หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

1. วัสดุ

1.1 พืชทดลอง เมล็ดข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 ขาวดอกมะลิ 105 และ กข. 23 ที่เจริญเต็มที่แล้ว ซึ่งได้รับมาจากกองการข้าว กรมวิชาการเกษตร

1.1.1 ข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 เป็นข้าวเจ้าที่คัดจากพันธุ์พื้นเมืองจากจังหวัดเพชรบุรี เป็นข้าวไวต่อแสง มีความต้านทานโรคไหม้ ออกเผยแพร่ในปีพ.ศ. 2508

1.1.2 ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวเจ้าที่คัดจากพันธุ์พื้นเมืองจากจังหวัดฉะเชิงเทรา เป็นข้าวไวต่อแสง มีความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาล ออกเผยแพร่ในปี พ.ศ. 2502

1.1.3 ข้าวพันธุ์ กข.23 ได้จากการผสมข้าว 3 พันธุ์ คือ กข. 1 กข.7 และ IR32 เป็นข้าวพันธุ์ดีที่ปลูกได้ทุกภาคทุกฤดูและให้ผลผลิตสูงถ้ามีน้ำเพียงพอ มีความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โรคใบหงิก และโรคขอบใบแห้ง ออกเผยแพร่ในปีพ.ศ. 2524 (วีรวุฒิ กตัญญุกุล, 2526)

1.2 สารเคมี แบ่งเป็น 3 กลุ่มดังนี้

1.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว ใช้สารเคมีเกรด AR (analytical reagent) ของบริษัท Merck หรือ Sigma ละลายในน้ำกลั่นแก้ว ประกอบด้วย ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง และสารอินทรีย์อื่น ๆ ตามสูตรการเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวของ Vajrabhaya et al. (1983 : 1984)

1.2.2 สารเคมีที่ใช้ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดข้าว ได้แก่ Clorox 95% Ethyl alcohol และ Tween 20

1.2.3 สารออสโมติคัมที่ใช้ทดลอง ได้แก่ manitol, sorbitol polyethylene glycol 6000 เกรด AR ของบริษัท Merk หรือ Sigma

1.2.4 สารเคมีที่ใช้ย้อมสีศึกษาเซลล์ข้าว ได้แก่ Crystal violet ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2. อุปกรณ์

2.1 เครื่องมือต่าง ๆ ซึ่งเป็นเครื่องมือมาตรฐานในการเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ หม้อนึ่งอัดความดัน เครื่องชั่งสาร เครื่องวัด pH ปากคีบ ด้ามมีดและใบมีดผ่าตัดเบอร์ 11

2.2 เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดแก้วสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร สูง 7.5 เซนติเมตร พร้อมฝาเกลียว Erlenmayor flask ขนาด 250 มิลลิลิตร Petridish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.5 เซนติเมตร Pipette ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร กระบอกตวงขนาด 10, 50 และ 100 มิลลิลิตร แท่งแก้วคนขนาด 30 เซนติเมตร ปีกเกอร์ขนาด 1, 2 และ 3 ลิตร

2.3 ชั้นสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ชั้นมืด และชั้นสว่าง ชั้นสว่างใช้หลอดฟลูออเรสเซนซ์ชนิด Philips TL 40W/33 เหนือชั้นวางสูงขึ้นไป 30 เซนติเมตร ความเข้มแสงประมาณ 1,200 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิทั้งของชั้นมืดและชั้นสว่าง 23-25 องศาเซลเซียส

2.4 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ เตาอบไมโครเวฟ (microwave oven) กระดาษอลูมิเนียม (aluminum foil) ตู้เย็น ตู้อบอากาศร้อน (hot air oven) และ cryoscopic apparatus

3. วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 แผนดำเนินการทดลอง

เพื่อศึกษาผลของสารออสโมติคัมชนิดและปริมาณต่าง ๆ กันต่อการเจริญและพัฒนาการของแคลลัสข้าว ในการทดลองนี้จึงเริ่มด้วยการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเมล็ดข้าวที่เจริญเต็มที่ โดยใช้วิธีการและอาหารสูตรตาม Vajrabhaya et al. (1983) ซึ่งดัดแปลงจากอาหารสูตรของ Linsmaier และ Skoog (1965) ที่เติม Kinetin 0.3 ppm 2,4-D 1 ppm

