บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

<u>วัสดุและอุปกรณ์</u>

1. พืชทดลอง เอมบริโอจากเมล็ดข้าวที่เจริญเต็มที่พันธุ์ กข.23 ซึ่งได้จากกองการ-ข้าว กรมวิชาการเกษตร ข้าวพันธุ์กข.23 นี้เป็นข้าวพันธุ์ดี ปลูกได้ทุกภาคของประเทศ ในทุกฤดูกาล ให้ผลผลิตสูงหากมีน้ำเพียงพอ อายุเก็บเกี่ยว 100-130 วัน หลังหว่าน

2. สารเคมี

2.1 การเตรียมอาหารสำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใช้สารประกอบอนินทรีย์ที่เป็นธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง ในสูตรตามตารางที่ 1

2.2 สารควบคุมการเจริญ

2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), NAA (α-napthaleneacetic acid) และ BAP (6-benzylaminopurine)

2.3 สารประกอบอินทรีย์

สารประกอบอินทรีย์อื่นๆ (defined organic) ได้แก่ น้ำตาลซูโครส วิตามิน กรดอะมิโน

สารอินทรีย์เสริม (undefined organic additive) ได้แก่ กล้วยสุกพันธุ์หอมทอง มะเขือเทศสุกพันธุ์ฟลอราเดล มะละกอสุกพันธุ์แขกดำ มันฝรั่งพันธุ์สบุนตา น้ำมะพร้าว-อ่อนที่มีเนื้อหนาประมาณ 3 มิลลิเมตร และปุ๋ยปลา (fish emulsion fertilizer) สูตร 5-2-2 ของบริษัท Alaska เมือง Ranton รัฐวอชิงตัน ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารทำให้อาหารแข็งตัว ได้แก่ วุ้นผงชนิดเกรดทำยา (AR grade) แป้งข้าวโพดตราไมซินาของบริษัทซีพีซี/อายิ (ประเทศไทย) จำกัด และ gelrite ของบริษัท Kelco Division เมืองซานดิเอโก รัฐแคลิฟอเนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของสูตรอาหารทดลองต่างๆ

องค์ประกอบ	สูตรอาหาร (มิลลิกรัมต่อลิตร/ยกเว้นที่ระบุในตาราง)			
	สูตรชักนำแคลลัส	สูตรชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่		
	A	B	MN_6	SP
<u>ธาตุอาหารหลัก</u>	MN_6 (1988)	MN_6 (1988)	MN_6 (1988)	SP (1986)
KNO_3	เหมือน MN_6	เหมือน MN_6	2,830.00	670.00
$CaCl_2.2H_2O$			166.00	-
$MgSO_4.7H_2O$			185.00	720.00
KH_2PO_4			400.00	-
$(NH_4)_2SO_4$			463.00	-
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	-	-	-	1,200.00
$NaH_2PO_4.H_2O$	-	-	-	265.00
NH_4Cl	-	-	-	170.00
<u>ธาตุอาหารรอง</u>	MN_6 (1988)	MN_6 (1988)	MN_6 (1988)	MS (1962)
KI	เหมือน MN_6	เหมือน MN_6	0.80	0.83
H_3BO_3			10.00	6.20
$MnSO_4.4H_2O$			10.00	22.30
$ZnSO_4.7H_2O$			10.00	8.60
$Na_2MoO_4.2H_2O$			0.025	0.25
$CuSO_4.5H_2O$			0.025	0.025
$CoCl_2.6H_2O$			0.025	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	19.857	19.857	-	27.80
$Na_2EDTA.2H_2O$	26.642	26.642	-	37.30
Sequestrene 330Fe	-	-	40.00	-

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของสูตรอาหารทดลองต่างๆ

องค์ประกอบ	สูตรอาหาร (มิลลิกรัมต่อลิตร/ยกเว้นที่ระบุในตาราง)			
	สูตรชักนำแคลลัส	สูตรชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่		
	A	B	MN_6	SP
<u>สารอินทรีย์อื่นๆ</u>				
<u>วิตามิน</u>				
Myo-inositol	เหมือน MN_6	เหมือน MN_6	200.00	-
Nicotinic acid			1.00	-
Pyridoxine HCl			1.00	-
Thiamine HCl			5.00	-
Biotin			0.50	-
Calcium pantothenate	-	-	1.00	-
Ascorbic acid	-	-	0.50	-
<u>กรดอะมิโน</u>				
Glycine	เหมือน MN_6	เหมือน MN_6	2.00	-
Serine			40.00	-
Proline			40.00	-
Arginine			40.00	-
Asparagine			40.00	-
Alanine			40.00	-
Glutamine			400.00	-

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของสูตรอาหารทดลองต่างๆ

องค์ประกอบ	สูตรอาหาร (มิลลิกรัมต่อลิตร/ยกเว้นที่ระบุในตาราง)			
	สูตรชักนำแคลลัส	สูตรชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่		
	A	B	MN_6	SP
สารควบคุมการเจริญ				
2,4-D	0.80	-	-	-
IAA	-	-	-	1.00
BAP	0.40	-	-	-
Kinetin	-	-	-	3.00
สารอินทรีย์เสริม				
coconut water (มิลลิลิตรต่อลิตร)	100.00	-	-	100.00
potato extract (กรัมต่อลิตร)	100.00	-	-	-
Sucrose(กรัมต่อลิตร)	32.00	16.00	90.00	-
Agar (กรัมต่อลิตร)	8.00	16.00	-	8.00

A....สูตรอาหารทดลองชักนำให้เกิดแคลลัสดัดแปลงจากสูตร MN_6 (Chu and Hill,1988)

B....สูตรอาหารทดลองชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ดัดแปลงจากสูตร MN_6 สำหรับชักนำแคลลัสให้เกิด greenspot และหน่อ

MN_6..สูตรอาหารชักนำแคลลัสจากอับเรณูข้าวสาลีให้เกิดเป็นต้นใหม่

SP...สูตรอาหารชักนำแคลลัสจากเอมบริโอที่เจริญเต็มที่ของข้าวพันธุ์ กข.23 ให้เกิดเป็นต้นใหม่ที่มีธาตุอาหารหลักสูตร SP (สิริพร ชาตะปัทมะ,2529)

2.4 สารเคมีที่ใช้ในการทำให้ปลอดเชื้อและสารลดความตึงผิว ได้แก่ เอธิลแอลกอฮอล์ คลอรอกซ์ (โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5.25 %) Tween-20 และน้ำยาทำความสะอาด Teepol

3. อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ Petri dish ขนาด 100 x 15 มิลลิเมตร parafilm ขวดแก้วขนาด 40 x 75 มิลลิเมตร พร้อมฝาพลาสติกสีขาวแบบเกลียว Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ตะแกรงกรองขนาด 0.01 ตารางเซนติเมตร มีดสองคม และอุปกรณ์อื่นๆ ตามวิธีมาตรฐานสำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อทั่วไป

4. ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

อุณหภูมิห้อง 25 ± 2 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิที่ชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อ 27 ± 3 องศาเซลเซียส ช่วงแสง 16 ชั่วโมง ต่อช่วงมืด 8 ชั่วโมง ให้แสงโดยหลอดฟลูออเรสเซนต์ Philips TL 40 w/33 (Cool white) อยู่เหนือระดับวุ้นอาหารประมาณ 25 เซนติเมตร ความเข้มของแสงที่ระดับชั้นวาง Petri dish ประมาณ 2,500 ลักซ์ ชั้นมืดเป็นตู้มืดปิดด้วยกระดาษดำโดยรอบ

<u>วิธีดำเนินการวิจัย</u>

การเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเอมบริโอที่เจริญเต็มที่ของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข.23 มีขั้นตอนดังนี้

1. การฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ด

เนื่องจากเมล็ดข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ใช้ศึกษามีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์มากจึงใช้ขั้นตอนในการคัดเลือกและฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ด ดังนี้

1.1 คัดเลือกเมล็ดข้าวเปลือกที่เจริญเต็มที่และแกะเปลือกของเมล็ดข้าวด้วยปากคีบปลายแหลม

1.2 ล้างเมล็ดข้าวสารด้วยน้ำประปาที่เติม Teepol จำนวน 5 หยด ต่อน้ำประปา 250 มิลลิลิตร เขย่าประมาณ 5 นาที และล้างด้วยน้ำประปาสลับกัน 2 ครั้ง

1.3 ฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดข้าวสารด้วยคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 30 % และ 15 % โดยบริมาตรเป็นเวลา 30 นาที และ 15 นาที ตามลำดับ และใส่ Tween-20 จำนวน 3 หยด

ต่อสารละลายคลอรอกซ์ 100 มิลลิลิตร โดยเขย่าทุก ๆ 5 นาที

1.4 ล้างเมล็ดข้าวสารด้วยน้ำ deionized ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วทั้งหมด 5 ครั้ง จากนั้นเก็บไว้ใน Petri dish เพื่อเตรียมไว้สำหรับเลี้ยงในวุ้นอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสต่อไป

2. การเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อพัฒนาสูตรอาหาร

การเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว โดยการเลี้ยงจากเอมบริโอที่เจริญเต็มที่ มีขั้นตอนการเจริญและพัฒนา 3 ระยะ (ดังแสดงในภาพที่ 1) คือ

1. การทดลองชักนำให้เกิดแคลลัส (Callus induction)

โดยการเลี้ยงเอมบริโอที่ติดอยู่บนเมล็ดข้าว ในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส

2. การทดลองชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ (Plant regeneration)

โดยการเลี้ยง embryogenic callus ในอาหารสูตรชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ เพื่อพัฒนาเป็น greenspot และหน่อ เพียงระยะเดียวแทนการพัฒนา 2 ระยะ คือการชักนำแคลลัสให้เกิด greenspot ในอาหารสูตรชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ สูตรที่ 1 และการชักนำแคลลัสที่เกิด greenspot ให้เกิดหน่อในอาหารสูตรชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ สูตรที่ 2

3. การชักนำต้นใหม่ให้เกิดราก (Root formation)

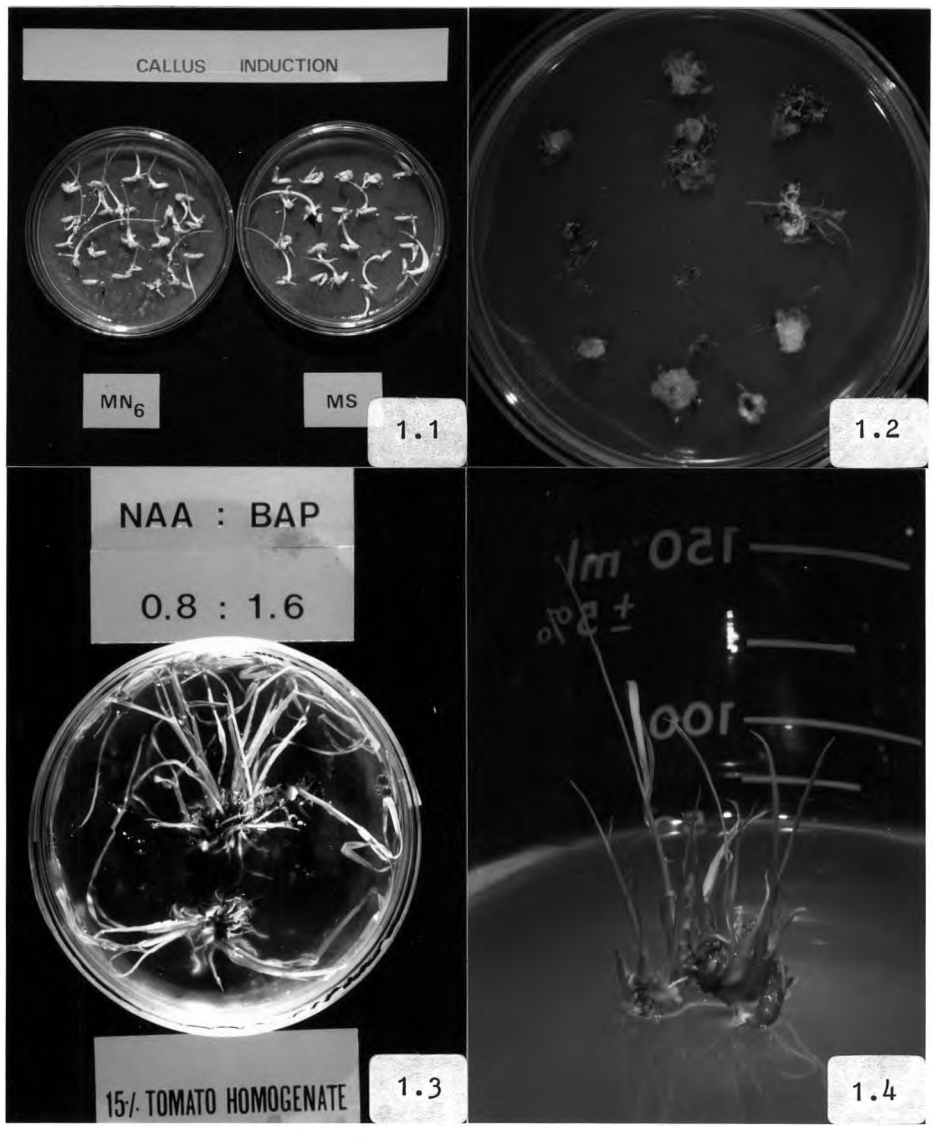
โดยการเลี้ยงต้นใหม่ในวุ้นอาหารสูตร MS (1962) ที่ไม่เติมฮอร์โมนและใช้น้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งส่วนรากสามารถเจริญออกมาได้ง่าย

สำหรับข้าวพันธุ์ กข.23 เป็นสายพันธุ์ที่มีอัตราการเกิดเป็นต้นใหม่จากแคลลัสต่ำ จึงศึกษาองค์ประกอบของอาหารและปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มอัตราการเกิดเป็นต้นใหม่จากแคลลัส โดยแบ่งการศึกษาวิจัยเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ผลของสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ที่มีต่อจำนวนแคลลัสที่เกิด greenspot จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อ และจำนวนหน่อที่เกิดทั้งหมด มีขั้นตอนการศึกษา ดังนี้

1.1 การชักนำแคลลัสเพื่อเตรียมใช้ศึกษา

เลี้ยงเอมบริโอที่ติดอยู่บนเมล็ดข้าวสาร ที่ฆ่าเชื้อที่ผิวเรียบร้อยแล้ว ในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตร A ตามตารางที่ 1 โดยเลี้ยงใน Petri dish ใช้ 20 เมล็ด ต่อวุ้น



ภาพที่ 1 การเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว

1.1 ระยะชักนำให้เกิดแคลลัสจากเอมบริโอที่เจริญเต็มที่

1.2 ระยะชักนำแคลลัสให้เกิด greenspot และหน่อ

1.3 การเกิดหน่อและต้น

1.4 การย้ายเลี้ยงในสูตรอาหารอนุบาลต้นอ่อน

อาหารปริมาณ 20 มิลลิลิตร ในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นเลือกเฉพาะ embryogenic callus สำหรับการทดลองต่อไป

1.2 การทดลองชักนำแคลลัสให้เกิด greenspot และหน่อ

เลี้ยง embryogenic callus ที่ได้จากข้อ 1.1 ในอาหารสูตรชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ใน Petri dish ใช้ 7 แคลลัสต่อวุ้นอาหารปริมาณ 25 มิลลิลิตร ทั้งหมด 6 plate ต่อหนึ่งสูตรอาหารที่ทำการทดลองเป็นเวลา 3 สัปดาห์ เพื่อศึกษาผลของสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ที่มีต่อจำนวนแคลลัสที่เกิด greenspot จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อ และจำนวนหน่อที่เกิดทั้งหมด โดยทำการทดลองดังนี้

1.2.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนิน ในอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ สูตร B ตามตารางที่ 1 ที่เติมน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ขั้นตอน คือ

1.2.1.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่าง NAA และ BAP โดยใช้ NAA ความเข้มข้น 0.4, 0.8 และ 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 0.8, 1.6 และ 3.2 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 9 สูตรการทดลอง

1.2.1.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่าง 2,4-D และ BAP โดยใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4 และ 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 1.6 และ 3.2 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 8 สูตรการทดลอง

จากนั้นเลือกสูตรอาหารที่ดีที่สุดในการชักนำแคลลัสให้เกิดหน่อจากข้อ 1.2.1.1 หรือ 1.2.1.2 สำหรับใช้ในการทดลองข้อ 1.2.3 ต่อไป

1.2.2 ศึกษาผลของสารอินทรีย์เสริมชนิดต่าง ๆ ในอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ สูตร B ตามตารางที่ 1 ที่เติม NAA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ น้ำสกัดมันฝรั่งพันธุ์สปุนตา 100 กรัมต่อลิตร ที่ปอกเปลือกแล้วหั่นเป็นชิ้นบางๆ มีความหนาประมาณ 0.13 เซนติเมตร ต้มให้สุกแล้วกรองและคั้นเอาเฉพาะน้ำหลังจากต้มให้สุกแล้วด้วยตะแกรงกรองขนาด 0.01 เซนติเมตร หรือเนื้อกล้วยสุกพันธุ์หอมทอง หรือเนื้อมะละกอสุกพันธุ์แขกดำ หรือเนื้อมะเขือเทศสุกพันธุ์พลอราเดล อย่างละ 150 กรัมต่อลิตร หั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมให้มีขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มให้สุกและปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นเป็นเวลา 3 นาที หรือปุ๋ยปลาสูตร 5-2-2 รวมทั้งหมด 5 สูตรการทดลอง จากนั้นเลือกสูตรอาหารที่ดีที่สุดในการ

ชักนำแคลลัสให้เกิดหน่อ สำหรับใช้ในการทดลองข้อ 1.2.3 ต่อไป

1.2.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่าง NAA และ BAP กับสารอินทรีย์เสริมในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ที่ให้ผลดีที่สุดในการชักนำแคลลัสให้เกิดหน่อจากข้อ 1.2.1 และ 1.2.2 ตามลำดับ โดยเลือกใช้ความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่าง NAA และ BAP คือ 0.4 : 0.8, 0.8 : 0.8, 0.4 : 1.6 และ 0.8 : 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สารอินทรีย์เสริม คือ น้ำสกัดมันฝรั่งและเนื้อมันฝรั่งอย่างละ 150 กรัมต่อลิตร แทนน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งเนื้อมันฝรั่งมีวิธีการเตรียมคล้ายน้ำสกัดมันฝรั่ง แต่หลังจากต้มให้สุกแล้วจะปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นเป็นเวลา 3 นาที และเปรียบเทียบการใช้เนื้อมะเขือเทศสุก 150 และ 500 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ รวมทั้งหมด 16 สูตรการทดลอง ดังตารางที่ 2 จากนั้นเลือกสูตรอาหารที่ดีที่สุดในการชักนำแคลลัสให้เกิดหน่อ สำหรับการทดลองต่อไป

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่าง NAA และ BAP กับสารอินทรีย์เสริม (หมายเลข 1-16 คือ สูตรอาหารที่ต่างกัน)

สารอินทรีย์เสริม	NAA : BAP (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
	0.4:0.8	0.8:0.8	0.4:1.6	0.8:1.6
น้ำสกัดมันฝรั่ง[1]	1	2	3	4
เนื้อมันฝรั่ง[1]	5	6	7	8
เนื้อมะเขือเทศสุก[1]	9	10	11	12
เนื้อมะเขือเทศสุก[2]	13	14	15	16

1/ น้ำหนัก 150 กรัมต่อลิตร, 2/ น้ำหนัก 500 กรัมต่อลิตร

1.2.4 ศึกษาผลของภาชนะที่เลี้ยงแคลลัส ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ที่ให้ผลดีที่สุดในการชักนำแคลลัสให้เกิดหน่อจากข้อ 1.2.3 ที่เติมน้ำสกัดมันฝรั่ง 150 กรัมต่อลิตร หรือเนื้อมะเขือเทศสุก 150 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบภาชนะที่เลี้ยงสองชนิดคือ ขวดแก้วกลมขนาด 40 x 75 มิลลิเมตร พร้อมฝาพลาสติกสีขาวแบบเกลียวไม่แน่น และ Petri dish ขนาด 100 x 15 มิลลิเมตร ที่ปิดด้วย parafilm (ดังแสดงในภาพที่ 2)

1.3 การทดลองชักนำแคลลัสที่เกิด greenspot ให้เกิดหน่อ

เลี้ยงแคลลัสที่เกิด greenspot จากอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ สูตรที่ 1 คือ สูตร B ตามตารางที่ 1 ที่เติม NAA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และ น้ำสกัดมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่สูตรที่ 2 ใน Petri dish ใช้ 7 แคลลัสต่อวุ้นอาหารปริมาณ 25 มิลลิลิตร ทั้งหมด 6 plate ต่อหนึ่งสูตรอาหารที่ทำการทดลอง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อศึกษาผลของสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ สูตรที่ 2 ที่มีต่อจำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อ และจำนวนหน่อที่เกิดทั้งหมด

โดยศึกษาผลของความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่าง NAA และ BAP ในอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ สูตร B ตามตารางที่ 1 ที่เติมน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร โดยใช้ NAA ความเข้มข้น 0.4, 0.8, 1.6 และ 3.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 16 สูตรการทดลอง

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาผลของการเติมสารอินทรีย์เสริมชนิดต่าง ๆ ในสูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส ที่มีผลต่อเนื่องกับจำนวนแคลลัสที่เกิด greenspot จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อ และจำนวนหน่อที่เกิดทั้งหมด ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ที่เติมสารอินทรีย์เสริมต่างกัน มีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

2.1 การทดลองชักนำแคลลัสโดยใช้สูตรอาหารที่เติมสารอินทรีย์เสริมต่างๆ

เลี้ยงเอมบริโอของเมล็ดข้าวสาร ในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสใน Petri dish ใช้ 20 เมล็ดต่อวุ้นอาหารปริมาณ 20 มิลลิลิตร ในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์

ศึกษาผลของการเติมสารอินทรีย์เสริมชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับการเติมน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร ในสูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตร A ตามตารางที่ 1 โดยใช้น้ำสกัด

ภาพที่ 2 การเปรียบเทียบภาชนะที่เลี้ยงแคลลัสระหว่างขวดแก้วกลม ขนาด 40 x 75 มิลลิเมตร และ Petri dish ขนาด 100 x 15 มิลลิเมตร

มันฝรั่ง 150 กรัมต่อลิตร หรือเนื้อมันฝรั่ง 100 หรือ 150 กรัมต่อลิตร หรือเนื้อมะเขือเทศ 150 กรัมต่อลิตร หรือน้ำสกัดมันฝรั่งร่วมกับเนื้อมะเขือเทศ อย่างละ 150 กรัมต่อลิตร หรือน้ำสกัดมันฝรั่งร่วมกับเนื้อมะเขือเทศ อย่างละ 75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ รวมทั้งหมด 7 สูตรการทดลอง จากนั้นเลือกเฉพาะ embryogenic callus ของแต่ละสูตรการทดลอง นำไปเลี้ยงต่อในอาหารสูตรชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ในข้อ 2.2

2.2 การทดลองชักนำแคลลัสให้เกิด greenspot และหน่อ

เลี้ยง embryogenic callus ของแต่ละสูตรการทดลองจากข้อ 2.1 ในอาหารสูตรชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ใน Petri dish ใช้ 7 แคลลัสต่อวุ้นอาหารปริมาณ 25 มิลลิลิตร ทั้งหมด 6 plate ต่อหนึ่งสูตรอาหารที่ทำการทดลอง เป็นเวลา 3 สัปดาห์

ศึกษาผลของการเติมสารอินทรีย์เสริมชนิดต่างๆ ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ที่ให้ผลดีที่สุดในการชักนำแคลลัสให้เกิดหน่อ จากขั้นตอนที่ 1 คือ สูตร B ที่เติม NAA 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้น้ำสกัดมันฝรั่ง 150 กรัมต่อลิตร หรือเนื้อมะเขือเทศ 150 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับน้ำสกัดมันฝรั่งร่วมกับเนื้อมะเขือเทศ อย่างละ 150 กรัมต่อลิตร หรือน้ำสกัดมันฝรั่งร่วมกับเนื้อมะเขือเทศ อย่างละ 75 กรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 28 สูตรการทดลอง ดังตารางที่ 3 จากนั้นเลือกสูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสและสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ที่ให้ผลดีที่สุดในการชักนำแคลลัสให้เกิดหน่อ สำหรับการทดลองต่อไป

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาผลของสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ที่มีต่อจำนวนแคลลัสที่เกิด greenspot จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อ และจำนวนหน่อที่เกิดทั้งหมด มีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

3.1 การชักนำแคลลัสเพื่อเตรียมใช้ศึกษา

เลี้ยงเอมบริโอของเมล็ดข้าวสารในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส สูตรที่ให้ผลดีที่สุดคือ สูตร A ที่เติมเนื้อมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร แทนน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร จากขั้นตอนที่ 2 ใน Petri dish ใช้ 20 เมล็ดต่อวุ้นอาหารปริมาณ 20 มิลลิลิตร ในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นเลือกเฉพาะ embryogenic callus สำหรับทดลองต่อไป

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณสารอินทรีย์เสริมในสูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส และสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ (หมายเลข 1-28 คือ สูตรอาหารที่ต่างกัน)

สารอินทรีย์เสริมในสูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส	สารอินทรีย์เสริมในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่			
	น้ำสกัดมันฝรั่ง[2]	เนื้อมะเขือเทศสุก[2]	น้ำสกัดมันฝรั่ง[2]+ เนื้อมะเขือเทศสุก[2]	น้ำสกัดมันฝรั่ง[3]+ เนื้อมะเขือเทศสุก[3]
น้ำสกัดมันฝรั่ง[1]	1	2	3	4
น้ำสกัดมันฝรั่ง[2]	5	6	7	8
เนื้อมันฝรั่ง[1]	9	10	11	12
เนื้อมันฝรั่ง[2]	13	14	15	16
เนื้อมะเขือเทศสุก[2]	17	18	19	20
น้ำสกัดมันฝรั่ง[2] + เนื้อมะเขือเทศสุก[2]	21	22	23	24
น้ำสกัดมันฝรั่ง[3]+ เนื้อมะเขือเทศสุก[3]	25	26	27	28

1/ น้ำหนัก 100 กรัมต่อลิตร, 2/ น้ำหนัก 150 กรัมต่อลิตร, 3/ น้ำหนัก 75 กรัมต่อลิตร

3.2 การทดลองชักนำแคลลัสให้เกิด greenspot และหน่อ

เลี้ยง embryogenic callus ที่ได้จากข้อ 3.1 ในอาหารสูตรชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ใน Petri dish ใช้ 7 แคลลัสต่อวุ้นอาหารปริมาณ 25 มิลลิลิตร ทั้งหมด 6 plate ต่อหนึ่งสูตรอาหารที่ทดลอง เป็นเวลา 3 สัปดาห์ เพื่อศึกษาสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ที่มีต่อจำนวนแคลลัสที่เกิด greenspot จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อ และจำนวนหน่อที่เกิดทั้งหมด ดังนี้

3.2.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่าง NAA และ BAP ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ที่ให้ผลดีที่สุดในการชักนำแคลลัสให้เกิดหน่อ จากขั้นตอนที่ 2 โดยเลือกใช้สารอินทรีย์เสริม คือ น้ำสกัดมันฝรั่ง 150 กรัมต่อลิตร หรือเนื้อมะเขือเทศ 150 กรัมต่อลิตร หรือน้ำสกัดมันฝรั่งร่วมกับเนื้อมะเขือเทศ อย่างละ 75 กรัมต่อลิตร ในแต่ละชุดที่ทำการทดลอง ใช้ NAA ความเข้มข้น 0.8, 3.2 และ 12.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 1.6, 6.4 และ 25.6 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 27 สูตรการทดลอง จากนั้นเลือกสูตรอาหารที่ชักนำแคลลัสให้เกิดหน่อที่ดีที่สุด สำหรับการทดลองต่อไป

3.2.2 ศึกษาผลของการเติมปุ๋ยปลาในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ที่ให้ผลดีที่สุดในการชักนำแคลลัสให้เกิดหน่อจากข้อ 3.2.1 คือ สูตร B ที่เติม NAA 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 6.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ใช้น้ำสกัดมันฝรั่ง 150 กรัมต่อลิตร หรือเนื้อมะเขือเทศ 150 กรัมต่อลิตร หรือน้ำสกัดมันฝรั่งร่วมกับเนื้อมะเขือเทศ อย่างละ 75 กรัมต่อลิตร โดยใช้ปุ๋ยปลาปริมาณ 2.0 และ 4.0 มิลลิลิตรต่อลิตร เปรียบเทียบกับการไม่เติมปุ๋ยปลา และเปรียบเทียบผลของระยะเวลาที่เลี้ยงแคลลัส 3 สัปดาห์และ 4 สัปดาห์ รวมทั้งหมด 9 สูตรการทดลอง

3.2.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่างสารทำให้อาหารแข็งตัว และน้ำตาลซูโครส ในสูตรอาหารชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่ ที่ให้ผลดีที่สุดในการชักนำแคลลัสให้เกิดหน่อ จากข้อ 3.2.2 คือ สูตร B ที่เติม NAA 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 6.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และเนื้อมะเขือเทศ 150 กรัมต่อลิตร โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ขั้นตอน คือ

3.2.3.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่าง gelrite แทนวุ้นผง และน้ำตาลซูโครส โดยใช้ gelrite ความเข้มข้น 2.0, 2.8, 4.0 และ 5.6 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 8.0, 16.0, 32.0 และ 64.0 กรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 16 สูตรการทดลอง

3.2.3.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นและสัดส่วนระหว่างแป้งข้าวโพด แทนวุ้นผง และน้ำตาลซูโครส โดยใช้แป้งข้าวโพด ความเข้มข้น 80.0, 110.0 และ 160.0 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 8.0, 16.0, 32.0 และ 64.0 กรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 12 สูตรการทดลอง

3. การเก็บรวบรวมข้อมูล

3.1 นับจำนวนแคลลัสที่เกิด greenspot

3.2 นับจำนวนแคลลัสที่สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ ซึ่งมีความสูงของหน่อตั้งแต่ 0.5 เซนติเมตร ขึ้นไป

3.3 นับจำนวนหน่อที่โผล่เหนือก้อนแคลลัสที่มีความสูงตั้งแต่ 0.5 เซนติเมตร ขึ้นไป

3.4 การวางแผนการทดลองตลอดงานวิจัยใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Complete Randomized Design) และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม IRRI STAT Version 3 (1993) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง treatment ด้วยวิธีการเปรียบเทียบแบบ DMRT (Duncan's New Multiple Range Test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %