บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย

วัสดุ และอุปกรณ์

1. พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลอง คือ *Oryza sativa* L. สายพันธุ์ต่างๆ ดังนี้

1.1 กข 21 (RD 21) พันธุ์ข้าวไม่ต้านทาน (อ่อนแอ) ต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ใช้ในการผสมพันธุ์

1.2 กข 23 (RD 23) พันธุ์ข้าวต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลใช้ เป็นพันธุ์มาตรฐานต้านทาน

1.3 สุพรรณบุรี 90 (สพ 90 หรือ SPR90) พันธุ์ข้าวต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลใช้ในการผสมพันธุ์และพันธุ์ มาตรฐานต้านทาน

1.4 Taichung Native 1 (TN1) พันธุ์มาตรฐานไม่ต้านทาน (อ่อนแอ) ต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกข้าว

- กระถางเคลือบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 นิ้ว สูง 12 นิ้ว ภายในบรรจุดิน 20 กิโลกรัม

-ป้ายพลาสติก

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการผสมพันธุ์ข้าว ได้แก่ กระติกน้ำร้อน กรรไกร ปากคีบ ถุงคลุมช่อดอก และป้ายกระดาษสำหรับติดรวงข้าวพันธุ์ผสม

4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาระยะการพัฒนาของไมโครสปอร์ (microspore) ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ สไลด์ และแผ่นปิดสไลด์

5. อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ จานแก้ว ขนาด 100 x 15 มิลลิเมตร ขวดแก้วขนาด 40 x 75 มิลลิลิตร พร้อมฝาพลาสติกสีขาวแบบเกลียว กระบอกตวง บีกเกอร์ เครื่องชั่งหยาบและละเอียด เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH-meter) หม้อนึ่งความดันไอน้ำ

6. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ได้แก่กะบะไม้ขนาด 45 x 60 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร ถาดสังกะสีขนาด 1.25 x 2.5 เมตร สูง 10 เซนติเมตร และป้ายพลาสติกสำหรับติดชื่อพันธุ์

7. สารเคมี

7.1 การเตรียมอาหารสำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อใช้สารประกอบอนินทรีย์ที่เป็นธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง ในสูตรตามตารางที่ 1 และ ตารางที่ 2

7.2 สารควบคุมการเจริญ

2,4-D (2,4- dichlorophenoxyacetic acid), IAA (indole-3-acetic acid), NAA (1-napthalencacetic acid), kinetin และ BAP (6-benzylaminopurine)

7.3 สารประกอบอินทรีย์

-สารประกอบอินทรีย์อื่นๆ (defined organic) ได้แก่ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลมอลโตส วิตามิน กรดอะมิโน

-สารอินทรีย์เสริม (undefined organic additive) ได้แก่ มะเขือเทศสุกพันธุ์ฟลอราเดล น้ำมะพร้าว และมันฝรั่ง

-สารทำให้อาหารแข็งตัว ได้แก่ ผงวุ้นเกรดทำยา

7.4 สารเคมีที่ใช้ในการทำให้ปลอดเชื้อ ได้แก่ เอธิล แอลกอฮอล์

7.5 สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีไมโครสปอร์ ได้แก่ อะซีโตคาร์มีน และ กรดอะซิติก

8. ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

อุณหภูมิห้อง 25±2 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิที่ชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อ 25±3 องศาเซลเซียส ช่วงแสง 16 ชั่วโมง ต่อช่วงมืด 8 ชั่วโมง ให้แสงโดยหลอดฟลูออเรสเซนต์ TLD36W/84 ความเข้มของแสงที่ระดับชั้นวาง 2500 ลักซ์

9. วัสดุสำหรับบำรุงรักษาต้นข้าวได้แก่ ดินปลูก ปุ๋ย และสารเคมี สำหรับป้องกันกำจัดศัตรูพืช

10. เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

สถานที่ และระยะเวลาทำการทดลอง

สถานที่ทำการทดลอง

1. หน่วยปฏิบัติการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ห้องปฏิบัติการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี
3. เรือนปลูกพืชทดลอง ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี

ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลองเดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2539 และ
สิ้นสุดการทดลอง เดือนกันยายน พ.ศ.2541

วิธีดำเนินการวิจัย

เนื่องจากงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาเทคนิคการเลี้ยงอับเรณู เพื่อผลิตสายพันธุ์ข้าวที่ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลซึ่งมาจากข้าวพันธุ์สพ 90แต่ในการเลี้ยงอับเรณูนั้น พบว่ามีความแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ ดังนั้น การวางแผนการดำเนินการวิจัย จึงจำเป็นที่จะต้องศึกษารายละเอียดของเทคนิคการเลี้ยงอับเรณูของคู่ผสมที่ต้องการ จึงได้วางขั้นตอนในการดำเนินการวิจัยดังนี้

1. ปลูกและผสมพันธุ์ข้าว กข 21 และ สพ 90

2. ศึกษาเทคนิคการเลี้ยงอับเรณูของพันธุ์ผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง กข 21 และ สพ90

3. การทดสอบความต้านทานของต้นที่เลี้ยงจากอับเรณู โดยมีพันธุ์ กข 23 และTaichung Native I (TN1) เป็นต้นเปรียบเทียบ (control) รวมทั้ง กข 21 และสพ 90 ด้วย

4. ศึกษาพันธุกรรมควบคุมความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลของพันธุ์ข้าว สพ 90

1. การปลูกและผสมพันธุ์ข้าวมีขั้นตอนดังนี้

การปลูก ทำการปลูกพันธุ์ข้าว กข 21 และ สพ 90 ทุกๆ 7 วัน โดยปลูกครั้งละ 5 กระถาง กระถางละ 3 ต้น เป็นเวลา 10 ครั้ง เพื่อใช้ในการผสมพันธุ์ต่อไป

การผสมพันธุ์ข้าว เมื่อต้นข้าวออกดอกจึงทำการผสมพันธุ์ข้าวแบบสลับพ่อแม่ (reciprocal cross) โดยการกำจัดเกสรตัวผู้ (emasculation) ด้วยวิธี hot air method โดยการใช้ไอร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อฆ่าเกสรตัวผู้ และป้องกันการผสมตัวเอง ทำการผสมพันธุ์ข้าวระหว่างพันธุ์ กข 21 และ สพ 90 โดยใช้พันธุ์ข้าว กข 21

เป็นพันธุ์แม่ และพันธุ์ สพ 90 เป็นพันธุ์พ่อ สลับกับพันธุ์ สพ 90 เป็นแม่ กข 21 เป็นพันธุ์พ่อ จำนวนคู่ละ 70 รวง รวงละ 10-20 เมล็ด เมล็ดพันธุ์ผสมชั่วที่ 1 ที่ได้นำมาศึกษาเทคนิคการเลี้ยงอับเรณู

2. ศึกษาเทคนิคการเลี้ยงอับเรณู

2.1 ศึกษาความยาวระหว่างข้อของใบธงถึงข้อของใบที่ถัดลงมาต่อระยะการพัฒนาของไมโครสปอร์

ประสิทธิภาพในการเลี้ยงอับเรณูข้าวขึ้นอยู่กับระยะการพัฒนาของไมโครสปอร์ที่อยู่ในอับเรณู ไมโครสปอร์ที่เหมาะสมจะอยู่ในระยะกลางถึงปลาย (mid to late uninucleate) (Raina, 1989) ซึ่งระยะนี้ เป็นระยะที่ไมโครสปอร์มีเพียงหนึ่งนิวเคลียส ซึ่งจะสังเกตจากแวคคิวโอลเริ่มขยายใหญ่ขึ้น และดันนิวเคลียสจากบริเวณกลางเซลล์ให้เคลื่อนไปทางด้านข้างของเยื่อหุ้มเซลล์ นิวเคลียสขยายใหญ่และเด่นชัดขึ้น การทดลองนี้จึงได้ศึกษาระยะความยาวระหว่างข้อของใบธงถึงข้อของใบที่ถัดลงมาจากใบธงกับระยะของไมโครสปอร์ที่อยู่ในอับเรณู เนื่องจากระยะการพัฒนาของดอกข้าวที่อยู่ภายในกาบใบจะเป็นไปตามช่วงความยาวระหว่างข้อของใบธงถึงใบที่ถัดลงมาจากใบธง (ภาพที่ 2) ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกช่อดอกจากต้นข้าวที่มีความยาวระหว่างข้อใบธงถึงข้อของใบที่ถัดลงมาต่างๆ กัน คือ 3 5 7 9 11 13 และ 15 เซนติเมตร นำดอกข้าวมาแช่ในน้ำยา Carnoy เก็บที่อุณหภูมิ 5-10 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (กันยารัตน์ ไชยสุต, 2532) แล้วสุ่มดอกข้าวจากบริเวณปลาย กลาง และโคนช่อดอก ย้อมสีด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ อะซีโตคาร์มีน (acetocarmine) ทำการตรวจหาระยะการพัฒนาของไมโครสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยนับจำนวนไมโครสปอร์ที่อยู่ในระยะกลางถึงปลาย

ภาพที่ 2 ระยะระหว่างข้อใบธงกับข้อใบที่ถัดลงมา

2.2 การให้ความเย็นก่อนเลี้ยง (Cold pretreatment)

ในการเลี้ยงอับเรณูของธัญพืชพบว่าถ้านำอับเรณูมาผ่านความเย็นก่อนนำไปเลี้ยงเป็นปัจจัยสำคัญ ที่จะช่วยให้การเลี้ยงอับเรณูประสบผลสำเร็จสูงขึ้น การวิจัยนี้ได้วางแผนการทดลองโดยนำช่อดอกข้าวพันธุ์ผสมชั่วที่ 1 มาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ กัน คือ 0 5 6 7 8 9 10 11 และ 12 วัน ก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร SK-1 ของ Raina และคณะ (1989) ซึ่งมีวิธีการปฏิบัติดังนี้ ตัดช่อดอกขนาดที่ต้องการ ทำความสะอาดโดยการเช็ดด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 70% ห่อช่อดอกด้วยกระดาษเพาะข้าวที่ชุบน้ำกลั่น แล้วห่อทับด้วยแผ่นอลูมินั่ม แล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ กัน หลังจากนั้นนำช่อดอกมาทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ โดยพ่นด้วยเอทธานอล 70% บนช่อดอก แล้วลอกกาบออก และพ่นด้วยเอทธานอล 70 % ซับให้แห้งด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว เลือกดอกข้าวที่มีสีเขียวจางๆ หรือที่ภายในมีอับเรณูสูง $^1/_3$ - $^1/_2$ ของความยาวดอก จากนั้นตัดโคนดอกข้าวด้วยกรรไกรเคาะเบาๆ เพื่อให้อับเรณูตกในขวดอาหารขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร สูง 5 เซนติเมตร ที่บรรจุด้วยอาหารสูตร SK-1ขวดละ 10 มิลลิลิตร (ภาพที่ 3) โดยใช้อับเรณูจากดอกข้าวจำนวน 6 ดอก ต่อ 1 ขวด การทดลองละ 10-30 ขวด

การวิเคราะห์ผลในขั้นตอนนี้ ดูจากจำนวนแคลลัสที่ชักนำได้เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร SK-1 (Raina et al., 1989)

2.3 ศึกษาสูตรอาหารสำหรับชักนำแคลลัส (Callus induction medium)

ศึกษาการเกิดแคลลัสในอาหารสูตรต่าง ๆ ที่ใช้ในการเลี้ยงอับเรณู จำนวน 4 สูตร ได้แก่ สูตร A (สุดารัตน์, 2538) SK-1 (Raina et al., 1989) M-019 Raina and Zapata. 1993 (อ้างโดย Raina, 1993) และ N_6Y_1 (Chung, 1988) (ตารางที่ 1)

โดยตัดช่อดอกจากต้นข้าวพันธุ์ผสมชั่วที่ 1 ที่มีความยาวของข้อใบธงถึงข้อใบที่ถัดลงมาจากใบธง 8-11 เซนติเมตร (ได้จากผลการทดลองข้อ 2.1) มาเช็ดทำความสะอาด

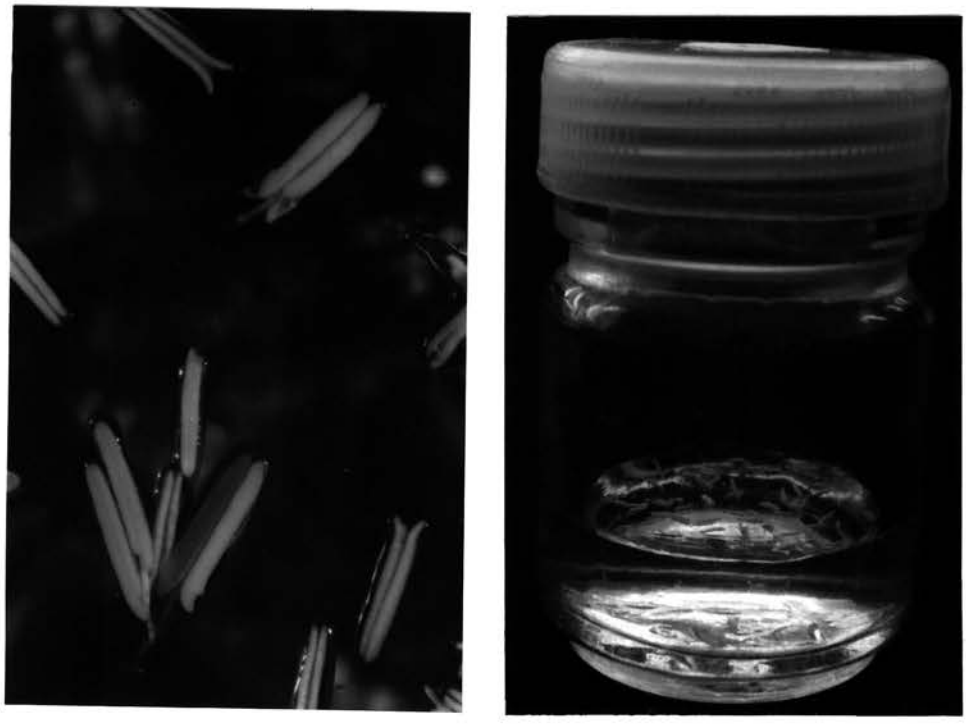
ตารางที่ 1 องค์ประกอบของสูตรอาหารทดลองเพื่อชักนำให้อับเรณูเกิดเป็นแคลลัส

องค์ประกอบ	สูตรอาหารชักนำแคลลัส (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
	A สุดารัตน์ (2538)	SK-1 Raina et al., (1989)	M-019 Raina and Zapata (1993)	N_6Y_1 Chung (1988)
<u>ธาตุอาหารหลัก</u>				
KNO_3	2830.00	3150.00	3134.00	2830.00
$CaCl_2.2H_2O$	166.00	150.00	440.00	166.00
$MgSO_4.7H_2O$	185.00	185.00	370.00	185.00
KH_2PO_4	400.00	540.00	540.00	400.00
$(NH_4)_2SO_4$	463.00	-	320.00	231.50
<u>ธาตุอาหารรอง</u>				
$MnSO_4.4H_2O$	10.00	22.30	22.30	4.40
$ZnSO_4.7H_2O$	10.00	10.00	8.60	1.50
KI	0.80	1.00	0.80	0.80
H_3BO_3	10.00	6.00	6.20	1.60
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.025	0.25	0.25	-
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.025	0.025	-
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	-	0.025	-
$FeSO_4.7H_2O$	19.857	37.25	27.80	27.85
$Na_2EDTA.\ 2H_2O$	26.642	27.85	37.30	37.25
<u>สารอินทรีย์อื่นๆ</u>				
<u>วิตามิน</u>				
Myo-inositol	200.00	100.00	100.00	-
Nicotinic acid	1.00	2.50	-	0.50
Pyridoxine HCl	1.00	2.50	2.00	0.50
Thiamine HCl	5.00	2.50	2.00	1.00
Biotin	0.50	-	-	-

ตารางที่ 1 (ต่อ)

องค์ประกอบ	สูตรอาหารชักนำแคลลัส (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
	A สุดารัตน์ (2538)	SK-1 Raina et al. (1989)	M-019 Raina and Zapata (1993)	N_6Y_1 Chung (1988)
<u>กรดอะมิโน</u>				
Glycine	2.00	2.00	2.00	2.00
Proline	40.00	-	-	-
Arginine	40.00	-	-	-
Asparagine	40.00	-	-	-
Alanine	40.00	-	-	-
Glutamine	400.00	-	-	265.00
<u>สารควบคุมการเจริญ</u>				
2,4-D	0.80	0.75	2.00	-
NAA	-	2.5	-	2.00
BAP	0.40	-	-	-
Kinetine	-	0.75	0.50	1.00
<u>สารอินทรีย์เสริม</u>				
เนื้อมันฝรั่ง (กรัมต่อลิตร)	100.00	-	-	-
coconut water (มิลลิกรัมต่อลิตร)	100.00	-	-	-
Sucrose	32,000	30,000	-	30,000
Maltose	-	-	50,000	-
Casein hydrolysat	-	500	-	-
Agar	8,000	8,000	-	8,000
Phytagel		-	2,500	-
pH	5.6	5.8	5.8	5.8

M-019 (Raina and Zapata, 1993) อ้างโดย (Raina, 1993)



ภาพที่ 3 การเลี้ยงอับเรณูข้าวบนสูตรอาหาร

เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำที่ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน (ได้จากผลการทดลอง ข้อ 2.2) มาเช็ดทำการฆ่าเชื้อและปฏิบัติตามวิธีการในข้อ 2.2 โดยใช้อับเรณูจากดอกข้าวจำนวน 6 ดอก ต่อ 1 ขวด ซึ่งเท่ากับ 36 อับเรณูต่อขวด ทดลอง 10 ซ้ำๆ ละ 10 ขวด สรุปคือ ใช้อับเรณู 6x6x10x10 = 3600 อับเรณูต่อหนึ่งสูตรอาหาร นำไปเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสของอับเรณูที่เลี้ยงทั้งหมด

2.4 สูตรอาหารสำหรับชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัส (Plant regeneration medium)

ศึกษาการเกิดต้นในอาหารสำหรับพัฒนาให้เกิดต้น จำนวน 4 สูตร ได้แก่ สูตร B (สุดารัตน์, 2538) MS Mod. (Lenka and Reddy, 1991) MSMU (Ayres et al. 1995) MSCU (Our) ซึ่งดัดแปลงมาจากสูตรอาหารของ Murashige และ Skoog (1962) (ตารางที่ 2)

โดยการนำแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงอับเรณู (จากการทดลองที่ 2.3) ขนาดเส้นผ้าศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร (Raina, 1993) โดยเลี้ยงแคลลัส 7 ชิ้นต่อ 1 ขวด จำนวน 10 ขวด จากนั้นนำไปวางบนชั้นให้ได้รับแสง 2500 ลักซ์ เป็นเวลาวันละ 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียสติดต่อกัน บันทึกผลการพัฒนาการเกิดต้น โดยนับจำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียว คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดจุดเขียว และนับจำนวนการเกิดต้น เมื่อต้นข้าวมีความสูงประมาณ 5 เซนติเมตร

สำหรับอาหารสูตร B ใช้ 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกใช้อาหารสูตร B เติมวุ้น 16 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงย้ายไปเลี้ยงต่อในสูตรปกติ (วุ้น 8 กรัมต่อลิตร)

3. ศึกษาลักษณะของสายพันธุ์ข้าวที่ได้จากการเลี้ยงอับเรณู

การศึกษาทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางการเกษตรของสายพันธุ์ข้าว (A_0) ที่ได้จากการเลี้ยงอับเรณู

นำต้นข้าวที่ได้จากการพัฒนาโดยการเลี้ยงอับเรณู (A_0) ที่มีลำต้นแข็งแรง ซึ่งมีอายุประมาณ 1 เดือน ออกปลูกในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว ในโรงเรือน

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของสูตรอาหารทดลองเพื่อพัฒนาให้เกิดต้น

องค์ประกอบ	สูตรอาหารชักนำให้เกิดต้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
	B สุดารัตน์ (2538)	MS Mod Lenka and Reddy (1991)	MSMU Ayres et al., (1995)	MSCU Our
<u>ธาตุอาหารหลัก</u>				
KNO_3	2830.00	1900.0	1900.0	1900.0
$CaCl_2.2H_2O$	166.00	440.0	440.0	440.0
$MgSO_4.7H_2O$	185.00	370.0	370.0	370.0
KH_2PO_4	400.00	170.0	170.0	170.0
$(NH_4)_2SO_4$	463.00	-	0	-
NH_4NO_3	-	1650.0	1650.0	1650.0
<u>ธาตุอาหารรอง</u>				
$MnSO_4.4H_2O$	10.00	22.3	22.3	22.3
$ZnSO_4.7H_2O$	10.00	8.6	8.6	8.6
KI	0.80	0.85	0.85	0.85
H_3BO_3	10.00	6.2	6.2	6.2
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.025	0.25	0.25	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.025	0.025	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.025	0.025	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	19.857	27.8	27.8	27.8
$Na_2EDTA.\ 2H_2O$	26.642	37.3	37.3	37.3
<u>สารอินทรีย์อื่นๆ</u>				
<u>วิตามิน</u>				
Myo-inositol	200.00	100.0	100.0	100.0
Nicotinic acid	1.00	0.5	0.5	0.5
Pyridoxine HCl	1.00	0.5	0.5	0.5
Thiamine HCl	5.00	0.5	0.5	0.5
Biotin	0.50	-	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

องค์ประกอบ	สูตรอาหารชักนำให้เกิดต้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
	B สุดารัตน์ (2538)	MS Mod Lenka and Reddy (1991)	MSMU Ayres et al., (1995)	MSCU Our
<u>กรดอะมิโน</u>				
Glycine	2.00	2.00	2.00	2.00
Proline	40.00	-	-	-
Arginine	40.00	-	-	-
Asparagine	40.00	-	-	-
Alanine	40.00	-	-	-
Glutamine	400.00	-	-	-
<u>สารควบคุมการเจริญ</u>				
IAA	-	1.00	0.5	0.5
NAA	0.8	-	-	-
BAP	6.40	2.00	1.00	2.00
Kinetine	-	0.60	-	-
<u>สารอินทรีย์เสริม</u>				
เนื้อมะเขือเทศ (กรัมต่อลิตร)	150.00	-	-	-
Sucrose	16,000	30,000	30,000	30,000
Casein hydrolysat	-	-	0.500	-
Agar	16,000	8,000	8,000	8,000
pH	5.6	5.8	5.8	5.8

I19306829

ประมาณ 20 วัน เพื่อให้ต้นข้าวแข็งแรงและตั้งตัวได้ จากนั้นทำการย้ายต้นข้าวลงปลูกในกระถางเคลือบ มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 นิ้ว โดยปลูก 3 ต้นต่อกระถาง ดูแลจนต้นข้าวออกดอก และเก็บเกี่ยวเมล็ด บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการสังเกตการเจริญเติบโตของลำต้น ขนาดของใบ นอกจากนี้บันทึกจำนวนต้น haploid และต้น double haploid โดยสังเกตได้จากการเจริญเติบโตและความแข็งแรงของต้น และการติดเมล็ดดังนี้

- ต้น haploid ลักษณะต้นจะเตี้ยกว่าปกติ ใบเล็กและแคบ ลำต้นเล็ก ไม่ติดเมล็ด

- สำหรับต้น double haploid มีลำต้น ใบ ความสูง ขนาดปกติ และติดเมล็ดดี

ส่วนลักษณะทางการเกษตรที่ทำการศึกษา ได้แก่ อายุวันออกดอก ความสูงของต้น จำนวนต้นต่อกอ จำนวนรวงต่อกอ เปอร์เซ็นต์เมล็ดดี และน้ำหนัก 100 เมล็ด

-อายุวันออกดอก รุ่น A_0 เริ่มนับตั้งแต่หน่อใหม่พัฒนาจากแคลลัส จนถึงวันที่ช่อดอกโผล่มาครึ่งช่อ หรือ 50 เปอร์เซ็นต์

- ความสูงวัดจากโคนกอถึงปลายรวงสูงสุด

-จำนวนต้นต่อกอนับเมื่อต้นข้าวมีอายุ 60 วัน

- จำนวนรวงต่อกอ โดยนับจำนวนรวงที่เก็บเกี่ยวได้ทั้งกอ

- เปอร์เซ็นต์เมล็ดดี คิดจาก % ของเมล็ดดี ต่อจำนวนเมล็ดทั้งหมดใน 1 รวง

-น้ำหนัก 100 เมล็ด โดยการสุ่มเมล็ดจากต้นข้าว A_0 มาซ้ำละ 100 เมล็ด จำนวน 3 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

4. การทดสอบปฏิกิริยาสายพันธุ์ข้าวต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ในการศึกษาความต้านทานของต้นที่ได้จากการเลี้ยงอับเรณูเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ใช้วิธีการทดสอบในระยะกล้า (วัชระ ภูรีวิโรจน์กุล, 2534) โดยนำต้นที่ได้จากการเลี้ยงอับเรณูมาปลูกแล้วเก็บเมล็ดเรียกเมล็ดรุ่นนี้ว่า A_1 นำเมล็ดรุ่น A_1 ในคู่ผสมระหว่าง กข 21/ สพ 90 จำนวน 21 สายพันธุ์ และในคู่ สพ 90/กข 21 จำนวน 53 สายพันธุ์ มาปลูกทดสอบปฏิกิริยาต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลภายในโรงเรือน โดยทำการเพาะเมล็ดพันธุ์ข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ สายพันธุ์ละ 100 เมล็ด รวมทั้งพันธุ์พ่อแม่ ได้แก่ กข 21 สพ 90 และพันธุ์ TN1 ซึ่งเป็นพันธุ์ไม่ต้านทานมาตรฐาน กข 23 เป็นพันธุ์ต้านทานมาตรฐานเปรียบเทียบ (ภาพที่ 4) เมื่อเมล็ดข้าวงอกแล้วนำไปปลูกลงในกะบะไม้ภายในบรรจุดินละเอียด สูงจากพื้นกะบะ 5 เซนติเมตร โดยปลูกแถวละ 25 ต้น ทำ 4 ซ้ำ ระยะระหว่างแถว 4 เซนติเมตร ระหว่างต้น 1 เซนติเมตร ปลูกกะบะละ 14 สายพันธุ์ทดสอบโดยมีพันธุ์พ่อแม่ พันธุ์ไม่ต้านทาน และ พันธุ์ต้านทานมาตรฐาน ปลูกร่วมด้วยทุกกะบะ เมื่อปลูกเรียบร้อยแล้ว นำกะบะไม้ไปวางไว้ในถาดสังกะสีบรรจุน้ำเล็กน้อย เพื่อหล่อเลี้ยงต้นข้าว เมื่อต้นข้าวอายุ 10 วัน จึงทำการปล่อยตัวอ่อนวัยที่ 2 ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ลงบนต้นกล้าจำนวน 7-8 ตัวต่อต้น (ภาพที่ 5) เมื่อต้นข้าวพันธุ์ TN1 ซึ่งเป็นพันธุ์ไม่ต้านทานมาตรฐานแห้งตาย ให้คะแนนปฏิกิริยาการทำลายจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตาม standard evaluation system for rice (IRRI, 1988)

0 คือ ต้นข้าวไม่มีอาการถูกทำลาย

1 คือ ใบแรกของต้นกล้ามีสีเหลืองบางส่วน

3 คือ ใบที่ 1 และ ใบที่ 2 มีสีเหลืองบางส่วน

5 คือ ใบข้าวทุกใบเหลือง แต่ต้นเขียว และแคระแกรน

7 คือ ต้นข้าวเหี่ยวหรือแห้งตาย ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์

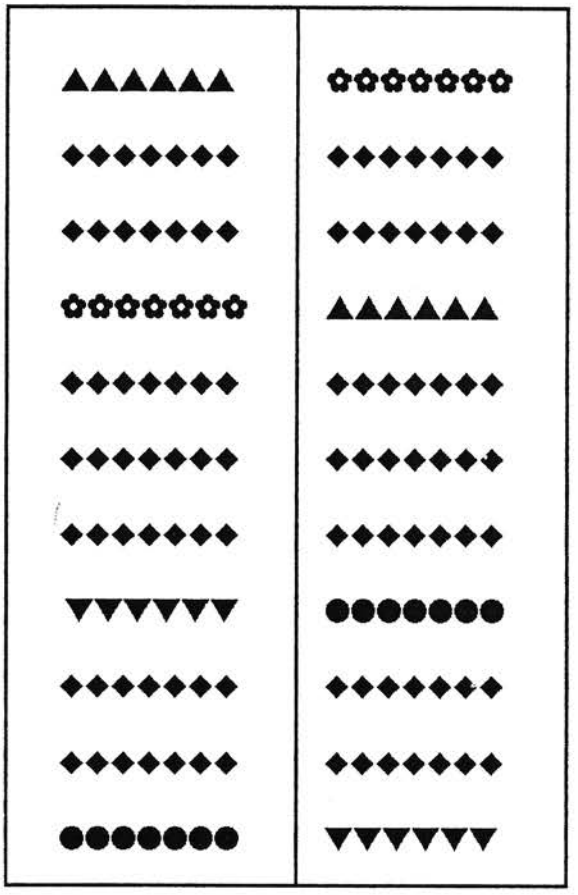
9 คือ ต้นข้าวแห้งตายหมด

ตรวจดูอาการถูกทำลายของต้นข้าวทุก ๆ ต้น แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยโดยใช้สูตร

$$\frac{(\text{ระดับ 1x จำนวนต้น}) + (\text{ระดับ 3 x จำนวนต้น}) + (\text{ระดับ 5 x จำนวนต้น}) + (\text{ระดับ 7 x จำนวนต้น}) + (\text{ระดับ 9 x จำนวนต้น})}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}}$$

จากนั้นนำค่าเฉลี่ยที่ได้มาให้ระดับความต้านทานต่าง ๆ ดังนี้

คะแนนเฉลี่ยของอาการถูกทำลาย	ระดับความต้านทาน
0.00-1.99	ต้านทานดีมาก (highly resistance)
2.00-3.99	ต้านทาน (resistance)
4.00-5.99	ต้านทานปานกลาง (moderately resistance)
6.00-6.99	ค่อนข้างอ่อนแอ (moderately susceptible)
7.00-7.99	อ่อนแอ (susceptible)
8.00-9.00	อ่อนแอมาก (very susceptible)



ภาพที่ 4 แผนผังการปลูกทดสอบปฏิกิริยาต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลของสายพันธุ์ข้าวที่ได้จากการเลี้ยงอับเรณู

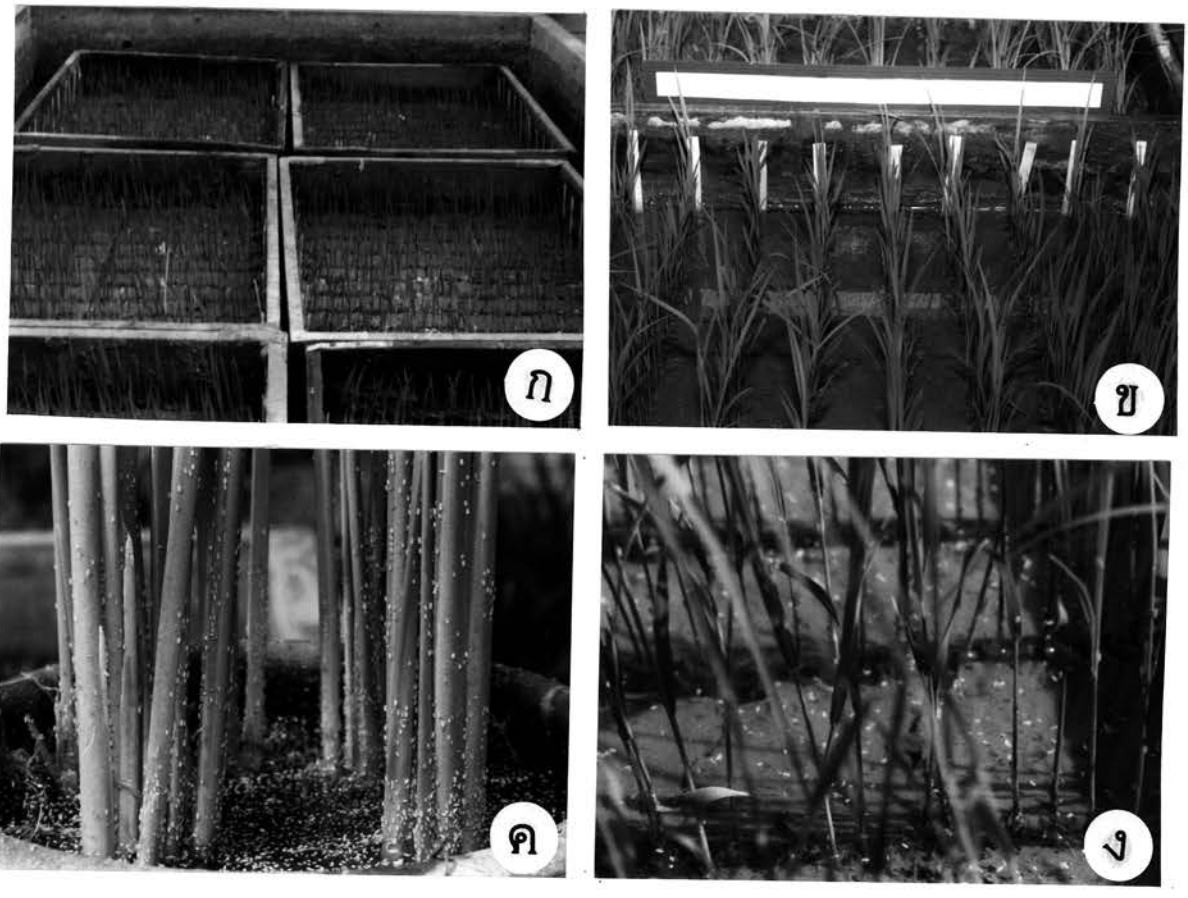
▲ กข 21

✿ กข 23

◆ สายพันธุ์ทดสอบ

▼ TN 1

● สพ 90



ภาพที่ 5 ขั้นตอนการทดสอบปฏิกิริยาต้านทานต่อการทำลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลของต้นข้าว
ที่ได้จากการเลี้ยงอับเรณู (A_1) ระหว่าง กข 21 และ สพ 90

ก ปลูกต้นข้าวสายพันธุ์ A_1 พันธุ์พ่อแม่ รวมทั้งพันธุ์ต้านทาน และ ไม่ต้านทานมาตรฐาน

ข ต้นข้าวอายุ 10 วัน หรือมีใบ 2 ใบ

ค ตัวอ่อนวัยที่ 2 ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ง ปล่อยตัวอ่อนวัยที่ 2 ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลลงบนต้นข้าว

5. พันธุกรรมควบคุมความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลของพันธุ์ข้าวสุพรรณบุรี 90

โดยนำเมล็ดข้าวพันธุ์ผสมชั่วที่ 1 (F_1) และชั่วที่ 2 (F_2) ที่ได้จากการผสมพันธุ์ข้าวแบบสลับพ่อแม่ (reciprocal cross) ระหว่างพันธุ์ กข 21 กับ สพ 90 พันธุ์ผสมชั่วที่ 1 ทดสอบ 50 เมล็ด ส่วนพันธุ์ผสมชั่วที่ 2 ทดสอบ 250 เมล็ด มาเพาะให้งอกและนำไปปลูกลงในกะบะไม้ ภายในบรรจุดินละเอียดสูงจากพื้นกะบะ 5 เซนติเมตร ปลูกเป็นแถวๆ ละ 25 ต้น ซึ่งแต่ละแถวห่างกัน 4 เซนติเมตร ระหว่างต้น 1 เซนติเมตร นำกะบะไม้ที่ปลูกเรียบร้อยแล้วไปวางในกะบะสังกะสีบรรจุน้ำเล็กน้อย เมื่อต้นข้าวอายุได้ 10 วัน ทำการปล่อยตัวอ่อนวัยที่ 2 ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจำนวน 7-8 ตัวต่อต้น จากนั้นตรวจปฏิกิริยาของต้นข้าวเมื่อต้นข้าวพันธุ์ TN1 ซึ่งเป็นพันธุ์มาตรฐานแห้งตาย โดยให้ระดับคะแนนปฏิกิริยาตาม standard evaluation system for rice (IRRI, 1988) นำปฏิกิริยาของข้าวพันธุ์ผสมต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ไปวิเคราะห์อัตราส่วนของจำนวนต้นที่ต้านทานต่อต้นไม่ต้านทานโดยปฏิกิริยาของต้นข้าวต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ระดับ 0, 1, 3, 5 จัดอยู่ในกลุ่มต้านทาน ระดับ 7 และ 9 จัดอยู่ในระดับไม่ต้านทาน โดยใช้ Chi-square test (Little and Hills, 1978)