014451

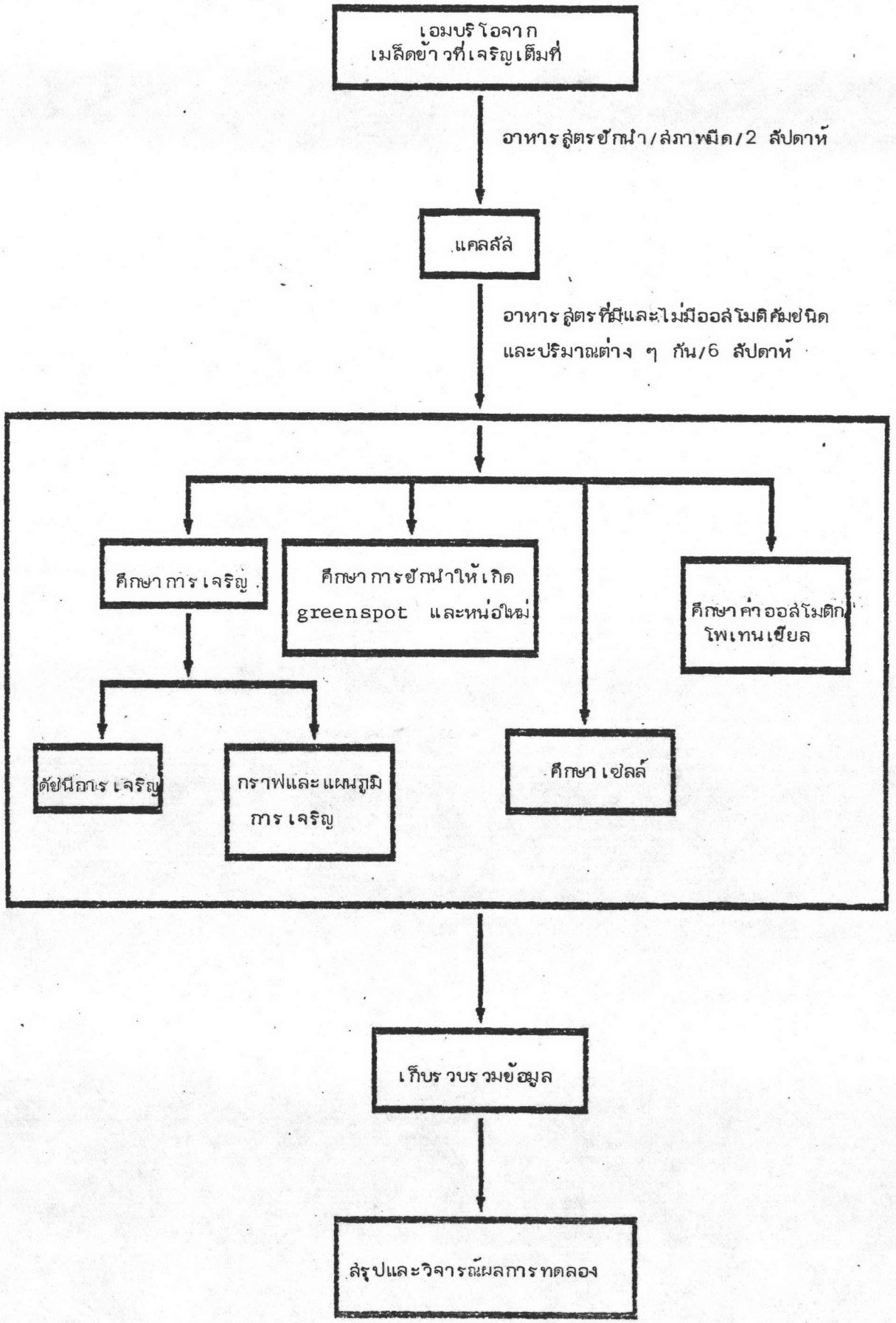
น้ำตาลซูโครส 30 กรัม และวุ้น 0.8 กรัมต่อปริมาตร 1 ลิตร ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 ชักนำให้เกิดแคลลัสโดยเลี้ยงเนื้อเยื่อในขั้นมืด อุณหภูมิ 23-25 องศา เซลเซียสเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายแคลลัสมาเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มี และไม่มีออสโมติคัมชนิดและปริมาณต่าง ๆ กัน รวมทั้งสิ้น 13 สูตร ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 เลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสูตรดังกล่าวเป็น 6 สัปดาห์ ในขั้นสร้างสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อศึกษาผลของออสโมติคัมในด้านต่าง ๆ ได้แก่ การเจริญของแคลลัส ค่าออสโมติกโพเทนเชียล และการศึกษาเซลล์ จากนั้นจึงย้ายแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้แคลลัสเกิด greenspot และหน่อใหม่ตาม Vajrabhaya et al. (1984) ซึ่งเป็นอาหารสูตรที่ดัดแปลงมาจากสูตรพื้นฐานของ White (1963) ตามตารางที่ 3 เลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารสูตรนี้เป็นเวลา 6 สัปดาห์ในขั้นสร้างสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อแคลลัสสร้าง greenspot และพัฒนาเป็นหน่อใหม่ที่แข็งแรงดีแล้ว ย้ายหน่อใหม่ของข้าวมาเลี้ยงในอาหารสูตร สำหรับชักนำให้เกิดราก ซึ่งดัดแปลงจากสูตรอาหารของ Murashige และ Skoog (1962) โดย Vajrabhaya et al. (1984) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4 เพื่อให้ได้ต้นข้าวที่สมบูรณ์ ขั้นตอนการทดลองโดยสังเขปแสดงตามแผนภาพที่ 1

3.2 <u>การทำอาหารให้ปลอดเชื้อ</u>

อาหารสำหรับใช้ในงานวิจัยนี้เตรียมตามสูตรต่าง ๆ ดังตารางที่ 1, 2, 3 และ 4 บรรจุในขวดแก้วสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร สูง 7.5 เซนติเมตร ขวดละ 12.5 มิลลิลิตร ปิดด้วยฝาเกลียว หรือใน Erlenmayor flask ขนาด 150 มิลลิลิตร flask ละ 50 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดัน 1.1 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที

3.3 <u>การชักนำให้เกิดแคลลัส</u> (callus induction)

นำเมล็ดข้าวที่เจริญเต็มที่ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว ขาวดอกมะลิ และ กข.23 มาฆ่าเชื้อที่ผิวเปลือกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ 3 นาที ผึ่งเมล็ดให้แห้งประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสีหรือขัดเอาเปลือกออกเหลือแต่เมล็ดข้าวสาร ที่มีเอมบริโอติดอยู่ ฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดข้าวสารตามวิธีของ Vajrabhaya et al. (1984) ดังนี้



แผนภาพที่ 1 ขั้นตอนการทดลองโดยสังเขป

1. นำเมล็ดข้าวสารประมาณ 250 เมล็ด ใส่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำ 100 มิลลิลิตร เติม tween 20 6 หยด เขย่าบีกเกอร์ไปมาแรง ๆ ประมาณ 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น

2. แช่เมล็ดในเอทิลแอลกอฮอล์ 90 เปอร์เซ็นต์ 1 นาที เขย่าแล้วเทแอลกอฮอล์ทิ้ง

3. แช่เมล็ดในคลอรอกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ 20 นาที

4. ทำซ้ำขั้นตอนที่ 3 โดยเติมคลอรอกซ์ 15 และ 10 เปอร์เซ็นต์ 20 นาที ตามลำดับ

5. ล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

นำเมล็ดข้าวที่ปลอดเชื้อเลี้ยงในขวดที่มีอาหารสูตรชักนำแคลลัส (ตารางที่ 1) โดยเลี้ยงบนชั้นมืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์

3.4 <u>การศึกษาผลของออสโมติคัมชนิดและปริมาณต่าง ๆ กันต่อการเจริญของแคลลัสข้าว</u>

นำแคลลัสที่ได้จากข้อ 3.3 มาตัดส่วนของเมล็ด ราก ยอดแรกเกิดและส่วนของ non-embryogenic callus ออก คัดเอาเฉพาะ embryogenic callus นำไปเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มีและไม่มีออสโมติคัมชนิดและปริมาณต่าง ๆ กัน (ภาพที่ 2) ซึ่งเป็นสูตรอาหารตาม Vajrabhaya et al. (1983) ที่เติม mannitol, sorbitol หรือ PEG 6000 ปริมาณต่าง ๆ กัน รวมทั้งสิ้น 13 สูตร (ตารางที่ 2) เพื่อศึกษาผลของออสโมติคัมชนิดและปริมาณต่าง ๆ กันต่อการเจริญของแคลลัสข้าว ในแต่ละสูตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อเปรียบเทียบกัน 16 ซ้ำ บนชั้นสว่างสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ อุณหภูมิ 23-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์

การทดลองต้องคัดเฉพาะ embryogenic callus มาศึกษา เนื่องจากเป็นแคลลัสที่มีศักยภาพสูงในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ ส่วน non-embryogenic callus เป็นแคลลัสที่ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงให้ต้นใหม่ได้ และต้องใช้จำนวนแคลลัสที่เริ่มต้นในแต่ละสูตรมากกว่า 16 ซ้ำ เพื่อป้องกันปัญหาจากการปนเปื้อนของแบคทีเรีย และเชื้อราขณะทดลอง

3.5 <u>การศึกษาค่าออสโมติกโพเทนเชียล</u> (osmotic potential)

ใช้วิธี Cryoscopic method ซึ่งเป็นวิธีหาค่าออสโมติกโพเทนเชียลของสารละลายโดยการหาค่าการลดลงของจุดเยือกแข็ง ด้วย cryoscopic apparatus ซึ่งประกอบด้วย vessel, inner freezing tube, outer freezing tube, differential

ตารางที่ 1 สูตรอาหารสำหรับชักนำให้เกิดแคลลัส (Vajrabhaya et al., 1983) ปรับปรุงจาก Linsmaier และ Skoog (1965)

สารประกอบ	มิลลิกรัม/ลิตร
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	1,650.00
KNO_3	1,900.00
$CaCl_2 \cdot H_2O$	440.00
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370.00
KH_2PO_4	170.00
ธาตุอาหารรอง	
Na_2EDTA	37.30
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.80
H_3BO_3	6.20
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.30
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.60
KI	0.83
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
สารอินทรีย์อื่น ๆ	
Myo-inositol	100.00
Thiamine-HCl	0.40
Kinetin	0.30
2,4-D	1.00
Sucrose	30,000.00
Agar	8,000.00

pH = 5.6 (ปรับด้วย 1 N.NaOH หรือ 1N. HCl)

ตารางที่ 2 สูตรอาหารทดลองสำหรับการศึกษาผลของออสโมติคัมชนิดและปริมาณต่าง ๆ กันต่อการเจริญของแคลลัสข้าว ซึ่งเป็นสูตรอาหารสำหรับชักนำให้เกิดแคลลัสตาม Vajrabhaya et al. (1983) ที่เติมสารออสโมติคัมดังต่อไปนี้

สูตรอาหาร (สัญญลักษณ์แทน) \ ชนิดของออสโมติคัมที่เติมลงไป		mannitol (กรัม/ลิตร)	sorbitol (กรัม/ลิตร)	PEG 6000 (กรัม/ลิตร)
1	(Control)	-	-	-
2	(M_1)	20	-	-
3	(M_2)	40	-	-
4	(M_3)	80	-	-
5	(M_4)	160	-	-
6	(S_1)	-	20	-
7	(S_2)	-	40	-
8	(S_3)	-	80	-
9	(S_4)	-	160	-
10	(P_1)	-	-	25
11	(P_2)	-	-	50
12	(P_3)	-	-	75
13	(P_4)	-	-	100

หมายเหตุ เฉพาะ PEG 6000 ใช้ Gelrite เป็นสารที่ทำให้อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นอาหารแข็ง โดยใช้ปริมาณ 8 กรัมต่อลิตร

thermometer, ยดลวดคน และจุกยาง ขั้นตอนของการทดลองคือ ใส่น้ำแข็งกับเกลือลงในส่วน vessel และ cryoscopic apparatus เติมสารละลายของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งเป็นอาหารสูตรทดลองสำหรับการศึกษาผลของออสโมติคัมชนิดและปริมาณต่าง ๆ กันต่อการเจริญของแคลลัสข้าว ปริมาตร 20 มิลลิลิตรลงใน inner freezing tube แล้วใส่ดิฟเฟอรเรนเชียล เทอร์โมมิเตอร์ (differential themometer) พร้อมกับยดลวดคนลงไป โดยให้กระเปาะของเทอร์โมมิเตอร์จุ่มอยู่ในสารละลายตลอดเวลา นำ inner freezing tube ใส่ลงใน outer freezing tube ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า จะทำให้เกิดช่องอากาศปิดที่เป็นฉนวน ซึ่งสามารถลดอัตราการ ถ่ายเทความร้อนได้เป็นการช่วยให้เย็นเร็วขึ้น นำ freezing tube ทั้งหมดใส่ลงในส่วนของ vessel ซึ่งมีส่วนผสมของน้ำแข็งกับเกลืออยู่ ขณะทดลองต้องคนสารละลายตลอดเวลาและจะต้องระวังไม่ให้ตัวทำละลายแข็งติดข้างหลอดแก้วคนสารละลายประมาณ 1 ครั้งต่อวินาทีโดยดึงให้ยดลวดคนเคลื่อนที่ขึ้นลง อุณหภูมิจะลดลงอย่างรวดเร็วต่ำกว่าจุดเยือกแข็งจนกระทั่งเกิดการแข็งตัวของสารละลาย ขณะที่อุณหภูมิสูงขึ้นทันทีทันใดและมาถึงจุดสูงสุดแล้วหยุดคงที่เป็นระยะเวลาสั้น ๆ ซึ่งต่อมาจะลดลงอย่างช้า ๆ จดบันทึกอุณหภูมิที่สูงที่สุด หลังจากที่เกิดการเป็นน้ำแข็งของสารละลาย ค่าของอุณหภูมินี้จะเป็นจุดเยือกแข็ง

เมื่อหาจุดเยือกแข็งของสารละลายอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อดังกล่าวครบทุกสูตรแล้วจึงทำการหาค่าจุดเยือกแข็งของน้ำกลั่นด้วยวิธีดังกล่าวมา แล้วนำค่าจุดเยือกแข็งที่ได้มาหาความแตกต่างของอุณหภูมิระหว่างจุดเยือกแข็งของน้ำกลั่นและของสารละลายอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรต่าง ๆ ค่าที่ได้เป็นค่าการลดลงของจุดเยือกแข็ง (freezing point depression) ค่าออสโมติกโพเทนเชียล มีความสัมพันธ์กับค่าการลดลงของจุดเยือกแข็งดังต่อไปนี้ (crafts et al., 1949)

$$\Psi_{\pi} = -(12.06\Delta - 0.021\Delta^{2})$$

โดยที่

Ψ_{π} = ออสโมติกโพเทนเชียล (หน่วยเป็น atmosphere)

Δ = ค่าการลดลงของจุดเยือกแข็ง (หน่วยเป็น องศาเซลเซียส)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6 การศึกษาเซลล์

ศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรที่มีออสโมติคัมชนิดและปริมาณต่าง ๆ กันต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โดยหยดสารละลายอาหารสูตรที่มีออสโมติคัมชนิดและปริมาณต่าง ๆ กันซึ่งเลือกเฉพาะบางความเข้มข้นมาศึกษา ดังต่อไปนี้

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ของเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างของใบต้นว่านกาบหอย (Rhoeo discolor Hance) โดยนำใบว่านกาบหอยมาลอกชั้นเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างให้บางที่สุด แล้วนำมาวางบนแผ่นสไลด์ หยดสารละลายอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีและไม่มีออสโมติคัมชนิดและปริมาณต่าง ๆ กันลงบนชิ้นเนื้อเยื่อโดยใช้ชนิดและความเข้มข้นดังนี้ mannitol sorbitol 20, 80 และ 160 กรัมต่อลิตร หรือ PEG 6000 25, 75 และ 100 กรัมต่อลิตร ปิด cover glass ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที แล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ข้าวพันธุ์เหลืองประทิว โดยนำแคลลัสข้าวพันธุ์เหลืองประทิวมาตัดให้มีขนาดประมาณ 0.3 เซนติเมตร แล้วไปวางบนแผ่นสไลด์ บดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ย้อมด้วยสี Crytal violet ซึ่งเป็นสีย้อมติดนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมที่มีคุณสมบัติไม่ทำอันตรายต่อเซลล์มีชีวิต ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร 1 นาที หยดสารละลายอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีและไม่มีออสโมติคัมชนิดและปริมาณต่าง ๆ กันลงบนเซลล์ข้าวโดยใช้ชนิดและความเข้มข้นเช่นเดียวกับที่ใช้ทดลองกับเซลล์ของใบว่านกาบหอยข้างต้น ทิ้งไว้ 2 นาที แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.7 การศึกษาการเกิด greenspot และหน่อใหม่ของแคลลัสข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่ผ่านการเจริญบนอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีหรือไม่มีออสโมติคัมชนิดและปริมาณต่าง ๆ กัน

นำแคลลัสที่ผ่านการศึกษาจากขั้นตอนที่ 3.4 มาเลี้ยงบนอาหารสูตรซักนำให้แคลลัสเกิด greenspot และหน่อใหม่ (ตารางที่ 3) ซึ่งเป็นอาหารสูตรตาม Vajrabhaya et al. (1984) เพื่อศึกษาผลของออสโมติคัมชนิดและปริมาณต่าง ๆ ต่อการเกิด greenspot และหน่อใหม่จากแคลลัสข้าว เลี้ยงเนื้อเยื่อบนชั้นล่างสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อเช่นเดียวกันกับขั้นตอนที่ 3.4 เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จะมี greenspot เกิดขึ้น ต่อจากนั้นจะพัฒนาเป็นหน่อใหม่ จึงทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3 สูตรอาหารสำหรับชักนำให้แคลลัสเกิด greenspot และหน่อใหม่โดย Vajrabhaya et al. (1984)

สารประกอบ	มิลลิกรัม/ลิตร
ธาตุอาหารหลัก	
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	300.00
$MgSO_4.7H_2O$	720.00
KCl	65.00
KNO_3	80.00
$NaH_2PO_4.H_2O$	16.50
ธาตุอาหารรอง	
Na_2EDTA	37.30
$FeSO_4.7H_2O$	27.80
H_3BO_3	6.20
$MnSO_4.4H_2O$	22.30
$ZnSO_4.7H_2O$	8.60
KI	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
สารอินทรีย์อื่น ๆ	
Myo-inositol	100.00
Thiamine-HCl	0.40
NAA	1.00
BAP	1.60
Coconut water*	100.00
Agar	8,000.00

pH = 5.6 (ปรับด้วย 1 N.NaOH หรือ 1 N.HCl)

หมายเหตุ Coconut water* = หน่วยเป็นมิลลิลิตร/ลิตร

3.8 การศึกษาการเกิดหน่อใหม่ของแคลลัสข้าวพันธุ์เหลืองประทิวที่ผ่านการเจริญบนอาหารสูตรที่มีหรือไม่มีออสโมติคัมระยะเวลาต่าง ๆ กัน

นำแคลลัสข้าวพันธุ์เหลืองประทิวที่ผ่านการเจริญบนอาหารสูตรที่มี mannitol sorbitol 20 กรัมต่อลิตร หรือ PEG 6000 25 กรัม เป็นเวลา 2 หรือ 4 สัปดาห์ มาเลี้ยงบนอาหารสูตรสำหรับชักนำให้แคลลัสเกิด greenspot และหน่อใหม่ เพื่อเปรียบเทียบการเกิดหน่อใหม่ระหว่างแคลลัสที่ผ่านการเจริญบนอาหารสูตรที่มีหรือไม่มีออสโมติคัมชนิดและปริมาณเดียวกันนี้เป็นเวลา 2, 4 และ 6 สัปดาห์

3.9 การชักนำให้เกิดราก

ย้ายแคลลัสซึ่งเกิด greenspot และหน่อใหม่ที่สมบูรณ์แล้ว ลงบนอาหารสูตรสำหรับชักนำให้ต้นใหม่เกิดราก ตามสูตรอาหารของ Vajrabhaya et al. (1984) (ตารางที่ 4) ซึ่งบรรจุอาหารใน Erlenmayor flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 50 มิลลิลิตร เลี้ยงบนชั้นสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้ได้ต้นใหม่ที่สมบูรณ์

4. การเก็บรวบรวมข้อมูลการทดลอง

การทดลองนี้ได้ศึกษาผลของออสโมติคัมในด้านต่าง ๆ ได้แก่

4.1 การศึกษาการเจริญของแคลลัส

นำแคลลัสข้าวพันธุ์เหลืองประทิว ขาวดอกมะลิ หรือ กข.23 ซึ่งเจริญบนอาหารสูตรที่มีออสโมติคัมชนิดและปริมาณต่าง ๆ กันเป็นระยะเวลา 2, 4 และ 6 สัปดาห์ตามลำดับ มาหาค่าน้ำหนักสดประจำสัปดาห์ต่าง ๆ โดยนำแคลลัสที่เลี้ยงอยู่ในขวดแก้วสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่เดิมมาย้ายลงในขวดแก้วที่มีแต่เฉพาะอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรเดียวกันนี้ซึ่งได้ชั่งน้ำหนักของขวดแก้วพร้อมอาหารไว้ก่อนแล้ว ต่อมานำขวดแก้วที่มีแคลลัสซึ่งได้ย้ายมานี้ มาชั่งหาน้ำหนักสดรวมจาก 16 ซ้ำแล้วเฉลี่ยค่าที่ได้จะเป็นค่าน้ำหนักสดเฉลี่ยประจำสัปดาห์นั้น

นำค่าน้ำหนักสดเฉลี่ยประจำสัปดาห์ที่ 2, 4 และ 6 มาหาค่าดัชนีการเจริญ (Growth Index) ประจำสัปดาห์ต่าง ๆ ตามวิธีของ Staba et al. (1982) ดังนี้

ตารางที่ 4 สูตรอาหารสำหรับชักนำให้เกิดราก ดัดแปลงจากสูตรอาหารของ Murashige และ Skoog (1962) โดย Vajrabhaya et al. (1984)

สารประกอบ	มิลลิกรัม/ลิตร
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	1,650.00
KNO_3	1,900.00
$CaCl_2.2H_2O$	440.00
$MgSO_4.7H_2O$	370.00
KH_2PO_4	170.00
ธาตุอาหารรอง	
Na_2 EDTA	37.30
$FeSO_4.7H_2O$	27.80
H_3BO_3	6.20
$MnSO_4.4H_2O$	22.30
$ZnSO_4.7H_2O$	8.60
KI	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
สารอินทรีย์อื่น ๆ	
Myo-inositol	100.00
Thiamine-HCl	0.40
Coconut water*	100.00
IAA	0.10
Sucrouse	60,000.00
Agar	8,000.00

pH = 5.6 (ปรับด้วย 1 N.NaOH หรือ 1N. HCl)

หมายเหตุ Coconut water* = หน่วยเป็นมิลลิลิตร/ลิตร

$$GI_x = \frac{F_x}{I_o}$$

GI_x คือดัชนีการเจริญเทียบจากน้ำหนักสดเฉลี่ยประจำสัปดาห์ที่ x

F_x คือน้ำหนักสดเฉลี่ยประจำสัปดาห์ที่ x

I_o คือน้ำหนักสดเฉลี่ยเริ่มต้น

เขียนกราฟแสดงการเจริญของแคลลัสข้าวพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้ค่าดัชนีการเจริญกับระยะเวลาที่ทดลอง เขียนแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างดัชนีการเจริญประจำสัปดาห์สุดท้ายของแคลลัสข้าวพันธุ์ต่าง ๆ กับออสโมติคัมชนิดและปริมาณต่าง ๆ กันที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วหาค่าดัชนีการเจริญสูงสุด

4.2 <u>การศึกษาค่าออสโมติกโพเทนเชียล</u>

นำค่าของจุดเยือกแข็งของน้ำกลั่นและสารละลายอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรต่าง ๆ มาหาค่าการลดลงของจุดเยือกแข็ง แล้วนำค่าที่ได้มาแทนในสูตรหาค่าออสโมติกโพเทนเชียลจะได้ค่า ออสโมติกโพเทนเชียลของสารละลายอาหารสูตรที่มีหรือไม่มีออสโมติคัมชนิดและปริมาณต่าง ๆ กัน เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของออสโมติคัมกับค่าออสโมติกโพเทนเชียล

4.3 <u>การศึกษาเซลล์</u>

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ของเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างของใบต้นว่านกาบหอยและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ข้าวพันธุ์เหลืองประทิว ภายหลังจากหยดสารละลายอาหารสูตรที่มีและไม่มีออสโมติคัมชนิดและปริมาณต่าง ๆ กันบางความเข้มข้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกลักษณะรูปร่างของเซลล์และถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์

4.4 <u>การศึกษาการเกิด greenspot และหน่อใหม่ของแคลลัสข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่ผ่านการเจริญบนอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีออสโมติคัมชนิดและปริมาณต่าง ๆ กัน</u>

เก็บรวบรวมข้อมูลการทดลองในสัปดาห์ที่ 2, 4 และ 6 ของการเลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตรสำหรับชักนำให้แคลลัสเกิด greenspot และหน่อใหม่โดยนับจำนวนแคลลัสที่เกิด greenspot นับจำนวนแคลลัสที่มีการพัฒนาเป็นหน่อใหม่ที่สมบูรณ์โดยมีความสูงตั้งแต่ 0.5

เซนติเมตรขึ้นไป นับจำนวนหน่อที่โผล่เหนือแคลลัสและมีความสูงตั้งแต่ 0.5 เซนติเมตรขึ้นไป บันทึกภาพเขียนแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนร้อยละของแคลลัสที่เกิด greenspot กับระยะเวลาที่ทดลองของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ และจำนวนร้อยละของแคลลัสที่เกิด greenspot ประจำสัปดาห์ที่ 6 ของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งผ่านการเจริญบนอาหารสูตรที่มีออสโมติคัมชนิดและปริมาณต่าง ๆ กัน เขียนแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนร้อยละของการเกิดหน่อใหม่ต่อจำนวนแคลลัสทั้งหมดประจำสัปดาห์ที่ 6 ของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งผ่านการเจริญบนอาหารสูตรที่มีออสโมติคัมชนิดและปริมาณต่าง ๆ กัน

4.5 <u>การศึกษาการเกิดหน่อใหม่ของแคลลัสข้าวพันธุ์เหลืองประทิวที่ผ่านการเจริญบนอาหารสูตรที่มีออสโมติคัมระยะเวลาต่าง ๆ กัน</u>

เก็บรวบรวมข้อมูลการทดลองในสัปดาห์ที่ 6 ของการเลี้ยงแคลลัสข้าวพันธุ์เหลืองประทิวที่ผ่านการเจริญบนอาหารสูตรที่มี mannitol, sorbitol 20 กรัมต่อลิตรหรือ PEG 6000 25 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 หรือ 4 สัปดาห์ โดยนับจำนวนหน่อที่โผล่เหนือแคลลัสและมีความสูงตั้งแต่ 0.5 เซนติเมตรขึ้นไป เปรียบเทียบค่าจำนวนร้อยละของการเกิดหน่อใหม่ต่อจำนวนแคลลัสทั้งหมดของแคลลัสที่ผ่านการเจริญบนอาหารสูตรที่มีออสโมติคัม 2, 4 และ 6 สัปดาห์ เขียนแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนร้อยละของการเกิดหน่อใหม่ต่อจำนวนแคลลัสทั้งหมดกับระยะเวลาที่แคลลัสผ่านการเจริญบนอาหารสูตรที่มีออสโมติคัมต่าง ๆ กัน

4.6 <u>การหาค่าทางสถิติ</u>

นำข้อมูลของค่าน้ำหนักสดเฉลี่ยกับดัชนีการเจริญของแคลลัสข้าวพันธุ์เหลืองประทิว ขาวดอกมะลิ และกข.23 ที่เจริญบนอาหารสูตรที่มีออสโมติคัมชนิดและปริมาณต่าง ๆ กัน ประจำสัปดาห์ที่ 6 ค่าจำนวนร้อยละของแคลลัสที่เกิด greenspot ประจำสัปดาห์ที่ 6 ค่าจำนวนร้อยละของการเกิดหน่อใหม่ต่อจำนวนแคลลัสทั้งหมดซึ่งผ่านการเจริญบนอาหารสูตรที่มีหรือไม่มีออสโมติคัมชนิดและปริมาณต่าง ๆ กัน และค่าจำนวนร้อยละของการเกิดหน่อใหม่ต่อจำนวนแคลลัสทั้งหมดซึ่งผ่านการเจริญบนอาหารสูตรที่มีหรือไม่มีออสโมติคัมระยะเวลาต่าง ๆ กัน มาหาค่าทางสถิติด้วยไมโครคอมพิวเตอร์ โดยใช้ซอฟแวร์ Statistical Processing System รุ่นที่ 4.0 ลิขสิทธิ์ของบริษัท Databasic, Inc. ในปีค.ศ. 1983 โดย Buhyoff, G.J., R.C. Kirk, H.M. Rauscher, R.B. Hull IV และ E.E. McKenna ซึ่งเขียนด้วยภาษาเบสิค