การชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ของข้าว (*Oryza sativa* L.) และทดสอบการเจริญเติบโตของแคลลัสในสภาวะทนแล้ง

REGENERATION OF RICE (*Oryza sativa* L.) AND CALLUS INDUCTION ON DROUGHT TOLERANT TEST

ภูดิส พัฒนเธียร
สุเมธ จันทะมาลา

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

การชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ของข้าว (*Oryza sativa* L.) และทดสอบการเจริญเติบโตของแคลลัสในสภาวะทนแล้ง

REGENERATION OF RICE (*Oryza sativa* L.) AND CALLUS INDUCTION ON DROUGHT TOLERANT TEST

ภูดิส พัฒนเธียร

สุเมธ จันทะมาลา

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2560

REGENERATION OF RICE (*Oryza sativa* L.) AND CALLUS INDUCTION ON DROUGHT TOLERANT TEST

PHUDIS PATTANATIEN

SUMATE CHANTHAMALA

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENT FOR

THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อโครงงานพิเศษ การชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ของข้าว (*Oryza sativa* L.) และทดสอบการเจริญเติบโตของแคลลัสในสภาวะทนแล้ง
Regeneration of Rice (*Oryza sativa* L.) and Callus Induction on Drought Tolerant Test

ชื่อนักศึกษา นายภูดิส พัฒนเธียร รหัสนักศึกษา 57050747
นายสุเมธ จันทะมาลา รหัสนักศึกษา 57050775

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2560

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.วิมลมาศ บุญมี

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	
ดร.วิมลมาศ บุญมี กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ การชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ของข้าว (*Oryza sativa* L.) และทดสอบการเจริญเติบโตของแคลลัสในสภาวะทนแล้ง

ชื่อนักศึกษา นายภูดิส พัฒนเธียร รหัสนักศึกษา 57050747

นายสุเมธ จันทะมาลา รหัสนักศึกษา 57050775

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2560

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

อารจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.วิมลมาศ บุญมี

บทคัดย่อ

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าว 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เฉี้ยงพัทลุง เล็บนกปัตตานี และสังข์หยดพัทลุง ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS และ NB ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ แอลโพรลีน พบว่าปริมาตรและการเกิดแคลลัสเฉลี่ย ให้ผลสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร NB โดยข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุดที่ 35 เปอร์เซ็นต์ และมีขนาดพื้นที่เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 313.91 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ใน 2,4-D 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีมี 75 เปอร์เซ็นต์ ใน 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีขนาดพื้นที่เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 367.96 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ใน 2,4-D 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่ 85 เปอร์เซ็นต์ และมีขนาดพื้นที่เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 356.20 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ใน 2,4-D 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร การชักนำให้เกิดต้นใหม่จากแคลลัส มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร NB โดยข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง มีอัตราการพัฒนาเป็นยอดและมีปริมาณพื้นที่เฉลี่ยเพิ่มขึ้น บนสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีที่ BAP ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงที่ NAA ร่วมกับ BAP ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร การศึกษาผลการเจริญเติบโตของแคลลัสภายใต้สภาวะแล้ง โดยนำแคลลัสลักษณะสีเหลืองอ่อนของแต่ละสายพันธุ์มาฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหาร NB ที่มีสารประกอบ PEG ซึ่งข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี สายพันธุ์สังข์หยดพัทลุง มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด 90 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกันที่ PEG ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรหลังจากผ่านไป 4 สัปดาห์

คำสำคัญ : การชักนำให้เกิดแคลลัส การชักนำให้เกิดต้นใหม่ ข้าว รังสีแกมมา สภาพเครียดจากสภาวะแล้ง

Title	Regeneration of Rice (*Oryza sativa* L.) and Callus Induction on Drought Tolerant Test
Students	Mr. Phudis Pattanatien Student ID 57050747
	Mr. Sumet Chanthamala Student ID 57050775
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2017
Advisor	Asst. Prof.Dr. Anurug Poeaim
Co-advisor	Dr.Wimonmat Boonmee

Abstract

Study on optimal medium for callus induction of rice (*Oryza sativa* L.) 3 cv Chiang Phatthalung, Leb Nok Pattani and Sung yod phatthalung rice cutured on MS and NB solid medium plemetited with 2,4-D and L-proline. The highest percentage of callus induction area was NB medium, Chiang Phatthalung rice had highest percentage of callus action at 35 % and average areas 313.91 mm^3 on 1.5 mg/L 2,4-D. Leb Nok Pattani rice was highest at 75 % on 0.5 mg/L 2,4-D and average area 367.96 mm^3 on 1.5 mg/L 2,4-D and Sung yod phatthalung rice had highest at 85% and average area 356.29 mm^3 on 1.5 mg/L 2,4-D. Plant regeneration from callus was cultured on NB solid medium supplemented with NAA and BAP for 1 week. Shoot rate and average area of Chiang Phatthalung rice were increased with 1 mg/L BAP and NAA, Leb Nok Pattani rice were increased with 3 mg/L BAP and NAA and Sung yod phatthalung rice were increased with 2 mg /L NAA and BAP. The result of callus induction on drought tolerant by irradiation gamma on light yellow callus in every cultivar. Then culture callus on NB medium supplemented with PEG. The maximum survival rate of Leb Nok Pattani and Sung yod phatthalung rice is 90 % at PEG 20 g/L after 4 weeks.

Keyword : Callus induction, Plant regeneration, Rice, Gamma rays, Drought tolerance

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเรื่อง “การชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ *(Oryza sativa* L.) ของข้าวและทดสอบการเจริญเติบโตของแคลลัสในสภาวะทนแล้ง”ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจาก ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารยที่ปรึกษาโคงงานพิเศษที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และแนวทางการปฏิบัติงาน ตลอดจนสนับสนุนในด้านต่างๆและให้ประสบการณ์ที่ดีแก่กลุ่มข้าพเจ้าจึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการโครงงานพิเศษ และ ดร.วิมลมาศ บุญมี กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงงานพิเศษ ที่ให้คำปรึกษาชี้แนะแนวทางในการแก้ปัญหาและช่วยตรวจสอบความถูกต้องเพื่อให้โครงงานพิเศษฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความร่วมมือ และอำนวยความสะดวก ต่อการทำโครงงานพิเศษในครั้งนี้

สุดท้ายกลุ่มข้าพเจ้า ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่คอยเป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนส่งเสริมการศึกษาในทุกด้านเป็นอย่างดีตลอดมา รวมทั้งพี่ๆและเพื่อนทุกคนที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำโครงงานพิเศษเรื่องนี้ให้สำเร็วลุล่วงไปได้ด้วยดี

ภูดิส พัฒนเธียร

สุเมธ จันทะมาลา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ข

กิตติกรรมประกาศ..... ค

สารบัญ..... ง

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญรูป..... ญ

คำย่อ/สัญลักษณ์..... ฐ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... 2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย..... 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

2.1 ข้าว..... 4

2.2 โครงสร้างของข้าว..... 4

2.2.1 เปลือกแข็งหุ้มเมล็ดหรือแกลบ..... 4

2.2.2 เปลือกหุ้มผล..... 4

2.2.3 เมล็ด..... 5

2.2.4 คัพภะ..... 5

2.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว..... 6

2.3.1 ราก..... 6

2.3.2 ใบ..... 6

2.3.3 ช่อดอก..... 6

2.3.4 เมล็ดข้าว..... 6

2.4 สายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษา..... 6

2.4.1 ข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง..... 6

2.4.2 ข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี..... 7

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.4.3 ข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุง..... 8
2.5 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช..... 8
2.6 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช..... 9
2.6.1 ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช..... 9
2.7 องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช..... 10
2.7.1 สารอนินทรีย์..... 10
2.7.2 สารอินทรีย์..... 10
2.8 ภัยแล้ง..... 12
2.9 ความสัมพันธ์ของสภาพแล้งกับการสะสมปริมาณโพรลีน..... 12
2.9.1 การสะสมโพรลีน..... 12
2.9.2 กระบวนการสรางโพรลีนในพืช..... 12
2.9.3 การสลายตัวของโพรลีนในพืช..... 13
2.10 PEG หรือ Polyethylene glycol..... 13
2.11 การศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส..... 13
2.11.1 ปัจจัยการชักนำให้เกิดต้นพืช..... 14
2.12 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสี..... 14
2.12.1 การกลายพันธุ์..... 14
2.12.2 การกำหนดปริมาณรังสีที่ใช้..... 14
2.12.3 การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เมื่อได้รับรังสี..... 15
2.13 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 15
2.13.1 การศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส..... 15
2.13.2 การศึกษาการชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่..... 18
2.13.3 การศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ในสภาวะแห้งแล้ง. 19
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 20
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี..... 20
3.1.1 เมล็ดข้าวที่ใช้ในการศึกษา..... 20
3.1.2 สารเคมี..... 20
3.1.3 อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ..... 21

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย 22
3.2.1 ศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำข้าวให้เกิดแคลลัส 22
3.2.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นใหม่ 22
3.2.3 การศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวแต่ละสายพันธุ์ภายใต้สภาวะแล้งจากสารประกอบ PEG 23
3.2.4 การศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสข้าวแต่ละสายพันธุ์ภายใต้สภาวะแล้งจากสารประกอบ PEG 23
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 24
4.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าว 3 สายพันธุ์ 24
4.1.1 ข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง 25
4.1.2 ข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี 29
4.1.3 ข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุง 33
4.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นใหม่ 37
4.2.1 ข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง 37
4.2.2 ข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี 40
4.2.3 ข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุง 43
4.3 ผลการศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวแต่ละสายพันธุ์ภายใต้สภาวะแล้งจากสารประกอบ PEG6000 46
4.3.1 ข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี 46
4.3.2 ข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุง 49
4.4 การศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสข้าว 52
4.4.1. การหาปริมาณรังสีที่ส่งผลต่ออัตราการตายของแคลลัสที่ 50 เปอร์เซ็นต์. 52
4.4.1.1 ข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง 52
4.4.1.2 ข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี 54
4.4.2 การศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสข้าวแต่ ละสายพันธุ์ภายใต้สภาวะแล้งจากสารประกอบ PEG 56

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

4.4.2.1 ข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี 56

4.4.2.2 ข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุง 59

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 62

5.1 สรุปผลการวิจัย 62

5.2 ข้อเสนอแนะ 63

เอกสารอ้างอิง 64

ภาคผนวก 70

ภารผนวก ก 71

ภาคผนวก ข 72

สารบัญตาราง

รูปที่		หน้า
4.1	ตารางเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์อัตราการเกิดแคลลัสและปริมาตรแคลลัสเฉลี่ยของข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุงบนอาหารสูตร NB และ MS ที่ประกอบไปด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ	26
4.2	ตารางเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์อัตราการเกิดแคลลัสและปริมาตรแคลลัสเฉลี่ยของข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีบนอาหารสูตร NB และ MS ที่ประกอบไปด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นต่าง	30
4.3	ตารางเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์อัตราการเกิดแคลลัสและปริมาตรแคลลัสเฉลี่ยของข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงบนอาหารสูตร NB และ MS ที่ประกอบไปด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ	34
4.4	ผลการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นใหม่ของสายพันธุ์ข้าวเฉี้ยงพัทลุงบนสูตรอาหาร NB ที่ประกอบไปด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ	38
4.5	ผลการชักนำชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นใหม่ของสายพันธุ์ข้าวเล็บนกปัตตานีบนสูตรอาหาร NB ที่ประกอบไปด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับNAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ	41
4.6	ผลการชักนำชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นใหม่ของสายพันธุ์ข้าวสังข์หยดพัทลุงบนสูตรอาหาร NB ที่ประกอบไปด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับNAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ	44
4.7	แสดงผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์แคลลัสของข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีที่รอดชีวิตบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร NB ที่ประกอบด้วย PEG6000 ในความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์	47
4.8	แสดงผลการเปรียบเทียบจำนวนแคลลัสของข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงที่รอดชีวิตบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร NB ที่ประกอบด้วย PEG6000 ในความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์	50
4.9	การศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุงเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	52

สารบัญตาราง (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.10	การศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	54
4.11	แสดงผลการเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสในข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุง ที่ผ่านการฉายรังสีแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสี 6 กิโลแรดบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร NB ที่ประกอบด้วย PEG6000 ในความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 2 และ4 สัปดาห์.....	57
4.12	แสดงผลการเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสในข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุง ที่ผ่านการฉายรังสีแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสีระหว่าง 8 และ 10 กิโลแรดบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร NB ที่ประกอบด้วย PEG6000 ในความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 2 และ4 สัปดาห์.....	60

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แสดงโครงสร้างของข้าว	5
2.2	แสดงลักษณะเมล็ดของข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง	7
2.3	แสดงลักษณะเมล็ดของสายพันธุ์ข้าวเล็บนกปัตตานี	7
2.4	แสดงลักษณะเมล็ดของสายพันธุ์ข้าวสังข์หยดพัทลุง	8
4.1	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์อัตราการเกิดแคลลัสของข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และอาหารสูตร NB	27
4.2	กราฟแสดงปริมาตรเฉลี่ยของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และอาหารสูตร NB	27
4.3	ลักษณะแคลลัสของข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NB (ก-ง) และอาหารสูตรMS (จ-ซ) ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	28
4.4	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์อัตราการเกิดแคลลัสของข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และอาหารสูตร NB	31
4.5	กราฟแสดงปริมาตรเฉลี่ยของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และอาหารสูตร NB	31
4.6	ลักษณะแคลลัสของข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NB (ก-ง) และอาหารสูตร MS (จ-ซ) ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	32
4.7	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์อัตราการเกิดแคลลัสของข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และอาหารสูตร NB	35
4.8	กราฟแสดงปริมาตรเฉลี่ยของแคลลัสข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุง ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และอาหารสูตร NB	35
4.9	ลักษณะแคลลัสของข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร NB (ก-ง) และ MS (จ-ซ) ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 0.5 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	36

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.10	กราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนแคลลัสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุงที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร NB โดยประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	39
4.11.	แสดงลักษณะของแคลลัสที่มีความเปลี่ยนแปลงจากแคลลัสเริ่มต้น 0 (ก-ง) และหลังจากผ่านไป 1 สัปดาห์ (จ-ซ) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร NB ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่างๆ.....	39
4.12	กราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนแคลลัสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร NB โดยประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	42
4.13	แสดงลักษณะของแคลลัสที่มีความเปลี่ยนแปลงจากแคลลัสเริ่มต้น (ก-ง) และหลังจากผ่านไป 1 สัปดาห์ (จ-ซ) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร NB ที่ปประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่างๆ.....	42
4.14	กราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนแคลลัสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร NB โดยประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับNAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	45
4.15	แสดงลักษณะของแคลลัสที่มีความเปลี่ยนแปลงจากแคลลัสเริ่มต้น (ก-ง) และหลังจากผ่าน ไป 1 สัปดาห์ (จ-ซ) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร NB ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับ NAAความเข้มข้นต่างๆ.....	45
4.16	กราฟแสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีภายใต้สภาวะแล้งที่มีสารประกอบ PEG6000.....	47
4.17	แสดงลักษณะสีของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี เพาะเลี้ยงบนอาหาร NB ที่มี สารประกอบ PEG ความเข้มข้น 0 20 40 60 และ 80 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ก-จ) และ 4 สัปดาห์ (ช-ญ).....	48
4.18	กราฟแสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงภายใต้สภาวะแล้งที่มีสารประกอบ PEG6000.....	50

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.19	แสดงลักษณะสีของแคลลัสข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุง เพาะเลี้ยงบนอาหาร NB ที่มี สารประกอบ PEG ความเข้มข้น 0 20 40 60 และ 80 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ก-จ) และ 4 สัปดาห์ (ช-ญ).....	51
4.20	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน.....	53
4.21	แสดงลักษณะการรอดชีวิตของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในสัปดาห์เริ่มต้น (ก) และในสัปดาห์ที่ 4 (ข).....	53
4.22	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน.....	55
4.23	แสดงลักษณะการรอดชีวิตของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในสัปดาห์เริ่มต้น (ก) และในสัปดาห์ที่ 4 (ข).....	55
4.24	กราฟแสดงการเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสภายใต้สภาวะแล้งในข้าวสายพันธุ์เล็บกนกปัตตานีที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร NB โดยประกอบด้วย PEG6000 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 และ4 สัปดาห์.....	57
4.25	แสดงลักษณะสีของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีเมื่อผ่านการฉายรังสีและเพาะเลี้ยงบนอาหาร PEG ที่ระดับความเข้มข้น 0 20 40 60 และ 80 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ก-จ) และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ฉ-ญ).....	58
4.26	กราฟแสดงการเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสภายใต้สภาวะแล้งในข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร NB โดยประกอบด้วย PEG6000 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 2 และ4 สัปดาห์.....	60
4.27	แสดงลักษณะสีของแคลลัสข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงเมื่อผ่านการฉายรังสีและเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีสารประกอบ PEG ที่ระดับความเข้มข้น 0 20 40 60 และ 80 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ก-จ) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ฉ-ญ).....	61

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
BAP	6-Benzylaminopurine
MS	อาหารสังเคราะห์สำเร็จสูตร Murashige and Skoog, 1962
NAA	1-Naphthalene acetic acid
NB	อาหารสังเคราะห์สูตร Modified Chu and Gamborg Basel Medium, 1968
PEG	Polyethylene Glycol
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxy acetic acid

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ/ที่มาของโครงงานพิเศษ

ข้าว (*Oryza sativa L.*) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเป็นอาหารหลักมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของผู้คนในเอเชีย ซึ่งทวีปเอเชียยังเป็นแหล่งเพาะปลูกพืชและธัญพืชที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในโลก ปัญหาด้านการเจริญเติบโตและผลผลิตนั้น ได้รับผลกระทบมาจากสภาวะแวดล้อมต่างๆ เช่น อุณหภูมิ แร่ธาตุในดิน ปัญหาแล้งเป็นต้น ซึ่งทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อความต้องการของประชากร โดยการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากรจึงเป็นสิ่งสำคัญในการพัฒนาข้าวสายพันธุ์ใหม่ เพื่อตอบสนองความต้องการอาหารที่เพิ่มมากขึ้น

โดยปัญหาที่สำคัญต่อการเพาะปลูกทางเกษตรกรรมคือภัยแล้ง ซึ่งเป็นภัยธรรมชาติหรือปรากฏการณ์ที่เกิดในช่วงเวลาอากาศแห้งผิดปกติหรือขาดฝน ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตตลอดจนพืชผลทางการเกษตร ความรุนแรงของภัยแล้งขึ้นกับความชื้นในอากาศ ความชื้น ในดินและระยะเวลาที่เกิดความแห้งแล้งส่งผลให้ผลผลิตของข้าวลดลง จึงได้มีโครงการใช้วิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพมาคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความทนแล้ง (สุจินต์, 2550)

ในปัจจุบันมีการศึกษาค้นคว้าวิจัยทางด้านเทคโนโลยีการปรับปรุงพันธุ์พืช และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมากขึ้น เพราะสามารถที่จะนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายทาง เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นองค์ประกอบสำคัญที่มีศักยภาพทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่ไม่เพียงแต่จะใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ของพืชที่มีอยู่แต่ยังสามารถปรับปรุงให้ได้พืชสายพันธุ์เพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูง ทนต่อสภาวะเครียด และอุณหภูมิที่สูง (Tariq และคณะ, 2008)

ซึ่งยังมีงานวิจัยเพื่อใช้ประโยชน์จากยีนข้าว สามารถค้นพบยีนในข้าวที่เป็นประโยชน์เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติต้านทานต่างๆ ยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติการทนต่อน้ำท่วม และคุณสมบัติความหอมเป็นต้น โดยความรู้นี้สามารถนำไปใช้ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่สำคัญต่อได้ และยังไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาและศึกษาระดับโมเลกุลของธัญพืชอื่นๆได้อีกด้วย

คณะผู้จัดทำจึงมีความสนใจนำขั้นตอนการศึกษาจากตัวอย่างงานวิจัยและปัญหาที่พบเห็นมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาครั้งนี้โดยทำการอาหารสูตรอาหาร ปัจจัย และสภาวะที่เหมาะสมต่อการพัฒนาและชักนำให้เกิดแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์จากข้าวตัวอย่าง คือข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง สังข์หยดพัทลุง และเล็บนกปัตตานี ซึ่งเป็นข้าวประจำท้องถิ่นที่มีการบริโภคมาเพาะเลี้ยงให้เกิดการเจริญเติบโตในอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) และอาหาร NB (Gamborg Basal Medium, 1968) นำแคลลัสที่ได้มาฉายรังสีแบบเฉียบพลัน เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ทนต่อสภาวะแล้งได้ โดยทดสอบบนอาหาร Polyethylene Glycol (PEG)ที่มีคุณสมบัติความชอบน้ำสูง

โดยสามารถนำองค์ความรู้จากการศึกษานี้ไปช่วยในการแก้ปัญหาและ พัฒนาวิธีลดปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อการเจริญของต้นข้าวจากภัยแล้งในภาคเกษตรกรรมต่อไปในอนาคตได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสของเมล็ดข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง เล็บนกปัตตานี และสังข์หยดพัทลุง

1.2.2 เพื่อศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ของข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง เล็บนกปัตตานี และสังข์หยดพัทลุง

1.2.3 เพื่อศึกษาผลของรังสีแกมมาที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง เล็บนกปัตตานี และสังข์หยดพัทลุง

1.2.4 เพื่อศึกษาผลการเจริญเติบโตของข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ในสภาวะแล้งโดยไม่มีการฉายรังสีแกมมาและนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Polyethylene Glycol (PEG) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

1.2.5 เพื่อศึกษาผลของรังสีแกมมาที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ในสภาวะแล้งโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารประกอบ PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเมล็ดข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง เล็บนกปัตตานี และสังข์หยดพัทลุง สูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตรวมทั้งปัจจัยที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส ศึกษาการการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ และนำแคลลัสของข้าวทั้งสามสายพันธุ์มาฉายรังสีแกมมาที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อนำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะแห้งแล้งบนอาหารที่เติมสารประกอบ PEG ระดับความเข้มข้นต่างๆ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสของเมล็ดข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง เล็บนกปัตตานี และสังข์หยดพัทลุง

1.4.2 ทราบผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ของข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง เล็บนกปัตตานี และสังข์หยดพัทลุง

1.4.3 ทราบผลการศึกษาของรังสีแกมมาที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง เล็บนกปัตตานี และสังข์หยดพัทลุง

1.4.4 ทราบผลการศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ในสภาวะแล้งโดยไม่มีการฉายรังสีแกมมาและนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Polyethylene Glycol (PEG) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

1.4.5 ทราบผลการศึกษาผลของรังสีแกมมาที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ในสภาวะแล้งโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารประกอบ PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่าง

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้าว

ข้าว เป็นพืชล้มลุกในตระกูลหญ้า โดยมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Oryza sativa* ข้าวเป็นธัญพืชที่ประชากรโลกนั้นบริโภคเป็นอาหารสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในทวีปเอเชีย มีการเพาะปลูกมากที่สุดเป็นอันดับสองทั่วโลก รองจากข้าวโพด เป็นธัญพืชที่สำคัญในด้านโภชนาการของมนุษย์ ข้าวคิดเป็นพลังงานกว่าหนึ่งในห้าที่มนุษย์ทั่วโลกบริโภค

เนื่องจากในปัจจุบันข้าวเป็นพืชทางเศรษฐกิจที่มีความสำคัญอย่างมากในประเทศที่กำลังพัฒนา จึงได้มีการศึกษาการค้นคว้าวิจัยทางด้านเทคโนโลยีการปรับปรุงพันธุ์พืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมากขึ้น เพราะสามารถที่จะนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายทาง สภาวะอากาศที่ไม่เหมาะสมต่อการเพาะปลูกข้าว การเกิดโรคในพืช ภัยแล้ง ทำให้ผลผลิตของข้าวที่มาจากการเพาะปลูกลดลงอย่างมากส่งผลให้ผลผลิตไม่เพียงพอต่อการบริโภคของประชากรโลก เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นองค์ประกอบสำคัญที่มีศักยภาพทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่ไม่เพียงแต่จะใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ของพืชเพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูง แต่ยังช่วยเพิ่มศักยภาพของพืชให้ทนต่อสภาวะเครียด และอุณหภูมิที่สูงได้ (Tariq และคณะ, 2008)

การศึกษาครั้งนี้จึงมีการมุ่งเน้นศึกษาข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวในแต่ละสายพันธุ์ การศึกษาอิทธิพลของรังสีแกมมาต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสข้าว การศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสข้าวแต่ละสายพันธุ์ภายใต้สภาวะแล้งจากสารประกอบ PEG เพื่อเป็นการขยายพันธุ์ข้าวหายาก และพันธุ์ข้าวที่ได้รับผลกระทบจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเพาะปลูก เพื่อทราบข้อมูลอันเป็นพื้นฐานนำไปสู่การปรับปรุงพันธุ์ต่อไปในอนาคตได้

2.2 โครงสร้างของข้าว (งามชื่น, 2542)

แบ่งออกได้เป็น 5 ส่วนใหญ่ๆ คือ

2.2.1 เปลือกแข็งหุ้มเมล็ดหรือแกลบ (Hull) ทำหน้าที่ห่อหุ้มเมล็ดเอาไว้ภายใน โดยมีน้ำหนักประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ของเมล็ดข้าว มีปริมาณเซลลูโลส (Cellulose) และเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) ประมาณ 68 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณลิกนิน (Lignin) 19.2 - 24.5 เปอร์เซ็นต์ แพนโทแซน (Pantosans) ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ และเถ้า (Ash) ประมาณ 13.2 – 29.0 เปอร์เซ็นต์

2.2.2 เปลือกหุ้มผล (Pericarp) เป็นเซลล์รูปแท่งห่อหุ้มรอบเมล็ด มีอยู่ด้วยกัน 6 ชั้น มีผนังเซลล์ที่บางอยู่ชั้นนอกสุด มีองค์ประกอบเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ให้โครงสร้าง เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส โปรตีน ไขมัน และแร่ธาตุต่างๆ

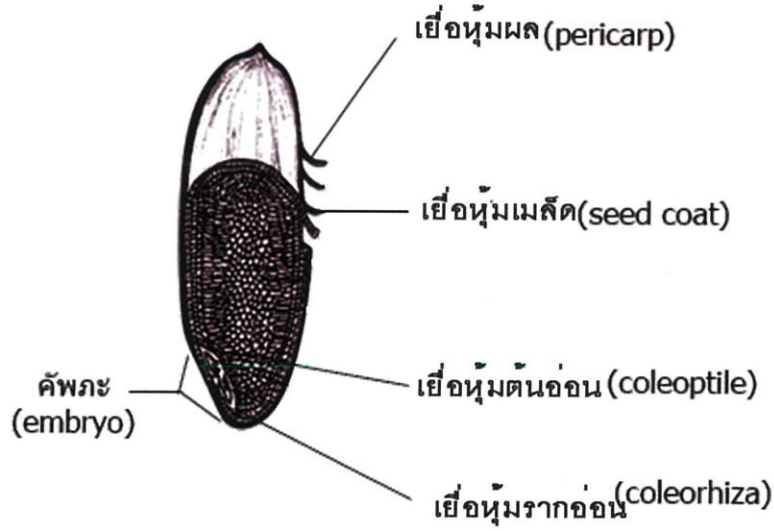
2.2.3 เมล็ด ประกอบไปด้วย

- เปลือกหุ้มเมล็ด (Tegmen หรือ Seed coat) เป็นผนังเซลล์บาง รูปร่างยาวรี อุดมไปด้วยไขมัน จึงทำให้มีคุณสมบัติในการป้องกันน้ำไม่ให้เข้าสู่เนื้อเมล็ด

- ชั้นเยื่อโปร่งใส (Hyaline layer หรือ Nucellus) อยู่ติดกับชั้นเปลือกหุ้มเมล็ด ลักษณะโปร่งใส ประกอบด้วยสารสี เช่นเดียวกับในชั้นเปลือกหุ้มเมล็ด

- ชั้นเยื่อหุ้มเมล็ด (Aleurone layer) มีลักษณะเซลล์รูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์และมีนิวเคลียสอยู่ตรงกลาง ประกอบด้วยโปรตีน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส

2.2.4 คัพภะ (germ หรือ embryo) เป็นส่วนที่เรียกว่าจมูกข้าวเป็นตำแหน่งรวมของส่วนที่จะงอกเป็นต้นข้าวต้นใหม่ งอกเป็นยอดอ่อน (Plummule) และส่วนที่จะงอกเป็นรากกำเนิด (Radicle) ทั้งสองส่วนนี้ยึดติดกันด้วยปล้องที่สั้นมากเรียกว่า มีโซคอททิล (Mesocotyl) ยอดอ่อนจะห่อหุ้มลักษณะที่คล้ายใบเรียกว่า เยื่อหุ้มยอดอ่อน (Coleoptile) ส่วนของคัพภะทั้งหมดอยู่ในชั้นเยื่อหุ้มเมล็ด และคัพภะอยู่ติดกับส่วนทางด้านท้องของเมล็ด (Ventral side) ในส่วนนี้จะอุดมไปด้วยสารอาหาร แร่ธาตุ และวิตามิน เพื่อการเจริญเติบโตโดยสารอาหารที่มีมาก คือ โปรตีน ไขมัน และวิตามินที่มีมากคือ วิตามินบี (Thiamine) กับ วิตามินอี (Tocopheral) (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างของข้าว
(ที่มา : ดัดแปลงจากกรมการข้าว)

2.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว

ข้าวเป็นพืชน้ำล้มลุกเขตร้อน ชอบขึ้นในที่ดินเหนียวมีน้ำท่วมขัง มีบางพันธุ์ที่สามารถขึ้นได้ในที่ดอนเรียกว่า ข้าวไร่ ข้าวมีลำต้นกลวงและแตกตรงข้อเจริญเติบโตแบบแตกกอ ใบยาวเรียวสากคล้ายใบตะไคร้หรือใบคา ดอกออกเป็นช่อดอกรวมที่ปลายยอด เรียกว่า รวงข้าว ผลหรือเมล็ดเมื่อยังอ่อนจะมีสีเขียว เมื่อแก่จะมีสีเหลืองทอง ลักษณะที่สำคัญของข้าวแบ่งออกได้เป็นลักษณะที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโตและลักษณะที่เกี่ยวกับการขยายพันธุ์

2.3.1 ราก (root) เป็นส่วนที่อยู่ใต้ผิวดิน มีรากพิเศษที่ขึ้นที่ข้อซึ่งอยู่เหนือพื้นดิน ต้นข้าวไม่มีรากแก้ว มีรากฝอยแตกแขนงกระจายอยู่ใต้ผิวดิน ลำต้นกลวงมีข้อและปล้องชัดเจน จำนวนปล้องประมาณ 20-25 ปล้อง ต้นสูงประมาณ 1-1.5 เมตร

2.3.2 ใบ (leaf) มีกาบใบ (sheath petiole) หุ้มลำต้น และแผ่นใบ (laminar) บางแคบและยาวประมาณ 0.6-2.5 เซนติเมตร เส้นกลางใบ (mid rib) เห็นชัดเจน ปลายใบแหลมโคนใบเป็นกาบหุ้ม รอบต้นยาวประมาณ 0.8-2.5 เซนติเมตร ผิวใบทั้งสองด้านและขอบใบมีขนสั้นๆ

2.3.3 ช่อดอก (inflorescence) หรือ รวงข้าว (panicle) ซึ่งเกิดขึ้นที่ข้อของปล้องอันสุดท้ายของต้นข้าวระยะระหว่างข้ออันบนของปล้องอันสุดท้ายกับข้อต่อของใบธง เรียกว่า คอรวง ดังนั้นคอรวงจะสั้น หรือยาวย่อมขึ้นอยู่กับระยะระหว่างข้ออันบนของปล้องสุดท้ายกับข้อต่อของใบธง รวงข้าวประกอบด้วยก้านอันใหญ่ต่อจากคอรวงขึ้นไปแล้วแตกแขนงออกไปมากมาย มุมของการแตกแขนงนั้นแตกต่างกันไปตามชนิดของพันธุ์ข้าว การมีข้อของแขนงถี่นั้นเรียกว่า ระแง้ถี่ ทำให้มีจำนวนดอกต่อรวงมาก ซึ่งเป็นลักษณะของพันธุ์ข้าวที่จะให้ผลิตผลสูง

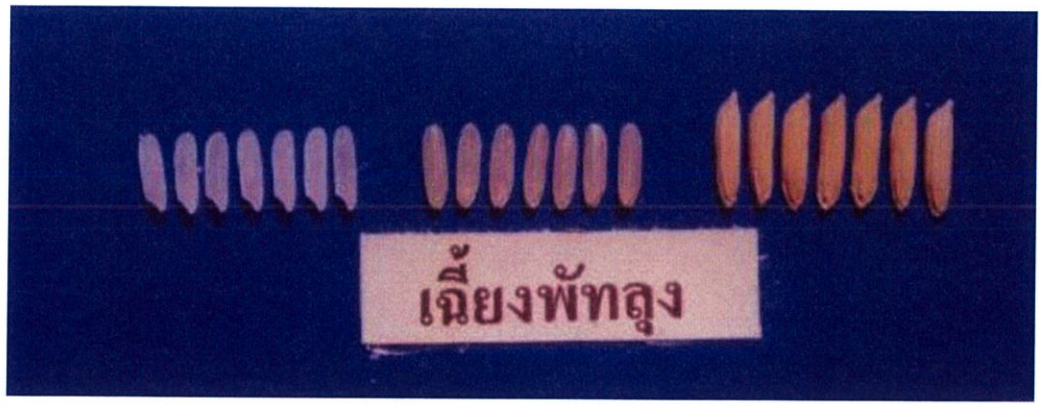
2.3.4 เมล็ดข้าว (seed) เป็นแหล่งรวมแป้ง ที่เรียกว่า เอนโดสเปิร์ม และส่วนที่เป็นคัพภะ ถูกห่อหุ้มไว้โดยเปลือกนอกแผ่นใหญ่สองแผ่น ซึ่งส่วนเอนโดสเปิร์มจะเป็นแป้ง และ คัพภะจะเป็นส่วนที่งอกออกมาเป็นต้นข้าว

2.4 สายพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา

2.4.2 ข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง

เป็นข้าวพันธุ์พื้นเมือง มีชื่อเดิมหลายชื่อได้แก่ ขาวกาหวิน เปอร์วิต ขาวมาเล บางแก้ว โดยนายเฉี้ยง ทองเรือง ชาวนาอำเภอป่าบอน จังหวัดพัทลุง ได้นำข้าวพันธุ์นี้จากอำเภอปากพะยูน จังหวัดพัทลุงไปปลูกที่ตำบลบ้านใหม่ อำเภอระโนด จังหวัดสงขลาเป็นครั้งแรก ลักษณะประจำพันธุ์เป็นข้าวเจ้านาสวนสูงประมาณ 150 เซนติเมตร ไวต่อช่วงแสง อายุเก็บเกี่ยวประมาณเดือนมกราคม มีใบสีเขียว ใบธงแผ่เป็นแนวนอน คอรวงยาว รวงยาวปานกลาง ระแง้ค่อนข้างถี่ เมล็ดข้าวเปลือกสีฟาง (รูปที่ 2.2) ให้ผลผลิตประมาณ 470 กิโลกรัมต่อไร่ สามารถปรับตัวได้ดีทั้งในพื้นที่ที่เป็นนาดอนและนาลุ่ม มีความเหมาะสมกับพื้นที่ทุกจังหวัดในภาคใต้ มีการปลูกกันมากในจังหวัดพัทลุง และ

นครศรีธรรมราช แต่สิ่งสำคัญมีข้อควรระวังคือ ไม่ต้านทานต่อโรคไหม้ และค่อนข้างอ่อนแอต่อโรคขอบใบแห้ง (ที่มา : กรมการข้าว)



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะเมล็ดของข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง
(ที่มา : กรมการข้าว)

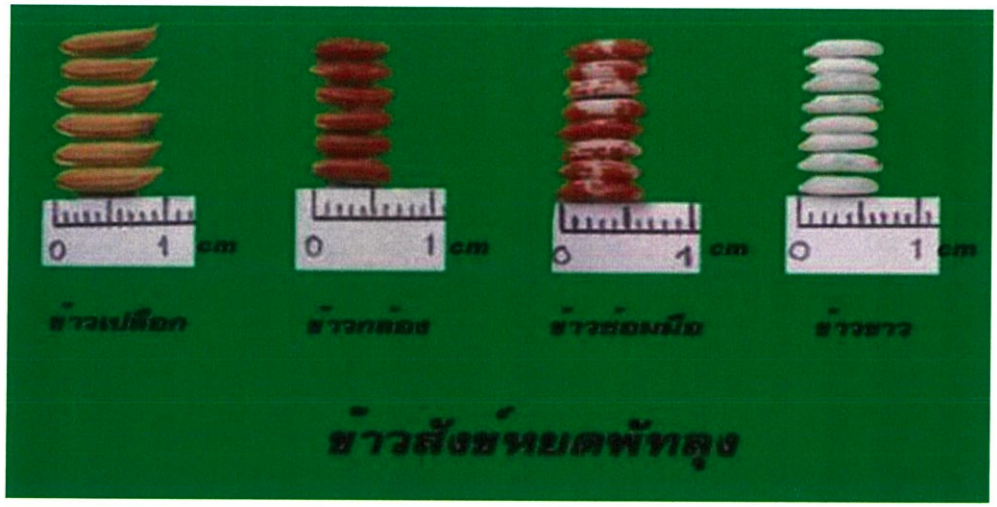
2.4.2 ข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี

ข้าวเล็บนก (รูปที่ 2.3) เป็นข้าวที่มีรสชาติดี และเป็นที่นิยมของผู้บริโภค โดยนิยมปลูกในภาคใต้ ลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวพันธุ์เล็บนก เป็นข้าวเจ้า ประเภทไวต่อแสง มีอายุการเก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ รวงยาวจับกันแน่น มีความสูงประมาณ 170 เซนติเมตร เมล็ดข้าวเปลือกสีฟาง มีปริมาณอะไมโลส 26 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลผลิตค่อนข้างสูง เมื่อปลูกในสภาพนาเป็นลุ่มน้ำที่แห้งช้า ปรับตัวได้ดีบริเวณพื้นที่จังหวัด สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และพัทลุง สำหรับข้อจำกัดของพันธุ์ข้าวที่ต้องระมัดระวัง คือ ไม่ต้านทานต่อโรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง (ที่มา : กรมการข้าว)

รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะเมล็ดของสายพันธุ์ข้าวเล็บนกปัตตานี
(ที่มา : กรมการข้าว)

2.4.3 ข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุง

ข้าวพันธุ์สังข์หยดพัทลุง (รูปที่ 2.4) เป็นข้าวเจ้าไวต่อช่วงแสง ต้นสูง 140 เซนติเมตร ทรงกอตั้ง ใบเขียว รวงแน่น คอรวงยาว มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง มีสีแดงปนสีขาว ข้าวจากรวงเดียวกันเมื่อขัดสีแล้วบางเมล็ดมีสีขาวใส แต่ส่วนใหญ่มีลักษณะขาวขุ่น มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เหมาะกับการบริโภค หุงแล้วมีกลิ่นหอม มีธาตุเหล็ก วิตามินบี และไนอาซิน (ที่มา : กรมการข้าว)



รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะเมล็ดของสายพันธุ์ข้าวสังข์หยดพัทลุง
(ที่มา : กรมการข้าว)

2.5 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือ การนำเอาส่วนใดส่วนนึงของพืช เช่น ใบ ตายอด ตาข้าง เนื้อเยื่อ หรือ เซลล์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วย แร่ธาตุ น้ำตาล วิตามินและสารควบคุมการเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังต้องทำการเพาะเลี้ยงในสภาพที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์และในสภาวะที่ควบคุมสิ่งแวดล้อมได้แก่ อุณหภูมิ แสง และ ความชื้น ซึ่งชิ้นส่วนของพืชดังกล่าวจะมีการเจริญเติบโตและพัฒนาไปในรูปแบบต่างๆ เช่น เกิดเป็นยอด เกิดเป็นราก เกิดเป็นเอมบริโอ หรือเกิดเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่าแคลลัส ที่สามารถชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์จำนวนมากได้ (วราพร, 2552)

หลักการสำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือต้องทำในสภาพที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์กล่าวคือ ขั้นตอนต้องปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ โดยขั้นตอนในการทำงานจะเริ่มจากการฟอกฆ่าเชื้อที่ชิ้นส่วนพืชแล้วตัดเอาเฉพาะส่วนที่ต้องการนำมาวางเพาะเลี้ยงให้หลอดทดลองหรือขวดแก้วที่บรรจุอาหารสังเคราะห์ซึ่งได้ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเช่นกัน ขวดเพาะเลี้ยงนี้จะถูกนำมาวางเลี้ยงในห้องที่มีการควบคุมสภาวะต่างๆ เช่น แสง อุณหภูมิ ให้เป็นไปตามที่ต้นพืชต้องการ ชิ้นส่วนของพืชจะได้รับแร่ธาตุและสารอาหารจากอาหารสังเคราะห์และเจริญเติบโตต่อไป ซึ่งการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชนี้สามารถควบคุมได้โดยการเลือกใช้สูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญที่เหมาะสม เช่น ฮอร์โมนพืช ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยงว่าต้องการให้ชิ้นส่วนนั้นเจริญไปเป็นส่วนใด เช่น ถ้า

ต้องการให้เจริญไปเป็นส่วนลำต้นก็สามารถทำการชักนำโดยใช้ ฮอร์โมนพืชกลุ่มไซโตไคนิน (Cytokinin) หากต้องการให้เกิดรากอาจใช้ฮอร์โมนกลุ่มออกซิน (Auxin) หรืออาจใช้ฮอร์โมนหลายชนิดรวมกัน

2.6 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (อนุรักษ์, 2550)

ปัจจัยที่สำคัญมากอย่างหนึ่งที่จะทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสบความสำเร็จ คือสูตรอาหารที่เหมาะสม ซึ่งต้องประกอบด้วยอาหารที่พืชสามารถนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ มักมีการเรียกอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแตกต่างกันไป เช่น อาหารวิทยาศาสตร์ อาหารสังเคราะห์ อาหารวุ้น ฯลฯ อาหารที่นิยมใช้มีหลายสูตรแต่ละสูตรจะเรียกตามชื่อผู้ที่คิดค้นสูตรอาหารนั้นๆ ซึ่งจะถูกปรับให้ใกล้เคียงกับธาตุอาหารที่พืชได้รับในสภาพธรรมชาติมากที่สุด โดยเพิ่มในส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต น้ำตาล สารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น สูตร MS (Murashige & Skoog ,1962) เป็นต้น การเลือกใช้อาหารสูตรใดขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของชนิดพืชและวัตถุประสงค์ที่ใช้ แตกต่างกันตามชนิดหรือพันธุ์พืช หรือตามพัฒนาการของเนื้อเยื่อ ส่วนประกอบพื้นฐานของสูตรอาหารประกอบด้วย ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง เกลือแร่ และวิตามินต่างๆสารอาหารอื่นๆ ที่จำเป็นได้แก่ กรดอะมิโน สารควบคุมการเจริญเติบโต หรือสารสกัดจากพืช ซึ่งมีผลต่อการเพิ่มจำนวน และการพัฒนาของเซลล์พืช

2.6.1 ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

- อาหารกึ่งแข็ง (semi-solid medium) เทคนิคที่ใช้ในยุคแรกนั้น ใช้วุ้น (agar) เพื่อปรับสารละลายอาหารให้มีสภาพเป็นของแข็งมากขึ้น โดยนำไปเข้าในไมโครเวฟเพื่อหลอมละลายอาหารแล้วเทใส่ภาชนะที่ใช้ใส่อาหารและทิ้งให้แข็งตัวอยู่ในสภาพอาหารกึ่งแข็ง แต่มักพบว่าคุณสมบัติของสารประกอบเคมีในอาหารอาจไม่ได้รับสูงสุดเท่ากับอาหารเหลว (liquid medium) แต่วุ้นยังคงถูกนำมาใช้แต่จำเป็นต้องดัดแปลงให้เหมาะสม และต้องแน่ใจว่ามีความบริสุทธิ์จริง ความเข้มข้นของวุ้นที่พอเหมาะสำหรับอาหารแต่ละชนิดจะต้องมีการทดสอบเสียก่อน อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของวุ้นที่ใช้กันแพร่หลายและได้ผลดีคือ 0.7-0.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสังเคราะห์พวก gelatin และ silica gel ได้เคยมีการใช้ และในปัจจุบันมี การพัฒนาสารประกอบพวก acrylamide gels เช่นเดียวกับ starch co-polymers ก็มีการแนะนำมาใช้แทนวุ้น สารเหล่านี้มีข้อดีที่ไม่จำเป็นต้องต้มให้เดือดเพื่อช่วยให้ละลายน้ำได้ แต่ยังมีปัญหาในเรื่องการปรับค่า pH สำหรับสารที่เป็นผงถ่าน (charcoal) จะถูกเติมในอาหารหลายสูตร เพื่อช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตเนื่องจากสามารถดูดซับสารพิษพวก toxic metabolites ที่เกิดจากเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงได้ดี

- อาหารเหลว (Liquid medium) เป็นอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของวุ้น ชิ้นพืชที่เลี้ยงในอาหารเหลวมักจะมีการเจริญเติบโตที่ดี และค่อนข้างรวดเร็ว แต่ต้องระวังเรื่องการถ่ายเทอากาศของชิ้นพืช ถ้าเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลว จำเป็นต้องเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (Shaker) ควบคู่กันไปเสมอ ทั้งนี้เครื่องเขย่าจะเคลื่อนไหวด้วยการหมุนในแนวขนานกับพื้นโลก อัตรา 100-120 รอบต่อนาที การเขย่าตลอดเวลาจะช่วยให้ออกซิเจนละลายลงในอาหารส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช การเลี้ยงในอาหารเหลวอาหารเหลวเป็นเวลานานพืชอาจมีการฉ่ำน้ำ หากพบอาการดังกล่าว ควรหยุดการใช้อาหารเหลว และเปลี่ยนไปใช้อาหารแข็งจะสามารถลดอาการฉ่ำน้ำของพืชลดลงได้

2.7 องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (อนุรักษ์, 2550)

2.7.1 สารอนินทรีย์ (inorganic nutrients) ได้แก่ แร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตโดยจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

2.7.1.1 แร่ธาตุอาหารหลัก ได้แก่ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนิเซียม และซัลเฟอร์ ซึ่งจะเป็นแร่ธาตุที่ต้องการในปริมาณมากและขาดไม่ได้

2.7.1.2 แร่ธาตุอาหารรอง ได้แก่ เหล็ก แมกกานีส สังกะสี โคบอลต์ โมลิบดีนัม ทองแดง โบรอน ซึ่งจะเป็นสารที่พืชต้องการในปริมาณที่น้อยแต่ขาดไม่ได้

2.7.2 สารอินทรีย์ (organic nutrients) ได้แก่ สารที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน ไฮโดรเจน และ ออกซิเจน แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม

2.7.2.1 คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีส่วนสำคัญในอาหารให้พลังงานแก่เนื้อเยื่อพืช

2.7.2.2 วิตามิน (vitamins) เป็นส่วนประกอบของอาหารในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ที่สำคัญมีผลทำให้พืชมีการพัฒนาและเจริญเติบโตขึ้น โดยมีวิตามินหลายชนิด เช่น ไทอะมีน ไนอะซีน อินโนซิทอล

2.7.2.3 กรดอะมิโน (amino acid) มีความสำคัญในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชเป็นอย่างมากกรดอะมิโนมีประมาณ 20 ชนิด และมีการใช้ในปริมาณที่แตกต่างกันไป เช่น ไกลซีน อะลานีน อาร์จินีน แอสพาราจีน กรดแอสปาร์ติก ซีสทีน

2.7.2.4 สารควบคุมการเจริญเติบโตการเจริญเติบโตของพืช

สารควบคุมการเจริญเติบโตที่สร้างขึ้นในต้นพืช (plant hormones) ทำหน้าที่กระตุ้นและมีส่วนร่วมในกระบวนการต่างๆ ที่นำไปสู่การพัฒนาของต้นที่เป็นปกติการเจริญเติบโตตลอดจน การเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์ เนื้อเยื่อ และ secondary metabolism เป็นผลมาจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเหล่านี้ทั้งสิ้น การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงในอาหารจึงอาจไม่

จำเป็นเสมอไปโดยเฉพาะในการ เลี้ยงแคลลัส อย่างไรก็ตามโดยปกติจะมีส่วนช่วยในการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต การกำเนิดอวัยวะและมีเนื้อเยื่อพืชไม่กี่ชนิดที่สร้างแคลลัสได้ในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและ ไซโทไคนินมีความสำคัญที่สุด พืชบางชนิดสร้างสารเหล่านี้อยู่แล้ว แต่ควรเพิ่มเข้าไปในอาหารเพื่อช่วยให้การเจริญดีขึ้น บางครั้งอาจต้องใช้จิบเบอเรลลิน หรือ เอทิลีน การเก็บสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชมักเก็บในตู้เย็นในรูปสารละลายเข้มข้น การนำสารควบคุมการเจริญของพืชไปใช้อาจมีปัญหาการทำละลายของสารควบคุมการเจริญของพืชในน้ำ การละลายออกซินควรทำในด่าง เช่น จิบเบอเรลลินละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ ออกซินและไซโทไคนินที่เตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นควรเก็บไว้ในที่มืด หรือใส่ขวดสีชาเพราะจะเสื่อมสภาพเมื่อได้รับแสง

-ออกซิน (auxin) จะช่วยเพิ่มขนาดของเซลล์ มักใช้ร่วมกับไซโทไคนินเพื่อช่วยในการแบ่งเซลล์ การสร้างราก แต่การเจริญของรากจะถูกยับยั้งถ้ามีออกซินในปริมาณที่สูง สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มนี้ ได้แก่ IAA (indole acetic acid) IBA (indole butyric acid) NAA (naphthalene acetic acid) 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)

-ไซโทไคนิน (cytokinin) ไซโทไคนินที่สังเคราะห์ได้ในธรรมชาติ คือ ซีอะทิน (zeatin) ใช้ในการกระตุ้นการเจริญเติบโต ไซโทไคนินที่ใช้กันมากคือ ไคเนทิน (kinetin) 2iP (N6-isopentenyl adenine) BAP (benzyl aminopurine) มีหน้าที่ส่งเสริมการแบ่งเซลล์โดยเฉพาะถ้าใช้ร่วมกับออกซิน ถ้าใช้ในความเข้มข้นสูงขึ้นจะช่วยในสร้างราก แต่ยับยั้งการเจริญของรากส่งเสริมการสร้างยอดโดยลดผลจากการที่ตายอดข่มตาข้าง มีบทบาทในการเปลี่ยน สภาพเซลล์เป็นอวัยวะได้และชักนำให้เกิดเป็นต้น ไซโทไคนินทนความร้อนได้ดีจึงมักเติมในอาหาร

-จิบเบอเรลลิน (gibberellin) สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มนี้มี 60 กว่าชนิด แต่จิบเบอเรลลินไม่ค่อยใช้กันมากนักในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีบทบาทในการชักนำให้ปล้องยาวขึ้นหลังจากการสร้างยอด ช่วยให้เนื้อเยื่อเจริญมีการเจริญเติบโตและช่วยในการงอกของเมล็ดไม่ควรนำสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดนี้มาฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน เพราะจิบเบอเรลลินส่วนหนึ่งจะเสื่อมสลายไปเมื่อได้รับความร้อน ควรทำให้ปลอดเชื้อโดยใช้เครื่องกรองเมมเบรน

-เอทิลีน (ethylene) อวัยวะพืช แคลลัส หรือเซลล์ในสภาพหลอดแก้วมีการผลิตเอทิลีน จึงไม่ควรปิดหลอดแก้วแน่นเกินไปเพื่อไม่ให้เกิดการสะสมของแก๊สนี้ ผลของเอทิลีนมีทั้งส่งเสริม และยับยั้งการเจริญเติบโต การเลี้ยงเนื้อเยื่อในที่มีแสง จะมีการสะสมเอทิลีนมากกว่า ในที่มืด ถ้ามีมากเกินไปจะทำให้เกิดการฉ่ำน้ำของพืชได้ แก๊สนี้ยังเป็นสาเหตุของการแก่ของเนื้อเยื่อพืช

2.8 ภัยแล้ง

ภัยแล้ง คือ ภัยที่เกิดจากการขาดแคลนน้ำในพื้นที่ใดพื้นที่หนึ่งซึ่งเกิดมาจากการที่มีฝนน้อยกว่าปกติ หรือฝนไม่ตกต้องตามฤดูกาล เป็นระยะเวลานานกว่าปกติ และครอบคลุมพื้นที่บริเวณกว้าง จนก่อให้เกิดความแห้งแล้งมีการขาดแคลนน้ำและอุณหภูมิที่สูงขึ้น ส่งผลกระทบต่อชุมชนการอุปโภคบริโภค และทางด้านเกษตรกรรม (กรมอุตุนิยมวิทยา)

ภัยแล้งที่ส่งผลกระทบโดยทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อการเกษตรกรรม จะทำให้พืชเกษตรกรรมอยู่ในสภาวะขาดน้ำเป็นเวลานานและอาจจะทำให้พืชเกิดอาการเหี่ยวเฉาและตายในที่สุด

ผลจากการขาดน้ำและอุณหภูมิที่สูงเกินไปจะทำให้พืชดูดน้ำขึ้นมาจากดินได้ไม่เพียงพอต่อการที่พืชจะนำไปใช้ในกระบวนการต่างๆที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตได้ ซึ่งจะมีผลทำให้ต้นพืชเหี่ยวแห้ง มีการสร้างสารอาหารที่จำเป็นได้ไม่เต็มที่ เกิดการชะงักการเจริญเติบโตได้

2.9 ความสัมพันธ์ของสภาพแล้งกับการสะสมปริมาณโพรลีน

2.9.1 การสะสมโพรลีน (พัฒนศักดิ์, 2550)

โพรลีนคือกรดอะมิโนชนิดหนึ่ง ถูกสร้างขึ้นมาจากกรดกลูตามิก โดยทั่วไปพืชจะมีการสะสมโพรลีนอยู่แล้ว แต่มีอยู่ในระดับต่ำ และถูกควบคุมโดยกระบวนการ feedback inhibition (Gzik, 1996) เมื่อได้รับสภาพขาดน้ำ จะส่งผลให้น้ำในพืชลดลง พืชจึงมีการลดศักย์ของน้ำลงเพื่อช่วยให้เกิดความต่างศักย์ของน้ำระหว่างดินกับพืช เมื่อน้ำในดินลดน้อยลงจนถึงจุดที่พืชดึงไปใช้ได้น้อยมาก พืชจะปิดปากใบเพื่อลดการคายน้ำ ในการรักษาศักย์ของน้ำ พืชจะมีกระบวนการปรับแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ พืชจะมีการสะสมสารบางชนิดในรูปของสารละลาย เช่น โพรลีน ไกลซีน บีเทน กรดอินทรีย์ และน้ำตาล ภายในไซโตพลาสซึม (Hore และคณะ, 1998) ได้มีการศึกษาของ Chiang and Dandeker (1995) รายงานว่าภายใต้สภาพที่เซลล์ถูกทำลาย หรือได้รับอันตราย มีการสะสมปริมาณโพรลีนที่สูง ซึ่งเป็นการสะสมสารประกอบไนโตรเจน (Barnett and Naylor, 1966) และคาร์บอนไว้ภายในเซลล์ ซึ่งพืชจะได้นำไปใช้ในการเจริญเติบโต หลังจากพ้นจากสภาพขาดน้ำ และพบว่าโพรลีนยังช่วยป้องกันการถูกทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์ และรักษาไม่ให้โปรตีนเสื่อมสภาพ ในระหว่างที่พืชได้รับสภาพแห้งแล้ง (Ain Lhont และคณะ, 2000)

มีรายงานว่าโพรลีนทำหน้าที่เป็นตัวเก็บรักษาคาร์บอนและไนโตรเจนไว้ในระหว่างที่พืชขาดน้ำ ซึ่งพืชจะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตหลังจากพืชพ้นสภาวะขาดน้ำ (Barnett and Naylor, 1966) และโพรลีนที่สะสมเพิ่มขึ้นในสภาวะขาดน้ำจะช่วย รักษาระดับการทำงานของเอนไซม์ให้ดำเนินเป็นปกติ และรักษาโครงสร้างของเซลล์ให้เป็นปกติ

2.9.2 กระบวนการสรางโพรลีนในพืช (Hanson and Hitz, 1982)

เริ่มต้นจากสาร glutamate โดยมีเอนไซม์ γ-glutamyl kinase และ glutamyl-semialdehyde dehydrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์คู่แรกของกระบวนการ จากปฏิกิริยาในช่วงนี้จะได้สาร γ -glutamyl-semialdehyde ต่อจากนั้นเกิดกระบวนการ dehydration โดยไม่มีเอนไซม์

เข้ามาเกี่ยวข้อง ผลของปฏิกิริยาจะได้ pyrroline-5-carboxylate จากนั้นก็เกิดปฏิกิริยา reduction โดย ใช้เอนไซม์ pyrroline-5-carboxylate reductase จากปฏิกิริยานี้จะได้สารโพรลีน โดยที่บางส่วนจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการสร้างโปรตีน บางส่วนเคลื่อนย้ายเข้าสู่ท่อลำเลียงอาหารของพืช

2.9.3 การสลายตัวของโพรลีนในพืช (Jone and Rawson, 1979)

เกิดจากกระบวนการ proline oxidation ของเอนไซม์ proline oxidase ผลจากปฏิกิริยานี้จะได้ pyrroline-5-carboxylate และจาก pyrroline-5-carboxylate จะ เกิดปฏิกิริยาอีกขั้นตอนหนึ่งโดยมี เอนไซม์ pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase ได้เป็น glutamate (Boggess และคณะ, 1976) กระบวนการสลายตัวของโพรลีนจะเกิดขึ้นเมื่อพืชอยู่ในสภาพปกติ แต่ถ้ามีการขาดน้ำกระบวนการจะถูกยับยั้งทำให้ไม่เกิดการสลายตัวของโพรลีน

2.10 PEG หรือ Polyethylene glycol

PEG หรือ Polyethylene glycol เป็นสารเคมีสังเคราะห์ เนื่องจากสมบัติที่ดี เช่น มีความชอบน้ำสูง ทำให้สามารถนำไปผสมกับสารอื่นๆ ให้เพิ่มความชอบน้ำได้ ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ต่างๆที่เกิดจากสารประกอบดังกล่าว เช่น เครื่องสำอาง ครีม โลชั่น โดย PEG เองมีหลายชนิดแตกต่างไปตามน้ำหนัก เช่น PEG200 PEG300 PEG400 และ PEG600 เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลน้อยทำให้ลักษณะของมันจะใส เปรียบเทียบกับ PEG3350 PEG4500 และ PEG8000 ซึ่งมีลักษณะข้นคล้ายแวกซ์ น้ำหนักโมเลกุลที่เพิ่มขึ้นนี้จะส่งผลทำให้คุณสมบัติ เช่น ความสามารถในการละลายน้ำ การดูดความชื้น จุดเยือกแข็ง เปลี่ยนแปลงไปด้วย และด้วยความสามารถในการละลาย(solubility) และการเข้ากันได้ (compatibility) ที่หลากหลาย (หน่วยคลังข้อมูลยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาลัยมหิดล)

2.11 การศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส (รังสฤษดิ์, 2541)

แคลลัส (callus) หมายถึงเซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่างๆ ประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมาแต่เพียงอย่างเดียว มีขนาดไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีแวคิวโอจำนวนมาก ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะไม่มีรงควัตถุ แต่อาจมีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ (chlorophylls) มีสีเหลืองจากแคโรทีนอยด์ (carotenoids) และมีฟลาโวนอยด์ (flavonoids) หรือสีม่วงจากแอนโทไซยานิน (anthocyanins)

ปริมาณและชนิดของรงควัตถุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหาร และปัจจัยสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะอย่างยิ่งแสง แคลลัสที่ได้จะมีรูปร่าง สี แตกต่างออกไป ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและอาหารที่เลี้ยง เช่น แคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์ที่เกาะตัวกันหลวม ๆ สามารถหลุดได้ง่าย เรียกว่า friable callus และแคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์ที่เกาะตัวกันแน่น หลุดได้ยาก จะเรียกว่า compact callus

ชิ้นส่วนพืชเกือบทุกชนิดจากอวัยวะต่างๆ สามารถนำมาชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่โดยทั่วไปแล้วเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จสูงในพืชใบเลี้ยงคู่ได้จากส่วนของคัพภะ ใบเลี้ยง ส่วนที่อยู่เหนือใบเลี้ยง

ปลายยอด ส่วนที่อยู่ใต้ใบเลี้ยง และราก ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้จากส่วนของคัพภะ ใบอ่อน ปลายยอด ดอกอ่อน และส่วนของเมล็ดที่เริ่มงอกจะให้ผลดีที่สุด เนื้อเยื่อพิเศษอื่น ๆ ของพืชที่สามารถนำมาชักนำให้เกิดแคลลัสได้เช่นกัน คำว่า การเจริญ หมายถึง การเพิ่มขนาดโดยถาวร เกิดจากการแบ่งเซลล์แล้วเพิ่มจำนวนเซลล์ การเจริญของแคลลัสในอาหารแข็งเห็นได้จากการที่มีก้อนโตขึ้น วิธีวัดการเจริญของแคลลัสทำได้หลายวิธี เช่น ชั่งน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง การนับจำนวนเซลล์ โดยส่วนใหญ่นิยมใช้วิธีการชั่งน้ำหนักสด

2.11.1 ปัจจัยการชักนำให้เกิดต้นพืช (อารีย์, 2541)

ปัจจัยที่มีความเกี่ยวข้องโดยตรงต่อกระบวนการชักนำให้เกิดเป็นต้นพืชนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของพืช อายุและชิ้นส่วนของพืชที่นำมาใช้เพาะเลี้ยง นอกจากนั้นยังมีปัจจัยภายนอกอื่นๆอีก เช่น แสง อุณหภูมิ ชนิดและส่วนประกอบของอาหาร เป็นต้น ส่วนเนื้อเยื่อ เช่น ตายอด ตาข้าง หรือชิ้นส่วนอื่นที่ผ่านกระบวนการออร์แกโนเจเนซิส (organogenesis) สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นพืชได้ง่าย การชักนำเนื้อเยื่อที่ผ่านขั้นตอนของการเกิดเอ็มบริโอเจเนซิส (embryogenesis) มีความสำคัญยิ่ง เพราะเนื้อเยื่อดังกล่าวนี้มักจะยากต่อการชักนำให้เกิดต้นในต้นพืชบางชนิด

2.12 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสี (สิรินุช, 2540)

2.12.1 การกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ คือ การเปลี่ยนสารพันธุกรรมซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการสูญหายไปของยีนหรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยีน โดยเรียกว่า การกลายพันธุ์ของยีน หรือ การกลายพันธุ์เฉพาะจุด ส่วนการเปลี่ยนแปลงที่มีความเกี่ยวข้องกับส่วนของโครโมโซมนั้นจะเรียกว่า การกลายพันธุ์ของโครโมโซม

2.12.2 การกำหนดปริมาณรังสีที่ใช้

พืชแต่ละชนิดมีความไวหรือต้านทานต่อรังสียังขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ลักษณะความต้านทานหรือความไวต่อรังสีส่วนหนึ่งควบคุมโดยยีน สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ การพิจารณาในปริมาณที่เท่าใดจึงจะเหมาะสม วิธีการโดยเริ่มจากการนำเมล็ดพืชมาฉายรังสีในปริมาณต่างๆ ตั้งแต่ปริมาณที่ต่ำ (low dose) ไปจนถึงปริมาณที่สูงมากจนทำให้เกิดการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ปลูกลงในกระบะสำหรับเพาะปลูกเป็นแถวตามจำนวนปริมาณรังสีที่ใช้ เมื่อประมาณ 30 วัน หาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของต้นกล้าที่ปริมาณรังสีต่างๆ คิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ชุดควบคุม (ชุดที่ไม่มีการฉายรังสี) ปรับให้จำนวนต้นที่อยู่รอดของชุดควบคุมเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ หาความสัมพันธ์ของปริมาณรังสีกับเปอร์เซ็นต์ของการอยู่รอดของต้นกล้า โดยให้ปริมาณรังสีอยู่บนแกน x เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของต้นกล้าอยู่บนแกน y จากจุด 50 เปอร์เซ็นต์ ของแกน y ลากเส้นออกมาตัดเปอร์เซ็นต์

ความอยู่รอดและลากลงมาตัดค่าของปริมาณรังสีในแกน x ณ จุดตัดบนแกน x เป็นปริมาณรังสีที่ทำให้พืชอยู่รอด 50 เปอร์เซ็นต์ หรือตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เรียกปริมาณนี้ว่า LD_{50}

2.12.3 การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เมื่อได้รับรังสี

เซลล์พืชประกอบด้วยชีวโมเลกุลต่างๆ ที่มีความสำคัญต่อการเป็นโครงสร้างและการทำหน้าที่ต่างๆ ภายในเซลล์ ชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ ใช้เป็นแหล่งสะสมอาหาร โปรตีนทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ แคทาลิสต์ (catalyst) ในปฏิกริยาที่สำคัญต่างๆภายในเซลล์ ทำหน้าที่เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตและแอนติบอดีคอยกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกมาภายในเซลล์ ลิพิด (lipid) มีหน้าที่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ กรดนิวคลีนิค (nucleic acid) ทำหน้าที่เป็นสารพันธุกรรมและภายในเซลล์ยังมีสารอนินทรีย์ต่างๆอยู่ด้วย เช่น โซเดียม โปแทสเซียม แมกนีเซียม เป็นต้น โมเลกุลที่มีมากที่สุดในเซลล์คือน้ำมีปริมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์ เมื่อเซลล์พืชได้รับรังสีจะมีการถ่ายพลังงานให้กับโมเลกุลต่างๆของเซลล์ ในกระบวนการถ่ายเทพลังงานทำให้โมเลกุลที่ได้รับพลังงานแตกตัวเป็นไอออน (ion) และฟรีเรดิคอล (free radical) ต่างๆทำให้มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลใหม่มีการทำปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างกัน เกิดเป็นโมเลกุลที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างไปจากเดิม รังสีสามารถถ่ายทอดพลังงานให้กับโมเลกุลต่างๆได้โดยตรง เรียกว่าไดเรคแอคชั่น (direct action) หรือส่งผ่านทางอ้อม เรียกว่า อินไดเรคแอคชั่น (indirect action)

ในการส่งผ่านทางอ้อมหรืออินไดเรคแอคชั่นนั้นรังสีจะถ่ายพลังงานให้กับโมเลกุลของน้ำที่มีอยู่ภายในเซลล์เป็นจำนวนมากทำให้โมเลกุลของน้ำแตกตัวเป็นไอออนและฟรีเรดิคอลต่างๆเรียกรวมกันว่า เรดิโอไลติกโปรดักท์ (radiolytic product) พวกโมเลกุลเหล่านี้สามารถเข้าไปทำอันตรายกับชีวโมเลกุลภายในเซลล์ทำให้มีการมีเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างและหน้าที่ของชีวโมเลกุลได้ ดังนั้นอันตรายที่เกิดจากรังสีของเซลล์จึงเป็นผลรวมจากทั้งการรับสีนั้นโดยทางตรงและทางอ้อม

2.13 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.13.1 การศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส

Amin และคณะ (2004) ได้ศึกษาและทดลองโดยใช้ข้าวของบังคลาเทศสายพันธุ์ BR-8 เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร อินโนซินทอล 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 3 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่ไม่มีแสงเป็นเวลา 25 วัน เมื่อทำการชักนำให้เกิดต้นจึงเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับBAP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

Saharan และคณะ (2004) ทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากข้าวสายพันธุ์ HKR 46 และ HKR 126 โดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โพรลีน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลไลท์ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่ไม่มีแสงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในส่วนการชักนำให้เกิดต้นจะต้องดึงน้ำออกจากเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไคเนติน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลไลท์ 6 กรัมต่อลิตร หรืออาหารสูตร MS ซึ่งมี NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลไลท์ 2 กรัมต่อลิตร

Pipatpanukul และคณะ (2004) พบว่าการชักนำให้เกิดแคลลัสที่ดีจากขาวสายพันธุ์ กข 6 สามารถทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหาร N6 ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 300 มิลลิกรัมต่อลิตร และวุ้นผง 8 กรัมต่อลิตร ในสภาวะที่มีแสงเป็นเวลา 28 วัน และสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ภายใน 45 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม IAA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

เกศสุคนธ์ และคณะ (2548) ทำการเพาะเลี้ยงข้าวสายพันธุ์ สุพรรณบุรี 1 บนอาหารสูตร N6 พบว่าที่ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด โดยเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง

สุพรรณญิกา และประดิษฐ์ (2548) ได้เพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวสายพันธุ์หอมคลองหลวง 1 หอมสุพรรณบุรี และปทุมธานี 1 เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าข้าวหอมพันธุ์คลองหลวง 1 เกิดแคลลัสได้ดีในอาหารสูตร N6 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เช่นเดียวกันกับข้าวหอมสุพรรณบุรี และสามารถใช้อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้เช่นเดียวกัน ส่วนข้าวพันธุ์ ปทุมธานี 1 เกิดแคลลัสได้ดีบนอาหารสูตร N6 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

Rashid และคณะ (2004) ทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากข้าวสายพันธุ์ Super Basmati พบว่าอาหารสูตร N6 ชักนำให้เกิดแคลลัสดีกว่าอาหารสูตร MS โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด คือ 87.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อชักนำให้เกิดต้นพบว่า การเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารที่มี NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดต้นได้สูงถึง 45.3 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี NAA ต่ำ และ BAP สูง จะทำให้เพิ่มการเกิดต้นของข้าวได้

Tariq และคณะ (2008) ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและการชักนำให้เกิดต้นในข้าวสายพันธุ์ Super-Basmati Basmati-370 Basmati-371 และ Fakhre-Malakand ในอาหารสูตร MS และ N6 ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 2 2.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าข้าวสายพันธุ์ Fakhre Malakand สามารถเกิด

แคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารสูตร N6 ที่ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักสูงสุดถึง 0.26 กรัม ในขณะที่ข้าวอีกสามสายพันธุ์สามารถเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารสูตร N6 ที่ 2,4-D ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำการศึกษาการชักนำให้เกิดต้นใหม่ในข้าวสายพันธุ์ Basmati-370 และ Basmati-371 ในอาหารสูตร N6 ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BAP ผลที่ได้สามารถเกิดทั้งยอดและรากได้ พร้อมกันซึ่งให้ผลดีเนื่องจากช่วยประหยัดทั้งเวลาและแรงงาน

Aadarsh และคณะ (2010) ทำการชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวสายพันธุ์ Swarna masoori โดยเฉพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 2 4 8 และ 16 มิลลิกรัมต่อลิตร สังเกตการณ์เกิดแคลลัสสัปดาห์ที่ 2 ถึง 7 ผลที่ได้พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากกว่า 2,4-D ความเข้มข้น 8 และ 16 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งส่งผลให้เกิดสีน้ำตาลในแคลลัสหลังจากสัปดาห์ที่ 3 ถึงแม้ว่า 2,4-D ความเข้มข้น 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี แต่เมื่อนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำเกิดต้น สูตร MS ที่ประกอบด้วย Kin ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดเคซามิโน (casamino acid) 300 มิลลิกรัมต่อลิตร cefotaxime 50 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ซอร์บิทอล 10 กรัมต่อลิตร gelrite 2.5 กรัมต่อลิตร และในอาหารที่ชักนำให้เกิดรากประกอบไปด้วยอาหารสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ gelrite 2.5 กรัมต่อลิตร แคลลัสที่สามารถนำมาชักนำให้เกิดต้นได้ดี ได้จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนแคลลัสที่ได้จาก 2,4-D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนใหญ่จะเกิดรากได้ดี

Din และคณะ (2015) ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวสายพันธุ์ Panderas ในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดที่ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยลักษณะแคลลัสที่ได้เป็นแบบเกาะกันแน่น (compact) ทรงกลม สีเหลืองอ่อน

ภพเก้า (2013) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวหอมมะลิ 105 และข้าวเหนียว กข 6 บนสูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 0 0.1 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น เวลา 6 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้แคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุดมีลักษณะแข็ง เกาะตัวกันแน่น สีเหลือง

เผดิม และคณะ (2536) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าว 6 สายพันธุ์ จากเมล็ดบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับไคเนตินในปริมาณต่างๆ พบว่าข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บาสมาติ 370 และ กข 15 สามารถเกิดแคลลัสได้ดี เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนติน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พันธุ์นางมลเอส 4 และประดู่แดงเกิดแคลลัสได้ดีเมื่อเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนติน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนพันธุ์ปทุมธานี 60 เกิดแคลลัสได้ดีบนอาหารเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนติน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเพาะเลี้ยงให้เกิดต้นบนอาหารสูตร MS พบว่าข้าวพันธุ์ดอกมะลิ 105 และพันธุ์นางมลเอส 4 สามารถเกิดเป็นต้นได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MSที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตใดๆเลย ในขณะที่ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 60 เกิดต้นได้ดีบนอาหารที่มีไคเนติน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พันธุ์ กข 15 สามารถเกิดต้นได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมไคเนตินเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ประภา (2537) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เช่นกัน พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงสุด ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยแคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุด เท่ากับ 6.9 มิลลิเมตร และแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นได้

2.13.2 การศึกษาการชักนำแคลลัสให้เกิดต้นใหม่

Lee และคณะ (2002) ศึกษาผลที่ช่วยในการชักนำให้เกิดต้นของข้าวสายพันธุ์ Dong-Jin Hwa-Chung และ Nak-Dong เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรละ Kin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการศึกษาร่วมกับความเข้มข้นของวุ้น พบว่าในสูตรอาหารที่มีวุ้นความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์พบว่าการเกิดยอดเพียงเล็กน้อยแต่เมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของวุ้นเป็น 1.3 และ 1.6 เปอร์เซ็นต์ พบว่าจำนวนการเกิดยอดเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ

Saharan และคณะ (2004) ศึกษาการชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสในข้าวสายพันธุ์ HKR-126 และ HKR-46 โดยใช้เวลา 0 48 และ 72 ชั่วโมง ในการทำให้แคลลัสแห้ง และเปรียบเทียบจากอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง 6 สูตร พบว่าในระยะ 48 ชั่วโมง มีผลในการชักนำให้เกิดต้นสูงที่สุดในข้าวทั้งสองสายพันธุ์จากอาหารทั้งหมด 6 สูตร

Karthikeyan และคณะ (2009) ประสบผลสำเร็จในการชักนำให้เกิดต้นผ่านเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP และ NAA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันส่งผลให้เพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัส อย่างไรก็ตามจะไม่พบเปอร์เซ็นต์ในการเกิดต้นที่สูงขึ้นเมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของ BAP และ NAA ให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น แต่จะพบว่าที่ความเข้มข้นสูงๆนั้น ช่วยเพียงการชักนำให้เกิดรากเท่านั้น หลังจาก

การเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน จึงทราบว่าผลจากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BAP และ NAA นอกจากชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้แล้วยังสามารถพัฒนาให้เกิดรากได้อีกด้วย

2.13.3 การศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ในสภาวะแห้งแล้ง

นวรัตน์ และอมรรัตน์ (2537) ได้ศึกษาปริมาณโพรลีนที่ใช้บ่งบอกถึงสภาพความทนแล้งในข้าวบาร์เลย์ 3 สายพันธุ์ คือ AKB1, AKB2 และBRB2 พบว่าปริมาณโพรลีนเพิ่มมากขึ้นในสภาวะขาดน้ำ การเพิ่มขึ้นของโพรลีนสูงที่สุดอยู่ที่สายพันธุ์ AKB2 และสามารถที่จะใช้ปริมาณโพรลีนสำหรับคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์ข้าวบาร์เลย์ให้ทนต่อสภาพแล้งได้

วรัญญา (2541) ได้คัดเลือกข้าวสายพันธุ์ที่ทนแล้งในสายพันธุ์ กข23 โดยศึกษาการสะสมปริมาณโพรลีนของต้นกล้าข้าวที่มีอายุ 7 วัน เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารแข็งสังเคราะห์ที่เติม PEG6000 ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าข้าวที่เจริญในสภาพแล้งจะมีการสะสมของปริมาณโพรลีนสูงกว่าสายพันธุ์ปกติ

ตุลาพร และวัฒนา (2549) ได้ศึกษาอิทธิพลของสภาวะขาดน้ำที่เกิดจากความแห้งแล้งต่อลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการในข้าวสายพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 ระยะต้นกล้าทำการปลูกในอาหารสูตร MS และทำการเติม ซอร์บิทอล เพื่อให้เกิดสภาวะแล้งในอาหารเพาะเลี้ยงปลูกเป็นเวลา 15 วัน พบว่าข้าวที่ปลูกในสภาวะแล้งมีความยาวของรากที่เพิ่มมากขึ้น

อรพิน และคณะ (2550) ได้ศึกษาการตอบสนองของข้าวสายพันธุ์ชัยนาท1 และสุพรรณบุรี1 ที่ปลูกในกระถางในสภาวะแล้งที่อายุข้าว 25 40 55 70 และ 85 วัน พบว่าการงดการให้น้ำที่อายุข้าวต่างกันมีพบต่อปริมาณโพรลีนในใบเพิ่มมากขึ้น และข้าวที่ปลูกในปลูกในสภาวะแล้งจะมีปริมาณโพรลีนที่มากกว่าข้าวที่ปลูกแบบปกติ

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เมล็ดข้าวที่ใช้ในการศึกษา

3.1.1.1 ข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง

3.1.1.2 ข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุง

3.1.1.3 ข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 สารที่ใช้ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

- อาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)
- อาหารสังเคราะห์สูตร NB (Gamborg Basel Medium, 1968)
- แอลโพรลีน (L-proline)
- น้ำตาลซูโครส (Sucose)
- ไฟทาเจล (phytagel) ยี่ห้อ sigma
- Polyethylene Glycol (PEG) มวลโมเลกุล 6000

3.1.2.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับปรับความเป็นกรด-ด่าง

- ไฮโดรคลอริก (HCl)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3.1.2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

- 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D); Phytotech
- 1-Naphthalene acetic acid (NAA); Phytotech
- 6-Benzylanminopurine (BAP); Phytotech

3.1.2.4 สารที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ

- โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (Sodlium hypochlrite)
- น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (distilled water)
- แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ (70% ethyl alcohol) และแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (95% ethyl alcohol)

3.1.3 อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ

- เครื่องชั่ง (balance)
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)
- หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
- เตาอบไมโครเวฟ (microwave)
- เครื่องเขย่า (shaker)
- เครื่องฉายรังสีแกมมา
- เครื่องวัดเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ (vernier calipers)
- กระบอกตวง (cylinder)
- กรวยกรอง (funnel)
- จานแก้ว (petro dish)
- ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture bottle)
- ช้อนตักสาร (spatula)
- อลูมิเนียมฟอยด์ (aluminium foil)
- ไมโครปิเปต (micropipette)
- ไมโครปิเปตทิป (micropipette tips)
- ปากคีบ (forcep)
- มีดผ่าตัด (scalpel)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์ (burner)
- ไฟแช็ค (lighter)
- กระดาษทิชชู (tissue)
- พาราฟิลม์ (parafilm)
- คัตเตอร์ (cutter)
- ปากกาเคมี (permanent marker)

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 ศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำข้าวให้เกิดแคลลัส

นำเมล็ดข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง เล็บนกปัตตานี และสังข์หยดพัทลุงที่สมบูรณ์ มาแกะเปลือกออก ล้างด้วยน้ำสะอาดเพื่อขจัดสิ่งสกปรกออก และล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที นำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสายละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เขย่าต่อเนื่องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที และนำมาผึ่งให้แห้งบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำเมล็ดข้าวที่ได้วางบนอาหารสูตร NB และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร แอลโพรลีน 1 กรัมต่อลิตร และไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีแสงควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส จะทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกภาพและวัดปริมาตรแคลลัสด้วยเครื่องวัดเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ทำการวัดในหน่วยลูกบาศก์มิลลิเมตร นำค่าที่คำนวณได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 24.0 พร้อมทั้งสังเกตการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสที่เกิดขึ้น

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส คำนวณได้จาก :} \quad \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{ปริมาตรเฉลี่ยของแคลลัส คำนวณได้จาก :} \quad \frac{\text{กว้าง} \times \text{ยาว} \times \text{สูงของแคลลัสที่เกิด}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เกิดแคลลัส}}$$

3.2.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นใหม่

นำแคลลัสของข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง เล็บนกปัตตานี และสังข์หยดพัทลุงจากการทดลองการศึกษาข้างต้น มาตัดแบ่งให้มีขนาดที่เท่ากันวางลงบนอาหารสูตร NB ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟทาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีแสงควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ วัดความสูงของต้นใหม่ที่เกิดจากแคลลัสด้วยเครื่องวัดเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ สังเกตลักษณะและนับจำนวนแคลลัสที่เกิดการเปลี่ยนแปลง

3.2.3 การศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวแต่ละสายพันธุ์ภายใต้สภาวะแล้งจากสารประกอบ PEG

นำแคลลัสข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง สังข์หยดพัทลุง และเล็บนกปัตตานีอายุ 4 สัปดาห์ที่ได้จากการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าว จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร NB ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้น 0 20 40 60 และ 80 กรัมต่อลิตร 2,4-D ความเข้มข้นที่ชักนำให้เกิดแคลลัสดีที่สุด แอลโพรลีน 1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีแสงควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกภาพ จากนั้นทำการหาอัตราการรอดชีวิตของแคลลัส สังเกตการเปลี่ยนแปลงของแคลลัส และบันทึกผล

$$\text{อัตราการรอดชีวิตของแคลลัส คำนวณได้จาก :} \quad \frac{\text{จำนวนแคลลัสที่รอดชีวิต}}{\text{จำนวนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100$$

3.2.4 การศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสข้าวแต่ละสายพันธุ์ภายใต้สภาวะแล้งจากสารประกอบ PEG

นำแคลลัสข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง เล็บนกปัตตานี และสังข์หยดพัทลุงอายุ 4 สัปดาห์มาฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณต่างๆคือ 2 4 6 8 และ 10 กิโลแรด โดยใช้เครื่องฉายรังสีแกมมาที่ศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยีมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จากนั้นนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NB น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร แอลโพรลีน 1 กรัมต่อลิตร และไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีแสงควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองโดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสที่เกิดขึ้น และหา LD_{50} จากอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสข้าวที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา จากนั้นนำแคลลัสของข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุง และเล็บนกปัตตานี อายุ 4 สัปดาห์ที่มีลักษณะเกาะกลุ่มกันแน่นมีสีเหลือง มาตัดแบ่งให้มีขนาดที่เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน ไปวางลงเพลทที่มีอาหารสูตร NB ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต นำเพลทที่เตรียมไว้ทำการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน ตามปริมาณรังสีที่ตามค่า LD_{50} ของข้าวแต่ละสายพันธุ์ที่ศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยีมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นำแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีแล้วมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร NB ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้น 0 20 40 60 และ 80กรัมต่อลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีแสงควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกภาพ หาอัตราการรอดชีวิตของแคลลัส สังเกตการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสที่เกิดขึ้น บันทึกผลและนำไปเปรียบเทียบกับผลการทดลองการศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวแต่ละสายพันธุ์ภายใต้สภาวะแล้งจากสารประกอบ PEG

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าว 3 สายพันธุ์

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง เล็บนกปัตตานี และสังข์หยดพัทลุง ในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS และ NB ที่มีสารประกอบควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ แอลโพรลีนที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในสภาวะที่ไม่มีแสงและควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งอาหาร ทั้ง 2 สูตรนั้นสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยที่อาหารสูตร NB มีอัตราการเจริญของแคลลัสดีกว่าอาหารสูตร MS สอดคล้องกับงานวิจัย ของรัญญิการ์ (2559) ทำการชักนำข้าวให้เกิดเป็นแคลลัสจากสายพันธุ์ น้ำรู ขาวโป่งไคร้ เจ้าฮ่อ และขาวดอกมะลิ 105 ในอาหารสูตร MS และ NB ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลที่ได้อาหาร NB ส่งผลการเจริญเป็นแคลลัสดีกว่าอาหาร MS ซึ่งการใส่สารควบคุมการเจริญ 2,4-D นั้นส่งผลให้เกิดการชักนำแคลลัสมากขึ้นสอดคล้องกับงานวิจัย Raina (1989) ที่ระบุว่า สารควบคุมการเจริญ 2,4-D เป็นสารในกลุ่มออกซิน ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจากข้าว ซึ่งความเข้มข้นของ 2,4-D มีความเหมาะสมต่อ การชักนำให้เกิดแคลลัสนั้นขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนและจีโนไทป์ที่แตกต่างกันของพืชด้วย Din และคณะ (2016) มีการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสจากข้าวสายพันธุ์ Panderas บนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งผลที่ได้สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสดีที่สุด 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งลักษณะแคลลัสนั้นเป็นแบบเกาะแน่น (compact callus) ทรงกลม และมีสีเหลืองอ่อน สอดคล้องเช่นเดียวกับงานวิจัยของ จารุวรรณ และคณะ (2547) ในการเพาะเลี้ยงข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 และขาวตาแห้ง 1 เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เติมสาร 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และแอลโพลีนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลที่ได้นั้นแคลลัสสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีที่สุด 0.0909 กรัมต่อเมล็ดใน 3 สัปดาห์ เช่นเดียวกับงานวิจัยของภพเก้า (2013) ที่ศึกษาการชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวสายพันธุ์หอมมะลิ 105 และข้าวเหนียว กข 6 ผลที่ได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

พบว่าสูตรอาหาร NB ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสดีที่สุด สูงถึง 85.71% เช่นเดียวกับงานวิจัยของยงศักดิ์ และอัญชลี (2015) ในการศึกษาผลของ 2,4-D และ ไคเนติน ที่ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าว พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และปทุมธานี1 โดยผลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารดัดแปลงสูตร MS และ NB เมื่อเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่างๆ พบว่าข้าวแต่ละพันธุ์มีการตอบสนองต่อสารควบคุมการ เจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือข้าวสายพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ NB ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไคเนติน ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุดสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส 100 และ 80.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แคลลัสมีลักษณะจับกลุ่มเป็นก้อนแน่น (compact callus) จากรายงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าสูตรอาหาร ส่วนประกอบในอาหารเพาะเลี้ยงมีความคล้ายคลึงกับการศึกษางานในครั้งนี้ เพื่อศึกษา หาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส ของข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ ข้าวสายพันธุ์ เฉี้ยงพัทลุง เล็บนกปัตตานี และสังข์หยดพัทลุง

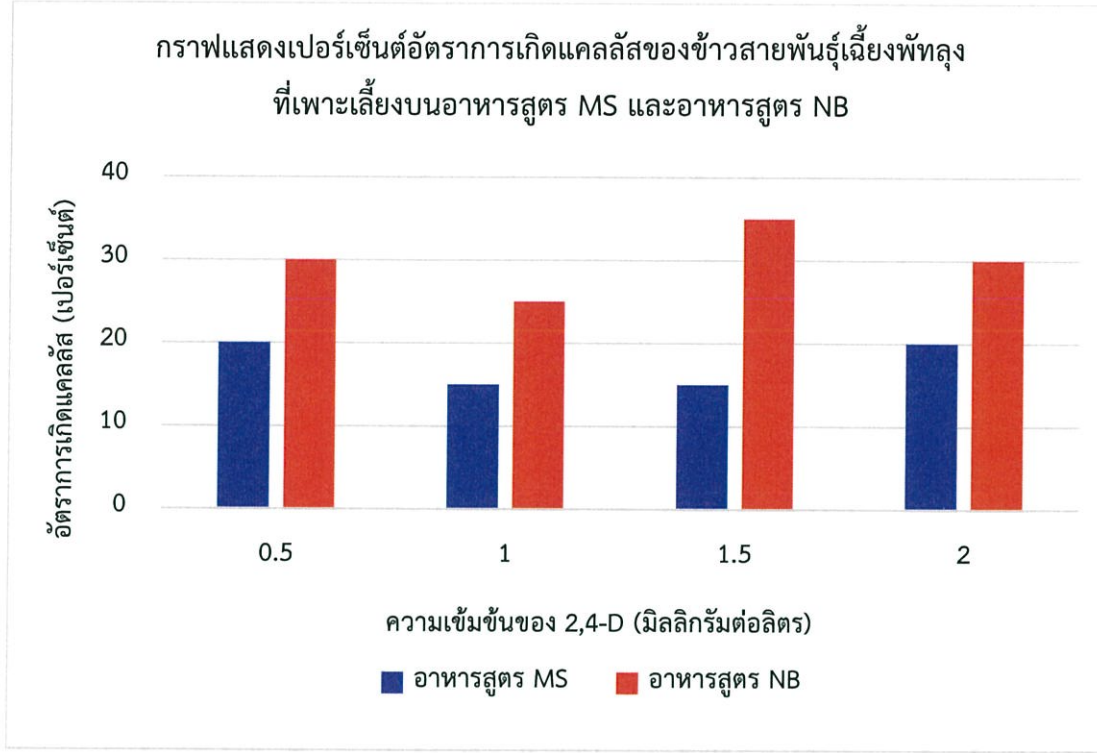
4.1.1 ข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง

จากการศึกษาการเกิดแคลลัสจากเมล็ดสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นเป็นรูปแบบของ compact callus มีสีเหลืองปนน้ำตาล และมีชิ้นส่วนลักษณะคล้ายต้นและยอดเกิดขึ้นเล็กน้อย โดยบนอาหารสูตร NB ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสสูงถึง 35 เปอร์เซ็นต์ ให้ขนาดแคลลัสเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 313.91 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ในขณะที่อาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้นเดียวกันให้อัตราการเกิดแคลลัสที่ 15 เปอร์เซ็นต์ และมีขนาดพื้นที่เฉลี่ย 226.71 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.1) (รูปที่ 4.1)

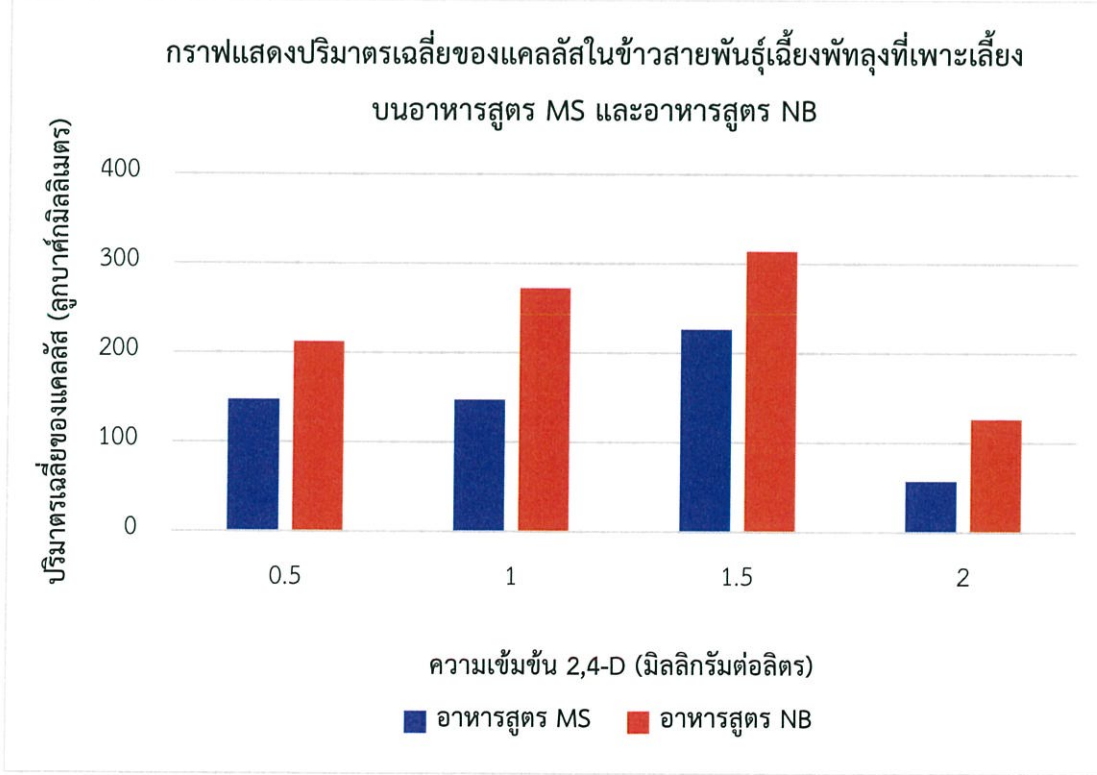
ตารางที่ 4.1 ตารางเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์อัตราการเกิดแคลลัสและปริมาตรแคลลัสเฉลี่ยของข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุงบนอาหารสูตร NB และ MS ที่ประกอบไปด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนเมล็ด (เมล็ด)	อัตราการเกิดแคลลัส (เมล็ด) (เปอร์เซ็นต์) บนอาหาร NB	ปริมาตรแคลลัสเฉลี่ยบนอาหารสูตร NB (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)	อัตราการเกิดแคลลัส (เมล็ด) (เปอร์เซ็นต์) บนอาหาร MS	ปริมาตรแคลลัสเฉลี่ยบนอาหารสูตร MS (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)
0.5	60	18 (30.00)	212.04[c]	12 (20.12)	147.42[b]
1.0	60	15 (25.00)	272.10[b]	9 (15.00)	147.41[b]
1.5	60	21 (35.00)	313.91[a]	9 (15.00)	226.71[a]
2.0	60	18 (30.00)	126.08[d]	12 (20.00)	57.30[c]

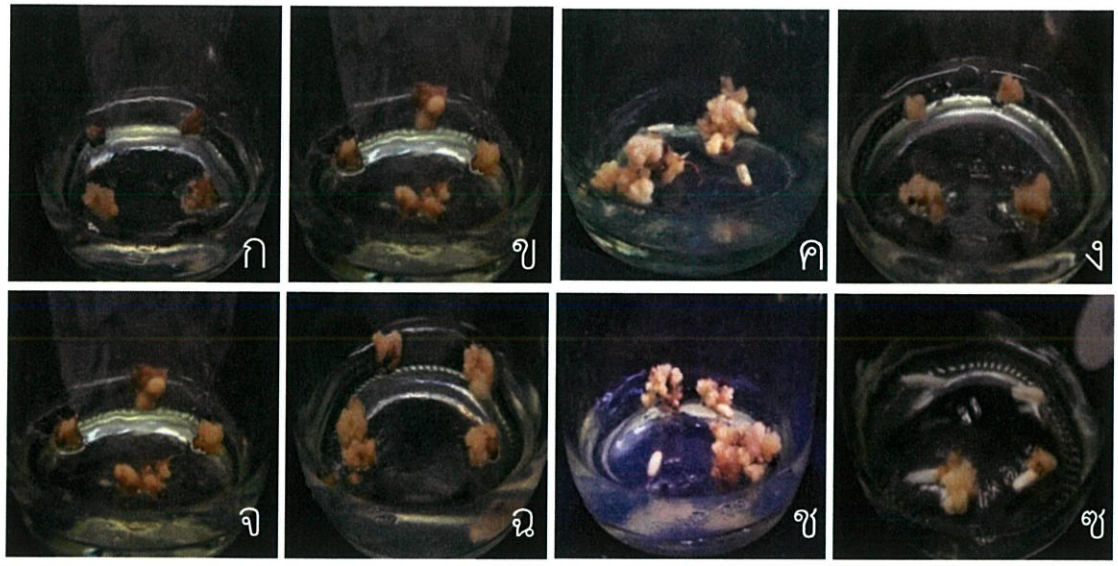
หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่ามีค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์อัตราการเกิดแคลลัสของข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และอาหารสูตร NB



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงปริมาตรเฉลี่ยของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และอาหารสูตร NB



รูปที่ 4.3 ลักษณะแคลลัสของข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NB (ก-ง) และอาหารสูตรMS (จ-ซ) ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

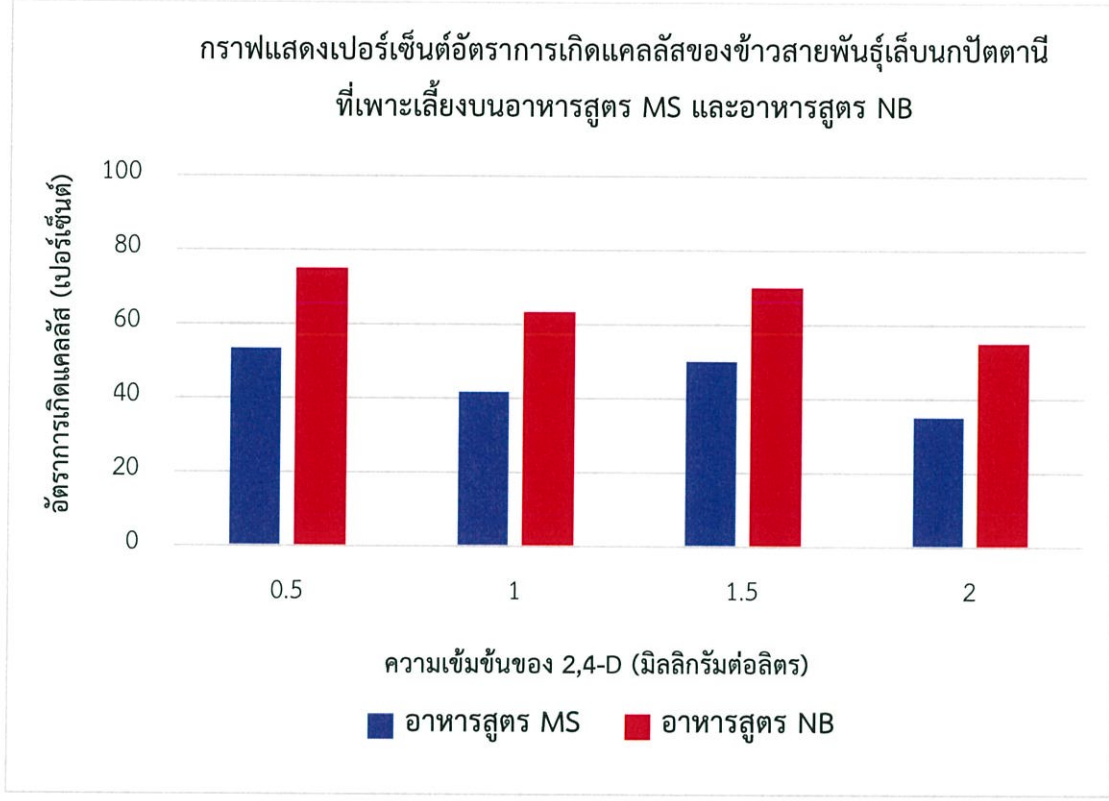
4.1.2 ข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี

จากการศึกษาการเกิดแคลลัสจากเมล็ดข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นเกาะเป็นกลุ่มก้อน มีสีเหลืองปนน้ำตาล และมีชิ้นส่วนลักษณะคล้ายต้นเกิดขึ้นเล็กน้อย โดยจากตารางที่ 4.2 บนอาหารสูตร NB ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสสูงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ และ ให้ขนาดแคลลัสเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 367.96 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ในขณะที่อาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้นที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งให้อัตราการเกิดแคลลัสสูงที่สุดอยู่ที่ 53.33 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดพื้นที่เฉลี่ย 126.57 ลูกบาศก์มิลลิเมตร และในอาหารทั้งสูตร MS และ NB ที่ความเข้มข้นของ 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรให้อัตราการเกิดแคลลัสเฉลี่ยได้น้อยที่สุดคือ 35 และ 55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยพิจารณาได้จากรูปการณ์เปรียบเทียบของทั้งสองอาหาร (รูปที่ 4.4) (รูปที่ 4.5)

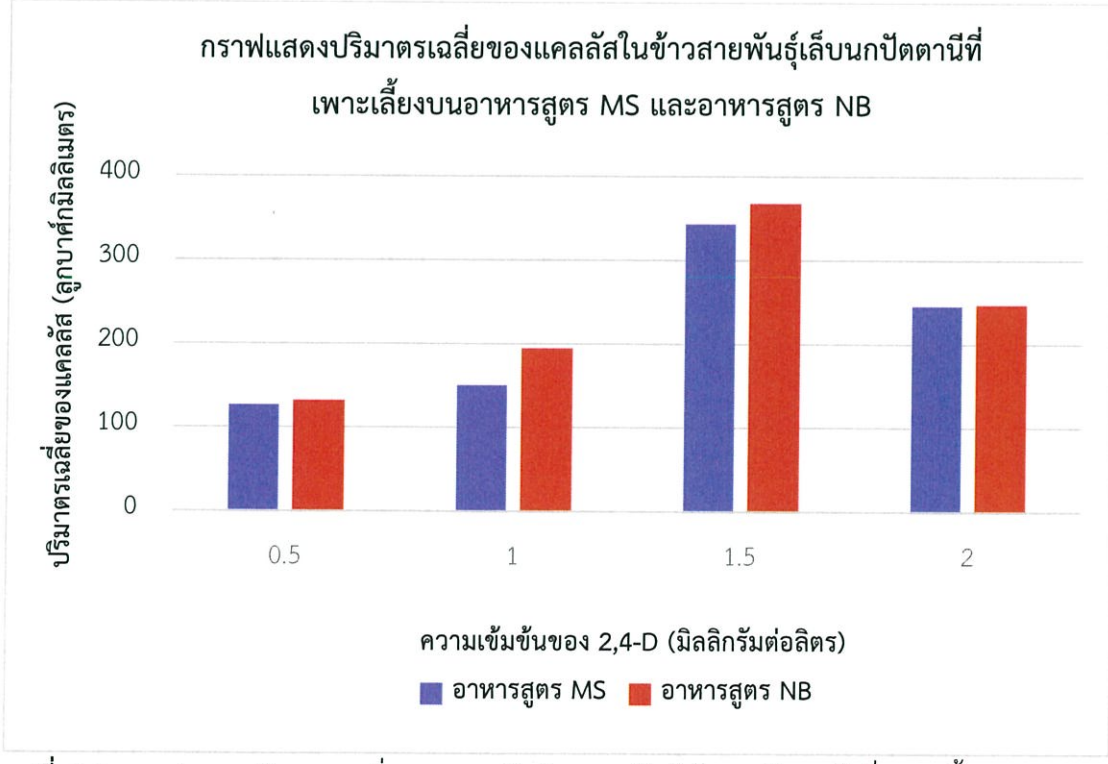
ตารางที่ 4.2 ตารางเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์อัตราการเกิดแคลลัสและปริมาตรแคลลัสเฉลี่ยของข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีบนอาหารสูตร NB และ MS ที่ประกอบไปด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนเมล็ด (เมล็ด)	อัตราการเกิดแคลลัส (เมล็ด) (เปอร์เซ็นต์) บนอาหาร NB	ปริมาตรแคลลัสเฉลี่ยบนอาหารสูตร NB (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)	อัตราการเกิดแคลลัส (เมล็ด) (เปอร์เซ็นต์) บนอาหาร MS	ปริมาตรแคลลัสเฉลี่ยบนอาหารสูตร MS (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)
0.5	60	45 (75.00)	131.83^{d}	32 (53.33)	126.57^{d}
1.0	60	38 (63.33)	194.36^{c}	25 (41.67)	150.20^{c}
1.5	60	42 (70.00)	367.96^{a}	30 (50.00)	343.33^{a}
2.0	60	33 (55.00)	247.07^{b}	21 (35.00)	245.63^{b}

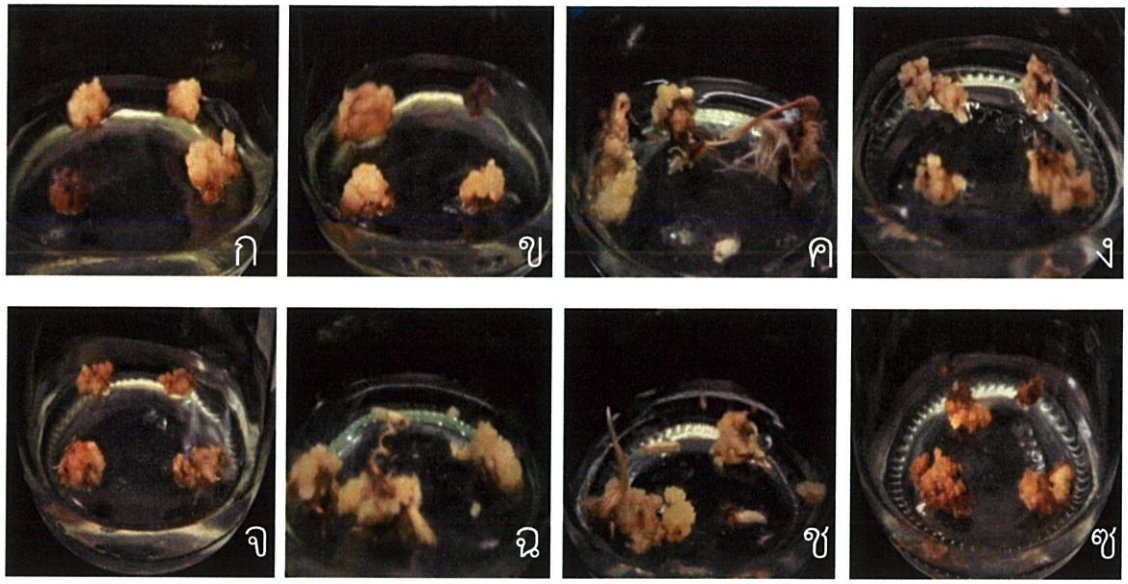
หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่ามีค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์อัตราการเกิดแคลลัสของข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และอาหารสูตร NB



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงปริมาตรเฉลี่ยของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และอาหารสูตร NB



รูปที่ 4.6 ลักษณะแคลลัสของข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NB (ก-ง) และอาหารสูตร MS (จ-ซ) ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

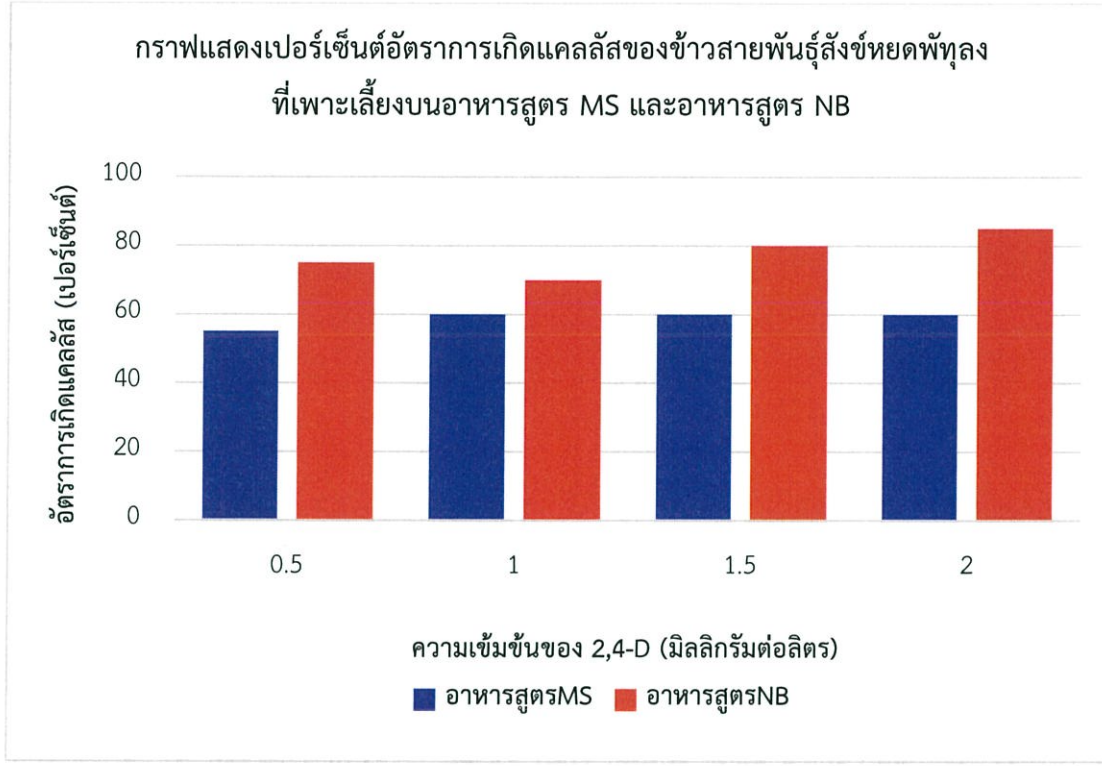
4.1.3 ข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุง

เจริญเป็นแคลลัสได้ทั้งในอาหารสูตร MS และอาหารสูตร NB เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ลักษณะของแคลลัสที่ได้มีลักษณะเกาะแน่น สีเหลืองอ่อน และสีเหลืองเข้ม มีเส้นสายของรากและยอดอ่อนเจริญขึ้น นอกจากนี้พบว่าขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่ใหญ่ที่สุดเท่ากับ 356.2 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NB ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าผลที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีขนาดพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัส 274.76 ลูกบาศก์มิลลิเมตร จากการเพาะเลี้ยงทั้งอาหารสูตร MS และ อาหารสูตร NB ผลที่ได้คือแคลลัสมีเปอร์เซ็นต์การเจริญบนอาหาร NB มากกว่า บนอาหารสูตร MS โดยสังเกตได้ว่า 2,4-D ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารสูตร NB สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสสูงถึง 85 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อาหารสูตร MS มีเพียง 60 เปอร์เซ็นต์ บนความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เท่ากัน (ตารางที่ 4.3)

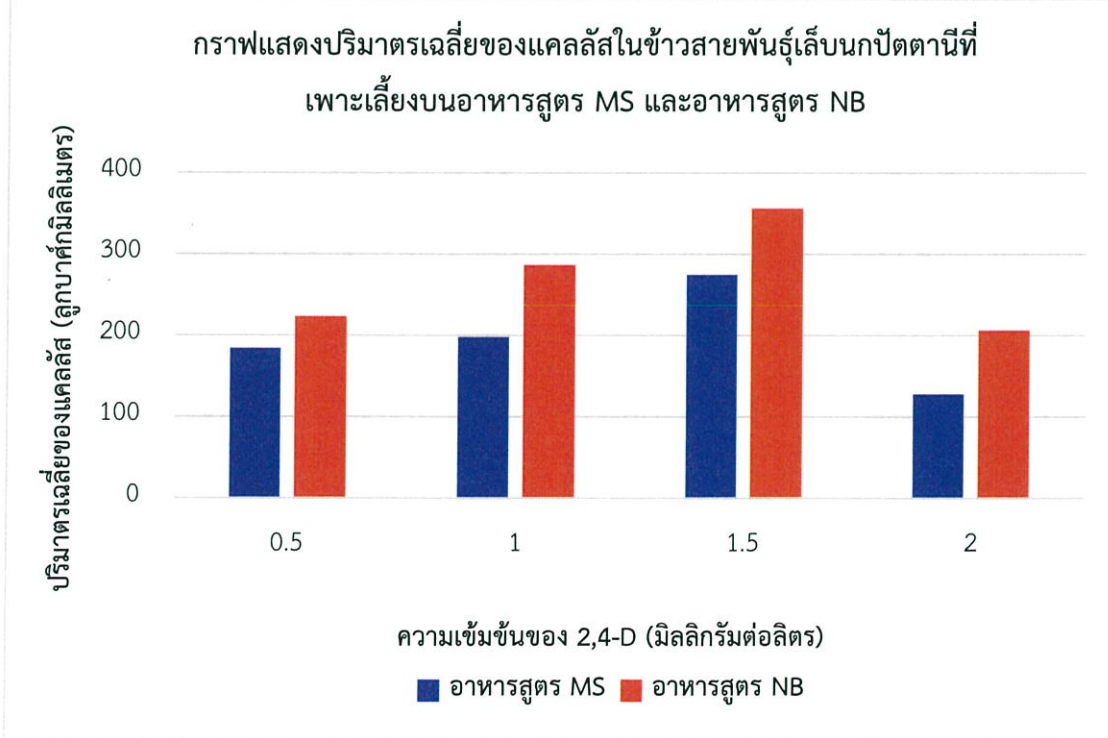
ตารางที่ 4.3 ตารางเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์อัตราการเกิดแคลลัสและปริมาตรแคลลัสเฉลี่ยของข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงบนอาหารสูตร NB และ MS ที่ประกอบไปด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนเมล็ด (เมล็ด)	อัตราการเกิดแคลลัส (เมล็ด) (เปอร์เซ็นต์) บนอาหาร NB	ปริมาตรแคลลัสเฉลี่ยบนอาหารสูตร NB (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)	อัตราการเกิดแคลลัส (เมล็ด) (เปอร์เซ็นต์) บนอาหาร MS	ปริมาตรแคลลัสเฉลี่ยบนอาหารสูตร MS (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)
0.5	60	45 (75.00)	223.43[c]	33 (55.00)	184.22[c]
1.0	60	42 (70.00)	286.47[b]	36 (60.00)	197.80[b]
1.5	60	48 (80.00)	356.20[a]	36 (60.00)	274.76[a]
2.0	60	51 (85.00)	206.48[d]	36 (60.00)	128.02[d]

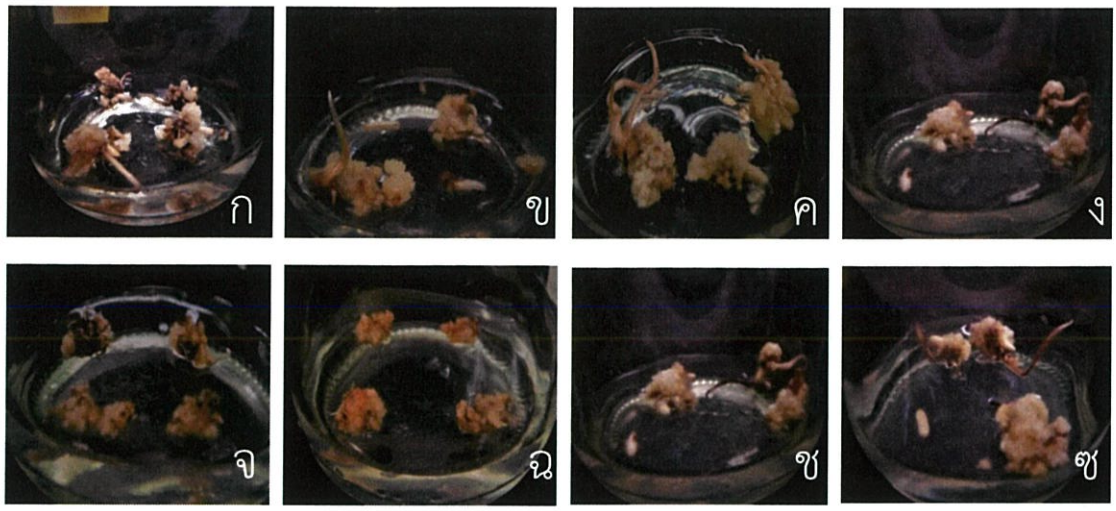
หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่ามีค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์อัตราการเกิดแคลลัสของข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และอาหารสูตร NB



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงปริมาตรเฉลี่ยของแคลลัสข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุง ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และอาหารสูตร NB



รูปที่ 4.9 ลักษณะแคลลัสของข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร NB (ก-ง) และ MS (จ-ซ) ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 0.5 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

4.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นใหม่

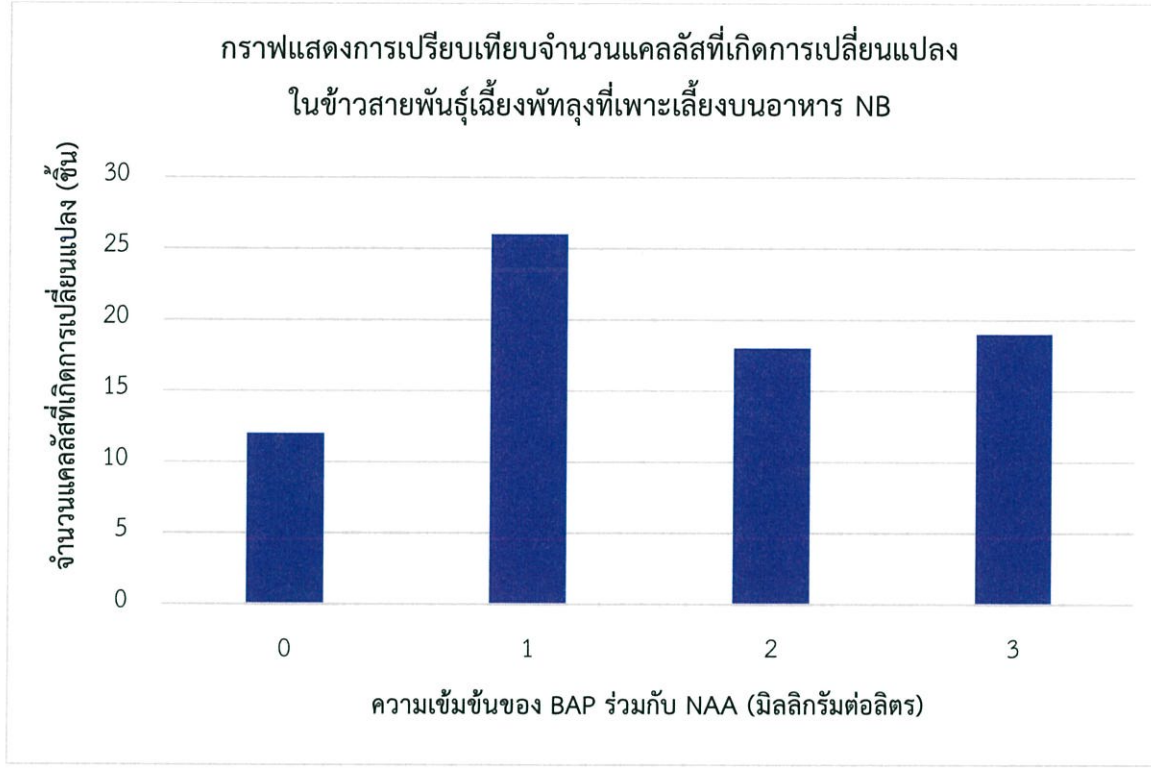
4.2.1 ข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง

นำแคลลัสของข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุงที่ได้จากการศึกษาในหัวข้อจากการทดลองการศึกษาการสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำข้าวให้เกิดแคลลัส โดยคัดเลือกแคลลัสที่มีลักษณะเป็น compact callus สีเหลือง มาตัดแบ่งให้มีขนาดประมาณ 5 มิลลิเมตร วางลงบนอาหารสูตร NB ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 2 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้น เพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีแสง อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (ตารางที่ 4.4) พบว่าในอาหารสูตร NB ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสูงสุดเท่ากับ 26 ชิ้น (86.67 เปอร์เซ็นต์) (รูปที่ 4.10) โดยมีปริมาตรแคลลัสเฉลี่ยขึ้นสูงสุดเท่ากับ 98.31 ลูกบาศก์มิลลิเมตร และให้ความยาวเฉลี่ยของต้นข้าวสูงสุด 8.19 มิลลิเมตร เมื่อทำการวัดจากรากจนถึงปลายยอด

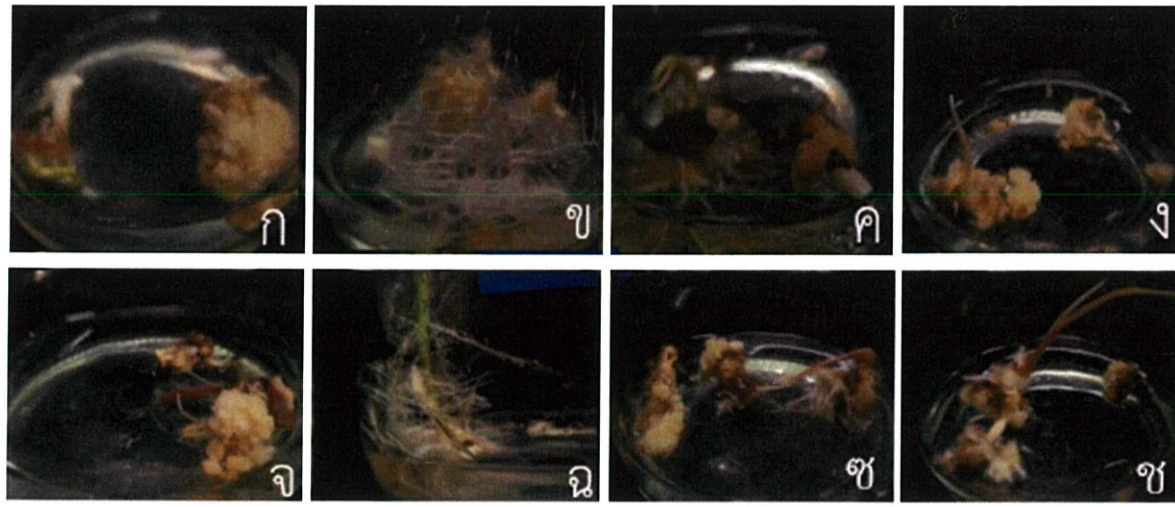
ตารางที่ 4.4 ผลการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นใหม่ของสายพันธุ์ข้าวเฉี้ยงพัทลุงบนสูตรอาหาร NB ที่ประกอบไปด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัม/ลิตร)		จำนวนแคลลัสทั้งหมด (ชิ้น)	จำนวนแคลลัสที่เกิดการเปลี่ยนแปลง (ชิ้น)	เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เกิดการเปลี่ยนแปลง	ปริมาตรแคลลัสเฉลี่ยเริ่มต้น (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)	ปริมาตรแคลลัสเฉลี่ยที่ 1 สัปดาห์ (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)	ผลต่างปริมาตรเฉลี่ยของแคลลัส (ลูกบาศ์กมิลลิเมตร)	ความยาวเฉลี่ยตลอดลำต้น (มิลลิเมตร)
BAP	NAA							
0	0	30	12	40	303.15[d]	327.63[d]	24.78[d]	5.11 [d]
1	1	30	26	86.67	361.01[a]	459.63[a]	98.31[a]	8.19 [a]
2	2	30	18	60	340.10[b]	404.61[b]	64.61[b]	7.22 [b]
3	3	30	19	63.33	313.48[c]	343.28[c]	29.63[c]	6.40 [c]

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่ามีค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.10 กราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนแคลลัสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุงที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร NB โดยประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะของแคลลัสที่มีความเปลี่ยนแปลงจากแคลลัสเริ่มต้น 0 (ก-ง) และหลังจากผ่านไป 1 สัปดาห์ (จ-ซ) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร NB ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่างๆ

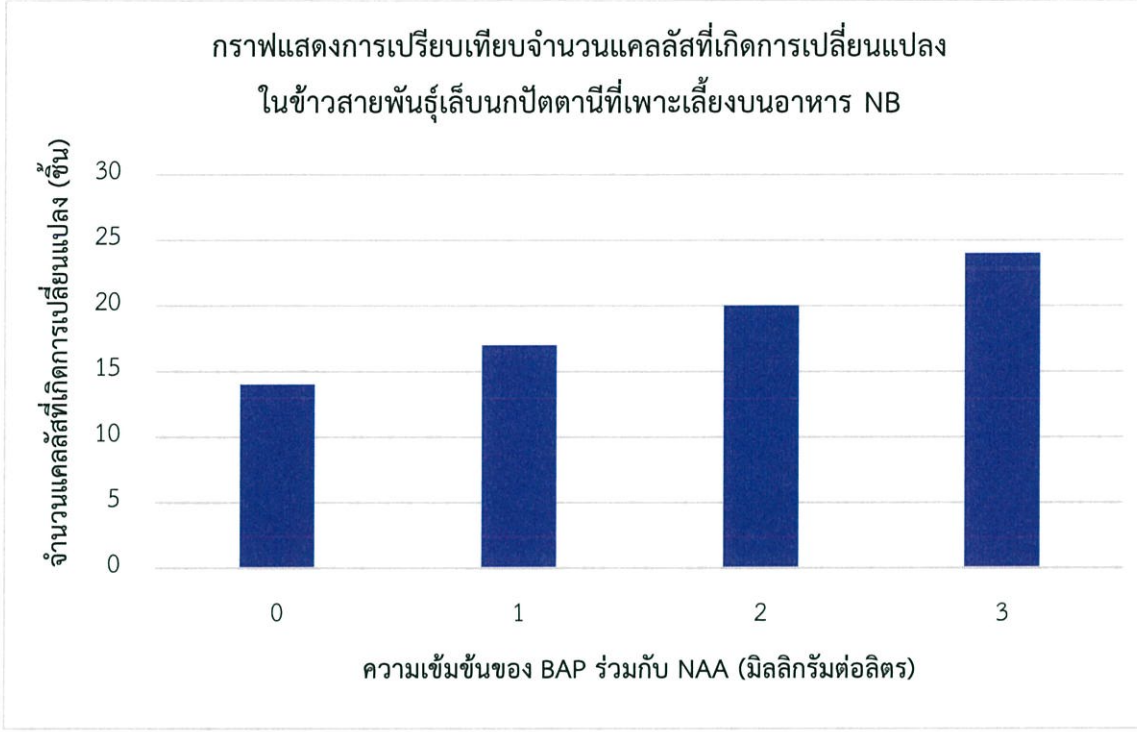
4.2.2 ข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี

นำแคลลัสของข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีที่ได้จากการศึกษาในหัวข้อจากการทดลองการศึกษาการสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำข้าวให้เกิดแคลลัส โดยคัดเลือกแคลลัสที่มีลักษณะเป็น compact callus สีเหลือง มาตัดแบ่งให้มีขนาดประมาณ 5 มิลลิเมตร วางลงบนอาหารสูตร NB ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 2 และ3 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 2 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้น เพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีแสง อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (ตารางที่ 4.5) พบว่าในอาหารสูตร NB ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสูงสุดเท่ากับ 24 ชิ้น (80.00 เปอร์เซ็นต์) โดยมีปริมาตรแคลลัสเฉลี่ยเกิดขึ้นสูงสุดเท่ากับ 152.33 ลูกบาศก์มิลลิเมตร และให้ความยาวเฉลี่ยของต้นข้าวสูงสุด 6.37 มิลลิเมตร เมื่อทำการวัดจากรากจนถึงปลายยอด (รูปที่ 4.12) ที่แสดงการเปรียบเทียบจำนวนแคลลัสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร NB จะพบได้ว่ายิ่งมีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตจะส่งให้ให้มีปริมาตรแคลลัส และการเปลี่ยนแปลงของข้าวจะเพิ่มมากขึ้น จึงคาดว่าต้องใช้เวลาเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษามากกว่านี้

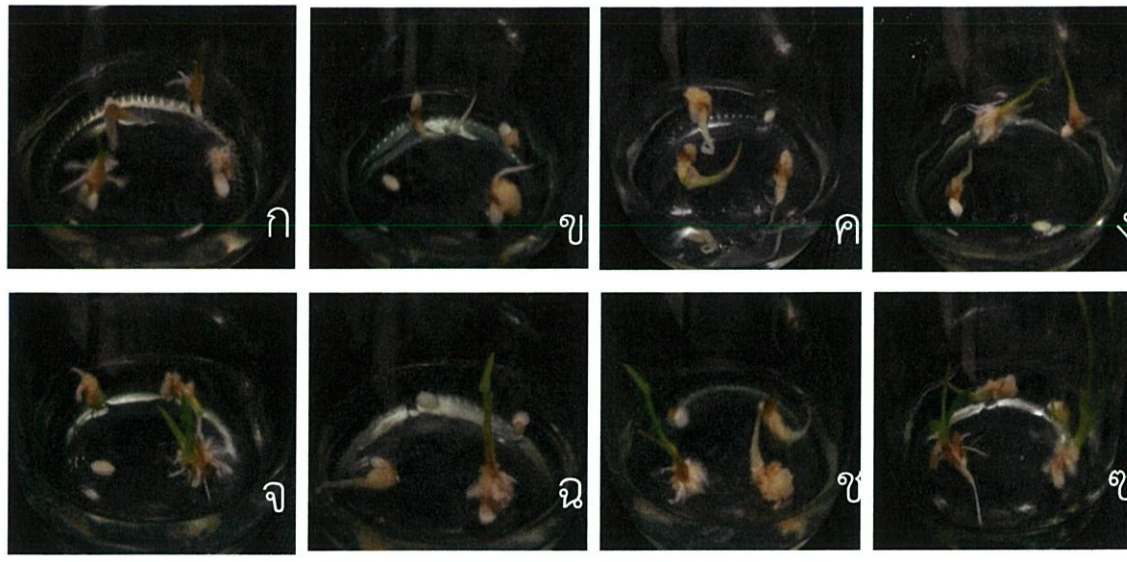
ตารางที่ 4.5 ผลการชักนำชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นใหม่ของสายพันธุ์ข้าวเล็บนกปัตตานีบนสูตรอาหาร NB ที่ประกอบไปด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับNAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)		จำนวนแคลลัสทั้งหมด (ชิ้น)	จำนวนแคลลัสที่เกิดการเปลี่ยนแปลง (ชิ้น)	เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เกิดการเปลี่ยนแปลง	ปริมาตรเฉลี่ยของแคลลัสเริ่มต้น (ลูกบาศ์กมิลลิเมตร)	ปริมาตรเฉลี่ยของแคลลัสที่ 1สัปดาห์ (ลูกบาศ์กมิลลิเมตร)	ผลต่างปริมาตรเฉลี่ยของแคลลัส (ลูกบาศ์กมิลลิเมตร)	ความยาวเฉลี่ยตลอดลำต้น (มิลลิเมตร)
BAP	NAA							
0	0	30	14	46.67	101.30^{d}	106.70^{d}	5.50^{d}	4.57 ^{d}
1	1	30	17	56.67	126.12^{c}	144.85^{c}	18.71^{c}	5.09 ^{c}
2	2	30	20	66.67	171.61^{b}	252.62^{b}	81.00^{b}	5.76 ^{b}
3	3	30	24	80.00	221.42^{a}	374.47^{a}	152.33^{a}	6.37 ^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่ามีค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.12 กราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนแคลลัสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร NB โดยประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.13 แสดงลักษณะของแคลลัสที่มีความเปลี่ยนแปลงจากแคลลัสเริ่มต้น (ก-ง) และหลังจากผ่านไป 1 สัปดาห์ (จ-ซ) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร NB ที่ปประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นต่างๆ

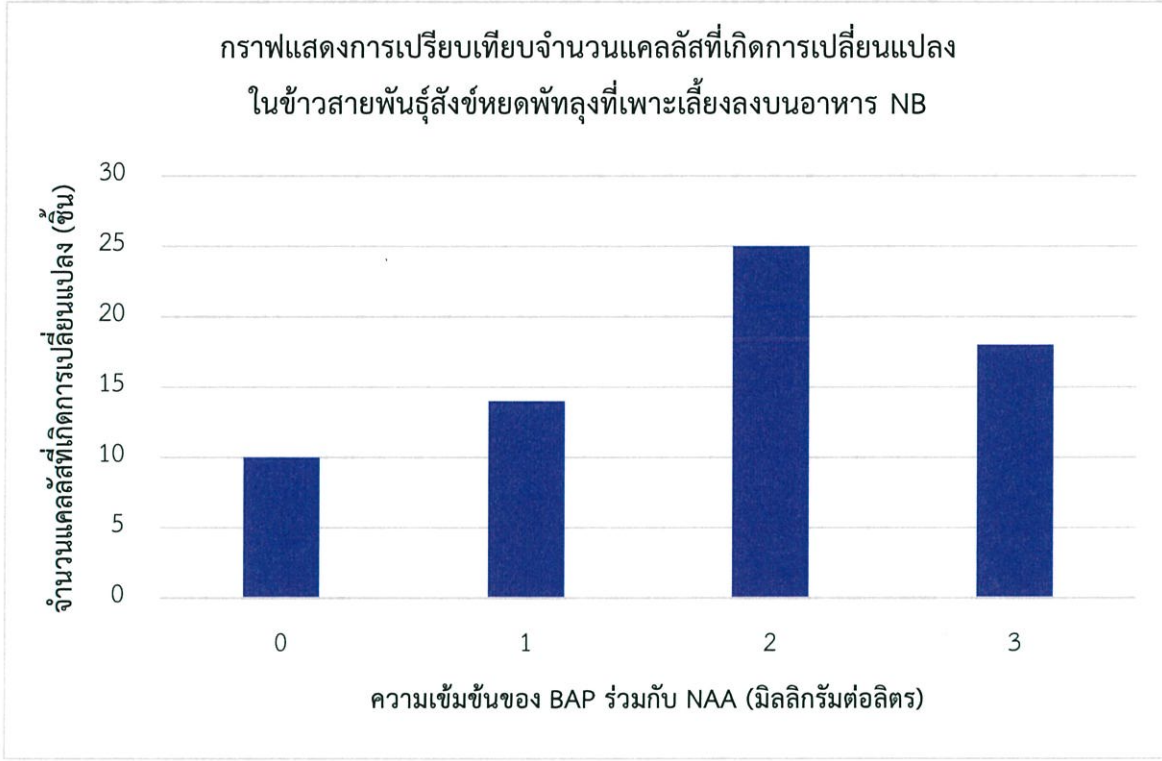
4.2.3 ข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุง

นำแคลลัสของข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงที่ได้จากการศึกษาในหัวข้อจากการทดลองการศึกษาการสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำข้าวให้เกิดแคลลัส โดยคัดเลือกแคลลัสที่มีลักษณะเป็น compact callus สีเหลือง มาตัดแบ่งให้มีขนาดประมาณ 5 มิลลิเมตร วางลงบนอาหารสูตร NB ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 2 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้น เพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีแสง อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (ตารางที่ 4.6) พบว่าในอาหารสูตร NB ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสูงสุดเท่ากับ 23 ชิ้น (76.67 เปอร์เซ็นต์) โดยมีปริมาตรแคลลัสเฉลี่ยเกิดขึ้นสูงสุดเท่ากับ 87.27 ลูกบาศก์มิลลิเมตร และให้ความยาวเฉลี่ยของต้นข้าวสูงสุด 6.03 มิลลิเมตร เมื่อทำการวัดจากรากจนถึงปลายยอด ลักษณะของ ลำต้นที่ได้เป็นสีเขียวเข้ม เกิดรากเล็กน้อย มีการแตกหน่อเพิ่มขึ้น และมีแนวโน้มจะเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอีกในการศึกษาเพื่อที่สามารถพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสให้เข้าใจได้มากขึ้นสังเกต จากรูปที่ 4.14 ที่แสดงการเปรียบเทียบจำนวนแคลลัสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในข้าวสายพันธุ์สังข์หยัดพัทลุงที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร NB และสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับNAA ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของแคลลัสรองลงมาคือ 60 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาตรแตกต่างเฉลี่ยอยู่ที่ 48.02 ลูกบาศ์กมิลลิเมตร เมื่อทำการเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับ NAA ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงแคลลัสอยู่ที่ 10 ชิ้น จากตัวอย่างจำนวนซ้ำ 30 ชิ้น คิดเป็น 33.33 เปอร์เซ็นต์

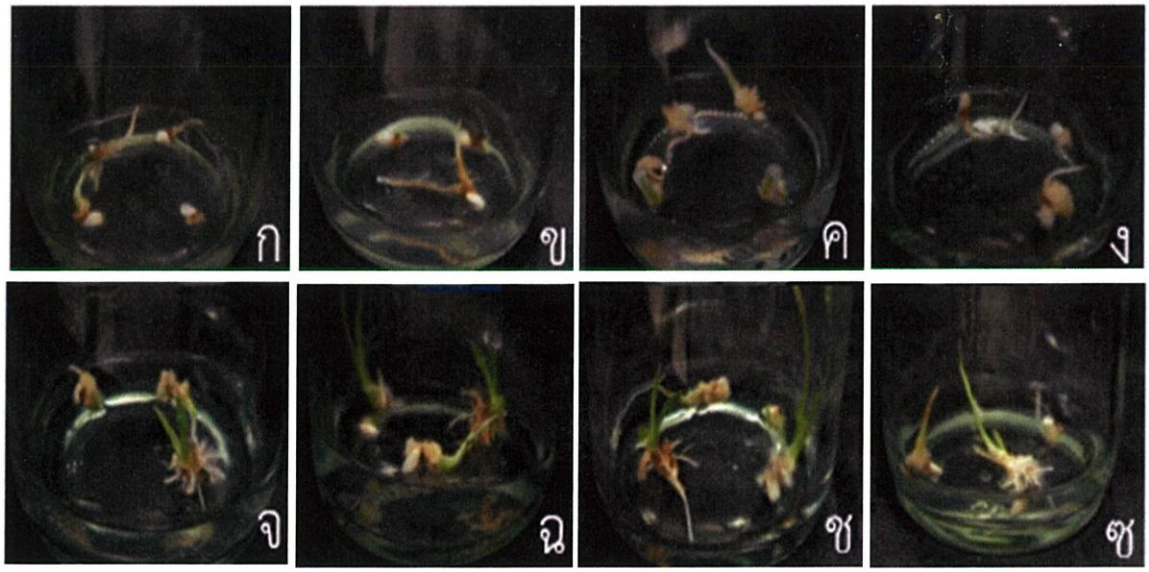
ตารางที่ 4.6 ผลการชักนำชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นใหม่ของสายพันธุ์ข้าวสังข์หยดพัทลุงบนสูตรอาหาร NB ที่ประกอบไปด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับNAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)		จำนวนแคลลัสทั้งหมด (ชิ้น)	จำนวนแคลลัสที่เกิดการเปลี่ยนแปลง (ชิ้น)	เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เกิดการเปลี่ยนแปลง	ปริมาตรเฉลี่ยของแคลลัสเริ่มต้น (ลูกบาศ์กมิลลิเมตร)	ปริมาตรเฉลี่ยของแคลลัสที่ 1สัปดาห์ (ลูกบาศ์กมิลลิเมตร)	ผลต่างปริมาตรเฉลี่ยของแคลลัส (ลูกบาศ์กมิลลิเมตร)	ความยาวเฉลี่ยตลอดลำต้น (มิลลิเมตร)
BAP	NAA							
0	0	30	10	33.33	108.48^{d}	115.70^{d}	7.39^{d}	4.46 ^{d}
1	1	30	14	46.67	152.47^{c}	175.09^{c}	22.60^{c}	5.02 ^{c}
2	2	30	23	76.67	197.97^{a}	286.01^{a}	87.27^{a}	6.03 ^{a}
3	3	30	18	60	165.40^{b}	213.40^{b}	48.02^{b}	5.49 ^{b}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่ามีค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.14 กราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนแคลลัสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร NB โดยประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.15 แสดงลักษณะของแคลลัสที่มีความเปลี่ยนแปลงจากแคลลัสเริ่มต้น (ก-ง) และหลังจากผ่านไป 1 สัปดาห์ (จ-ซ) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร NB ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ร่วมกับ NAAความเข้มข้นต่างๆ

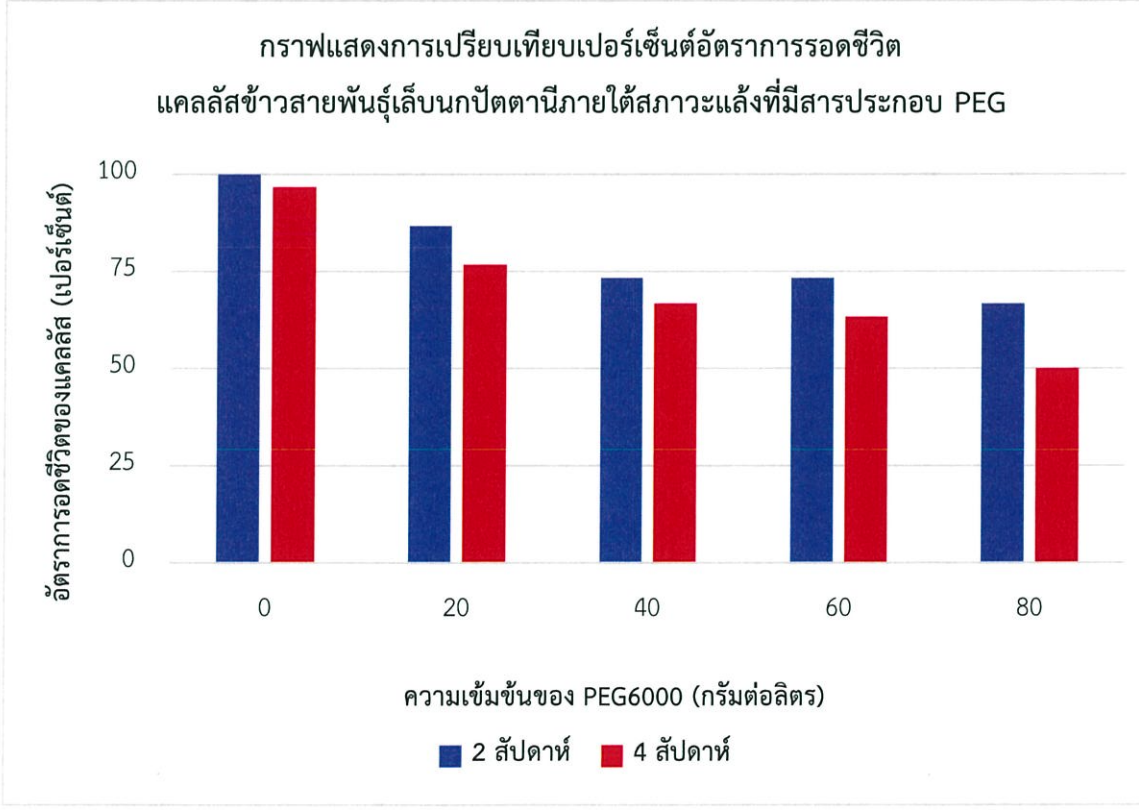
4.3 ผลการศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวแต่ละสายพันธุ์ภายใต้สภาวะแล้งจากสารประกอบ PEG6000

4.3.1 ข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี

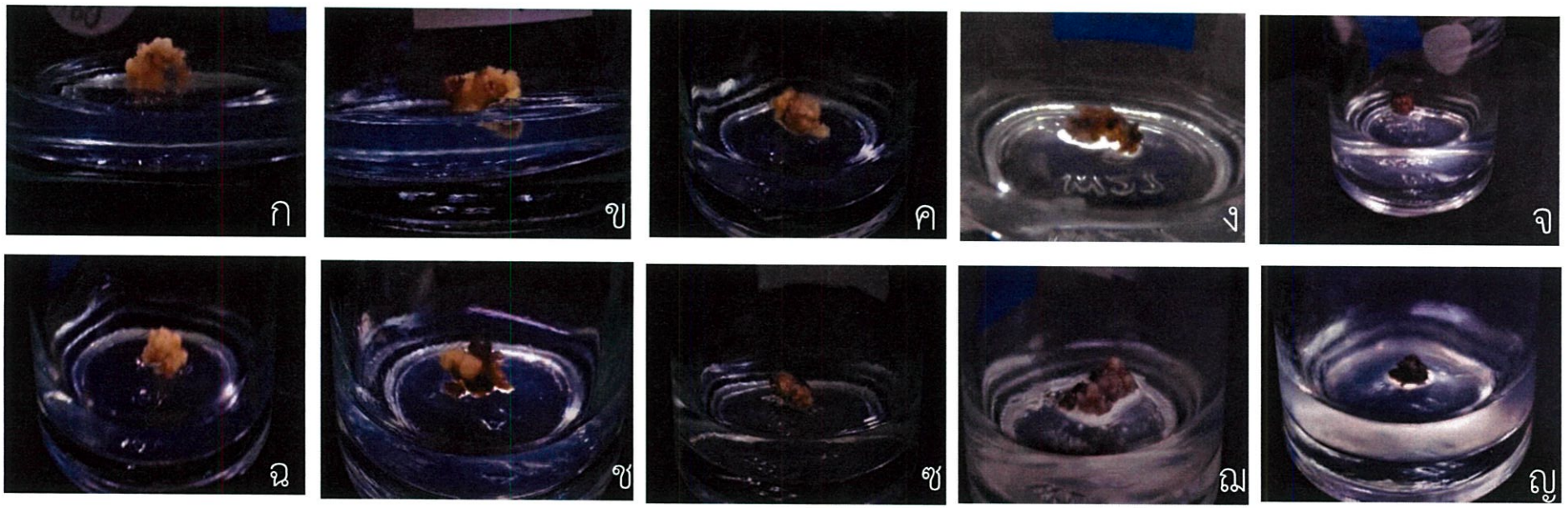
นำแคลลัสข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีอายุ 4 สัปดาห์ ที่ได้จากการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าว ในอาหารสูตร NB ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D BAP ร่วมกับNAA ในความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร NB ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้น 0 20 40 60 และ80 กรัมต่อลิตร โดยแบ่งออกเป็น 2 ตัวอย่าง ในแต่ละตัวอย่างจะมีจำนวนแคลลัสอยู่ 15 ชิ้น นำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีแสงควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากตารางที่ 4.12 จะพบว่าที่ความเข้มข้นของ PEG ที่ 0 กรัมต่อลิตรนั้นเปอร์เซ็นต์แคลลัสรอดชีวิตอยู่ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ใน 2 สัปดาห์ และ96.67 เปอร์เซ็นต์ ใน 4 สัปดาห์ แคลลัสไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อนำมาเปรียบเทียบในความเข้มข้นของ PEG ที่สูงขึ้น ในความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตรมีจำนวนแคลลัสที่รอดชีวิตน้อยที่สุดเท่ากับ 20 ชิ้น คิดเป็น 66.67 เปอร์เซ็นต์ใน 2 สัปดาห์ ความเข้มข้นของ PEG ที่จำนวนแคลลัสของข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีรอดชีวิตสูงที่สุดคือ 20 กรัมต่อลิตร มีจำนวนรอดชีวิตคือ 24 ชิ้นจาก 30 ชิ้น หรือเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ใน 2 สัปดาห์ ในรูปที่ 4.16 เป็นกราฟแสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตแคลลัสข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีภายใต้สภาวะแล้งที่มีสารประกอบ PEG จะพบว่าจำนวนการรอดชีวิตของแคลลัสข้าวนั้นลดลงไปอีกอย่างเห็นได้ชัดในสัปดาห์ที่ 4 และในความเข้มข้นที่ 80 กรัมต่อลิตร แคลลัสมีจำนวนการรอดชีวิตน้อยที่สุดกับ 12 ชิ้นหรือ 40 เปอร์เซ็นต์ต่ำกว่าครึ่งของจำนวนตัวอย่างซ้ำของแคลลัส

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์แคลลัสของข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีที่รอดชีวิตบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร NB ที่ประกอบด้วย PEG6000 ในความเข้มข้นต่างๆเป็นระยะเวลา 2 และ4 สัปดาห์

ความเข้มข้น PEG6000 (กรัมต่อลิตร)	จำนวนแคลลัส (ชิ้น)	อัตราการรอดชีวิตของแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)	
		2 สัปดาห์	4 สัปดาห์
0	30	30 (100.00)	29 (96.67)
20	30	24 (80.00)	20 (66.67)
40	30	22 (73.33)	18 (60.00)
60	30	21 (70.00)	14 (46.67)
80	30	20 (66.67)	12 (40.00)



รูปที่ 4.16 กราฟแสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีภายใต้สภาวะแล้งที่มีสารประกอบ PEG6000



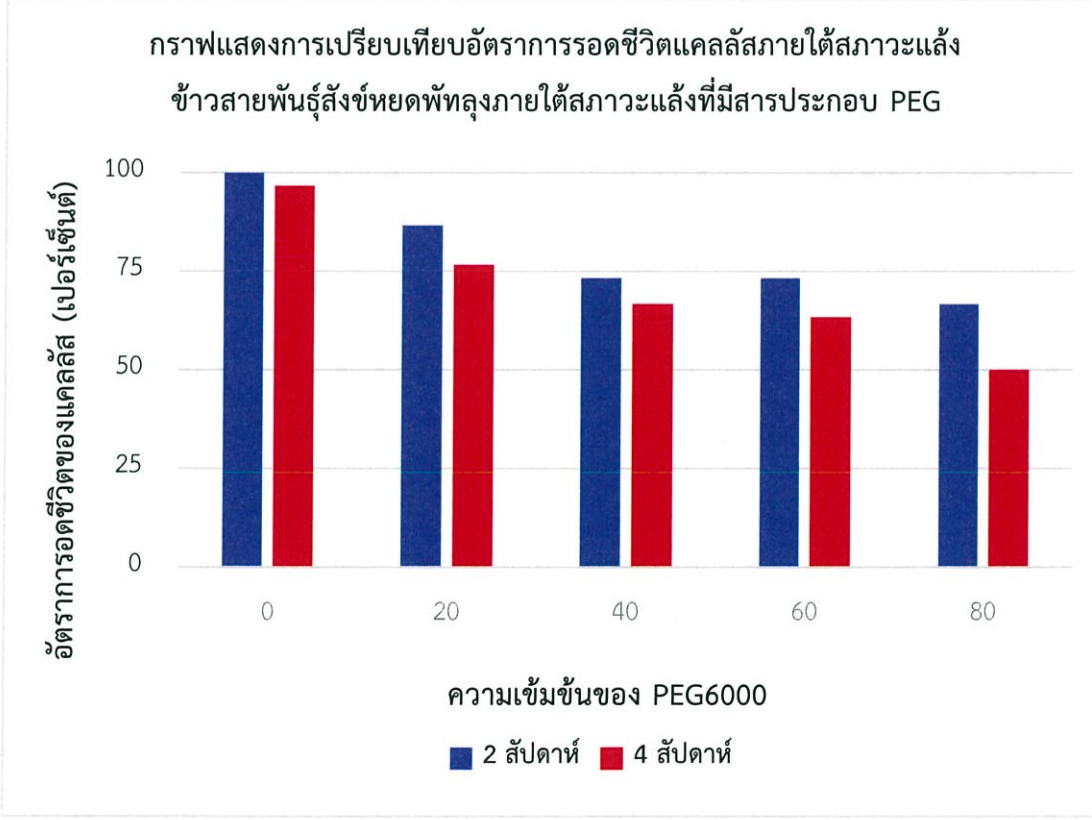
รูปที่ 4.17 แสดงลักษณะสีของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี เพาะเลี้ยงบนอาหาร NB ที่มี สารประกอบ PEG ความเข้มข้น 0 20 40 60 และ 80 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ก-จ) และ 4 สัปดาห์ (ช-ญ)

4.2.2 ข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุง

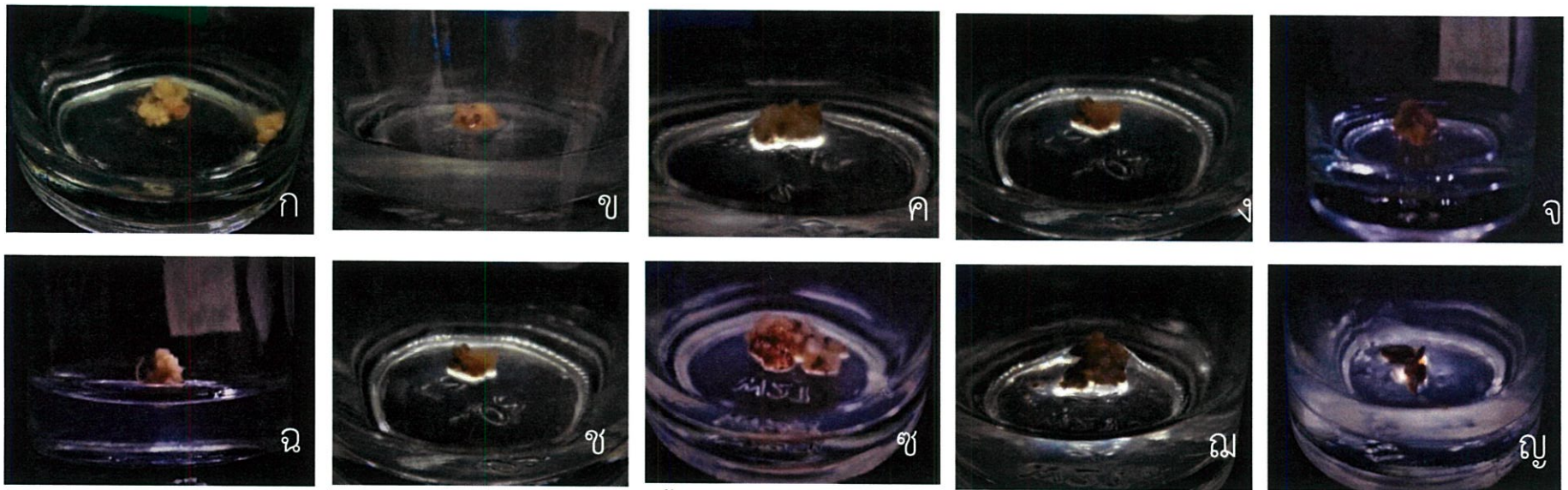
จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุง เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสภายใต้สภาวะแล้งด้วยอาหารสูตร NB ที่ประกอบด้วยสาร PEG6000 ในความเข้มข้นที่ 0 20 40 60 และ80 กรัมต่อลิตร นำแคลลัสแยกออกเป็น 2 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 15 ซ้ำ ตัดแบ่งให้มีขนาดที่เท่ากัน นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร NB ที่ประกอบด้วยสาร PEG6000 ในความเข้มข้นต่างๆ ที่สภาวะไม่มีแสง ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 และ4 สัปดาห์ จากตารางที่ 4.8 ที่แสดงผลเปรียบเทียบจำนวนแคลลัสของขาวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุง ในอาหารที่ประกอบด้วย PEG6000 จะพบว่ายิ่งความเข้มข้นของ PEG6000 ที่เพิ่มขึ้นและระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่นานขึ้นจะทำให้จำนวนแคลลัสที่รอดชีวิตนั้นลดลงโดยที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรมีจำนวนการรอดชีวิตมากที่สุดเท่ากับ 26 ชิ้นและ 23 ชิ้น ในระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ตามลำดับ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับตัวควบคุมที่มีความเข้มข้นของ PEG6000 เท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร จะพบว่าอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงอยู่ที่ 100 และ 96.67 เปอร์เซ็นต์ใน 2 และ 4 สัปดาห์ตามลำดับ จากรูปที่ 4.18 กราฟแสดงจำนวนการรอดชีวิตแคลลัสภายใต้สภาวะแล้งข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงภายใต้สภาวะแล้งที่มีสารประกอบ PEG จะสังเกตได้ว่าที่ความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร มีการรอดชีวิตน้อยที่สุดในทั้ง 2 และ 4 สัปดาห์ เท่ากับ 20 และ15 ชิ้น ตามลำดับซึ่งมีค่าเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแคลลัสที่ทำการทดลองทั้งหมด 30 ชิ้น

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการเปรียบเทียบจำนวนแคลลัสของข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงที่รอดชีวิตบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร NB ที่ประกอบด้วย PEG6000 ในความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 2 และ4 สัปดาห์

ความเข้มข้น PEG6000 (กรัมต่อลิตร)	จำนวนแคลลัส (ชิ้น)	อัตราการรอดชีวิตของแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)	
		2 สัปดาห์	4 สัปดาห์
0	30	30 (100.00)	29 (96.67)
20	30	26 (86.67)	23 (76.67)
40	30	22 (73.33)	20 (66.67)
60	30	22 (73.33)	19 (63.33)
80	30	20 (66.67)	15 (50.00)



รูปที่ 4.18 กราฟแสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงภายใต้สภาวะแล้งที่มีสารประกอบ PEG6000



รูปที่ 4.19 แสดงลักษณะสีของแคลลัสข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุง เพาะเลี้ยงบนอาหาร NB ที่มี สารประกอบ PEG ความเข้มข้น 0 20 40 60 และ 80 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ก-จ) และ 4 สัปดาห์ (ช-ญ)

4.4 การศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสข้าว

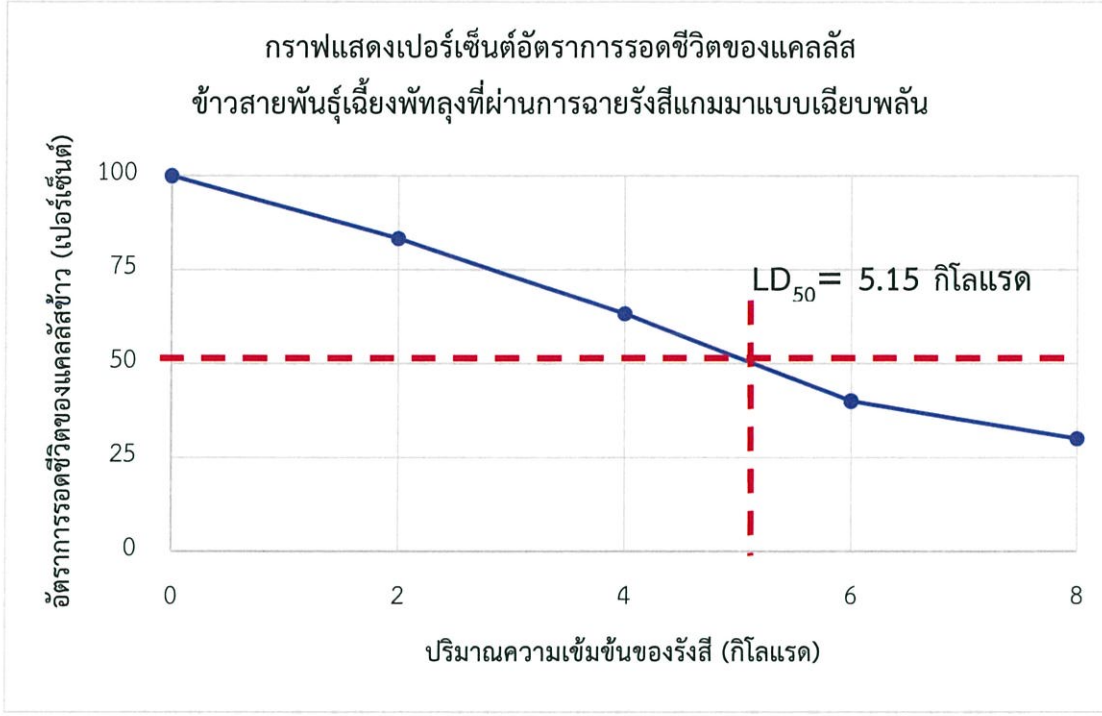
4.4.1. การหาปริมาณรังสีที่ส่งผลต่ออัตราการตายของแคลลัสที่ 50 เปอร์เซ็นต์

4.4.1.1 ข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง

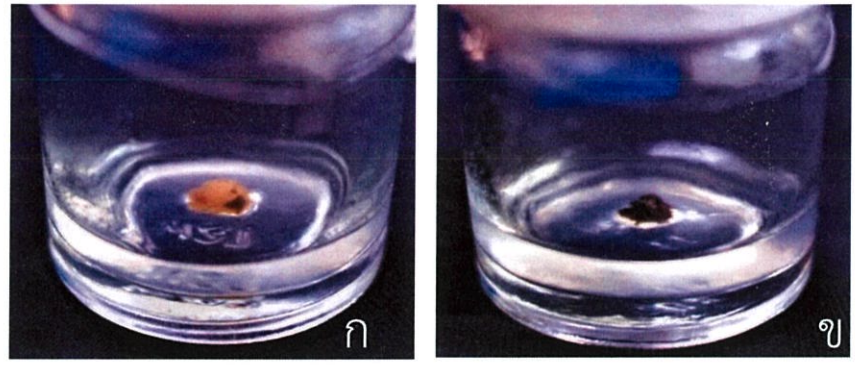
นำแคลลัสข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง ที่ได้จากการชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารสูตร NB อายุ 4 สัปดาห์ จำนวน 30 ชิ้น ไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน โดยปริมาณที่ใช้คือ 2 4 6 และ 8 กิโลแรด โดยใช้เครื่องฉายรังสีแกมมา จากนั้นนำแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NB ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ในความเข้มข้นที่มีความเหมาะสมต่อการชักนำให้แคลลัสเป็นต้นใหม่ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร แอลโพรลีน 1 กรัมต่อลิตร และไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร มีหน่วยการทดลองแคลลัส 2 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้น เพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีแสงควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากตารางที่ 4.10 โดยพบว่าแคลลัสที่ไม่ได้นำไปผ่านการฉายรังสีหรือชุดควบคุมนั้น มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และที่ปริมาณรังสี 8 กิโลแรด มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสน้อยสุดเท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาจากรูปที่ 4.16 พบว่ามีค่า LD_{50} เท่ากับ 5.15 กิโลแรด และจากรูปที่ 4.13 แคลลัสไม่สามารถที่จะเจริญเติบโตได้มีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลเข้มไปจนถึงสีดำ และตายในที่สุดเมื่อทำการเปรียบเทียบสีกับชุดควบคุม

ตารางที่ 4.9 การศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุงเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ปริมาณรังสี (กิโลแรด)	จำนวนแคลลัส (ชิ้น)	อัตราการรอดชีวิตของแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)
0	30	30 (100.00)
2	30	25 (83.33)
4	30	19 (63.33)
6	30	13 (40.00)
8	30	9 (30.00)



รูปที่ 4.20 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน



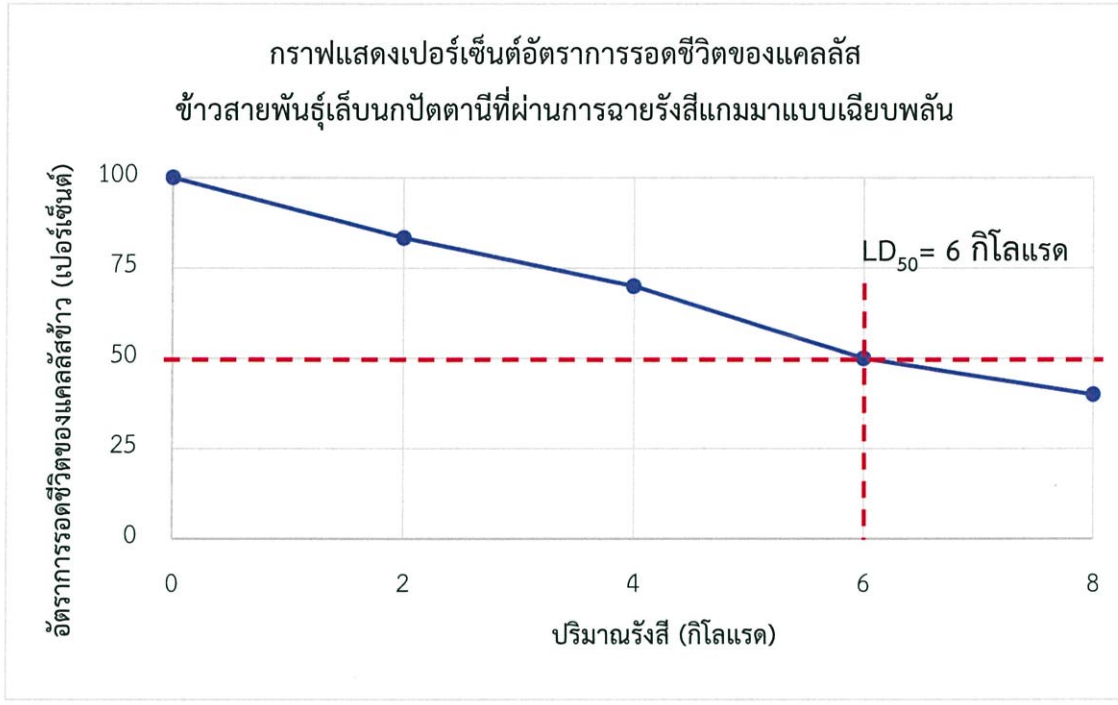
รูปที่ 4.21 แสดงลักษณะการรอดชีวิตของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในสัปดาห์เริ่มต้น (ก) และในสัปดาห์ที่ 4 (ข)

4.4.1.2 ข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี

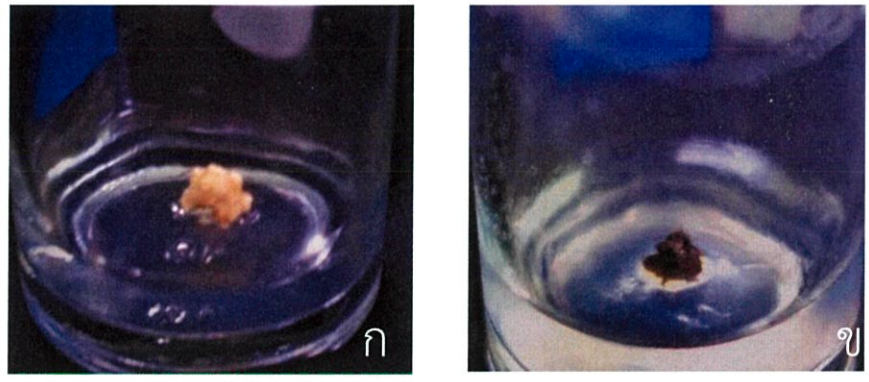
นำแคลลัสข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี ที่ได้จากการชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารสูตร NB อายุ 4 สัปดาห์ จำนวน 30 ชิ้น ไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน โดยปริมาณที่ใช้คือ 2 4 6 และ 8 กิโลแรด โดยใช้เครื่องฉายรังสีแกมมา จากนั้นนำแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NB ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ในความเข้มข้นที่มีความเหมาะสมต่อการชักนำให้แคลลัสเป็นต้นใหม่ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร แอลโพรลีน 1 กรัมต่อลิตร และ ไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร มีหน่วยการทดลองแคลลัส 2 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้น เพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีแสงควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากตารางที่ 4.11 โดยพบว่าแคลลัสที่ไม่ได้นำไปผ่านการฉายรังสีนั้น มีเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดชีวิตสูงเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และที่ปริมาณรังสี 8 กิโลแรด มีเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสน้อยสุดเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาจากรูปที่ 4.18 พบว่ามีค่า LD_{50} เท่ากับ 6 กิโลแรด และจากรูปที่ 4.14 แคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีจะมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลเข้ม บางชิ้นมีการเปลี่ยนแปลงจากสีน้ำตาลเข้มเป็นสีดำ และตายในที่สุดเมื่อทำการเปรียบเทียบสีกับชุดควบคุม

ตารางที่ 4.10 การศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ปริมาณรังสี (กิโลแรด)	จำนวนแคลลัส (ชิ้น)	อัตราการรอดชีวิตของแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)
0	30	30 (100.00)
2	30	25 (83.33)
4	30	21 (70.00)
6	30	15 (50.00)
8	30	12 (40.00)



รูปที่ 4.22 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน



รูปที่ 4.23 แสดงลักษณะการรอดชีวิตของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในสัปดาห์เริ่มต้น (ก) และในสัปดาห์ที่ 4 (ข)

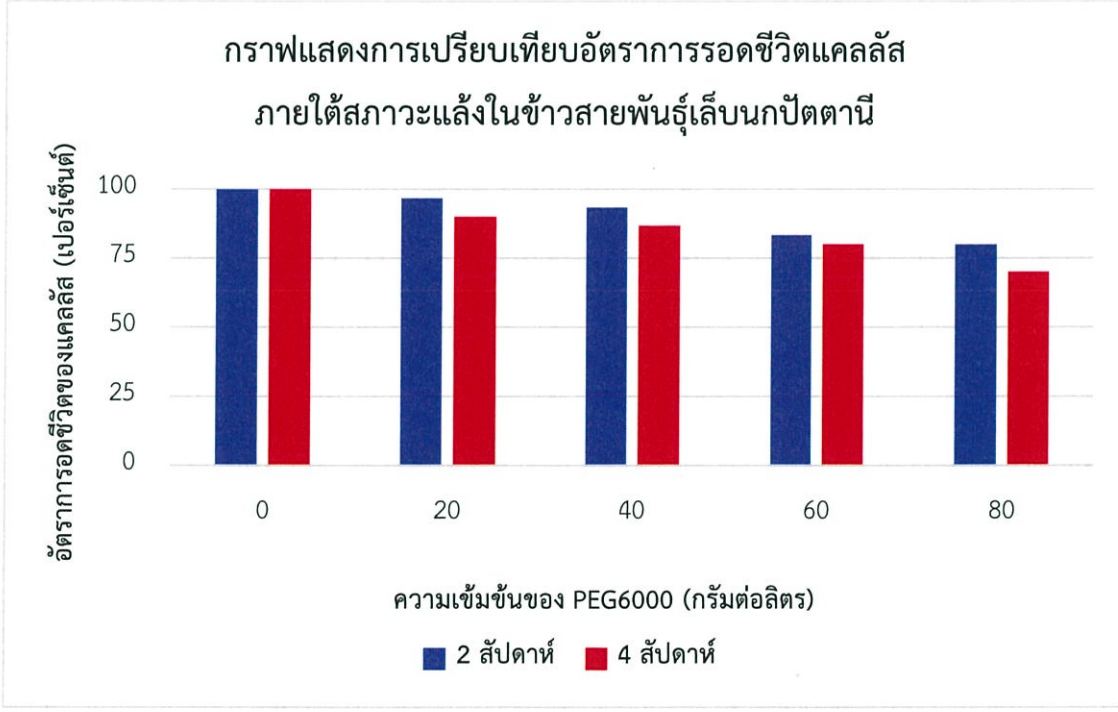
4.4.2 การศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสข้าวแต่ละสายพันธุ์ภายใต้สภาวะแล้งจากสารประกอบ PEG

4.4.2.1 ข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี

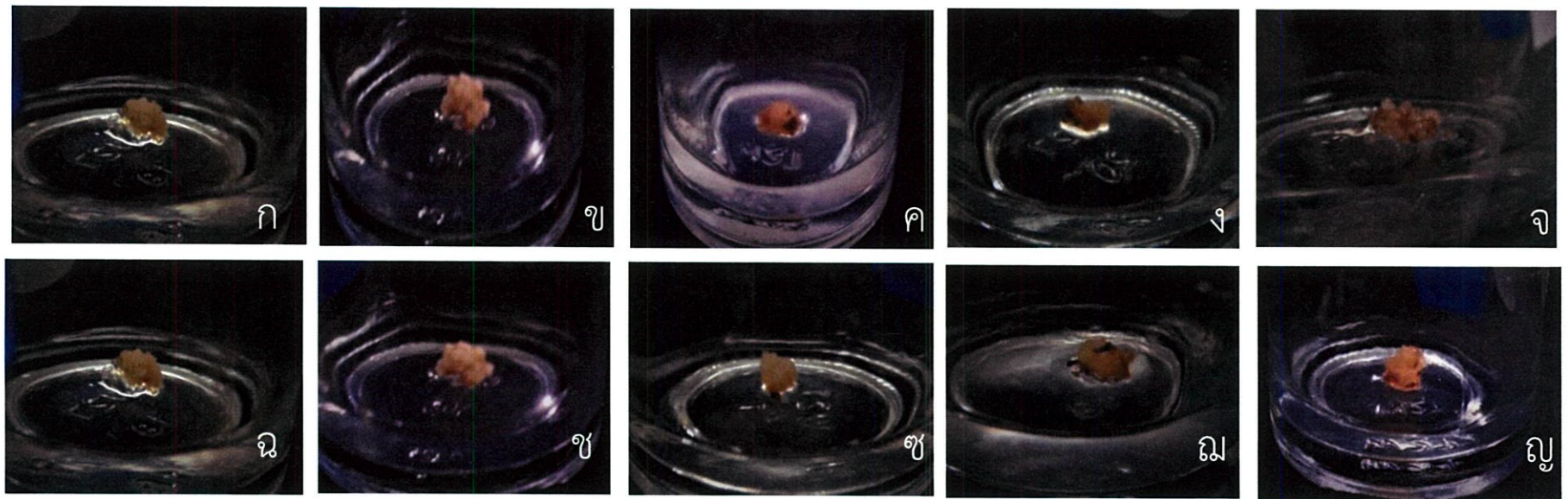
นำแคลลัสของข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี อายุ 4 สัปดาห์ที่มีลักษณะเกาะกลุ่มกันแน่นมีสีเหลือง มาตัดแบ่งให้มีขนาดที่เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน จากนั้นนำไปวางลงเพลทที่มีอาหารสูตร NB ที่ไม่มีการใส่สารควบคุมการเจริญเติบโตนำ เพลทที่เตรียมไว้ทำการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ทราบได้จากผลการทดลอง 4.4 ปริมาณรังสีที่เหมาะสมต่อข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีคือ 6 กิโลแรด จากนั้นนำแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีแล้วมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร NB ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้น 0 20 40 60 และ80 กรัมต่อลิตร โดยในแต่ละความเข้มข้นจะมีจำนวนแคลลัส 30 ชิ้น เพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีแสงควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สังเกตได้จากตารางที่ 4.11 ในความเข้มข้นของ PEG ที่สูงที่สุด คือ 80 กรัมต่อลิตรจะมีอัตราการรอดชีวิตต่ำที่สุดเท่ากับ 24 ชิ้นจากตัวอย่าง 30 ชิ้นคิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ในสัปดาห์ที่ 2 และในสัปดาห์ที่ 4 มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 21 ชิ้นมีเปอร์เซ็นต์ อัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ในความเข้มข้น PEG ที่ 80 กรัมต่อลิตรในข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีที่ไม่ได้นำไปฉายรังสีแบบเฉียบพลัน มีอัตราการรอดชีวิตที่น้อยกว่าเท่ากับ 66.67 และ 40 เปอร์เซ็นต์ใน 2 และ4 สัปดาห์ตามลำดับ

ตารางที่ 4.11 แสดงผลการเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสในข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงที่ผ่านการฉายรังสีแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสี 6 กิโลแรดบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร NB ที่ประกอบด้วย PEG6000 ในความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 2 และ4 สัปดาห์

ความเข้มข้น PEG6000 (กรัมต่อลิตร)	จำนวนแคลลัส (ชิ้น)	อัตราการรอดชีวิตของแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)	
		2 สัปดาห์	4 สัปดาห์
0	30	30 (100.00)	30 (100.00)
20	30	29 (96.67)	27 (90.00)
40	30	28 (93.33)	26 (86.67)
60	30	25 (83.33)	24 (80.00)
80	30	24 (80.00)	21 (70.00)



รูปที่ 4.24 กราฟแสดงการเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสภายใต้สภาวะแล้งในข้าวสายพันธุ์เล็บกนกปัตตานีที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร NB โดยประกอบด้วย PEG6000 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 และ4 สัปดาห์



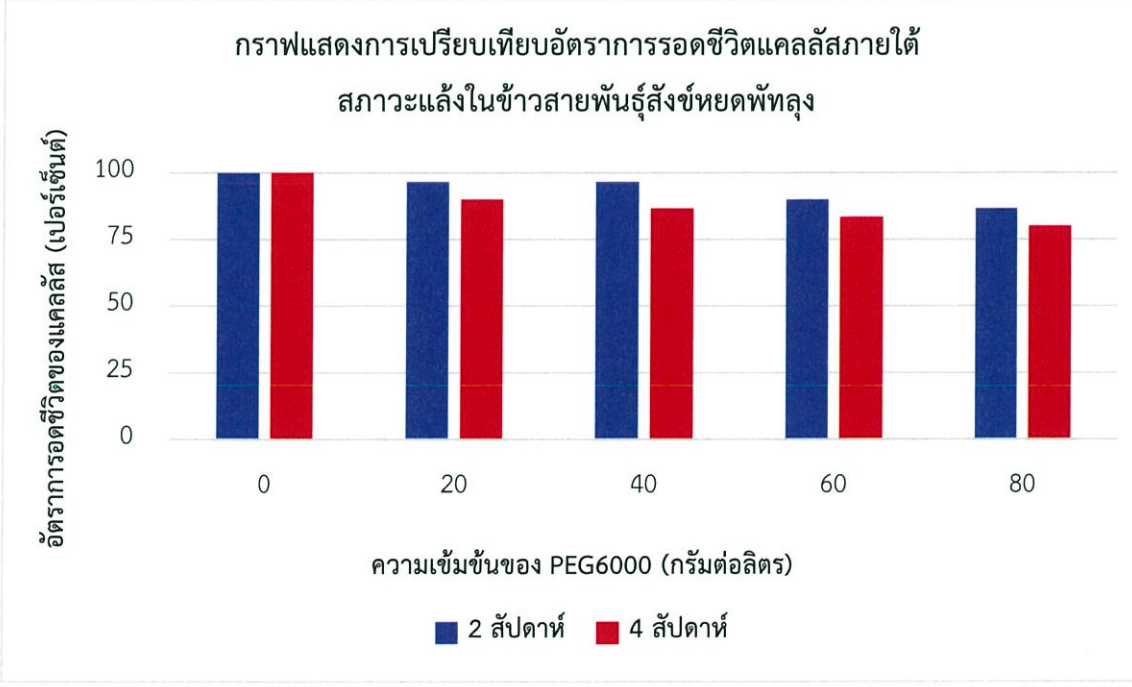
รูปที่ 4.25 แสดงลักษณะสีของแคลลัสข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีเมื่อผ่านการฉายรังสีและเพาะเลี้ยงบนอาหาร PEG ที่ระดับความเข้มข้น 0 20 40 60 และ 80 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวล 2 สัปดาห์ (ก-จ) และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ฉ-ญ)

4.4.2.2 ข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุง

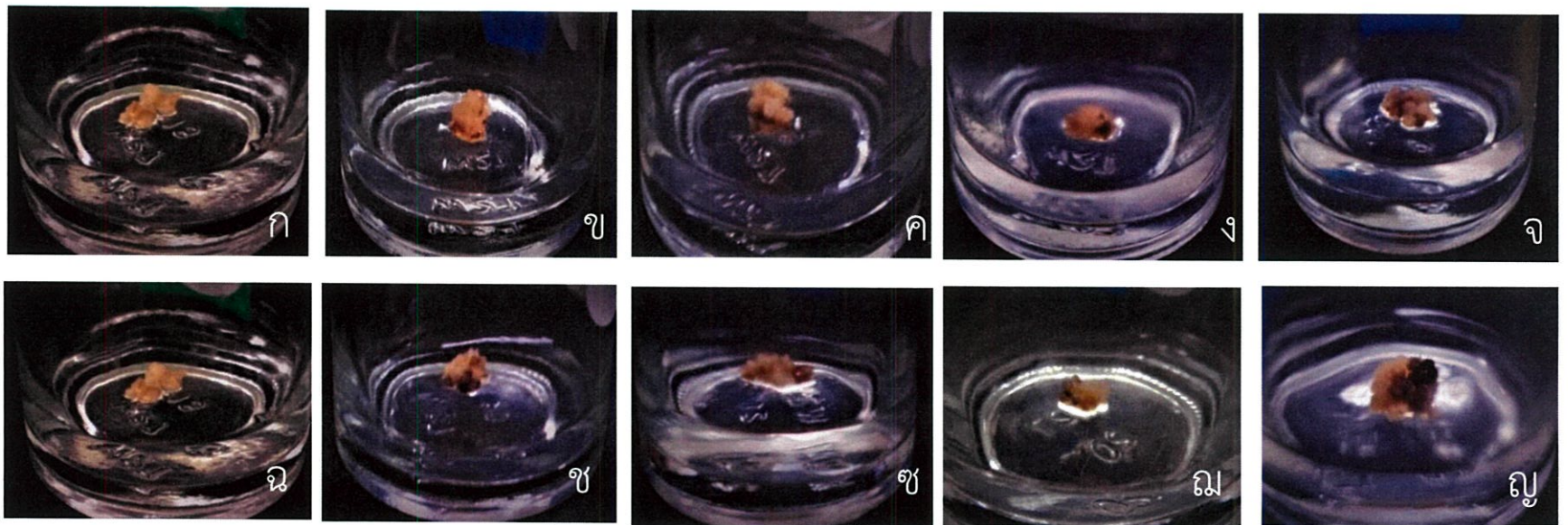
นำแคลลัสของข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงอายุ 4 สัปดาห์ที่มีลักษณะเกาะกลุ่มกันแน่น มีสีเหลือง มาตัดแบ่งให้มีขนาดที่เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน นำเพลทที่เตรียมไว้ทำการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน ในปริมาณรังสีที่มีอัตราการตายของแคลลัสอยู่ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยจากงานวิจัยของกนกวรรณ และคณะ (2559) ที่ได้ทำการทดลองและพบว่าข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงมีค่า LD_{50} อยู่ที่ 8.54 กิโลแรด จึงมีการนำแคลลัสไปฉายรังสีที่อยู่ในช่วง 8 และ 10 กิโลแรด จากนั้นนำแคลลัสของข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงที่ผ่านการฉายรังสีมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร NB ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้น 0 20 40 60 และ80 กรัมต่อลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีแสง ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยพบว่าแคลลัสมีอัตราการรอดชีวิตสูงเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ประกอบไปด้วย PEG จากตารางที่ 4.12 ในความเข้มข้นของ PEG ที่สูงที่สุดคือ 80 กรัมต่อลิตรจะมีอัตราการรอดชีวิตต่ำที่สุดเท่ากับ 26 ชิ้นจากตัวอย่าง 30 ชิ้นคิดเป็น 86.67 เปอร์เซ็นต์ในสัปดาห์ที่ 2 และในสัปดาห์ที่ 4 มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 24 ชิ้นมีเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ในความเข้มข้น PEG ที่ 80 กรัมต่อลิตรในข้าวที่ไม่ได้นำไปฉายรังสีแบบเฉียบพลัน มีอัตราการรอดชีวิตเพียง 66.67 และ 50 เปอร์เซ็นต์ใน 2 และ 4 สัปดาห์ตามลำดับ

ตารางที่ 4.12 แสดงผลการเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสในข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงที่ผ่านการฉายรังสีแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสีระหว่าง 8 และ 10 กิโลแรดบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร NB ที่ประกอบด้วย PEG6000 ในความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์

ความเข้มข้น PEG6000 (กรัมต่อลิตร)	จำนวนแคลลัส (ชิ้น)	อัตราการรอดชีวิตของแคลลัส (เปอร์เซ็นต์)	
		2 สัปดาห์	4 สัปดาห์
0	30	30 (100.00)	30 (100.00)
20	30	29 (96.67)	27 (90.00)
40	30	29 (96.67)	26 (86.67)
60	30	27 (90.00)	25 (83.33)
80	30	26 (86.67)	24 (80.00)



รูปที่ 4.26 กราฟแสดงการเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสภายใต้สภาวะแล้งในข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร NB โดยประกอบด้วย PEG6000 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 2 และ4 สัปดาห์



รูปที่ 4.27 แสดงลักษณะสีของแคลลัสข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงเมื่อผ่านการฉายรังสีและเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีสารประกอบ PEG ที่ระดับความเข้มข้น0 20 40 60 และ 80 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ก-จ) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา4 สัปดาห์ (ฉ-ญ)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้สำหรับการควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าว 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวสายพันธุ์ เฉี้ยงพัทลุง เล็บนกปัตตานี และสังข์หยดพัทลุงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บนอาหารสูตร NB และสูตร MS ที่ประกอบไปด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในข้าวทั้งสามสายพันธุ์นั้นมีอัตราการเกิดแคลลัสและปริมาตรแคลลัสในอาหารสูตร NB สูงกว่าในอาหารสูตร MS โดยในข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุงจะมีปริมาตรใหญ่ที่สุดและมีการอัตราการเกิดแคลลัสสูงที่สุดในความเข้มข้นของ 2,4-D ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี มีอัตราการเกิดแคลลัสสูงที่สุดอยู่ที่ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D คือ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงเหมาะสมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นตัวใหม่ นำแคลลัสข้าว 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง เล็บนกปัตตานี และสังข์หยดพัทลุงที่มีอายุเวลา 4 สัปดาห์มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร NB ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 0 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 0 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีแสงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าในข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุงมีจำนวนแคลลัสที่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดยอดมากที่สุดเท่ากับ 86.67 เปอร์เซ็นต์ในความเข้มข้นของ BAP ร่วมกับ NAA ที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีเกิดการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสมากที่สุด 80 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงเท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่าแคลลัสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงนั้นเกิดการพัฒนาเป็นต้นใหม่แต่ช่วงระยะเวลาการเก็บผลการทดลองไม่มากทำให้ข้อมูลที่ได้ไม่เพียงพอผลการทดลองที่ได้จึงถือว่าไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้เวลาเพาะเลี้ยงมากกว่านี้จึงจะสามารถได้แคลลัสที่พัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้อย่างสมบูรณ์

การศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสข้าว 2 สายพันธุ์ได้แก่ ข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุง และเล็บนกปัตตานี ที่ปริมาณรังสี 0 2 4 6 8 และ 10 กิโลแรด เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะพบว่าที่ปริมาณรังสีที่ทำให้แคลลัสข้าวเกิดการตาย 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบจากชุดควบคุมที่ไม่ได้ทำการฉายรังสี ข้าวสายพันธุ์เฉี้ยงพัทลุงมีอัตราการตาย

50 เปอร์เซ็นต์ ที่ปริมาณรังสี 5.15 กิโลแรด และข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี มีอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์อยู่ที่ 6 กิโลแรด

การศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสข้าวและแคลลัสข้าวแต่ละสายพันธุ์ภายใต้สภาวะแล้งจากสารประกอบ PEG6000 ของข้าว 2 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์เล็บนกปัตตานี และสังข์หยดพัทลุง โดยการนำแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์ของข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีสารประกอบ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 20 40 60 และ 80 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อสังเกตอัตราการรอดชีวิตเพื่อนำไปเปรียบเทียบกับแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา ที่ปริมาณรังสีที่ทำให้เกิดอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ของข้าวในแต่ละสายพันธุ์จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีสารประกอบ PEG จะพบว่าในข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์คือ เล็บนกปัตตานี และสังข์หยดพัทลุงนั้น เมื่อผ่านการฉายรังสีแกมมาจะสามารถทำให้แคลลัสข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ มีอัตราการรอดชีวิตภายใต้สภาวะแล้งในอาหาร PEG6000 สูงกว่าแคลลัสข้าวที่ไม่ผ่านการฉายรังสีโดยในแคลลัสข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานีที่ผ่านการฉายรังสี ในอาหารที่ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตรมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ในแคลลัสที่ไม่ได้นำไปฉายรังสีมีอัตราการรอดเพียง 40 เปอร์เซ็นต์ในความเข้มข้น PEG 80 กรัมต่อลิตร และแคลลัสข้าวสายพันธุ์สังข์หยดพัทลุงที่ผ่านการฉายรังสีมีอัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับแคลลัสที่ไม่ได้นำไปฉายรังสีมีอัตราการรอดเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ในความเข้มข้น PEG 80 กรัมต่อลิตรเช่นกัน

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรนำผลการทดลองที่ได้ไปทำการปรับปรุงเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสม และเพิ่มระยะเวลาทำการวางแผนสำหรับการเพาะเลี้ยงแคลลัสให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ให้นานมากขึ้น และควรนำแคลลัสข้าวที่รอดชีวิตจากอาหารสภาวะแล้งไปทำการตรวจองค์ประกอบและตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมถึงสาเหตุที่ทำให้อัตราการรอดชีวิตของแคลลัสสูงขึ้น

เอกสารอ้างอิง

กนกวรรณ รัตนวงศ์, กฤตยาภรณ์ มีสุข และวรรณิศา ทองมี. 2559. “อิทธิพลของรังสีแกมมาที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของข้าว (*Oryza satiza* L.).” ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

กรมอุตุนิยมวิทยา. 2561. **ภัยแล้ง.** [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : https://www.tmd.go.th/info/info.php?FileID=71. วันที่สืบค้น 24 มิถุนายน 2561.

เกศสุคนธ์ มณีวรรณ. 2548. “การส่งถ่ายยีนไคทิเนสสู่ข้าว (*Oryza sativa* L.).” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

งามชื่น คงเสรี. 2542. **เทคนิคการทดสอบคุณภาพข้าว.** หนังสือพิมพ์ กสิกร : 467-473.

จารุวรรณ จาติเสถียร, มิ่งขวัญ มิ่งเมือง, สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล และสงกรานต์ จิตรากร. 2547. “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวพื้นเมืองไทย พันธุ์เหลืองประทิว 123 และขาวตาแห้ง 17 เพื่อรองรับการปรับปรุงพันธุ์ด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ.” *วารสารวิชาการเกษตร.* 1 : 65-79.

ตุลาพร แก้วแก่น และวัฒนา พัฒนากูล. 2549. “ผลของสภาวะขาดน้ำจากความแล้งและความเครียดเกลือต่อลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการและเมทาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตในข้าวระยะต้นกล้า.” *วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น.* 11(4,260) : 268.

นวรัตน์ อุดมประเสริฐ และอมรรัตน์ พรหมบุญ. 2537. “การใช้ลักษณะการสะสมโพรลีนเนื่องจากสภาวะขาดน้ำบ่งบอกถึงความทนแล้งในข้าวบาร์เล่ย์.” หน้า 62-71 ใน **รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 32** .

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2537. **การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.** คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประภา ศรีพิจิตต์. 2537. “การพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสที่เจริญมาจากเอมบริโอของข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105.” *วารสารเกษตรศาสตร์.*

เผดิม ระติสุนทร, ประดิษฐ์ พงศ์ทอง, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล และเลิศลักษณ์ เงินศิริ. 2536. “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในข้าวพันธุ์ต่างๆ.” *วารสารเกษตรศาสตร์.* 27 : 278-285.

พัฒนศักดิ์ รุจิหาญ. 2550. “กิจกรรมแอนติออกซิแดนซ์และการสะสมโพรลีนต่อการทนแล้งในอ้อย.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพืชไร่ บัณฑิตวิทยาลัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

ภพเก้า พุทธรักษ์. 2013. "การชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวหอมมะลิ 105 และข้าวเหนียว กข 6." *วารสารวิชาการ.* คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.

ยงศักดิ์ ขจรผดุงกิตติ และอัญชลี จาละ. 2015. "ผลของ 2, 4-D และ kinetin ชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และปทุมธานี 1." *วารสารวิชาการ.* ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการเทคนิค.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัญญิการ์ โปราหา. 2559. "การเจริญของแคลลัส เซลล์แขวนลอย และการเจริญเป็นต้นใหม่ของข้าว (*Oryza sativa* L.) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วรัญญา คำปัน. 2541. "ปริมาณโพรลีนและน้ำตาลเมื่อข้าวอยู่ในสภาวะแล้งและการคัดเลือกพืชทนแล้ง." วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วราพร สีระพลากร. 2552. **พันธุศาสตร์ของพืช.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

สงกรานต์ จิตราการ. 2539. **ทรัพยากรเชื้อพันธุ์ข้าวในประเทศไทย.** (ความหลากหลายแห่งชีวิต) โครงการ จัดตั้งศูนย์ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ.

สิรินุช ลามศรีจันทร์. 2540. **การกลายพันธุ์ของพืช.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาลัยเกษตรศาสตร์.

สุจินต์ ภัทรภูวดล. 2550. "พืชเทคโนโลยีชีวภาพกับปัญหาภัยแล้ง". *จดหมายข่าวศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีและความปลอดภัยทางชีวภาพ.* คลังข้อมูล สพท. 3(4).

สุพรรณญิกา เส็งสาย และประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2548. "การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวหอม 3 สายพันธุ์." จากพื้นฐานสู่เทคโนโลยีระดับโมเลกุล หน้า 337-342 ใน **รายงานการประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 14 สาขาพันธุศาสตร์.**

สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว. 2560. **องค์ความรู้เรื่องข้าว : พันธุ์ข้าว.** [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : http://www.ricethailand.go.th/Rkb/varieties/index.php.htm วันที่สืบค้น 24 มิถุนายน 2561.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว. 2560. **องค์ความรู้เรื่องข้าว : พันธุ์ข้าว: เฉี้ยงพัทลุง.** [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : http://www.ricethailand.go.th/rkb/varieties/index.php-file=content.php&id=23.htm.
วันที่สืบค้น 24 มิถุนายน 2561.

สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว. 2560. **องค์ความรู้เรื่องข้าว : พันธุ์ข้าว: เล็บนกปัตตานี.** [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : http://www.ricethailand.go.th/rkb/varieties/index.php-file=content.php&id=36.htm.
วันที่สืบค้น 24 มิถุนายน 2561.

สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว. 2560. **องค์ความรู้เรื่องข้าว : พันธุ์ข้าว: สังข์หยดพัทลุง.** [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : http://www.ricethailand.go.th/rkb/varieties/index.php-file=content.php&id=93.htm.
วันที่สืบค้น 24 มิถุนายน 2561.

แหล่งคลังข้อมูลยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาลัยมหิดล. 2561. **Polyethylene glycol.** [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/dic/QA_full.php?id=2234.
วันที่สืบค้น 15 มิถุนายน 2561.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม (ก). 2550. **เทคโนโลยีชีวภาพเรื่องพืช.** กรุงเทพฯ : โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม (ข). 2550. **ปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืช.** พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ : โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อรพิน เกิดชูชื่น, ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์ และอุบลรัตน์ กล่ำศรี. 2550. "การตอบสนองของข้าวเจ้าชัยนาท1 และสุพรรณบุรี1 ในสภาวะขาดน้ำ." *วิทยาสารเกษตรศาสตร์.* สาขาวิทยาศาสตร์ 38 : 322-325.

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช.** กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์อักษรสรรค์.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Aadarsh, P. Murthy, P.B. Deecaraman, M. and Sridhar, R. 2010. "Optimization of Callus Induction and Regeneration in *Swarna masoori* Rice Cultivar Short Title : *In Vitro* Somatic Embryogenesis of *Swarna massori* Rice Cultivar" *Department of Biotechnology International Institute of Biotechnology and Toxicology*. Padappai Chennai. India.

Ain Lhont, F. Zunzunnegui, F.A. Diaz Barrada, M.C. Tirado, R. Clavijio, A. and Novo, F.C. 2000. "Comparision of Proline Accumulation in Mediterranean Shrubs Subjected to Natural and Experimental Water Deficit. " *Plant and Soil*. 230 : 175-183.

Amin, RA. Husted, S. and Schjoerring, JK. 2004. "Identification of an Apoplastic Protein Involved in The Initial Phase of Salt Stress Response in Rice Root by Two-Dimensional Electrophoresis." *Institute of Molecular and Cell Biology*. Hebei Normal University. China.

Barnett, N.M. and Naylor, A.W. 1996. "Amino Acid and Protein Metabolism in Bermuda Grass During Water Stress." *Laboratoire De Zoologie, Institut National De La Recherche Agronomique Lusignan*. 86600 Lusignan France (C.G., R.B.).

Bogges, S.F. Stewart, C.R. Aspinall, D. and Paleg, L.G. 1976. "Effect of Water Stress on Proline Synthesis from Radioactive Precursors". *Plant Physiology*. 58 : 398-401.

Chiang, H.-H. and Dandeker, A.M. 1995. "Regulation of Proline Accumution in Response to Desiccation." *Plant Cell and Environment*. 18 : 1280-1290.

Din, A.R.J.M. Ahmad, F.l. Wagiran, A. Samad, A.A. Rahmat, Z. and Sarmidi, M.R. 2016. "Improvement of Efficient *In Vitro* Regeneration Potential of Mature Callus Induced from Malaysian Upland Rice Seed (*Oryza sativa* cv. Panderas)." *Saudi Journal of Biological Sciences*. 23 : 69-77.

Gamborg, O.L. Miller, R.A. and Ojima, K. 1968. "Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cell." *Experimental Cell Research*. 50 : 151-158.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Gzik, A. 1996. "Accumulation of Proline and Pattern of Alpha-Amino Acid in Sugar Beet Plants in Response to Osmotic, Water and Salf Stress." *Environmental and Experimental Botany*. 36 : 29-38.

Hanson, A.D. and Hitz, W.D. 1982. "Metabolic Response of Mesophytes to Plant After Deficits." *Plant Physiol*. 33 : 163-203.

Hore, P.D. Cress, W.A. and Staden, J.V. 1998. "Dissecting The Role of Osmolyte Accumulation During Stress." *Plant Cell and Environment*. 21 : 535-553.

Jone, M.M. and Rawson, H.M. 1979. "Influence of Rate of Development of Leaf Water Deficits up on Photosynthesis, Leaf Conductance, Water Use Efficiency and Osmotic Potential in Sorghum." *Plant Physiol*. 45 : 103-111.

Karthikeyan, A. Pandian, S.T.K. and Ramesh, M. 2009. "High Frequency Plant Regeneration from Embryogenic Cell of a Popular *Indica* Rice *(Oryza sativa* L.*)*." *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 15(4) : 371-375.

Lee, K. Joen, H. and Kim, M. 2002. "Opimization of a Mature Embryo Base *In Vitro* Culture System for High Frequency Somatic Embryogenetic Callus Induction and Plant Regeneration from *Japonica* Rice Cultivars." *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 71 : 237-244.

Murashike, T. and Skoog, F. 1962. *"A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures." Journal of Plant Physiology.* 15 : 473-497.

Pipatpanukul Thodsaporn, Sumontip Bunnag, Piyada TheeraKulpisut and Kosittrakul Manit. 2004. "Transformation of *Indica* Rice (*Oryza sativa* L.) cv. RD6 Mediated by *Argobacterium Tumefaciens*." *Songklanakarin Journal Science Technology*. 26(1) : 1-13.

Raina, S.K. 1989. "Tissue Culture in Rice Improvement: Status and Potential." *Advances in Agronomy Journal*. 42 : 339-398.

Rashid, H. Saleem, M. Chaudhry, Z. Gilani, S.T. and Qureshi, A.S. 2004. "Studies on Developing a Hight Regeneration from Seed Derived Callus of Rice (*Oryza sativa* L.) C.V. *Super Basmati*." *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 7(2) : 273-276.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Saharan, V. Yadav, R.C. Yadav, N.R and Chapagain B.P. 2004. "High Frequency Plant Regeneration from Desiccated Calli of *Indicca* Rice (*Oryza sativa* L.)." *African Journal of Biotechnology*. 3 : 572-575.

Tariq, M. Ali, G. Hadi, F. Ahmad, S. Ali, N. and Shah, A.A. 2008. "Callus Induction and *In Vitro* Plant Regeneration of Rice (*Oryza sativa L.*) Under Various Conditions." *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 11(2) : 255-259.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช MS Murashige and Skoog (Murashige and Skoog, 1962); Phytotech

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
Ammonium Nitrate	1650
Boric Acid	6.2
Calcium Chloride	332.2
Cobalt Chloride Hexahydrate	0.025
EDTA, Disodium Salt	37.26
Ferrous Sulfate, Heptahydrate	27.8
Maxnesium Sulffate, Anhydydrous	180.7
Magnesium Sulfate	16.9
Potassium lodide	0.83
Potassium Nitrate	1900
Potassium Phophate, Monobasic, Anhydrous	170
Sodium Molybdate (VI), Dihydrate	0.25
Zinc Sulfate, Heptahydrate	2.0
myo-Inositol	100
Nicotinic Acid	0.5
Pyridoxine HCl	0.5
Thiamine HCl	0.1
Sucrose	30,000

ภาคผนวก ข

ตารางสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช NB Basal Medium (Gamborg, 1968); Phytotech

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
Ammonium Nitrate	463
Boric Acid	3.0
Calcium Chloride, Anhydrous	125.33
Cobalt Chloride Hexahydrate	0.025
Cupric Sulfate, Pentahydrate	0.025
EDTA, Disodium Salt	37.26
Ferrous Sulfate, Heptahydrate	27.8
Magnesium Sulfate, Anhydrous	90.37
Manganese Sulfate	10
Potassium Iodide	0.75
Potassium Nitrate	2830
Potassium Phosphate, Monobasic, Anhydrous	400
Sodium Molybdate (VI), Dihydrate	0.25
Zinc Sulfate, Heptahydrate	2.0
myo-Inositol	100
Nicotinic Acid	1.0
Pyridoxine HCl	1.0
Thiamine HCl	10

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ

วันที่ 17 กรกฎาคม พ.ศ. 2561

ข้าพเจ้า นายภูดิส พัฒนเธียร รหัสประจำตัว 57050747

นายสุเมธ จันทะมาลา รหัสประจำตัว 57050775

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชา ชีววิทยา ขอรับรองว่า โครงงานพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ของข้าว (*Oryza sativa* L.) และทดสอบการเจริญเติบโตของแคลลัสในสภาวะทนแล้ง

ชื่อภาษาอังกฤษ REGENERATION OF RICE (*Oryza sativa* L.) AND CALLUS INDUCTION ON DROUGHT TOLERANT TEST

ปีการศึกษา 2560

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 1.50 %

ลงชื่อ.....ภูดิส พัฒนเธียร..... ลงชื่อ.....

(นายภูดิส พัฒนเธียร) (นายสุเมธ จันทะมาลา)

นักศึกษา นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ..... ลงชื่อ.....

(ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม) (ดร.วิมลมาศ บุญมี)

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม