตรศึกษา

ตารางที่ 6 สูตรทดลองที่มีความเข้มข้นของ Ca และ Mg ระดับต่าง ๆ ในสูตรคัดเลือก สูตรที่ 43, 45, 55 และ 93 กับสูตรเปรียบเทียบ (รวม 30 สูตร)

ความเข้มข้นของ Ca^{++} และ Mg^{++} (จำนวนเท่า = x)		สูตรทดลอง (จากสูตรคัดเลือก)				
		1	43	45	55	93
Ca^{++}	Mg^{++}	สูตรที่ (ในการทดลองนี้)				
$\frac{1}{4}$ x	$\frac{1}{4}$ x	1.1	43.1	45.1	55.1	93.1
	1 x	1.2	43.2	45.2	55.2	93.2
1 x	$\frac{1}{4}$ x	1.3	43.3	45.3	55.3	93.3
	1 x	1.4	43.4	45.4	55.4	93.4
4 x	$\frac{1}{4}$ x	1.5	43.5	45.5	55.5	93.5
	1 x	1.6	43.6	45.6	55.6	93.6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ความเข้มข้นของ Ca และ Mg ที่ใช้ในสูตรทดลอง

ธาตุอาหาร	ปริมาณธาตุที่ใช	ความเข้มข้นของสารประกอบ (mM)	ปริมาณอนุมูล (มก./ล.)	จำนวนเท่า	สารประกอบที่ใช้	ปริมาณสารประกอบ มก./ล.
Ca	12.83	0.32	12.83	1/4	*$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	75.6
					*$NaNO_3$	161.5
	50.92	1.27	50.92	1	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	300.0
	203.64	5.08	203.64	4	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	300.0
					*$CaCl_2.2H_2O$	560.2
Mg	17.75	0.73	17.75	1/4	*$MgSO_4.7H_2O$	180.0
	71.01	2.92	71.01	1	$MgSO_4.7H_2O$	720.0

หมายเหตุ * คือสารประกอบที่ใช้ปรับความเข้มข้นในสูตรทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การเก็บรวบรวมข้อมูลการทดลอง

ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของแคลลัส จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อ และจำนวนหน่อ ดังนี้

4.1 การให้คะแนนลักษณะแคลลัสโดยสังเกตจากขนาดของแคลลัส สีของแคลลัส พื้นที่ greenspot บนพื้นที่ผิวของแคลลัส พื้นที่เกิดรากบนพื้นที่ของแคลลัส และระดับความสูงของหน่อ (shoot)ที่โผล่เหนือก้อนแคลลัสโดยแต่ละลักษณะแบ่งเป็น 5 คะแนน จากคะแนนน้อยคือลักษณะที่ไม่ดีที่สุดไปถึงคะแนนมากคือลักษณะที่ดีที่สุด

ตารางที่ 8 การให้คะแนนลักษณะแคลลัส

ลักษณะแคลลัส	คะแนน				
	1 น้อยที่สุด	2 น้อย	3 พอใช้	4 ดี	5 ดีที่สุด
ขนาด (เส้นผ่าศูนย์กลาง, ม.ม.)	2	3	4	5	6 ขึ้นไป
สี (พื้นที่แคลลัสมีสีดำ)	4/4 พื้นที่	3/4 พื้นที่	2/4 พื้นที่	1/4 พื้นที่	0
greenspot (พื้นที่ผิวแคลลัสเหนือวุ้น)	1/5 พื้นที่	2/5 พื้นที่	3/5 พื้นที่	4/5 พื้นที่	5/5 พื้นที่
ราก (พื้นที่แคลลัสใต้วุ้น)	0	1/4 พื้นที่	2/4 พื้นที่	3/4 พื้นที่	4/4 พื้นที่
ระดับความสูงของหน่อ (ซม.)	<0.5	0.5-0.9	1-1.9	2-2.9	≥ 3

4.2 นับจำนวนแคลลัสที่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นหน่อใหม่ และหน่อมีความสูงตั้งแต่ 0.5 ซม. ขึ้นไป

4.3 นับจำนวนหน่อที่โผล่เหนือก้อนแคลลัส และมีความสูงตั้งแต่ 0.5 ซม. ขึ้นไป เก็บรวบรวมข้อมูลการทดลองในสัปดาห์ที่ 2 4 และ 6 ของการเลี้ยงแคลลัสในสูตรทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย