

## บทที่ 2

### อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

#### 1. พืชทดลอง

1.1 เมล็ดข้าวพันธุ์ กข. 23 (*Oryza sativa*. L.) ชนิดเมล็ดพันธุ์หลัก (foundation seed) ซึ่งมีลักษณะประจำพันธุ์และมีข้อดี หลายประการดังนี้ (กรมวิชาการเกษตร, 2533)

ลักษณะประจำพันธุ์ของข้าว กข. 23

1. ไม้ไวต่อช่วงแสง
2. อายุการเก็บเกี่ยว 120-130 วัน
3. เป็นลูกผสมสามทางระหว่าง กข.7 กับ IR 32 และ กข.1
4. เป็นข้าวเจ้า

ข้อดีของข้าวพันธุ์ กข. 23

1. อายุการเก็บเกี่ยวสั้น
2. ปลูกได้ตลอดปี
3. ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง
4. ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและโรคฉ่ำ

1.2 เมล็ดข้าวพันธุ์ กข. 23 สายพันธุ์ทนแล้งที่คัดจาก somaclonal variation ของโครงการ " การคัดเลือกข้าวทนแล้งจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ " ของ รศ. มณฑานติ วัชรภักย์ ซึ่งเป็นการคัดเลือกโดยใช้ PEG 6000 ความเข้มข้น 125 กรัมต่อลิตร เติมลงในสารอาหารสังเคราะห์ที่เลี้ยง embryogenic callus (ชักนำมาจากการเลี้ยงเอ็มบริโอ) เป็นเวลา 14 วัน โดยกำหนดการคัดเลือกในช่วงนี้ว่าชั่วอายุ R0 (R0 generation ) นำ regenerate plants ที่คัดเลือกได้มาปลูกในสภาพปกติ เพื่อให้เกิด segregation และ recombination จากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เมล็ดที่ได้เรียกว่า รุ่น R1 (R1 = ลูกของ R0) ซึ่งมีสายพันธุ์ R1 ที่คัดเลือกได้จำนวนทั้งหมด 295 สายพันธุ์ มาทำการคัดเลือกต่อไป

## 2. อุปกรณ์

- 2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ย้ายต้นพืชในสภาพปลอดเชื้อ ได้แก่ ตู้ Laminar-flow , forceps , Petri dish
- 2.2 อุปกรณ์เพาะเมล็ดและคัดเลือกกล้าข้าวในสารละลาย PEG 5000 ได้แก่ ขวดแก้วปากกว้าง ขนาด 50 และ 100 มิลลิลิตร พร้อมฝาขาวขุ่น
- 2.3 ห้องทดลองที่ประกอบไปด้วย ชั้นแสงที่ให้แสงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ขนาด 40 วัตต์ ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ โดยใช้หลอดของ Philips TL 33
- 2.4 อุปกรณ์ปลูกต้นกล้าข้าวเพื่อเก็บเมล็ด
  - 2.4.1 อุปกรณ์ปลูกแบบ hydroponic ได้แก่
    - 2.4.1.1 กะละมังพลาสติกเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 ซม. สูง 10 ซม.
    - 2.4.1.2 แผ่นโฟมกลมหนา 2.5 ซม. ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 23 ซม. เจาะช่องกลม จำนวน 25 รูกระจายทั่วโฟม
    - 2.4.1.3 ฟองน้ำค้ำจุนต้นกล้าขนาด 1x5x1 ซม.
  - 2.4.2 อุปกรณ์ปลูกในสภาพธรรมชาติ
    - 2.4.2.1 โรงเรือนที่มีหลังคาพลาสติกใส ล้อมด้วยตาข่าย และก่อกำแพงด้วยอิฐบล็อก สูงประมาณ 30 ซม. เพื่อป้องกันนกและหนู
    - 2.4.2.2 กระถางดินเผาไม่มีรูเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 ซม.
    - 2.4.2.3 ทรายหยาบที่ล้างสะอาด

## 3. สารเคมี

- 3.1 สารเคมีกำจัดโรคและแมลง
- 3.2 ปุ๋ย เคมีสูตร 16-16-16
- 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการคัดเลือกกล้าข้าว ได้แก่ PEG 6000 ของบริษัท Mark ประเทศเยอรมัน
- 3.4 สารเคมีชักนำให้เกิด demethylation คือ 5-azacytidine ของบริษัท Sigma (4-Amino-1-B-D-ribofuranosyl-5-triazine-2-[1H]-one)(C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>) FW 244.2 A2385
- 3.5 สารเคมีฆ่าเชื้อ ได้แก่ คลอโรกซ์ ของบริษัท คลอโรกซ์ จำกัด ประเทศอเมริกา และ Tween 20
- 3.6 สารเคมีสำหรับเตรียมธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP NO.2 1991 (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991)

ตารางที่ 1 สารเคมีสำหรับเตรียมธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 1991 (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991)

สารเคมี	ปริมาณ (มิลลิกรัม/ลิตร)
<b>Macroelements</b>	
$\text{KNO}_3$	580
$\text{CaSO}_4$	500
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	450
Triple super phosphate	250
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	100
<b>Microelements</b>	
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	40
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	30
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	15
$\text{H}_3\text{BO}_3$	5
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1.5
KI	1.0
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.05

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## โครงการวิจัยเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวทนแล้ง

ข้าวทนแล้งเป็นข้าวที่ต้องการนำไปปลูกในช่วงที่มีความแห้งแล้ง ดังนั้นจึงเลือกข้าวที่มีอายุสั้นคือ พันธุ์ กข.23 เนื่องจากมีคุณลักษณะที่ดีหลายประการ เช่น ด้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และโรคจู่ มีอายุเก็บเกี่ยว 120-130 วัน และปลูกได้ตลอดปี

ในการคัดเลือกสายพันธุ์ทนแล้งนี้ มีวัตถุประสงค์คือให้คงลักษณะเดิมของข้าวพันธุ์ กข.23 แต่เพิ่มลักษณะการทนแล้งมาอีก 1 ลักษณะ โดยการคัดเลือกจาก somaclonal variation ที่เกิดขึ้นในขณะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากนั้นนำมาคัดเลือกต่ออีก 3ชั่วอายุ เพื่อให้ได้ลักษณะทนแล้งเสถียร ดังนั้นโครงการคัดเลือกข้าวสายพันธุ์ทนแล้งจึงแบ่งขั้นตอนการปฏิบัติเป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ ๆ คือ

1. การคัดเลือกข้าวสายพันธุ์ทนแล้งจาก somaclonal variation ที่เกิดในขณะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ต้นที่ได้จากการคัดเลือกในช่วงนี้เรียกว่า R0 generation (ส่วนของ รศ. มณฑกานติ วัชรากัญ) มีขั้นตอนและวิธีการ คือ

1.1 การชักนำให้เกิด embryogenic callus จากการเลี้ยงเอ็มบริโอของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข. 23 บน callus induction medium โดยใช้สารอาหารสูตรพื้นฐาน MS + 2, 4-D 1 มิลลิกรัม + BAP 0.1 มิลลิกรัม + น้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตร + ู้น 6,000 มิลลิกรัม และน้ำตาล 30,000 มิลลิกรัมต่อ 1,000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.2 ย้าย embryogenic callus ซึ่งมีลักษณะเกาะกันแน่นสีค่อนข้างเหลืองลงเลี้ยงใน callus induction medium ที่เติม PEG 6000 ความเข้มข้น 125,000 มิลลิกรัมต่อ 1,000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์

1.3 ย้ายแคลลัสที่ผ่านการคัดเลือกด้วย PEG (ซึ่งเหลือแคลลัสเพียง 0.5 - 1.0%) ลงเลี้ยงใน callus induction medium เป็นเวลา 2-4 สัปดาห์ แล้วย้ายเลี้ยงใน greenspots formation medium โดยใช้สารอาหารสูตร MS + NAA 0.1 มิลลิกรัม + BAP 1 มิลลิกรัม + มันฝรั่ง 150,000 มิลลิกรัมต่อ 1,000 มิลลิลิตร จนแคลลัสมีการพัฒนาเป็น greenspot

1.4 ย้ายแคลลัสที่มี greenspot มาเลี้ยงในสารอาหารสูตร shoot formation medium โดยใช้สารอาหารสูตร MS + NAA 0.5 มิลลิกรัม + BAP 0.2 มิลลิกรัม + มันฝรั่ง 150,000 มิลลิกรัมต่อ 1,000 มิลลิลิตร

1.5 ย้ายแคลลัสที่พัฒนาเป็นหน่อเลี้ยงในสารอาหารสูตร MS จนมีต้นสมบูรณ์

1.6 นำต้นใหม่ที่ได้จากการคัดเลือกในระยะแคลลัสด้วย PEG 6000 ทั้งหมด 295 สายพันธุ์ มาปลูกเพื่อเก็บเมล็ดสำหรับคัดเลือกในชั่วอายุ R1 ต่อไป



2. การคัดเลือกข้าวสายพันธุ์ทนแล้งในระดับกล้า (seedling) ของรุ่น R1, R2 และ R3 ซึ่งเป็นงานวิจัยในโครงการนี้ มีขั้นตอนการวิจัยโดยสังเขปดังนี้

2.1 ทาวิธีการคัดเลือกกล้าข้าวทนแล้งด้วย PEG 6000 ในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้ข้าวพันธุ์ กข. 23 ชนิดเมล็ดพันธุ์หลัก โดยทดลองกับกล้าข้าวขนาด 0.5 ซม. อายุ 4 วัน 1.0 ซม. อายุ 7 วัน และ 6.0 ซม. อายุ 11 วัน สำหรับความเข้มข้นของ PEG 6000 ที่ทดลองคือ 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 และ 350 กรัมต่อลิตร โดยเติมลงในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร แต่ละการทดลองใช้ต้นกล้าจำนวน 200 ต้น โดยแช่กล้าข้าวในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ผสม PEG เป็นเวลา 1 เดือน และกำหนดให้มีอัตราการรอดตายของกล้า 2-3% เป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุด มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

2.1.1 การฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดและการเพาะกล้าข้าว

2.1.1.1 คัดเมล็ดข้าวพันธุ์ กข.23 ชนิดเมล็ดพันธุ์หลัก โดยเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ปราศจากโรคและแมลง

2.1.1.2 นำมาฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดด้วยคลอโรกซ์ 40% ผสม Tween 20 2-3 หยดในสารละลายคลอโรกซ์ 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชม. ล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อหลาย ๆ ครั้ง

2.1.1.3 นำเมล็ดที่สะอาดแช่น้ำพองท่วม วางบนชั้นที่มีแสงสว่าง 1500 ลักซ์

2.1.2 การคัดเลือกกล้าข้าวทนแล้งมีวิธีการดังนี้

2.1.2.1 เมื่อต้นกล้ามีขนาด 0.5 ซม. อายุ 4 วัน 1 ซม. อายุ 7 วัน และ 6.0 ซม. อายุ 11 วัน คัดเลือกความทนแล้งโดยแช่กล้าข้าวในขวดขนาด 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุสารละลายธาตุอาหารผสม PEG ความเข้มข้นต่างกัน โดยแต่ละขวดมีปริมาณสารละลาย PEG 10 มิลลิลิตร และจำนวนต้นกล้า 20 ต้น

2.1.2.2 นำไปวางบนชั้นแสงโดยให้แสง 1500 ลักซ์ โดยให้กล้าข้าวได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 30-33 °C และอยู่ในสารละลาย PEG 6000 ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 เดือน

2.1.2.3 สรุปหาวิธีที่เหมาะสมคือขนาดหรืออายุของกล้าข้าวและความเข้มข้นของ PEG ที่ทำให้กล้าข้าวรอดตายประมาณ 2-3% เพื่อใช้เป็นวิธีคัดเลือกกล้าข้าวทนแล้งต่อไป



ก .

ข .

ค .

ภาพที่ 4 แสดงกล้าข้าวพันธุ์ กข. 23 ทั้ง 3 ช่วงอายุ

ก . อายุ 4 วัน

ข . อายุ 7 วัน

ค . อายุ 11 วัน

2.2 การคัดเลือกข้าวสายพันธุ์ทนแล้งในรุ่น R1 จำนวน 295 สายพันธุ์ และรุ่น R2 จำนวน 28 สายพันธุ์ ตามวิธีการที่เหมาะสมในข้อ 2.1 คือ มีวิธีปฏิบัติคือ

2.2.1 การฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด และการเพาะกล้าข้าว ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 2.1

2.2.2 เมื่อกกล้าข้าวมีขนาด 1.0 ซม. อายุ 7 วัน คัดเลือกความทนแล้งด้วยวิธีปลูกเชื้อโดยแช่ต้นกล้าในสารละลายธาตุอาหารสูตรคัดแปลง WP No.2 ผสม PEG 150 กรัมต่อลิตร โดยใช้ข้าวพันธุ์ กข. 23 ชนิดเมล็ดพันธุ์หลักเป็นชุดเปรียบเทียบ

2.2.3 วางบนชั้นแสงเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2.2

2.2.4 นำต้นที่เหลือรอดมาปลูกบนโพนที่เจาะรูหลุมลำต้นด้วยฟองน้ำสำหรับค้ำจุนลอยแผ่นโพนในกะละมังพลาสติกที่ใส่สารละลายธาตุอาหารสูตรคัดแปลง WP No.2 จนกล้าข้าวสูงประมาณ 30 ซม. อายุประมาณ 2 เดือน

2.2.5 ย้ายปลูกในสภาพธรรมชาติโดยปลูกในกระถางดินเผาไม่มีรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 ซม. ที่ใส่ทรายหยาบล้างสะอาดต่ำกว่าขอบกระถาง 4-5 ซม. แล้วนำต้นที่แข็งแรง 1-10% ของแต่ละสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มาปลูก รดด้วยสารละลายธาตุอาหารสูตรคัดแปลง WP No.2 อย่างน้อยสัปดาห์ละครั้ง กำจัดโรคและแมลงเมื่อมีการระบาด

2.2.6 เก็บเมล็ดสำหรับเลือกทดลองขั้นต่อไป

2.3 การใช้สาร 5-azacytidine เพื่อชักนำให้เกิด demethylation ตามวิธีการของ ทรงศักดิ์ สำราญสุข (2536) ในข้าวสายพันธุ์ทนแล้งรุ่น R2 ที่มีอัตราการรอดตายในรุ่น R1 20% ขึ้นไป ซึ่งมี 21 สายพันธุ์ มีวิธีปฏิบัติดังนี้

2.3.1 เพาะเมล็ดข้าวอายุ 3 วันแล้วย้ายลงแช่ใน 5-azacytidine ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน ล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อหลาย ๆ ครั้ง แช่ในน้ำปลอดเชื้อให้ท่วมผิวเมล็ด 1-2 ซม. วางที่มีความเข้มของแสง 2000 ลักซ์

2.3.2 เมื่อดันกล้ามีขนาด 1 ซม. ทำการคัดเลือกความทนแล้งและปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 2.2

2.4 คัดเลือกกล้าข้าว กข. 23 สายพันธุ์ทนแล้งในรุ่น R3 ที่มีอัตราการรอดตายในรุ่น R2 สูงกว่า 10% ซึ่งมีจำนวน 11 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ทนแล้งที่ได้จากข้อ 2.3 จำนวน 2 สายพันธุ์ มาปฏิบัติตามข้อ 2.2

3. การศึกษาลักษณะบางลักษณะของข้าวสายพันธุ์ทนแล้งที่คัดเลือกได้ในรุ่น R3 โดยปลูกในสภาพปกติ และศึกษาลักษณะความสูง การแตกกอ และอายุการออกดอก