บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. พืชทดลอง เมล็ดข้าวที่เจริญเต็มที่ (mature seed) สายพันธุ์ กข 23 ซึ่งได้จากกองการข้าว กรมวิชาการเกษตร ข้าวพันธุ์ กข 23 นี้ เป็นข้าวลูกผสมที่ได้จากการผสมพันธุ์ข้าว 3 สายพันธุ์ คือ กข 1/IR 32 // กข 7 เป็นข้าวพันธุ์ดีซึ่งปลูกได้ทุกภาคของประเทศในทุกฤดูกาล ให้ผลผลิตสูงหากมีน้ำเพียงพอ มีอายุเก็บเกี่ยว 100-130 วัน หลังหว่าน ดังนั้น คณะกรรมการวิจัยของกรมวิชาการเกษตรได้พิจารณาให้เผยแพร่แก่ชาวนาเพื่อปลูกแทนข้าวพันธุ์เตี้ยที่เคยปลูกและเสียหายเพราะโรคจู๋จากเชื้อวิสา ตั้งแต่ พ.ศ. 2524

2. สารเคมี

2.1 การเตรียมอาหารสำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใช้เกลือซึ่งเป็นธาตุอาหารหลัก (macronutrients) และธาตุอาหารรอง (micronutrients) ชนิด AR (analytical reagent) ตามสูตรในตารางที่ 1-7

2.2 สารควบคุมการเจริญ

2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)

IAA (Indole-3-acetic acid)

NAA (∝-napthaleneacetic acid)

Kinetin (6-furfurylaminopurine)

BAP (6-benzylaminopurine)

2.3 สารอินทรีย์

น้ำมะพร้าวอ่อน

วุ้นผง (ใช้เกรดสำหรับทำยา)

2.4 สารที่ใช้ในการทำให้ปลอดเชื้อ

clorox (ซึ่งมี sodium hypochlorite 5.25%)

เอธิลแอลกอฮอล์ 90% และ 70%

tween-20

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. อุปกรณ์

3.1 เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น บีกเกอร์ กระบอกตวง บิเปต

3.2 ขวดแก้วใส่อาหารพร้อมฝาพลาสติกทนความร้อนขนาด 4 x 7.5 ซม. (ใช้ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

3.3 ขวด vial พร้อมฝาเบคคาไลท์ ขนาด 2.5 x 9.5 ซม. และ ขวดขนาด 4 X 8 ซม. (ใช้ที่ Colorado State University)

3.4 อุปกรณ์อื่น ๆ ที่จำเป็น เช่น laminar flow หม้อนึ่งอัดความดัน เครื่องชั่ง เครื่องวัด pH ฯลฯ

4. ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4.1 ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุณหภูมิห้อง 24-27 องศาเซลเซียส

ความชื้นสัมพัทธ์ ประมาณ 60 เปอร์เซนต์

ชั้นสว่าง ใช้หลอดไฟฟลูออเรสเซนซ์ ชนิด TL 40/33 ความเข้มแสงประมาณ 1200 ลักซ์ ช่วงแสง สว่าง/มืด 16/8 ชั่วโมงต่อวัน

ชั้นมืด เป็นตู้มืด กรุด้วยกระดาษดำโดยรอบ

4.2 ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ TCCP Colorado State University สหรัฐอเมริกา

อุณหภูมิห้อง 24-28 องศาเซลเซียส

ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 60 เปอร์เซนต์

ชั้นสว่าง ใช้หลอดฟลูออเรสเซนซ์ ชนิด Daylight F 40 W. ความเข้มแสงประมาณ 1200 ลักซ์ ช่วงแสงตลอด 24 ชั่วโมง (continuous light)

ชั้นมืด ใช้กล่องกระดาษที่ปิดมิดชิด

วิธีดำเนินการทดลอง

เนื่องจากการวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัย "New Varieties of Rice for Saline and Acid Soil through Tissue Culture" ซึ่งเริ่มปฏิบัติงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2526 และ พ.ศ. 2527 ประสบปัญหาในเรื่องการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่จากแคลลัสข้าว ซึ่งยังมีเปอร์เซ็นต์ต่ำอยู่มาก โดยเฉพาะหลังจากที่แคลลัสได้รับ stress จาก NaCl การเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ของแคลลัสในกลุ่ม indica นั้นนักวิทยาศาสตร์อื่นๆ ก็ประสบปัญหา

เช่นกัน (Yamada, 1982; Nabors, 1983; และ Zapata et al., 1983) จึงมีการแลกเปลี่ยนความคิดเห็นกับผู้ร่วมมือระหว่างโครงการ คือ Prof. M.W. Nabors แห่ง Colorado State University และโครงการข้าวฯ จุฬาฯ เพื่อแก้ไขปัญหาการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่จากแคลลัสข้าวให้มีเปอร์เซนต์สูงขึ้น โดยมีทุนแลกเปลี่ยนนิสิตระดับปริญญามหาบัณฑิตเพื่องานวิจัยระหว่างจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยกับ Colorado State University จึงทำให้งานวิจัยนี้แบ่งการปฏิบัติงานออกเป็น 2 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 ปฏิบัติงาน ณ หน่วยปฏิบัติการวิจัยการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อหาชนิดและความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินที่เหมาะสำหรับการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่จากแคลลัสข้าวพันธุ์กข23 จากสูตรทดลอง 100 สูตร และสูตรเปรียบเทียบ 4 สูตร

ส่วนที่ 2 ปฏิบัติงาน ณ หน่วยปฏิบัติการ TCCP Colorado State University เมื่อเสร็จสิ้นการทดลองส่วนที่ 1 เลือกสูตรที่ให้ผลดีที่สุด แล้วทำการทดลองซ้ำเปรียบเทียบกับสูตรเปรียบเทียบอีก 2 สูตร ในเรื่องของธาตุอาหารหลัก สารอินทรีย์บางชนิด อายุของแคลลัส และ เทคนิคของการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

โดยมีขั้นตอนในการศึกษาตลอดงานวิจัยนี้ ดังนี้.-

1. แผนดำเนินงานวิจัย

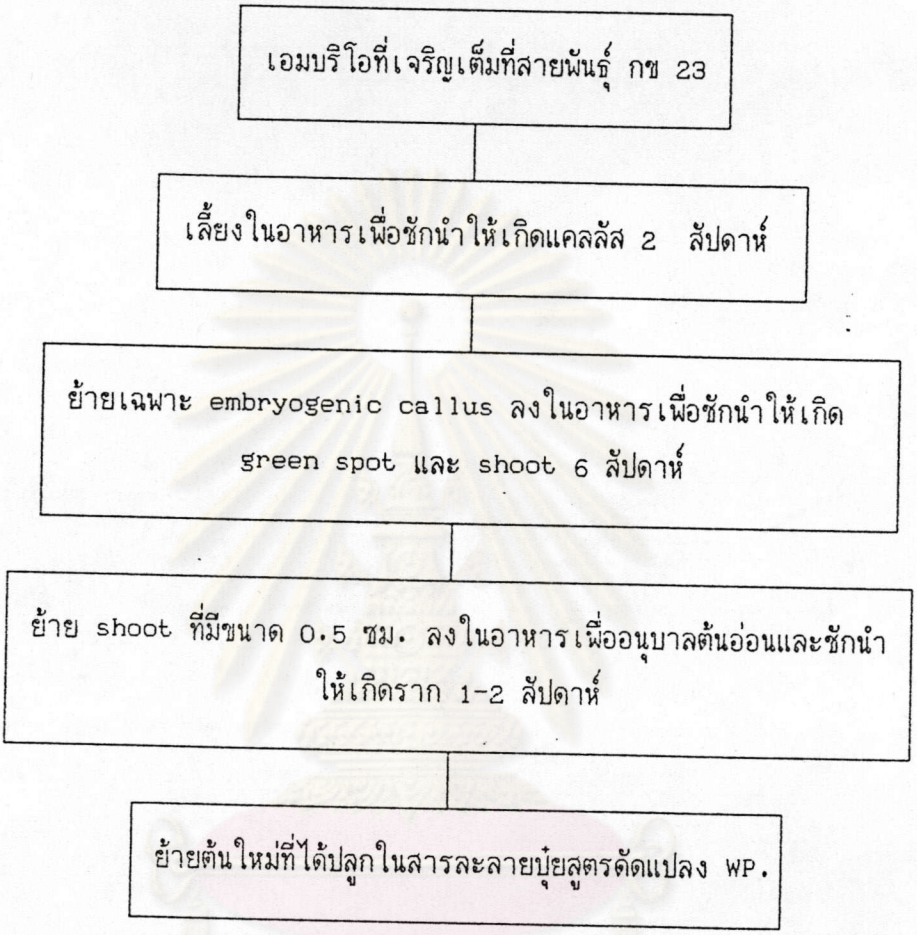
ขั้นตอนในการดำเนินการทดลองตลอดโครงการสามารถแสดงได้ดังแผนภาพที่ 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

014450

แผนภาพที่ 1

แผนดำเนินงานวิจัยโดยสังเขปตลอดโครงการ



2. การเตรียมอาหารสำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.1 สูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส (Callus induction medium) ใช้สูตรดัดแปลง Murashige และ Skoog (1982) ตามวิธีการของ Vajrabhaya และคณะ (1983) และ Vajrabhaya และ Vajrabhaya (1986) (ตารางที่ 1) เพื่อเตรียมแคลลัสสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

2.2 สูตรอาหารสำหรับชักนำให้เกิดต้น

2.2.1 สูตรอาหารเปรียบเทียบ เนื่องจากในระหว่างปฏิบัติงานมีผู้เชี่ยวชาญมาเยี่ยมชมที่ห้องปฏิบัติการฯ จุฬา ฯและได้ให้คำแนะนำที่มีประโยชน์ จึงทดลองใช้เป็นสูตรเปรียบเทียบตามสูตรของ

ก. Vajrabhaya และคณะ (1984) เป็นสูตรเปรียบเทียบที่ 1 ตามตารางที่ 2

ข. Modified Vajrabhaya (1984) สูตรเปรียบเทียบที่ 2 ตามตารางที่ 3 (ต่างจากสูตรเปรียบเทียบที่ 1 เฉพาะส่วนของออกซินและไซโตไคนิน)

ค. Zapata et al. (1983) สูตรเปรียบเทียบที่ 3 ตามตารางที่ 4

ง. Nabors et al. (1983) สูตรเปรียบเทียบที่ 4 ตามตารางที่ 5

2.2.2 สูตรทดลอง

ใช้สูตรพื้นฐานของธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง สารอินทรีย์ต่าง ๆ ตามสูตรเปรียบเทียบที่ 1 โดยเปลี่ยนชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญจาก IAA และ kinetin 1.0 และ 3.0 ppm. เป็น ออกซิน และไซโตไคนินชนิดต่างๆ คือ

IAA ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 4.0 pmm.

NAA ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 4.0 pmm.

BAP ที่ความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.8 1.6 pmm.

K ที่ความเข้มข้น 0 0.75 1.5 3.0 6.0 pmm.

รวมทั้งหมดได้ 100 สูตรดังแผนภาพที่ 2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพที่ 2

ความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินที่ใช้ในสูตรทดลอง

K (ppm.)	IAA 0.0	IAA 0.5	IAA 1.0	IAA 2.0	IAA 4.0
6.0	21	22	23	24	25
3.0	16	17	18	19	20
1.5	11	12	13	14	15
0.75	6	7	8	9	10
0.0	1	2	3	4	5

ก. ความเข้มข้นของ Kinetin (K) และ IAA ต่าง ๆ กัน โดยใช้ตัวย่อว่า KI 1 ถึง KI 25

BAP (ppm.)	IAA 0.0	IAA 0.5	IAA 1.0	IAA 2.0	IAA 4.0
1.6	21	22	23	24	25
0.8	16	17	18	19	20
0.4	11	12	13	14	15
0.2	6	7	8	9	10
0.0	1	2	3	4	5

ค. ความเข้มข้นของ BAP และ IAA ต่าง ๆ กัน โดยใช้ตัวย่อว่า BI 1 ถึง BI 25

K (ppm.)	NAA 0.0	NAA 0.5	NAA 1.0	NAA 2.0	NAA 4.0
6.0	21	22	23	24	25
3.0	16	17	18	19	20
1.5	11	12	13	14	15
0.75	6	7	8	9	10
0.0	1	2	3	4	5

ข. ความเข้มข้นของ Kinetin (K) และ NAA ต่าง ๆ กัน โดยใช้ตัวย่อว่า KN 1 ถึง KN 25

BAP (ppm.)	NAA 0.0	NAA 0.5	NAA 1.0	NAA 2.0	NAA 4.0
1.6	21	22	23	24	25
0.8	16	17	18	19	20
0.4	11	12	13	14	15
0.2	6	7	8	9	10
0.0	1	2	3	4	5

ง. ความเข้มข้นของ BAP และ NAA ต่าง ๆ กัน โดยใช้ตัวย่อว่า BN 1 ถึง BN 25

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.3 สูตรอาหารสำหรับอนุบาลต้นอ่อน และชักนำให้เกิดราก หลังจากแคลลัสเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงเป็น green spot และมียอดแล้ว ก็จะย้ายลงอาหารสำหรับอนุบาลต้นอ่อนต่อไป โดยใช้สูตรอาหารตาม Vajrabhaya et al.(1985) ซึ่งใช้ธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรองของ MS (1962) ที่เติม IAA 0.1 ppm. myo-inositol 100 มก./ล. thiamine-HCL 0.4 มก./ล. และซูโครส 60 กรัม/ล. (ตารางที่ 6)

เมื่อได้ต้นอ่อนที่เจริญทั้งต้นและรากพร้อมแล้ว ก็นำออกปลูกและรดด้วยปุ๋ยสูตรดัดแปลงWP(ภาคผนวก ข)

การทำให้อาหารปลอดเชื้อ จะนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่ 1.1 กก./ตร. อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที

3. การเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.1 การดำเนินงานวิจัยที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.1 การฆ่าเชื้อที่พื้นผิวของเมล็ด (surface sterlization)

เนื่องจากเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23 ที่ใช้ศึกษาพบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์มาก จึงมีขั้นตอนการฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ด ดังนี้

ก. นำเมล็ดที่เจริญเต็มที่ของข้าวพันธุ์ กข 23 มาฆ่าเชื้อผิวเปลือกเมล็ดด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 3 นาที แล้วผึ่งเมล็ดให้แห้งประมาณ 1 ชั่วโมง

ข. นำเมล็ดที่แห้งแล้วมาสีเอาเปลือกออกเหลือเมล็ดข้าวสารที่มีเอมบริโอติดอยู่

ค. ฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดข้าวสารด้วย clorox ความเข้มข้น 20 15 และ 10 เปอร์เซนต์ โดยปริมาตรตามลำดับ ความเข้มข้นละ 20 นาที และใส่ tween-20 ซึ่งเป็น wetting agent 2-3 หยด ต่อ 100 มล. ของสารละลาย clorox ทุกครั้ง

ง. ล้างเมล็ดข้าวสารด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วอีก 3 ครั้ง เก็บไว้ใน Petri dish แล้วนำเมล็ดข้าวสารไปเลี้ยงในอาหารวุ้นที่ใช้สำหรับชักนำให้เกิดแคลลัสต่อไป

3.1.2 การชักนำให้เกิดแคลลัส (callus induction)

ใช้เมล็ดข้าวสารที่ฆ่าเชื้อที่พื้นผิวเรียบร้อย มาเลี้ยงไว้ใน

ตารางที่ 1

สูตรอาหารชักนำแคลลัส (Vajrabhaya et al., 1983)

สารประกอบ	มก./ล.
ธาตุอาหารหลัก MS (1962)	
NH_4NO_3	1,690.0
KNO_3	1,900.0
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370.0
KH_2PO_4	170.0
ธาตุอาหารรอง MS (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
สารควบคุมการเจริญ	
2,4-D	1.0
K	0.3
สารอินทรีย์อื่นๆ	
myo-inositol	100.0
thiamine-HCl	0.4
sucrose	30,000.0
agar-agar	8,000.0
pH = 5.6 (ปรับด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl)	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2

สูตรชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ตามวิธีการของ Vajrabhaya et al. (1984)
สูตรพื้นฐานและสูตรเปรียบเทียบที่ 1

สารประกอบ	มก./ล.
ธาตุอาหารหลัก ดัดแปลงของ White (1963)	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	300.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370.0
KCl	65.0
KNO_3	80.0
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	16.5
Na_2SO_4	200.0
$(NH_4)_2SO_4$	200.0
ธาตุอาหารรอง MS (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
สารควบคุมการเจริญ	
IAA	1.0
K	3.0
สารอินทรีย์อื่นๆ	
bacto-agar	8,000.0
coconut water	100.0 มล. (v/v)
pH = 5.6 (ปรับด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl)	

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3

สูตรชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ สูตรเปรียบเทียบที่ 2

สารประกอบ	มก./ล.
<u>ธาตุอาหารหลัก</u> ดัดแปลงของ White (1963)	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	300.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	720.0
KCl	65.0
KNO_3	80.0
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	16.5
Na_2SO_4	200.0
$(NH_4)_2SO_4$	200.0
<u>ธาตุอาหารรอง</u> MS (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
<u>สารควบคุมการเจริญ</u>	
IAA	0.5
BAP	0.1
<u>สารอินทรีย์อื่นๆ</u>	
bacto-agar	8,000.0
coconut water	100.0 มล. (v/v)
pH = 5.6 (ปรับด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl)	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4

สูตรชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ตามวิธีการของ Zapata et al. (1983)

สูตรเปรียบเทียบที่ 3

สารประกอบ	มก./ล.
ธาตุอาหารหลัก B_5 (1970)	
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	150.0
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	150.0
KNO_3	2,500.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	250.0
$(NH_4)_2SO_4$	134.0
ธาตุอาหารรอง B_5 (1970)	
H_3BO_3	3.0
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
$CuSO_4$	0.025
KI	0.750
$MnSO_4 \cdot H_2O$	10.0
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.250
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.0
NaFeEDTA	28.0
สารควบคุมการเจริญ	
NAA	1.0
K	1.0
สารอินทรีย์อื่นๆ	
myo-inositol	100.0
nicotinic acid	1.0
pyridoxine-HCl	1.0
thiamine-HCl	10.0
sucrose	20,000.0
bacto-agar	8,000.0
pH = 5.6 (ปรับด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl)	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5

สูตรชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ตามวิธีการของ Nabors et al., (1983) สูตรเปรียบเทียบที่ 4

สารประกอบ	มก./ล.
ธาตุอาหารหลัก MS (1962)	
NH_4NO_3	1,690.0
KNO_3	1,900.0
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370.0
KH_2PO_4	170.0
ธาตุอาหารรอง MS (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
สารควบคุมการเจริญ	
IAA	0.5
BAP	0.1
สารอินทรีย์อื่นๆ	
myo-inositol	100.0
thiamine-HCl	0.4
sucrose	40,000.0
bacto-agar	8,000.0
pH = 5.6 (ปรับด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl)	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6

สูตรอาหารสำหรับอนุบาลต้นอ่อน และชักนำให้เกิดราก

สารประกอบ	มก./ล.
ธาตุอาหารหลัก MS (1962)	
NH_4NO_3	1,690.0
KNO_3	1,900.0
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370.0
KH_2PO_4	170.0
ธาตุอาหารรอง MS (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
สารควบคุมการเจริญ	
IAA	0.1
สารอินทรีย์อื่นๆ	
myo-inositol	100.0
thiamine-HCl	0.4
sucrose	60,000.0
bacto-agar	8,000.0
pH = 5.6 (ปรับด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl)	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สูตรอาหารที่ใช้สำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัส (ตารางที่ 1) โดยบรรจุขวดละ 4 เมล็ด ต่อวุ้นอาหารประมาณ 12.5 มล. เลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 14 วัน เมื่อครบกำหนดแล้วจึงนำเมล็ดที่งอกและมีแคลลัสเจริญอยู่ออกจากภาชนะที่เลี้ยงเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

3.1.3 การเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่จากแคลลัส (Plant regeneration from callus)

นำเมล็ดข้าวที่ชักนำให้เกิดแคลลัสจนครบ 2 สัปดาห์แล้ว มาตัดส่วนของเมล็ด ราก ยอดแรกเกิด และ non-embryogenic callus ทิ้ง คัดเฉพาะ embryogenic callus นำไปเลี้ยงในวุ้นอาหารสูตรต่าง ๆ เพื่อศึกษาาชนิดและความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินต่าง ๆ ว่ามีผลต่อการชักนำให้แคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่อย่างไร โดยมีชนิดและสัดส่วนของออกซินและไซโตไคนินที่แตกต่างกันรวม 100 สูตร

ยิ่งกว่านั้นยังได้ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นในสูตรอาหารที่เรียกว่าสูตรเปรียบเทียบที่ 1, 2, 3, และ 4 (ตารางที่ 2 - 5)

3.2 การศึกษาที่ปฏิบัติงาน ณ TCCP มหาวิทยาลัยโคโลราโดเสตท สหรัฐอเมริกา

3.2.1 การฆ่าเชื้อที่พื้นผิวของเมล็ด (surface sterilization)

วิธีฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดข้าวที่ TCCP มีขั้นตอนที่แตกต่างไปจากจุฬาฯ โดยมีวิธีการดังนี้

ก. นำเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23 ที่สีเอาเปลือกออกเหลือแต่เมล็ดข้าวสารที่มีเอมบริโอติดอยู่ล้างด้วยน้ำสบู่ประมาณ 3 นาที แล้วล้างน้ำ deionized จนหมดฟอง

ข. ฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดข้าวสารด้วยสารละลาย Clorox 50 เปอร์เซนต์ที่มี Tween-20 3-4 หยด ต่อเข้ากับเครื่อง vacuum pump เป็นเวลา 30 นาที

ค. ล้างเมล็ดข้าวสารด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วอีก 3 ครั้ง เก็บไว้ใน Petri dish แล้วนำเมล็ดข้าวสารไปเลี้ยงในอาหารวุ้นเพื่อชักนำแคลลัสต่อไป

3.2.2 การชักนำให้เกิดแคลลัส (Callus induction)

นำเมล็ดข้าวสารที่ฆ่าเชื้อที่พื้นผิวเรียบร้อยแล้ว มาเลี้ยงไว้ในสูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส (ตารางที่ 1) แต่ใช้น้ำตาลซูโครสสองความเข้มข้นคือ 3% และ 4% โดยเลี้ยงในขวด vial ขวดละ 1 เมล็ดต่อวุ้นอาหารประมาณ 8 มล. ในที่มืดเป็นเวลา 14 และ 30 วัน เมื่อครบกำหนดแล้วจึงนำเมล็ดที่งอกและมีแคลลัสเจริญอยู่ออกจากภาชนะเพื่อศึกษาต่อไป

3.2.3 การเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่จากแคลลัส (Plant regeneration from callus)

ตารางที่ 7

สูตรชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ที่ได้ผลดีจากการทดลองที่ปฏิบัติงาน ณ หน่วยปฏิบัติการวิจัยการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จุฬาฯ สูตรพื้นฐานที่ 3

สารประกอบ	มก./ล.
ธาตุอาหารหลัก ดัดแปลงของ White (1963)	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	300.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	720.0
KCl	65.0
KNO_3	80.0
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	16.5
Na_2SO_4	200.0
$(NH_4)_2SO_4$	200.0
ธาตุอาหารรอง MS (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
สารควบคุมการเจริญ	
NAA	0.5
BAP	1.6
สารอินทรีย์อื่นๆ	
bacto-agar	8,000.0
coconut water	100.0 มล. (v/v)
pH = 5.6 (ปรับด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl)	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คัดเฉพาะ embryogenic callus นำไปเลี้ยงในวุ้นอาหารสูตรต่าง ๆ โดยใช้สูตรพื้นฐาน 3 สูตร คือ สูตรเปรียบเทียบที่ 1 (ตารางที่ 2) สูตรเปรียบเทียบที่ 4 (ตารางที่ 5) และสูตรที่ใช้ได้ผลดีจากการทดลองที่ 3.1 เป็นสูตรพื้นฐานที่ 3 (ตารางที่ 7) แล้วเปรียบเทียบผลของน้ำมะพร้าว และสารควบคุมการเจริญที่แตกต่างกันทั้ง 3 สูตร ดังนี้

ก. ทดสอบผลของน้ำมะพร้าวที่ได้รับจากฮาวาย ในสูตรพื้นฐานที่ 3 และสูตรเปรียบเทียบที่ 4 โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำมะพร้าว 0, 5, 10, 15% (v/v) (แทนน้ำตาลซูโครสในสูตรเปรียบเทียบที่ 4)

สูตรพื้นฐานที่ 3 + น้ำมะพร้าว

(Mod. White 's major + MS minor + 0.5 pmm.NAA + 1.6 pmm.BAP + น้ำตาล 0) + น้ำมะพร้าว

น้ำมะพร้าว	0	5	10	15	เปอร์เซนต์
ใช้สูตรสัญลักษณ์	A_1	A_2	A_3	A_4	

สูตรเปรียบเทียบ 4 + น้ำมะพร้าว

(MS + IAA 0.5 pmm. + BAP0.1 pmm. + น้ำตาล 0) + น้ำมะพร้าว

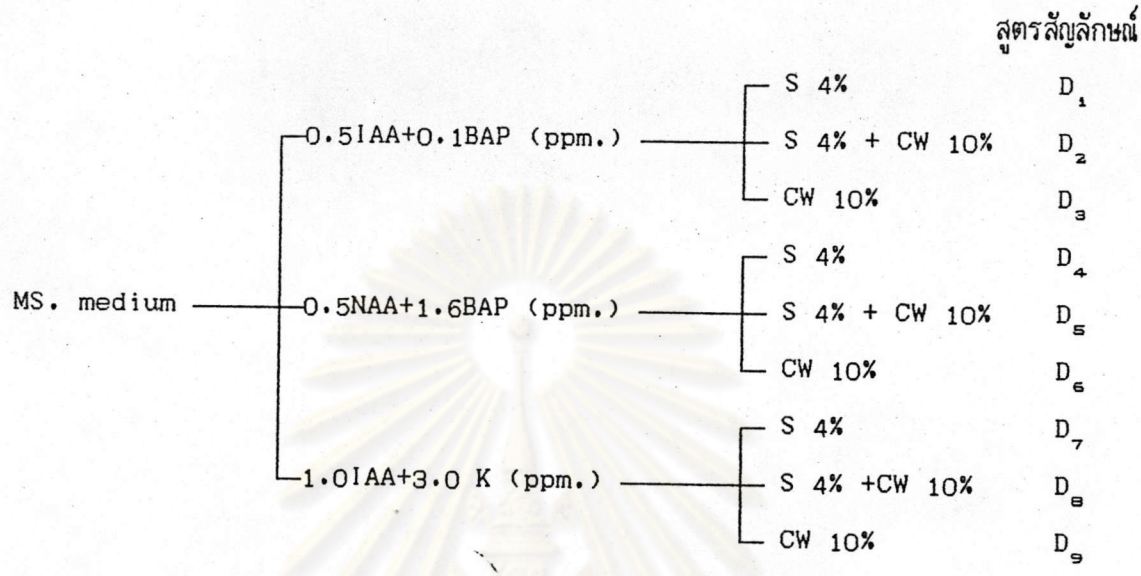
น้ำมะพร้าว	0	5	10	15	เปอร์เซนต์
ใช้สูตรสัญลักษณ์	B_1	B_2	B_3	B_4	

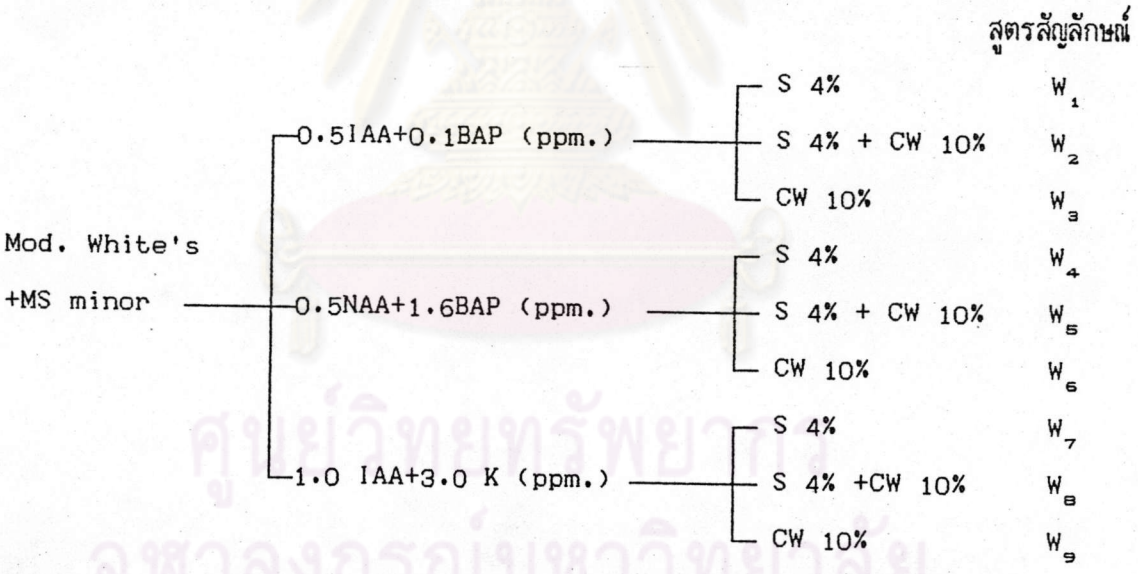
ข. ทดสอบสารควบคุมการเจริญ โดยใช้ NAA แทน IAA ในสูตรเปรียบเทียบที่ 4

MS + 0.1 ppm.BAP + น้ำตาล 4% + NAA

NAA	0	0.25	0.5	0.75	1.0 ppm.
ใช้สูตรสัญลักษณ์	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5

ค. เปรียบเทียบชนิดของสารควบคุมการเจริญ น้ำมะพร้าว และน้ำตาลซูโครส ในสูตรพื้นฐานทั้ง 3





นอกจากนี้ยังเปรียบเทียบเทคนิคของการเลี้ยงเนื้อเยื่อระหว่างวิธีการของ CU (Chulalongkorn University) ตามขั้นตอนที่ 3.1 และวิธีการของ CSU (Colorado State University) ซึ่งจะใช้แคลลัสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 มม. เป็นมาตรฐานต่อวุ้นอาหาร 12.5 มล. เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคลลัสที่ใช้เพื่อให้ได้ขนาด 9 มม. จะต้องใช้แคลลัส 8 ก้อน/ขวด เมื่ออายุแคลลัส 14 วัน และ 5 ก้อน/ขวด เมื่ออายุ 30 วัน จากสูตรชักนำแคลลัสที่มีน้ำตาล 3% และ 4% เมื่อรวมสูตรอาหารที่ปฏิบัติงาน ณ ห้องปฏิบัติการ TCCP เป็น 31 สูตร รวมทั้งวิธีการเปรียบเทียบ จะได้สูตรทดลองทั้งหมด 248 สูตร แต่ละสูตรจะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มีอยู่ 10 ซ้ำ

4. การเก็บรวบรวมข้อมูลการทดลอง

ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาถึง ลักษณะการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ของแคลลัส จำนวนแคลลัสที่เกิดหน่อ และจำนวนหน่อ ดังนี้

ตารางที่ 8

การให้คะแนนแคลลัส

ลักษณะแคลลัส	คะแนน				
	1 น้อยที่สุด	2 น้อย	3 พอใช้	4 ดี	5 ดีที่สุด
ขนาด (เส้นผ่าศูนย์กลาง, มม.)	2	3	4	5	6
สี (พื้นที่ที่แคลลัสมีสีดำ)	4/4 พื้นที่	3/4 พื้นที่	2/4 พื้นที่	1/4 พื้นที่	0
green spot (พื้นที่ผิวแคลลัสเหนือวุ้น)	1/5 พื้นที่	2/5 พื้นที่	3/5 พื้นที่	4/5 พื้นที่	5/5 พื้นที่
ราก (พื้นที่แคลลัสใต้วุ้น)	0 พื้นที่	1/4 พื้นที่	2/4 พื้นที่	3/4 พื้นที่	4/4 พื้นที่
ระดับความสูงของหน่อ (ซม.)	< 0.5	0.5 0.9	1.0 1.9	2.0 2.9	> 3.0

4.1 การให้คะแนนลักษณะของแคลลัสโดยสังเกตจากขนาดของแคลลัส สีของแคลลัส พื้นที่ที่เกิด green spot บนพื้นผิวของแคลลัส พื้นที่ที่เกิดรากบนแคลลัส และระดับความสูงของหน่อ (shoot) ที่โผล่เหนือก้อนแคลลัส โดยแต่ละลักษณะแบ่งเป็น 5 คะแนน จากคะแนนน้อย คือ ลักษณะที่ไม่ดีที่สุดไปถึงคะแนนมาก คือ ลักษณะที่ดีที่สุด (ตารางที่ 8)

4.2 นับจำนวนแคลลัสที่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นหน่อใหม่ซึ่งจะต้องมีความสูงตั้งแต่ 0.5 เซนติเมตรขึ้นไป

4.3 นับจำนวนหน่อที่โผล่เหนือก้อนแคลลัส และมีความสูงตั้งแต่ 0.5 ซม. ขึ้นไปเก็บรวบรวมข้อมูลการทดลองในสัปดาห์ที่ 2, 4 และ 6 ของการเลี้ยงแคลลัสในสูตรทดลองต่าง ๆ ที่ปฏิบัติงาน ณ ห้องปฏิบัติการฯ จุฬาฯ และเก็บผลเฉพาะสัปดาห์ที่ 6 ที่ห้องปฏิบัติการ TCCP Colorado State University

การวางแผนการทดลองตลอดงานวิจัยใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Complete Randomized Design) และคิดคำนวนค่าสถิติด้วยไมโครคอมพิวเตอร์ โดยใช้ซอฟแวร์ Statistical Processing System รุ่นที่4 ลิขสิทธิ์ของบริษัท Databasic, Inc. ในปี 1983 โดย Buhyoff, G.J., R.C. Kirk, H.M., Rauscher, R.B. Hull IV E.E. MacKenna ซึ่งเขียนด้วยภาษาเบสิค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย