

การคัดเลือกข้าวเพื่อให้ทนเค็มโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นางสาว พิจิกา ทิมสุกใส

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-533-211-9

***In vitro* SELECTION FOR SALT TOLERANCE IN RICE
(*Oryza sativa* L.)**

Miss Pijika Timsuksai

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Crop Production Technology**

Suranaree University of Technology

Academic Year 2002

ISBN 974-533-211-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การคัดเลือกข้าวเพื่อให้ทนเค็มโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....
(อาจารย์ ดร. โสภณ วงศ์แก้ว)

ประธานกรรมการ

.....
(ศาสตราจารย์ ดร. อารีย์ วรรณวัฒน์)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

.....
(ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล เหล่าสุวรรณ)

กรรมการ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ทวีข จิตรสมบูรณ์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. กนก ผลารักษ์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

พิจิกา ทิมสุกใส : การคัดเลือกข้าวเพื่อให้ทนเค็มโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

***In vitro* SELECTION FOR SALT TOLERANCE IN RICE (*Oryza sativa* L.)**

อาจารย์ที่ปรึกษา : ศ. ดร. อารีย์ วรรณวัฒน์, 86 หน้า. ISBN 974-533-211-9

การศึกษาสูตรอาหารชักนำแคลลัสที่เหมาะสมได้ใช้เมล็ดข้าว 6 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวดอกมะลิ 105, เหลืองประทิว 123, น้ำสะกุก 19, หอมคลองหลวง 1 และหอมสุพรรณบุรี ภายใต้สภาพที่มีแสงและไม่มีแสง พบว่าสูตรที่เหมาะสมสำหรับการชักนำแคลลัส คือ MS ดัดแปลง ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัม/ลิตร NAA 1 มิลลิกรัม/ลิตร และ kinetin 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ทั้งสองสภาพแสง ได้จำนวนแคลลัส 72.4, 73.4, 74.6, 24.4, 10.6 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พันธุ์ข้าว สูตรอาหาร และสภาพแสง มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) ต่อการเกิดแคลลัส การคัดเลือกแคลลัสทนเค็มบนอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) หลังจากคัดเลือกนาน 60 วัน มีเฉพาะแคลลัสของพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และน้ำสะกุก 19 มีอัตราการรอดชีวิตในอัตราที่ลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น ได้นำแคลลัสที่ไม่ผ่านการคัดเลือกของข้าว 4 พันธุ์ มาศึกษาการชักนำยอด พบว่า อาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม BA 4 มิลลิกรัม/ลิตร IAA 1 มิลลิกรัม/ลิตร หรือ BA 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ IAA 0.01 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดต้นได้มากที่สุด 66.6 และ 58.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แคลลัสของพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ 16, 2 และ 15 ต้น จากแคลลัสทนเค็ม 0, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และได้ต้นเผือกจากแคลลัสทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์ 1 ต้น แต่ไม่สามารถชักนำต้นจากแคลลัสทนเค็มของพันธุ์น้ำสะกุก 19 ได้ แต่ชักนำต้นจากแคลลัสไม่ทนเค็มได้ 38 ต้น อย่างไรก็ตาม มี 27 ต้นที่เป็นต้นเผือก ได้นำรากของต้นเหล่านี้มาวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Bradford assay พบว่าต้นที่ปลูกในสารละลายเกลือ มีปริมาณโปรตีนรวมสูงกว่าต้นที่ปลูกในสภาพธรรมดา เทคนิค SDS-PAGE แสดงให้เห็นว่า ต้นจากแคลลัสทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์ต้นหนึ่ง ที่ปลูกในสภาพธรรมดา มีโปรตีนขนาด 89.33 กิโลดาลตัน แต่ต้นอื่นที่ปลูกในสารละลายเกลือ มีโปรตีนขนาด 90.22 และ 96.27 กิโลดาลตัน การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร สามารถแบ่งพืชออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีการสะสมโซเดียมมากกว่าโพแทสเซียม และกลุ่มที่มีการสะสมโพแทสเซียมมากกว่าโซเดียม

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

ปีการศึกษา 2545

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

**PIJKA TMSUKSAI : *In vitro* SELECTION FOR SALT TOLERANCE IN RICE
(*Oryza sativa* L.). THESIS ADVISOR : PROF. AREE WARANYUWAT, Ph, D.
86 P. ISBN 974-533-211-9**

Appropriate callus induction media were studied using immature seeds of six rice cultivars, namely Kao Dawk Mali 105, Luang Pra Tew 123, Nam Sa Kui 19, Hom Klong Luang 1, and Hom Suphan Buri, under light and dark conditions. It was found that the best medium for callus induction was modified MS supplemented with 1 mg/l 2,4-D, 1 mg/l NAA and 0.1 mg/l kinetin in both culture conditions. Callus formation of the cultivars listed above was 72.4, 73.4, 74.6, 24.4, 10.6, and 0 percent, respectively. The cultivars, media and culture conditions had significant influence ($P < 0.01$) on callus induction. The calli were selected for salt tolerance on the medium supplemented with 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 percent (w/v) NaCl concentrations. After selection for 60 days, only the calli of Kao Dawk Mali 105 and Nam Sa Kui 19 survived with diminishing rate as the salt level increased. The unselected calli of all four cultivars were also compared for shoot regeneration. A modified MS medium supplemented with either 4 mg/l BA plus 1 mg/l IAA or 1 mg/l BA plus 0.01 mg/l IAA gave highest plantlet regeneration of 66.6 and 58.9 percent, respectively. Kao Dawk Mali 105 calli developed 16, 2, 15 complete plants from 0, 0.5, and 1.0 percent NaCl treatments respectively. One albino plant was obtained from 1.0 percent salt-selected callus. No plantlet was regenerated from salt-selected calli of Nam Sa Kui 19, but 38 plantlets were regenerated from unselected calli. However, 27 plantlets were albino. Root tissue of these plants that were grown in pots to maturity was analyzed for protein by Bradford assay. Higher total protein was observed in plants under saline condition than those in normal culture. SDS-PAGE technique revealed one plant from 1 percent salt-tolerant calli grown in normal culture showing the protein size 89.33 kDa, but other plants showing the size of 90.22 and 96.27 kDa when grown in salt-treated condition. Nutrient element determination separated all plants into two groups, one with higher Na than K and another with higher K than Na.

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

ปีการศึกษา 2545

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลืออย่างดียิ่ง ทั้งในด้านวิชาการและด้านดำเนินการวิจัย อาทิเช่น

ศาสตราจารย์ ดร. อารีย์ วรรณวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้การอบรมสั่งสอน ให้ความรู้ให้โอกาส และประสบการณ์ต่าง ๆ ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล เหล่าสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และอาจารย์ ดร. ไสภณ วงศ์แก้ว ที่ช่วยให้คำแนะนำ ตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. อัครชัย สุขธำรง และอาจารย์ ดร. ปิยะดา ทิพย์พ่อง ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา และคณาจารย์ทุกท่านที่ให้การอบรมสั่งสอน

ศูนย์วิจัยข้าวพิมาย อ. พิกุล อ. นครราชสีมา ที่ช่วยอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวสำหรับการทำวิทยานิพนธ์นี้

ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 และ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ศูนย์วิทยาศาสตร์สถาบันราชภัฏนครราชสีมา ที่ให้ความอนุเคราะห์ ในการใช้สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ คุณนวลปรานค์ อุทัยดา คุณเอกวัฒน์ จันทรวงศ์ คุณพรทิพา โปร่งกลาง และเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือ ที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และโครงการพัฒนาการเรียนการสอนวิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ในสถาบันราชภัฏ (พวส.) ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในการศึกษาและทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ คุณศิริประภา มหานิล และคุณยิ่งยศ จิตตยโสธร ที่มีส่วนช่วยอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย คุณมิ่งขวัญ ทวีทรัพย์ เพื่อนๆ และน้องๆ บัณฑิตศึกษาผลิตพืชทุกท่าน ขอขอบคุณเป็นพิเศษ คุณสุภาวรัตน์ ชาญยุทธ และคุณจุฑามาศ เพี้ยชัย ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

ท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงยิ่ง สำหรับคุณพ่อผู้ช่วยศาสตราจารย์เสน่ห์ คุณแม่พันธุ์ทิพย์ ที่เป็นทั้งที่ปรึกษา ให้คำแนะนำ ช่วยตรวจสอบแก้ไข อีกทั้งให้การอบรมเลี้ยงดู ช่วยเหลือปล้ำใจ ส่งเสริมในทุกๆ ด้านเป็นอย่างดี ทำให้ผู้วิจัยดำเนินชีวิตที่ดีมาโดยตลอด และที่สำคัญ ได้ประสบผลสำเร็จในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

พิจิกา ทิมสุกใส

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ง
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 ปรัชญ์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
1. ดินเค็ม.....	3
2. การทนเค็มของพืช.....	4
3. ความเค็มและการเจริญเติบโตของข้าว.....	5
4. แคลลัสข้าว.....	6
5. การปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนเค็มโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....	7
6. การชักนำให้เกิดต้น.....	9
7. ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการสะสมสารต่าง ๆ ของพืช.....	12
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	15
1. วัสดุ อุปกรณ์.....	15
2. วิธีการทดลอง.....	17
2.1 การทดลองที่ 1.....	17
2.2 การทดลองที่ 2.....	18
2.3 การทดลองที่ 3.....	19
2.4 สถานที่ทำการทดลอง.....	24
4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	25
4.1 การทดลองที่ 1.....	25

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 การทดลองที่ 2.....	40
4.3 การทดลองที่ 3.....	44
5 สรุปผลการทดลอง.....	59
ข้อเสนอแนะ.....	61
รายการอ้างอิง.....	62
ภาคผนวก.....	69
ประวัติผู้เขียน.....	86

ฅารบัญญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1.1 จํานวนก้อนแคลลัสทํงหมดและเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสที่ชักนํ้าจากอาหาร สูตรตําง ๆ ในสภาพทํมีแสงและไม่มีแสง.....	28
4.1.2 ปฏิกริยาระหวํางพันธู์ข้าวและสูตรอาหารต่อปริมาณการเกิดแคลลัส.....	29
4.1.3 ปฏิกริยาระหวํางพันธู์ข้าวและสภาพแสงทํมีต่อปริมาณการเกิดแคลลัส และเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส.....	29
4.1.4 คําเฉลี่ยของจํานวนแคลลัสข้าวที่ชักนํ้าในอาหารสูตรตําง ๆ ทํงในสภาพทํมีแสง และไม่มีแสง.....	30
4.1.5 ปฏิกริยาระหวํางพันธู์ข้าวและสภาพแสงทํมีต่อขนาดเฉลี่ยของแคลลัสข้าวอายุ 2 สัปดาห์.....	34
4.1.6 ปฏิกริยาระหวํางพันธู์ข้าวและสภาพแสงทํมีต่อขนาดเฉลี่ยของแคลลัสข้าวอายุ 4 สัปดาห์.....	34
4.1.7 ปฏิกริยาระหวํางพันธู์ข้าวและสูตรอาหารต่อขนาดแคลลัสข้าวอายุ 2 สัปดาห์.....	35
4.1.8 ปฏิกริยาระหวํางพันธู์ข้าวและสูตรอาหารต่อขนาดแคลลัสข้าวอายุ 4 สัปดาห์.....	35
4.1.9 คําเฉลี่ยของขนาดแคลลัสข้าวอายุ 2 สัปดาห์ที่ชักนํ้าในอาหารสูตรตําง ๆ ทํงในสภาพทํมีแสงและไม่มีแสง.....	36
4.1.10 คําเฉลี่ยของขนาดแคลลัสข้าวอายุ 4 สัปดาห์ที่ชักนํ้าในอาหารสูตรตําง ๆ ทํงในสภาพทํมีแสงและไม่มีแสง.....	38
4.2.1 คําเฉลี่ยของจํานวนแคลลัสข้าว 2 พันธุ์ที่คัดเลือกบนอาหารทํมีความเข้มข้น เกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 ระดับ และวางเลียงเป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 วัน.....	42
4.2.2 ปฏิกริยาระหวํางพันธู์ข้าวและความเข้มข้นเกลือ(%) ทํมีต่อจํานวนแคลลัส ข้าว 2 พันธุ์บนอาหารคัดเลือก.....	43
4.2.3 ปฏิกริยาระหวํางพันธู์ข้าวและจํานวนวันที่ใช้คัดเลือก ทํมีผลต่อจํานวนแคลลัส ข้าว 2 พันธุ์บนอาหารคัดเลือก.....	43
4.3.1 จํานวนแคลลัสรวมของข้าว 4 พันธุ์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อเพาะเลี้ยง บนอาหารชักนํ้าคํนสูตรตํางๆ นาน 6 สัปดาห์.....	48

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.3.2 ปฏิบัติการระหว่างพันธุ์ข้าวและสูตรอาหารต่อจำนวนการเกิดยอดจากแคลลัสของข้าว 4 พันธุ์ บนอาหารชักนำต้น 4 สูตร เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์.....	49
4.3.3 ปฏิบัติการระหว่างพันธุ์ข้าวและสูตรอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นจากแคลลัสของข้าว 4 พันธุ์ บนอาหารชักนำต้น 4 สูตร เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์.....	49
4.3.4 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสข้าวขาวดอกมะลิ 105 และน้ำสะกดย 19 ที่ผ่านการคัดเลือกทนเค็มบนอาหารสูตรชักนำต้นสูตร MS + BA 4 mg/l + IAA 1 mg/l + sucrose 3% เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์.....	50
4.3.5 ลักษณะการเจริญเติบโตและพัฒนาของต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้จากแคลลัสไม่ทนเค็มและแคลลัสทนเค็ม 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ในกระถางปลูก.....	51
4.3.6 ปริมาณโปรตีนรวม (มิลลิกรัมต่อกรัม) จากรากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกในสภาพธรรมดาและปลูกในสารละลายเกลือ.....	54
4.3.7 ปริมาณโซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม และคลอไรด์เป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (%Wt) ในใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และค่าอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียม (Na/K ratio).....	58

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
1 การวิเคราะห์หาเรียนรู้ของจำนวนและขนาดแคลลัสอายุ 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ที่ชักนำในอาหารสูตรต่าง ๆ ในสภาพที่มีแสงและไม่มีแสง.....	70
2 ขนาดเฉลี่ยของแคลลัสข้าวพันธุ์ต่าง ๆ อายุ 2 สัปดาห์และ 4 สัปดาห์ในสภาพที่มีแสงและไม่มีแสง.....	71
3 การวิเคราะห์หาเรียนรู้ของจำนวนแคลลัสที่คัดเลือกบนอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือ 5 ระดับ และวางเลี้ยงเป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 วัน.....	72
4 จำนวนแคลลัสข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารคัดเลือกที่มีความเข้มข้นเกลือ 5 ระดับ วางเลี้ยงเป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 วัน.....	73
5 จำนวนแคลลัสข้าวพันธุ์น้ำสะกวย 19 บนอาหารคัดเลือกที่มีความเข้มข้นเกลือ 5 ระดับ วางเลี้ยงเป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 วัน.....	74
6 คะแนนการพัฒนาของแคลลัสข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารคัดเลือกที่มีความเข้มข้นเกลือ 5 ระดับ วางเลี้ยงเป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 วัน.....	75
7 คะแนนการพัฒนาของแคลลัสข้าวพันธุ์น้ำสะกวย 19 บนอาหารคัดเลือกที่มีความเข้มข้นเกลือ 5 ระดับ วางเลี้ยงเป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 วัน.....	76
8 ระดับคะแนนการพัฒนาของแคลลัสข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารคัดเลือกเมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน เปรียบเทียบกับแคลลัสที่ไม่ได้ผ่านการคัดเลือกมาก่อน.....	77
9 ระดับคะแนนการพัฒนาของแคลลัสข้าวพันธุ์น้ำสะกวย 19 บนอาหารคัดเลือกเมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน เปรียบเทียบกับแคลลัสที่ไม่ได้ผ่านการคัดเลือกมาก่อน.....	78
10 การวิเคราะห์หาเรียนรู้ของจำนวนแคลลัสที่เกิดจุดสีเขียว ราก ยอด และเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นของข้าว 4 พันธุ์บนอาหารชักนำต้น 4 สูตร.....	79

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.3.1	เจลที่ย้อมด้วยเทคนิค silver stain แสดง band ของโปรตีนในรากข้าวที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ.....55
4.3.2	เจลที่ย้อมด้วยเทคนิค silver stain แสดง band ของโปรตีนในรากข้าวที่ปลูกในสารละลายเกลือ.....56
ภาพผนวกที่	หน้า
1	ภาพแสดงระดับคะแนนการพัฒนาของแคลลัสข้าวบนอาหารคัดเลือก.....80
2	แคลลัสที่มีจุดสีเขียวเกิดขึ้นบนก้อนแคลลัสเมื่อชักนำบนอาหารสูตร 1D1K และ 0.5D.....81
3	แคลลัสที่มีขนาดที่เหมาะสมจะถูกแยกยอดและรากออกไปเพิ่มปริมาณและคัดเลือกแคลลัสทนเค็ม.....81
4	แสดงแคลลัสชนิด friable ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน.....81
5	ขนาดของแคลลัสข้าวบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส.....82
6	ต้นข้าวที่ชักนำได้จากแคลลัสทนเค็มและแคลลัสที่ไม่ได้คัดเลือกทนเค็ม.....83
7	ต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ชักนำได้จากแคลลัสทนเค็ม 1.0 %.....84
8	ต้นข้าวที่เกิดจากแคลลัสทนเค็มสามารถสืบพันธุ์และติดเมล็ด.....85

บทที่ 1

บทนำ

ข้าวเป็นพืชไรที่มีพื้นที่ปลูกมากกว่าพืชชนิดอื่น ๆ คิดเป็นพื้นที่ประมาณ 63 ล้านไร่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ทำนามากที่สุดประมาณ 31 ล้านไร่ แต่ผลผลิตต่อไร่ค่อนข้างต่ำประมาณ 281 กิโลกรัม(สำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2540) สาเหตุที่ทำให้ผลผลิตต่ำเนื่องจากปัญหาความอุดมสมบูรณ์ของดินต่ำและยังมีปัญหาเรื่องดินเค็มในพื้นที่ทำนาของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปัญหาดินเค็มเกิดได้จาก 2 สาเหตุคือ เกิดจากการกระทำของมนุษย์ เช่น การทำเหมืองเกลือ การตัดไม้ทำลายป่า เป็นต้น ส่วนอีกปัจจัยหนึ่งเกิดจากสภาพธรรมชาติ เนื่องจากภายใต้ดินเป็นชั้นของหินเกลือและมีแหล่งน้ำใต้ดินเป็นพาหนะในการนำเกลือขึ้นมาจากการระเหยของน้ำที่ผิวดินโดยเฉพาะในฤดูแล้ง ทำให้พื้นดินบริเวณดังกล่าวมีความเค็ม

การเกิดอุทกภัยทางธรรมชาติเป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญในการแพร่กระจายของความเค็มที่ผิวดินไปตามแหล่งต่าง ๆ จากการศึกษาพบว่าดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นดินเกลือ 17% ของพื้นที่คิดเป็นพื้นที่ประมาณ 17.6 ล้านไร่ (สมศรี อรุณินท์, 2531 และ 2534) ดินเค็มเกิดขึ้นเป็นหย่อม ๆ และพบว่าเกิดขึ้นระหว่างรอยต่อของพื้นที่ปลูกข้าวกับปลูกพืชไร่ ดังนั้นจึงไม่เหมาะแก่การปลูกพืช ถ้าเค็มมากทำให้เกิดปัญหาต่อการเจริญเติบโตของพืช ทำให้พืชเหี่ยวและใบไหม้ เรียกปรากฏการณ์นี้ว่าพลาสโมไลซิส (plasmolysis) ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดการออสโมซิส (osmosis) กลับทาง อันเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารละลายเกลือในดินมาก เกิดแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) สูง ทำให้น้ำในดินมีแรงดึงดูดออสโมติกสูงกว่าในต้นพืช น้ำในต้นพืชจึงไหลกลับทาง ไม่สามารถดูดน้ำจากดินมาเลี้ยงลำต้นได้ เป็นผลทำให้ต้นพืชเหี่ยวและตายในที่สุด

นอกจากนี้การที่มีสารละลายเกลือในดินมาก ทำให้ดินมีสมบัติทางฟิสิกส์ไม่เหมาะสม เช่น ไม่จับตัวกันเป็นเม็ด ดินแน่นทึบ มีการระบายน้ำและอากาศไม่ดี ดินมีลักษณะแข็งเมื่อแห้ง ความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารต่ำเมื่อพีเอช (pH) สูง เนื่องจากธาตุอาหารถูกตรึงในรูปที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ได้ เช่น เหล็ก แมงกานีส ทองแดง สังกะสี และฟอสฟอรัส ทำให้พืชแสดงอาการขาดธาตุอาหาร นอกจากนี้ยังมีไอออนของเกลือบางชนิดสูง ซึ่งเป็นพิษต่อพืชอีกด้วย ได้แก่ ไอออนคลอไรด์ (Cl^-) ซัลเฟต (SO_4^{2-}) และไฮโดรเจนคาร์บอเนต (HCO_3^-)

เนื่องจากดินเค็มเป็นดินที่มีเกลืออยู่หลายชนิด จากการศึกษาพบว่า ดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือส่วนใหญ่เป็นดินที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณสูง (เพิ่มพูน กิริติสิกร, 2527) ดินเค็มทำให้ข้าวมีผลผลิตและคุณภาพต่ำ ต้นข้าวไม่เจริญเติบโตเท่าที่ควร การแตกกอน้อย ต้นเตี้ย ขอบใบม้วน

พับและแห้งตายในที่สุด ทั้งนี้เพราะปริมาณเกลือในดินมากทำให้ข้าวใช้น้ำมากกว่าปกติ (เพิ่มพูน กิริติกสิกร, 2527) จากปัญหาดังกล่าวได้มีการคิดวิธีการแก้ปัญหาดินเค็มของดินในบางส่วนลง แต่วิธีนี้ต้องลงทุนสูง วิธีการหนึ่งที่น่าสนใจในการแก้ปัญหาคือการปลูกพืชในดินเค็ม คือการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนเค็มแทนการปรับสภาพดิน ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ทนเค็มโดยใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จึงเป็นแนวทางที่ดีวิธีหนึ่งที่ช่วยแก้ไขปัญหาดินที่ยั่งยืนได้

วัตถุประสงค์

เพื่อคัดเลือกพันธุ์ข้าวให้มีความทนเค็มโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ดินเค็ม

ดินเค็ม เป็นดินที่มีเกลือที่ละลายน้ำได้อยู่มาจนเป็นอันตรายต่อการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งเกลือในดินมีอยู่หลายชนิด เช่น ชนิดที่ละลายน้ำได้ดี ชนิดที่ละลายน้ำได้บ้าง และชนิดที่ละลายน้ำได้น้อย เกลือในดินส่วนใหญ่เป็นเกลือพวก โซเดียม แคลเซียม โพแทสเซียม ในรูปของ คลอไรด์ ซัลเฟต ไบคาร์บอเนต และไนเตรด เกลือเหล่านี้เมื่อละลายน้ำมีพิษต่างกัน อาจเป็นกลาง เป็นกรดอย่างอ่อนหรือเป็นด่างอย่างอ่อนก็ได้ สำหรับชนิดเกลือของดินเค็มภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนใหญ่เป็นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (เพิ่มพูน กิริติกสิกร, 2527)

มาตรฐานในการวัดความเป็นดินเค็ม วัดจากการมีเกลือมากพอที่จะทำให้ผลผลิตพืชลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ หรือใช้ค่าความเข้มข้นของเกลือในสารละลายดินและค่าเปอร์เซ็นต์ของโซเดียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน (ESP : exchangeable sodium percentage) เป็นตัวจำแนก โดยทั่วไปการวัดค่าความเข้มข้นของเกลือนิยมวัดในรูปค่าการนำไฟฟ้า (EC : electrical conductivity) มีหน่วยวัดเป็นโมห์ต่อเซนติเมตร(mho/cm) หรือในระบบหน่วยสากล (SI unit) ใช้หน่วยซีเมนต่อเมตร (siemens/m : S/m) แทน โดยที่ 1 ซีเมนเท่ากับ 1 โมห์ ดังนั้น 1 ซีเมนต่อเมตร เท่ากับ 10 มิลลิโมห์ต่อเซนติเมตร (mmho/cm) การวัดค่าการนำไฟฟ้า ทำได้โดยวัดน้ำที่สกัดจากดินที่ให้อิ่มตัวด้วยน้ำ (saturated soil paste) ซึ่งมีลักษณะเหมือนดินโคลนและ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ถ้ามีค่าสูงกว่า 2 มิลลิซีเมนต่อเซนติเมตร (mS/cm) จัดว่าเป็นดินเค็ม (ยงยุทธ โอสดสภา, 2524; ถวิล ครุฑกุล, 2531 ; และสมศรี อรุณินท์, 2539)

ดินเค็มอาจจำแนกได้เป็น 3 ชนิด คือ

1. ดินเกลือ (saline soil) คือดินที่มีค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายดินที่สกัดจากดินที่อิ่มตัวด้วยน้ำสูงกว่า 2 เดซิซีเมนต่อเมตร (dS/m) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมที่แลกเปลี่ยนได้น้อยกว่า 15 และพีเอชมักจะน้อยกว่า 8.5 เกลือที่พบบ่อยเป็นเกลือโซเดียมคลอไรด์และซัลเฟตของโซเดียม แคลเซียมและแมกนีเซียม
2. ดินโซดิกหรือดินด่าง (sodic soil) คือ ดินที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ของโซเดียมที่แลกเปลี่ยนได้มากกว่า 15 ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายดินที่สกัดจากดินที่อิ่มตัวด้วยน้ำต่ำกว่า 2 เดซิซีเมนต่อเมตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีค่าพีเอชที่วัดได้อยู่ระหว่าง 8.5-10 มักพบในเขตกึ่งแห้งแล้ง เกลือที่พบบ่อยเป็นเกลือคาร์บอเนตของโซเดียม ซึ่งก่อให้เกิดการฟุ้งกระจายของ

อนุภาคดิน ทำให้ดินเปลี่ยนไปอยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะกับการเคลื่อนที่ของน้ำและการไถพรวน นอกจากนี้ เกิดความไม่สมดุลของธาตุ โดยเฉพาะความเป็นพิษของโบรอนและโมลิบดีนัม หรือการขาดธาตุสังกะสี เป็นต้น

3. ดินเค็มโซดิก (saline-sodic soil) คือดินที่มีเกลือปริมาณมากเกินไป มีค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายดินที่สกัดจากดินที่อิ่มตัวด้วยน้ำมากกว่า 2 เดซิซีเมนต่อเมตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โซเดียมที่แลกเปลี่ยนได้มากกว่า 15

ค่าการนำไฟฟ้าของดินที่สกัดได้จากดินที่อิ่มตัวด้วยน้ำ นำมาใช้ประเมินปริมาณเกลือและอิทธิพลของเกลือในดินต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช ดังนี้

EC (dS/m)	เกลือในดิน (%)	ระดับความเค็ม ของดิน	อิทธิพลต่อพืช
2	< 0.1	ไม่เค็ม	ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช
2-4	0.1-0.2	เค็มเล็กน้อย	มีผลต่อพืชที่ไม่ทนเค็ม
4-8	0.2-0.4	เค็มปานกลาง	มีผลต่อพืชหลายชนิด
8-16	0.4-0.8	เค็มมาก	พืชทนเค็มเท่านั้นที่ยังเจริญเติบโตได้ดี
16	> 0.8	เค็มจัด	พืชทนเค็มน้อยชนิดมากที่เจริญเติบโตได้ดี

(ที่มา: สมศรี อรุณินท์, 2537)

ซึ่งค่าความเค็มที่ลดผลผลิตข้าวลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ คือ ค่า EC 8 เดซิซีเมนต่อเมตร

2. การทนเค็มของพืช

ความเค็มมีผลกระทบต่อขบวนการเมตาโบลิซึมของพืชในหลาย ๆ ลักษณะและยังส่งผลให้พืชมีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางกายวิภาคและลักษณะทางสัณฐานวิทยา อย่างไรก็ตามพืชชนิดต่าง ๆ จะมีความสามารถในการทนเค็มแตกต่างกันไป แม้แต่พืชชนิดเดียวกันแต่ต่างพันธุ์กัน รวมถึงในพันธุ์เดียวกันก็มีความทนเค็มแตกต่างกันไปตามระยะการเจริญเติบโต ดังนั้นจึงอาจแบ่งพืชตามความเค็มเป็น 2 กลุ่ม (Flower *et al.*, 1977) ดังนี้

พืชทนเค็ม (halophyte) หมายถึง พืชที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในที่ที่มีเกลือในปริมาณสูง พืชเหล่านี้สามารถปรับตัวได้อย่างรวดเร็วตลอดช่วงการเจริญเติบโต

พืชไม่ทนเค็ม (glycophyte หรือ nonhalophyte) หมายถึง พืชที่เจริญเติบโตได้ดีในแหล่งที่ไม่มีเกลือ (nonsaline habitat) แต่สามารถปรับตัวได้บ้างในบางสภาพดินเค็ม

กลไกการทนเค็มของพืช

1. การอวบน้ำ (succulence) โดยเพิ่มปริมาณน้ำภายในเซลล์ทำให้ความเข้มข้นของเกลือภายในเซลล์ลดลง
2. การมีต่อมเกลือหรือ vesiculated hair เป็นแหล่งสะสมเกลือ หรือโดยการที่พืชเคลื่อนย้ายเกลือไปสะสมในแวคิวโอล เป็นการหลีกเลี่ยงการสะสมเกลือในไซโตพลาสซึมในระดับที่เป็นพิษ
3. การสร้างสารเคลือบใบ สร้างใบให้หนาขึ้นเพื่อเก็บน้ำไว้ หรือมีใบขนาดเล็ก ขนใบเก็บน้ำ หรือแอเรนไคมา
4. รากพืชสามารถดูดเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำไปใช้ได้โดยไม่ดูดสารที่เป็นเกลือ (exclude)
5. พืชมีการปรับออสโมติกโดยการสะสมสารละลายออกานิกในไซโตซอล เช่น น้ำตาล กรดอะมิโน โพรลีน หรือไกลซีนเบตาอิน หรือการสะสมไอออนโดยเฉพาะโซเดียมและคลอไรด์ ไอออนเพื่อเป็นออสโมไลต์ (osmolyte)
6. การเปลี่ยนแปลงเซลล์ชนิดต่าง ๆ ภายในพืชเพื่อปรับตัวให้เหมาะสมกับแหล่งที่อยู่ที่มีเกลือ
7. เพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำโดยการที่พืชลดความต้านทานของเซลล์ชั้นมีไซฟิลล์ต่อคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อเพิ่มความต้านทานของปากใบ
8. การดูดซึมและการเคลื่อนย้าย (adsorption and translocation) โดยดูดเกลือเข้ามาสะสมในบริเวณรากหรือลำต้นเพื่อป้องกันไม่ให้เกลือไปสะสมที่ใบและยอด
9. กลไกการทนทาน (tolerance) พืชสามารถป้องกันหรือสร้างระบบเอนไซม์ต่าง ๆ ที่มีความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นของเกลือที่สูง โดยการที่เอนไซม์บางชนิดยังมีกิจกรรมได้ปกติแม้จะได้รับอิทธิพลจากความเค็ม

3. ความเค็มและการเจริญเติบโตของข้าว

ชัยนาม ดิสถาพร (อ้างถึงใน สมศรี อรุณันท์, 2532) ได้รวบรวมผลของความเค็มที่มีต่อการเจริญเติบโตของข้าว ความสามารถในการทนเค็มของข้าวจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตและสายพันธุ์

ในระยะต้นอ่อน ข้าวจะไวต่อความเค็มมาก ในระยะที่เป็นต้นอ่อนซึ่งมีใบประมาณ 2-3 ใบ ค่าวิกฤติความเค็มที่ทำให้ผลผลิตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 6 มิลลิโมลต่อเซนติเมตร ทำให้ความสูง ความยาวของรากและการงอกรากใหม่ลดลง ใบไหม้ ม้วนงอ ปลายใบเป็นสีน้ำตาลจนกระทั่งตายไป โดยทั่วไปความเสียหายจะเกิดกับใบที่แก่ก่อน ใบอ่อนก็แสดงอาการคล้ายกับใบแก่

แต่รุนแรงน้อยกว่า นอกจากนี้ความเค็มยังมีผลยับยั้งการยึดตัวของใบและการสร้างใบใหม่ ซึ่งไปมีผลต่อขบวนการสังเคราะห์แสงของข้าว

ระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ เป็นระยะที่ข้าวทนทานต่อความเค็ม ความเค็มจะสัมพันธ์กับอายุของต้นกล้า ซึ่งข้าวจะทนเค็มมากที่สุดเมื่ออายุ 90 วัน ความเค็มจะยับยั้งการเจริญเติบโตส่วนยอดมากกว่าส่วนราก สำหรับในส่วนของราก พบว่าความเค็มมีผลต่อการยึดตัวมากกว่าการสร้างน้ำหนักของราก

ในระยะสร้างดอกและเมล็ด ความเค็มมีผลต่อการลดลงของผลผลิตมากกว่าในระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ โดยความเค็มจะมีผลต่อการพัฒนาการเกิดช่อดอกและลดความสามารถในการผสมเกสรของข้าว ลดจำนวนรวงต่อกอ ความยาวของรวง จำนวนเมล็ดต่อรวง น้ำหนัก 1000 เมล็ด เปอร์เซ็นต์เมล็ดดีและผลผลิต

4. แคลลัสข้าว

แคลลัสที่ชักนำจากเมล็ดข้าวเกิดจากบริเวณที่เรียกว่า scutellum ซึ่งอยู่บริเวณส่วนฐานที่ต้นกล้างอกขึ้นมาและแคลลัสเกิดขึ้นพร้อมกับการงอกของต้นกล้า (อรัญญา ตันติปัญญพร และคณะ, 2531 (อ้างถึงโดย พรทิพย์ ชีวะเศรษฐกรรม, 2537); ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และคณะ, 2537; Tsukahara and Hirokawa, 1992; Rueb *et al.* (1994); Tsukahara *et al.*, 1996) Scutellum คือใบเลี้ยงของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวซึ่งมีเพียงอันเดียวและมีขนาดใหญ่ มีหน้าที่เป็นที่เก็บสะสมอาหาร ดูดซับอาหารที่ย่อยแล้วส่งต่อไปให้กับจุดเจริญของคัพภะ และเป็นอวัยวะที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง

เบญจวรรณ ยันต์วิเศษภักดี และคณะ (2543) ศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาของการเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บนอาหาร LS ที่มี 2,4-D และ kinetin 2 และ 0.5 mg/l ตามลำดับ และตัดแคลลัสอายุต่าง ๆ เป็นชิ้นบาง ๆ ย้อมสีและศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าแคลลัสเกิดจากเซลล์ที่มีไซโทพลาสซึมเข้มข้นในเนื้อเยื่อบริเวณท่อน้ำเลี้ยง ในส่วนของมิโซคอทิลและเอพิเทเลียมของใบเลี้ยง Nabors *et al.* (1983) และ Chowdhary *et al.* (1993) แบ่งแคลลัสเป็น 2 ชนิด ชนิดแรก แคลลัสจะมีลักษณะเป็นก้อนกลม (nodular) และเซลล์เกาะกันแน่น เรียกว่า embryogenic callus แคลลัสอีกชนิดมีเซลล์ที่เกาะกันอย่างหลวม ๆ เซลล์มีลักษณะยาว เป็นโพรง (tubular) เรียกว่า non-embryogenic callus พรทิพย์ ชีวะเศรษฐกรรม (2537) และ สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล และคณะ (2537) พบแคลลัส 2 ชนิด ได้แก่ compact callus มีลักษณะเซลล์เกาะกันแน่น ผิวของเซลล์จะดูแห้ง ส่วนอีกแบบคือ friable callus เซลล์เกาะกันหลวม ๆ และผิวของเซลล์ดูเป็นมัน แต่ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และคณะ (2537) พบแคลลัสชนิดผสมของแคลลัสทั้งสองชนิดที่กล่าวมาแล้ว และพบอีกว่า compact callus เจริญเติบโตช้ากว่า friable callus แต่สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ง่ายแม้จะผ่านการเพาะเลี้ยงชั่วระยะเวลาหนึ่ง ส่วน Rueb *et al.* (1994) ได้แบ่งแคล-

ลัสเป็น 3 ชนิด ชนิดที่ 1 เรียกว่า embryogenic callus มีลักษณะแข็ง เซลล์เกาะกันแน่นและเป็นก้อนกลม ชนิดที่ 2 เรียกว่า non-embryogenic callus มีลักษณะของเซลล์ที่เกาะกันอย่างหลวมใส (translucent) และค่อนข้างบาง ซึ่งเซลล์ชนิดนี้จะไม่มีการพัฒนาไปเป็นคัพพะ และชนิดที่ 3 เรียกว่า rhizogenic callus ซึ่งเกือบทั้งก้อนจะประกอบด้วย root primordia

5. การปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนเค็มโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Chanprame (1985) ได้คัดเลือกข้าวทนเค็มจากเซลล์ที่ชักนำมาจากอับละอองเกสรของข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ข้าวตาแห้ง 17 และเหลืองใหญ่ 148 ในอาหารสูตร N6 ที่มี 2,4-D 2 mg/l และ sucrose 3% เพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 4-8 สัปดาห์ จึงนำเซลล์มาคัดเลือกทนเค็มในอาหารสูตร MS ที่มี NAA 1 mg/l, kinetin 4 mg/l และ sucrose 3% ในเกลือ 5 ระดับ คือ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% เป็นเวลา 30 และ 60 วัน แล้วจึงย้ายเซลล์ที่รอดชีวิตลงอาหารที่ปราศจากเกลือเพื่อชักนำให้เกิดต้นในอาหาร MS ที่มี NAA 1 mg/l และ kinetin 4 mg/l พบว่า เมื่อระดับของเกลือเพิ่มขึ้นและระยะเวลาที่ใช้ในการคัดเลือกนานขึ้น การเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์ลดลง หรือมีการพัฒนาที่ผิดปกติจนถึงตาย แต่ได้เซลล์ทนเค็มระดับ 0.5-1.0% ของข้าวทั้ง 3 พันธุ์ และสามารถชักนำได้ทั้งต้นปกติ ต้นเผือกและราก

Krishnaraj and Sreerangasamy (1993) ได้เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวพันธุ์ IR 50 ในอาหารสูตร N6 ที่เติมน้ำมะพร้าว 5%, 2,4-D 9.1 μ M, kinetin 2.3 μ M, sorbitol 3%, sucrose 2% และ agar 0.8% เลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 45 วัน แล้วย้ายเซลล์ลงอาหาร MS ที่มี 2,4-D 4.5 μ M, น้ำมะพร้าว 5%, sorbitol 3%, sucrose 2% และ agar 0.8% นาน 1 เดือน จึงทำการคัดพันธุ์ทนเค็มในอาหาร MS ร่วมกับ 2,4-D 4.5 μ M ที่มีเกลือ 0.0-1.5% เลี้ยงในที่มืด 3-4 สัปดาห์ พบว่าที่ระดับเกลือ 0.6-0.9% มีเซลล์รอดชีวิตอยู่ได้แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นข้าวได้ และที่ระดับ 0.3-0.5% ได้เซลล์ที่ทนเค็มซึ่งสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ แต่มีเปอร์เซ็นต์ ของต้นเผือกสูง

Hanning and Nabors (1989) ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าว 5 พันธุ์ ได้แก่ Calrose, Giza 159, IR 36, Mahsuri และ Pokkali ใช้อาหาร LS ที่มี 2,4-D 0.5-1.0 mg/l, kinetin 0.2-0.5 mg/l, tryptophan 50 หรือ 100 mg/l และ sucrose 4% ขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าว นาน 28 วัน จึงเปลี่ยนอาหาร แล้วคัดเลือกเซลล์บนอาหารที่เติมเกลือ 0, 0.6 และ 1.0% ได้เซลล์ทนเค็มทั้ง 2 ระดับความเข้มข้นเกลือ จากนั้นได้ชักนำต้นจากเซลล์ทนเค็มเหล่านี้ ซึ่งเซลล์ที่ทนเค็ม 0.6% สามารถเกิดยอดได้มากกว่าเซลล์ที่ทนเค็ม 1.0% และในปีเดียวกัน Vajrabhaya *et al.* (1989) ได้รายงานการคัดเลือกพันธุ์ข้าวทนเค็มจากข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิและพันธุ์เหลืองประทิว โดยการชักนำเซลล์ในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 1 mg/l และ kinetin 0.3 mg/l ในที่มืด เป็นเวลา 2-4 สัปดาห์ จึงคัดเลือกเซลล์ทนเค็มในอาหารสูตรเดิมที่เติมเกลือ 1 และ 2% ได้เซลล์ที่รอดชีวิตจำนวน 38 จาก 50,000 ก้อน

จากนั้นจึงนำไปชักนำให้เป็นต้นในอาหารสูตร White's ดัดแปลงที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ น้ำมะพร้าว 100 ml/l kinetin 3 mg/l และ IAA 1 mg/l พบว่าพันธุ์เหลืองประทิวสามารถชักนำให้เป็นต้นได้ 9 ต้น ในขณะที่พันธุ์ขาวดอกมะลิได้เพียง 3 ต้นและไม่พบความผิดปกติของต้นข้าวเหล่านี้ เมื่อนำต้นข้าวมาปลูกในสารละลายที่มีเกลือความเข้มข้น 0.5% นาน 4 สัปดาห์ พันธุ์ขาวดอกมะลิมีลักษณะทนเค็มและรอด 19.8% และรุ่นลูก (R1) มีอัตราการรอดชีวิต 53.3% ขณะที่พันธุ์เหลืองประทิวรุ่น R2 มีอัตราการรอดชีวิต 29.9-63.9% และมีอัตราการรอดชีวิตของต้นข้าวมากกว่า 90% ในอีกสองรุ่นถัดมา

นอกจากนี้ยังได้มีผู้ศึกษาการทนเค็มของพืชชนิดอื่น ๆ โดยชาญวิทย์ ม่วงมิตร (2537) นำใบอ่อนอ้อยพันธุ์ Q83 มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมเกลือ พบว่าแคลสที่คัดเลือกได้สามารถทนความเค็มระดับ 0-1.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ต้นที่ชักนำได้นั้นมาจากอาหารที่มีเกลือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ถวัลย์รัตน์ ผ่องใส (2528) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบมะเขือเทศพันธุ์ VF134-1-2 และพันธุ์ P5-237 บนอาหารสูตร MS ที่เติมเกลือ พบว่าเฉพาะพันธุ์ VF134-1-2 สามารถเกิดแคลสได้บนอาหารที่เติมเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ แต่เนื้อเยื่อของมะเขือเทศทั้งสองพันธุ์นี้สามารถชักนำให้เกิดตายอดได้บนอาหารที่เติมเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำให้ยอดเกิดรากเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

เขวภา จิรเกียรติกุล (2536) และสุภัทรา สุขเมธิ (2533) ได้ใช้รังสีแกมมาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของหม่อนน้อยและหม่อนคุณไพและกล้วยหอมพันธุ์ Williams ตามลำดับ แล้วคัดพันธุ์ทนเค็มบนอาหารสูตร MS ที่เติมเกลือ ได้ต้นหม่อนทั้งสองพันธุ์ที่สามารถทนเค็มได้ที่ระดับ 2 เปอร์เซ็นต์ และกล้วยหอมพันธุ์ Williams ที่ทนเค็มได้ในระดับ 0.4 เปอร์เซ็นต์ อังคณา ศีตะโกเศศ (2528) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายราก mesocotyl ขั้วและใบอ่อนของต้นกล้า และกัพพะของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 1 บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมเกลือ พบว่าแคลสที่เกิดบนอาหารที่เติมเกลือ 0.5-1.0 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้

นอกจากนี้ การปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนเค็มโดยใช้วิธีการคัดเลือกในอาหารที่มีเกลือกับพืชชนิดอื่น จนได้สายพันธุ์ที่ทนเค็มกว่าพันธุ์เดิม คือ ส้ม (Garcia-Agustin and Primo-Millo, 1995) และถั่วอาหารสัตว์ (Chaudhary *et al.*, 1996 และ 1997) สำหรับส้มทำได้โดยการนำไข่ (ovule) ของส้มพันธุ์ Troyer citrange ที่ไม่ได้รับการผสมเกสรมาจุ่มในสาร ethyl methane sulphonate (EMS) เพื่อชักนำให้เกิดการ กลายพันธุ์ จากนั้นจึงชักนำต้นจากกัพพะที่พัฒนามาจากเนื้อเยื่อนucellus ของไข่ และคัดเลือกต้นทนเค็มโดยการเพาะเลี้ยงต้นส้มในสารละลาย (nutrient solution) ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 45 mM เปรียบเทียบกับต้นส้มที่ไม่ได้ทำให้กลายพันธุ์ พบว่าต้นที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าต้นที่ไม่กลายพันธุ์ นอกจากนี้ ใบได้รับความเสียหายจากเกลือในสารละลายที่มีเกลือน้อยกว่า และมีความเข้มข้นของ Cl^- และ Na^+ ในใบน้อยกว่าด้วย ต้นส้มที่ผ่านการคัดเลือกมีการสะสม Na^+ ในยอดและรากมากกว่า ซึ่งสัมพันธ์กับการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของ K^+ สามารถสรุปได้ว่า ต้นที่ผ่านการคัดเลือกสามารถทนเค็มได้ด้วยการสะสม

Na^+ ที่ใบ โดยให้ความสำคัญกับ Na^+ ที่ยอดและราก ส่วนถั่วอาหารสัตว์นั้น ได้ทำเซลล์แขวนลอยจากใบอ่อนแล้วจึงเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 200, 250 และ 300 mol/m³ ดันที่ชักนำได้จาก cell line ที่ผ่านการคัดเลือก สามารถทนเค็มได้มากกว่าดันที่ไม่ได้ผ่านการคัดเลือก (*Medicago media* พันธุ์ Rambler และพันธุ์อื่น ๆ และ *M. sativa* 4 พันธุ์) ดันที่ทนเค็มแสดงให้เห็นถึงการเพิ่ม exclusion ของ Na^+ และ Cl^- เมื่อเปรียบเทียบกับดันที่ทนเค็ม 250 mol/m³ กับพันธุ์ Rambler ที่ไม่ได้ผ่านการคัดเลือก พบว่าดันที่ผ่านการคัดเลือกสามารถรักษา Na^+/K^+ ได้ต่ำกว่าดันที่ไม่ได้คัดเลือก

6. การชักนำให้เกิดต้น

การชักนำต้นจากเนื้อเยื่อข้าวเป็นอุปสรรคอย่างหนึ่งของความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว โดยเฉพาะข้าวในกลุ่ม Indica ที่มีความสามารถในการชักนำให้เกิดต้นได้ต่ำกว่าข้าวกลุ่ม Japonica (Peterson and Smith, 1991; Rance *et al.*, 1994; Jain *et al.*, 1996; Morita *et al.*, 1999) มีหลายปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว ได้แก่ ลักษณะทางพันธุกรรม ระยะเวลาของชิ้นส่วนพืชที่ใช้ อัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต กรดอะมิโน ความเข้มข้นที่เหมาะสมของวุ้น (gelling agent) แหล่งของคาร์โบไฮเดรต และการทำให้แห้ง (dehydration) (Tsukahara and Hirosawa, 1992; Jain *et al.*, 1996; Chand and Sahrawat, 2001)

Tsukahara and Hirosawa (1992) ศึกษาถึงผลของการทำให้แคลลัสแห้งก่อนการชักนำต้นร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ ที่มีผลต่อการส่งเสริมการเกิดต้นจากแคลลัสข้าวพันธุ์ Sasanishiki โดยใช้อาหารสูตร N6 ที่มี proline 12 mM, casein hydrolysate 0.1 g/l, 2,4-D 4 mg/l, sucrose 10 g/l, sorbitol 30 g/l และ gellan gum 2 g/l ในที่มีด แล้วทำ suspension culture โดยใช้แคลลัสปริมาณ 1 กรัม เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิมในที่มีด จากนั้นจึงนำแคลลัสวางตากบนกระดาษกรอง Whatmann ที่ฆ่าเชื้อแล้วในจานแก้ว เก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-96 ชั่วโมง แล้วจึงย้ายแคลลัสเหล่านั้นลงบนอาหารสูตรชักนำต้นของ Abe and Futsuhara (1986) (อ้างถึงใน Tsukahara and Hirosawa, 1992) เลี้ยงในที่มืด 16 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30°C เปรียบเทียบกับ 8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าการลดปริมาณน้ำด้วยการตากแคลลัสให้แห้งร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ จะช่วยเพิ่มการเกิดต้นจากแคลลัสได้ ซึ่งระยะเวลาที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 24-72 ชั่วโมง ทำให้อัตราการเกิดต้นเพิ่มขึ้นถึง 47% และคงที่อยู่เช่นนั้น แคลลัสมีค่า water content 49% ผลการทดลองนี้ได้ยืนยันถึงค่า water content ของแคลลัสที่ 50% เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดต้น ถ้ามีค่าสูงกว่านี้จะทำให้แคลลัสตาย นอกจากนี้ยังได้ศึกษาถึงผลของ abscisic acid (ABA) และ mannitol ที่มีต่ออัตราการเกิดต้นในอาหารสูตรชักนำ แต่ไม่พบความแตกต่าง ถึงแม้จะมีรายงานว่า

พืชที่ได้รับความเครียดเนื่องจากการขาดน้ำจะมีกิจกรรมการสังเคราะห์ ABA สูง แต่การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า ABA ที่เนื้อเยื่อข้าวได้รับจากภายนอกไม่สามารถใช้แทนการทำให้แห้งได้ ส่วน mannitol นั้นถึงแม้จะไปลดปริมาณน้ำของแคลลัสลง 50.8% ก็ตาม แต่ก็ลดอัตราการเกิดต้นลงด้วย

ในข้าวกลุ่ม Indica ได้มีผู้ศึกษาถึงการชักนำต้นจากแคลลัส ประภา ศรีพิจิตต์ และพรทิพย์ ชิวเศรษฐธรรม (2537) ได้ศึกษาการพัฒนาเป็นต้นของแคลลัสที่เจริญมาจากคัพพะข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยการชักนำแคลลัสจากอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 2 mg/l และ sucrose 3% ในที่มีแสง นาน 1 เดือน ได้แคลลัสจำนวนมาก แต่ถ้าใช้อาหารชักนำสูตร MS ที่มี 2,4-D 2 mg/l, casein hydrolysate 300 mg/l และ sucrose 3% จะได้แคลลัสที่มีขนาดใหญ่ถึงแม้อัตราการเกิดแคลลัสจะลดลงเล็กน้อยก็ตาม จากนั้นจึงศึกษาเปรียบเทียบการชักนำต้นจากแคลลัสที่ผ่านการทำให้แห้งและไม่ทำแห้งในสูตรอาหารต่าง ๆ แคลลัสข้าวที่ไม่ผ่านการทำให้แห้ง จะมีอัตราการเกิดต้นต่ำมาก ประมาณ 2-3% ในอาหารสูตร MS ที่มี IAA 1 mg/l, BA 1 mg/l หรือ kinetin 4 mg/l ส่วนแคลลัสที่ผ่านการทำให้แห้งสามารถพัฒนาเป็นยอดได้ในอาหารชักนำต้นทุกสูตร แต่ที่ดีที่สุดคือ MS ที่มี IAA 1 mg/l และ BA 4 mg/l ซึ่งจะให้อัตราการเกิดต้นสูงที่สุด แล้วจึงทดลองหาสูตรอาหารเพื่อเพิ่มอัตราการเกิดยอด ได้สูตรที่ดีที่สุด 2 สูตร คือ MS ที่มี IAA 1 mg/l และ BA 4 mg/l และ MS ที่มี IAA 1 mg/l, BA 4 mg/l และ Yeast extract 1000 mg/l จากนั้นได้ย้ายต้นลงบนอาหารชักนำรากสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

Rance *et al.* (1994) ได้รายงานผลการศึกษาที่คล้ายคลึงกันในข้าวพันธุ์ TN 1, IR 64 และ IR 72 ด้วยการชักนำแคลลัสในอาหารสูตร NB ที่ประกอบด้วย N6 inorganic salts, B5 micro elements และวิตามิน, casein hydrolysate 300 mg/l, proline 300 mg/l, glutamine 300 mg/l, sucrose 30 g/l, agarose 4 g/l, 2,4-D 2 mg/l, NAA 1 mg/l และ BAP 1 mg/l แล้วจึงนำแคลลัสวางตากบนกระดาษ Whatmann ฆ่าเชื้อในจานแก้ว เก็บในที่มืด เป็นเวลา 1-99 ชั่วโมง จากนั้นจึงย้ายลงอาหารชักนำต้นที่ประกอบด้วย NB กับ NAA 1 mg/l และ BAP 3 mg/l เป็นเวลา 12 วัน ในที่มีแสง 16 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25°C แล้วจึงเปลี่ยนลงอาหาร 1/2 MS ที่มี NAA 1 mg/l และ BAP 1 mg/l เมื่อเกิดใบและรากจึงย้ายลงเลี้ยงในกล่อง Magenta ที่มีอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต แล้วสุ่มต้นไปปลูกเพื่อศึกษาลักษณะภายนอก และความสมบูรณ์พันธุ์ของต้นที่ชักนำได้ พบว่าการทำให้แห้งที่ 10-70% เป็นเวลา 1-76 ชั่วโมง จะมีอัตราการเกิดต้น 45-78% อัตราการเกิดต้นสูงสุด 78% ได้จากการทำให้แห้ง 40% ใช้เวลา 22 ชั่วโมง จากนั้นได้เปรียบเทียบการเกิดต้นระหว่างแคลลัสจากเมล็ดโดยตรงและแคลลัสที่ผ่านการ subculture (โดยการวางเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร NB เปลี่ยนอาหารทุก 20 วัน และเก็บในที่มืด แคลลัสก้อนแม่จะถูกแยกออกจากก้อนเกิดใหม่และเลี้ยงแยกกัน) พบว่าแคลลัสที่ผ่านการ subculture เมื่อนำมาตากให้แห้งจะมีการเกิดต้น

ได้ดีกว่า แต่ให้อัตราการเกิดต้นน้อยกว่าแคลลัสจากเมล็ด และแคลลัสที่ผ่านการ subculture มีต้นเพื่อกเกิดขึ้นด้วย ในขณะที่แคลลัสจากเมล็ดไม่พบว่ามีต้นเพื่อกเกิดขึ้น

ในปี 1996 Jain *et al.* ได้ศึกษาถึงปัจจัยที่ส่งเสริมการเกิดต้นจากการขาดน้ำของข้าวทั้งกลุ่ม Indica และ Japonica พันธุ์ IR 43, Pusa Basmati 1, Basmati 385 และ Taipei 309 โดยการชักนำแคลลัสจากอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม 2,4-D 2.5 mg/l และ agarose 0.5% จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว 2 สูตร ได้แก่ สูตร LS ที่เติม 2,4-D 2 mg/l สำหรับพันธุ์ Taipei 309 และสูตร LS ที่มี maltose 3% และ L-proline 560 mg/l เลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 26°C เปลี่ยนอาหารทุก 3 วัน สัปดาห์ที่ 8 จึงนำแคลลัสแขวนลอยมา กรองด้วยตะแกรงไนลอนขนาด 500 ไมโครเมตร แล้วนำมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว หลังจากนั้น 4 วันจึงนำแคลลัสแขวนลอยปริมาตร 0.5 ml มาเกลี่ยบนผิวหน้าของอาหารแข็ง LS เก็บในที่มืด อุณหภูมิ 26°C ประมาณ 2-3 สัปดาห์ จะได้แคลลัสขนาดประมาณ 1.0 มม. และนำไปใช้ในการศึกษาผลของ agarose และ mannitol ความเข้มข้นต่าง ๆ และการทำให้แคลลัสแห้ง โดยวางตากแคลลัสบน กระดาษ Whatmann ฆ่าเชื้อและเก็บในที่มืด 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 26°C ที่มีผลต่อการเกิดยอดของแคลลัส ย้ายแคลลัสลงอาหารสูตร MS ที่มี maltose 3%, kinetin 2 mg/l, NAA 0.5% และ agarose 0.5% นำแคลลัสทั้ง 3 กลุ่มเก็บไว้ในที่มืด 2 สัปดาห์ อุณหภูมิ 26°C จึงย้ายไปเลี้ยงในที่มืด 16 ชั่วโมงอีก 2 สัปดาห์ ต้นข้าวที่ได้จะถูกชักนำรากในอาหาร MS ที่มี NAA 1.5 mg/l และ phytagel 0.2% ในกล่อง Magenta ในที่มืด อุณหภูมิ 26°C นาน 3 สัปดาห์ จึงย้ายปลูกในเรือนเพาะชำและปลูกลงดินหลังจากนั้น 1 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่าทั้ง 3 ปัจจัยมีผลในการลดปริมาณน้ำของแคลลัสลง 3-19% การทำให้แคลลัสแห้งโดยใช้เวลา 24 ชั่วโมง จะช่วยเพิ่มการเกิดต้นจากเดิม 1 เท่าในข้าวทั้ง 2 กลุ่ม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ agarose ในอาหารจาก 0.5% เป็น 1.0% จะได้จำนวนยอดเกิดเพิ่มขึ้นจากข้าวทุกพันธุ์ ส่วน mannitol อัตรา 0.1-0.2 M เพิ่มการเกิดยอดของข้าว Pusa Basmati 1 เพียงพันธุ์เดียว แต่ที่ความเข้มข้น 0.4 M จะลดการเกิดยอดของข้าวทุกพันธุ์ แต่เมื่อย้ายแคลลัสออกจากอาหารที่มี mannitol ลงในอาหารที่ปราศจาก mannitol จะมียอดเกิดมากขึ้น ต้นข้าวที่ได้จากการทดลองนี้ เมื่อนำไปปลูกในเรือนเพาะชำมีอัตราการรอดชีวิต 100% และมีลักษณะภายนอกปกติ ออกดอกและติดเมล็ด 125-160 วันหลังย้ายปลูก

Chand and Sahrawat (2001) ศึกษาการชักนำต้นด้วยวิธีการเดียวกันในข้าวกลุ่ม Indica พันธุ์ Safari 17 และ Kasturi แต่ได้ชักนำแคลลัสจากช่อดอกอ่อนในอาหารสูตร MS ร่วมกับกรดอะมิโนและวิตามินของ Gamborg, BAP 4.4 μ M, sucrose 3%, agar 0.8% และ 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ เลี้ยงในที่มืด 16 ชั่วโมง อุณหภูมิ 24°C นาน 9 สัปดาห์ จากนั้นนำแคลลัสที่ได้มาทำให้แห้งโดยวางบนกระดาษ Whatmann ฆ่าเชื้อ เก็บในที่มืด อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง แล้วย้ายลงอาหารชักนำต้น MS ที่มี BAP 17.6 μ M และ 2,4-D 1.12 μ M ในที่มืด 16 ชั่วโมง อุณหภูมิ 24°C นาน 8 สัปดาห์ จึงย้ายต้นลงอาหารชักนำราก MS ที่มี IBA 4.9 μ M ได้ต้น

สมบูรณ์ที่พร้อมย้ายปลูกใน 3 สัปดาห์ จากการศึกษาพบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากช่อดอกอ่อนของข้าวพันธุ์ Safari 17 คือ MS ที่มี BAP 4.4 μM และ 2,4-D 9.0 μM ได้แคลลัส 72.2% ส่วนพันธุ์ Kasturi คือ MS ที่มี BAP 4.4 μM และ 2,4-D 11.25 μM ได้ 84.7% เมื่อทำให้แคลลัสแห้งก่อนย้ายลงอาหารชักนำต้น พบว่าจะเกิดจุดสีเขียวบนก้อนแคลลัสภายในสัปดาห์แรก และภายใน 4 สัปดาห์จะมียอดจำนวนมากเกิดบนก้อนแคลลัส แต่แคลลัสที่ไม่ได้ทำให้แห้งจะเห็นการเปลี่ยนแปลงในสัปดาห์ที่สองและได้ยอดจำนวนน้อย ข้าวพันธุ์ Safari 17 ให้อัตราการเกิดยอดสูงสุด 80%เมื่อทำให้แห้งนาน 24 ชั่วโมง มีค่า water content 51.7% แต่หลังจากทำให้แห้งนาน 42 ชั่วโมงจะลดอัตราการเกิดยอด ส่วนพันธุ์ Kasturi ให้อัตราการเกิดยอดสูงสุด 93.3% เมื่อทำให้แห้งนาน 48 ชั่วโมง มีค่า water content 51.4% และหลังจาก 72 ชั่วโมงจะลดการเกิดยอด

7. ผลของไซโตไคนมคลอไรด์ต่อการสะสมสารต่าง ๆ ของพืช

ได้มีการศึกษาผลของไซโตไคนมคลอไรด์ต่อการสะสมปริมาณโปรตีนในพืชที่ทนเค็ม Lin and Kao(1996) พบว่าปริมาณของไซโตไคนมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการเจริญเติบโตของรากข้าว โดยทำให้รากข้าวชะงักการเจริญเติบโต และมีการสะสมปริมาณของโปรตีนในรากข้าวเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Martinez *et al.* (1996) ก็พบว่ามันฝรั่งที่มีปริมาณของไซโตไคนมคลอไรด์เพิ่มขึ้น มีผลต่อการสะสมโปรตีนในใบมันฝรั่ง 4 ชนิด ได้แก่ *Solanum acaule*, *S. andigena*, *S. curtilobum* และ *S. juzepczukii*

นอกจากการศึกษากการสะสมโปรตีนที่เกิดจากปริมาณไซโตไคนมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นแล้ว ยังได้มีผู้ศึกษาถึงการสะสมธาตุต่าง ๆ ซึ่งสัมพันธ์กับการเพิ่มปริมาณของไซโตไคนมคลอไรด์ Kumar and Sharma(1989) และ Gulati and Jaiwal (1993) ได้คัดเลือกแคลลัสตัวเขียวทนเค็มจากอาหารสูตร PC-L2 ที่ผสมโปรตีน แล้วเลี้ยงแคลลัสในอาหารที่เพิ่มความเค็มขึ้นเรื่อย ๆ พบว่าสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้สามารถทนเค็มได้มากกว่าพันธุ์เดิม และยังพบอีกว่าสายพันธุ์ที่คัดเลือกนี้มีการสะสมของโปรตีนอิสระ(free proline) สูง นอกจากนี้ปริมาณความเค็มก็มีผลต่อการสะสมของไซโตไคนมและโพแทสเซียม โดยพบว่าถ้าความเค็มเพิ่มขึ้นพืชจะมีการสะสมโพแทสเซียมลดลง แต่มีการสะสมไซโตไคนมเพิ่มขึ้น Chaudhary *et al.* (1996 และ 1997) ได้คัดเลือกถั่วอาหารสัตว์ (lucerne) ทนเค็ม โดยเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของเนื้อเยื่อใบ ในอาหารที่มีความเค็มของเกลือระดับต่าง ๆ แล้วเพิ่มความเค็มขึ้นเรื่อย ๆ ในอาหารคัดเลือก ได้สายพันธุ์ที่ทนเค็มได้มากกว่าเดิม จากนั้นได้ศึกษาถึงการสะสมปริมาณของโปรตีนและไอออนของธาตุต่าง ๆ ของสายพันธุ์ทนเค็ม พบว่าปริมาณของไซโตไคนมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้เกิดการสะสมปริมาณโปรตีนและไซโตไคนมเพิ่มขึ้น แต่มีการสะสมโพแทสเซียมลดลง

Garcia-Agustin and Primo-Millo (1995) ได้คัดเลือกส้มที่สามารถทนเค็มได้มากกว่าปกติ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ nucellus tissue แล้วทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเอทิลมีเทน ซัลโฟเนต (EMS) จากนั้นจึงคัดเลือกบนอาหารที่มีเกลือ พืชที่คัดเลือกได้มีการเจริญเติบโตเร็ว และมีปริมาณโซเดียมและคลอไรด์ในใบน้อยเมื่อเพิ่มความเค็มในอาหาร นอกจากนี้พืชที่คัดเลือกได้ยังมีการสะสมของโซเดียมในยอดและรากมาก แต่มีการสะสมโพแทสเซียมลดลง ซึ่งสอดคล้องกับ Cano *et al.* (1996 และ 1998) ที่ได้ทำการศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ในมะเขือเทศพันธุ์ปา (*Lycopersicon pennellii*) พันธุ์ปลูก (*L. esculentum* Mill) และลูกผสมของทั้งสองพันธุ์นี้ พบว่ามะเขือเทศทั้ง 3 พันธุ์มีการตอบสนองต่อปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น โดยมีการสะสมโพแทสเซียมและคลอไรด์เพิ่มขึ้น แต่มีปริมาณของโพแทสเซียมลดลง ส่วน Morabito *et al.* (1996) ได้ศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยาของยูคาลิปตัส 2 สายพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกการทนเค็ม พบว่าความเค็มทำให้การเจริญเติบโตช้าลงและยับยั้งการยืดยาวของยอด นอกจากนี้ความเค็มยังมีผลต่อการสะสมแร่ธาตุในพืช โดยพบว่ามีการสะสมโพแทสเซียมและโซเดียมมากขึ้นในทั้ง 2 สายพันธุ์ ส่วนปริมาณของโพแทสเซียมและแคลเซียมในรากของสายพันธุ์ที่ 42 เพิ่มขึ้นแต่สายพันธุ์ที่ 43 ลดลง

นอกจากนี้ พบว่าพืชมีการสะสมและสร้างโปรตีนหลายชนิดเพื่อตอบสนองต่อสภาพดินเค็ม Ashwani *et al.* (1998a และ 1998b) ศึกษาการสร้างโปรตีนหลายชนิดที่เป็นผลมาจากสภาพเครียดต่าง ๆ (abiotic stress) ได้แก่ ความเค็ม ความแล้ง อุณหภูมิสูงและต่ำโดยใช้ SDS-PAGE พบกลุ่มของ stress protein ขนาด 100, 91, 87, 85 และ 78 กิโลดาลตัน (kDa) ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีการสะสมเมื่อข้าวอยู่ในสภาพเครียดที่กล่าวก่อนแล้วข้างต้น แต่พบโปรตีนที่จำเพาะต่อความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ขนาด 15 และ 13 กิโลดาลตันในยอดของข้าวพันธุ์ Lal nakanda สำหรับข้าวพันธุ์ Pusa 169 พบโปรตีนขนาด 29 และ 15 กิโลดาลตัน ในยอดและราก ตามลำดับ เมื่อทดลองเปรียบเทียบระหว่างข้าวพันธุ์ทนทาน (CSR 10 และ CSR 19) กับพันธุ์ไม่ทนทาน (Basmati 370 และ Pusa 169) โดยใช้เทคนิค Western blotting พบโปรตีนที่จำเพาะต่อความเค็มขนาด 104 กิโลดาลตัน ซึ่งสามารถชักนำให้มีการสะสมได้เมื่อเลี้ยงในสารละลายเกลือในข้าวพันธุ์ CSR 10, Pusa 169 และ Basmati 370 แต่ไม่พบว่าการสะสมโปรตีนนี้ในพันธุ์ CSR 19 สำหรับโปรตีนขนาด 90 กิโลดาลตันนั้นมีการสะสมในปริมาณน้อยเมื่อข้าวทั้ง 3 พันธุ์นี้อยู่ในสภาพปกติ แต่จะมีปริมาณมากขึ้นเมื่อชักนำโดยการเลี้ยงในสารละลายเกลือ ต่อมา Dubey (1999) ศึกษาและรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับการสังเคราะห์โปรตีนของพืชภายใต้สภาพเครียดต่าง ๆ พบว่า สภาพเครียดที่ต่างกัน ระยะเวลาที่พืชเผชิญกับสภาพเครียด และความรุนแรงของสภาพเครียด ทำให้เกิดความแตกต่างของการแสดงออกของข้อมูลทางพันธุกรรม ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ gene production รวมทั้ง mRNA และโปรตีน โปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมานี้จำเพาะเจาะจงต่อสภาพเครียด เพื่อให้พืช

สามารถอยู่รอดได้ในสภาพเครียดนั้น พืชที่อยู่ภายใต้สภาพความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ พบว่ามีการสร้างและสะสมโปรตีนหลายขนาด สำหรับข้าวพันธุ์ทนทานพบโปรตีนขนาด 28 กิโลดาลตันในยอด แต่ไม่พบในพันธุ์ไม่ทนทาน และปริมาณของโปรตีนนี้มีการสะสมมากขึ้นเมื่อเลี้ยงต้นกล้าในสารละลายเกลือ ส่วนพันธุ์ไม่ทนเค็มจะมีการหายไปของโปรตีนบางชนิด แต่มีโปรตีนชนิดใหม่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงในสารละลายเกลือ กัลยา กองเงิน และคณะ (2544) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่ถูกชักนำด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ ในเนื้อเยื่อรากข้าวโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE พบโปรตีนขนาด 90 กิโลดาลตัน ถูกชักนำให้สร้างมากขึ้นในรากเมื่อได้รับความเค็มในข้าวพันธุ์เหลืองใหญ่, เหลืองอนันต์, ขาวเม็ดเล็ก และพอกกาลิ แต่ไม่พบในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. วัสดุ อุปกรณ์

1.1 เมล็ดข้าวเปลือก ได้แก่ พันธุ์กข 27 ขาวดอกมะลิ 105 น้ำสะกุก 19 เหลืองประทิว 123
หอมคลองหลวง 1 และหอมสุพรรณบุรี ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์วิจัยข้าวพิมาย
อ. พิมาย จ. นครราชสีมา

1.2 สารเคมี

- สารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962)
- สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), indole acetic acid (IAA), kinetin, casein hydrolysate ฯลฯ
- เอทิลแอลกอฮอล์ 70 และ 95%
- สารฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว ได้แก่ สารละลายคลอโรกซ์ (Clorox) , สารจับใบ Tween-20
- น้ำกลั่นล้างเชื้อ
- สารเคมีที่ใช้ในการสกัดโปรตีน ได้แก่ homogenization buffer (0.2 M Tris-HCl pH 6.8, 1% Triton X-100, 5%(v/v) β -mercaptoethanol, 100 mM KCl และ 10 mM EDTA), ไนโตรเจนเหลว, bovine serum albumin standard (BSA) และ protein assay dye reagent concentrate (Bradford reagent)
- สารเคมีที่ใช้ ในการทำ SDS-PAGE ได้แก่ molecular weight standard, acrylamide solution, 4x lower buffer, 4x upper buffer, 5x running buffer, สารละลาย SDS, สารละลาย ammonium persulfate (APS), deionized distilled water (dH_2O), สารละลาย TEMED, Tris-base pH 6.8 และ 8.8, glutaraldehyde, silver nitrate, acetic acid, เมทิลแอลกอฮอล์ 95%
- สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณธาตุ ได้แก่ กรดไนตริก กรดไฮโดรฟลูออริก สารละลายมาตรฐานของโซเดียม โพแทสเซียม และแคลเซียม กรดอะซิติก โพแทสเซียมโครเมต โซเดียมคลอไรด์ ซิลเวอร์ไนเตรดมาตรฐาน โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต แคลเซียมออกไซด์

1.3 เครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารและถ่ายเนื้อเยื่อ

- เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหารได้แก่ หม้อนึ่งความดันไอน้ำ, เตาแก๊ส, เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบหยาบ (ทศนิยม 2 ตำแหน่ง) และแบบละเอียด (4 ตำแหน่ง), เครื่องวัดพีเอช (pH meter)
- เครื่องแก้วที่ใช้เตรียมอาหารเพาะเลี้ยง เช่น กระบอกตวง, บีกเกอร์, ขวดปรับปริมาตร ฯลฯ
- เครื่องมือที่ใช้ในการถ่ายเนื้อเยื่อ ได้แก่ ตู้อบเชื้อ, มีดผ่าตัดและปากคีบ, จานแก้ว, ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.4 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปรับอุณหภูมิประมาณ 26°C.

- อุปกรณ์ภายในห้องประกอบด้วย ชั้นวางที่ติดตั้งหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent), เครื่องควบคุมเวลา (timer), กล้องกระดาดปิดด้วยผ้าดำแทนห้องมืด และเครื่องปรับอากาศ
- สภาพแวดล้อมภายในห้อง มีอุณหภูมิประมาณ $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงและมีมืด 8 ชั่วโมง

1.5 วัสดุและภาชนะที่ใช้สำหรับปลูกต้นอ่อน ได้แก่ ดินนา, กระจกพลาสติกขนาด 6 นิ้ว, ถังพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 16 นิ้ว, ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15

1.6 เครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดโปรตีน ได้แก่ โกร่งบด, ซ้อนตัดกสเดนเลส, น้ำแข็งและถังน้ำแข็ง, ถังสำหรับแช่ไนโตรเจนเหลว, เครื่องปั่นเหวี่ยง, หลอด microfuge tube, เครื่องผสม (vortex), ชุด pipette man และ tip, เครื่อง microtiter plate reader, แผ่น microtiter plate

1.7 เครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) ได้แก่ แผ่นกระจก, floating rack, SDS-PAGE apparatus, power supply และชุดเครื่องมือ electrophoresis ยี่ห้อ BIO-RAD

1.8 เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer รุ่น AAS model analyst 100, เครื่อง Microwave Accelerated Reaction System ยี่ห้อ CEM, ตู้อบความร้อน (hot air oven), เครื่องบดตัวอย่างพืชและตะแกรงกรอง, บิวเรต, เตาเผาไฟฟ้า, เตาไฟฟ้า, กระดาษกรองเบอร์ 42 และกรวยกรอง

2. วิธีการทดลอง

2.1 การทดลองที่ 1 การชักนำแคลลัสจากเมล็ดข้าวในอาหารชักนำสูตรต่าง ๆ

(1) แกะเปลือกข้าวออกให้เหลือเมล็ดข้าวที่สมบูรณ์ ซึ่งจะมีส่วนที่เป็นเอ็มบริโอ (embryo) และ เอนโดสเปิร์ม (endosperm) อยู่ครบ

(2) นำเมล็ดข้าวที่แกะเปลือกแล้วมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% 1 นาที และสารละลายคลอโรกซ์ 20% ที่ใส่สาร Tween-20 1-2 หยดต่อน้ำ 100 มล. กวนตลอดเวลา 30 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

(3) นำเมล็ดข้าวที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ววางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส ทั้งในสภาพที่มีแสงและไม่มีแสง ประมาณ 3 สัปดาห์ จึงแยกก้อนแคลลัสออกจากยอดและเมล็ด แล้ววางเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมอีก 1 สัปดาห์ สูตรอาหารชักนำแคลลัส ได้แก่

MS + 2,4-D 2 mg/l + casein hydrolysate 0.3 g/l + sucrose 3% (2D)

MS + 2,4-D 1 mg/l + NAA 1 mg/l + kinetin 0.1 mg/l + sucrose 3% (1D1N)

MS + 2,4-D 1 mg/l + NAA 1 mg/l + kinetin 1 mg/l + sucrose 3% (1D1K)

MS + 2,4-D 2.5 mg/l + sucrose 3% (2.5D)

MS + 2,4-D 0.5 mg/l + NAA 2.5 mg/l + kinetin 0.5 mg/l + sucrose 3% (0.5D)

MS + 2,4-D 2 mg/l + myo-inositol 0.9 g/l + casein hydrolysate 0.03 g/l + maltose 3% (MCH) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารให้มีค่าประมาณ 5.7 และใส่วุ้น 7.5 กรัม/ลิตร ก่อนที่จะนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ใช้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

(4) ทำการ subculture เพื่อเพิ่มจำนวนทุก 2 สัปดาห์ในอาหารสูตร MS + 2,4-D 2 mg/l + NAA 1 mg/l + casein hydrolysate 0.1 g/l + proline 1 g/l + sucrose 2%

(5) วัดการพัฒนาของแคลลัสโดยการนับจำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้น และวัดขนาดด้วยการวาดวงกลมบนกระดาษให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0-15.0 มิลลิเมตร เพื่อนำแคลลัสวางเทียบขนาด และคิดอัตราการเกิดแคลลัสจากสูตร

$$\text{อัตราการเกิดแคลลัส (\%)} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดข้าวที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนเมล็ดข้าวที่เลี้ยง}} \times 100$$

(6) วางแผนการทดลองแบบ split-split plot in RCB (randomized complete block design) จำนวน 5 ซ้ำ โดยที่ main plot คือ พันธุ์ข้าว sub plot คือ สภาพแสง และ sub-sub plot คือ สูตรอาหารวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม IRRISTAT Version 3/93 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT (Duncan's New Multiple Range Test) การทดลองมีแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ, 2540) ดังนี้

- แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของแผนการทดลองแบบ split-split plot ที่มี 3 แฟกเตอร์ ดังนี้

$$X_{ijkl} = \mu + B_i + \alpha_j + \delta_{ij} + \beta_k + (\alpha\beta)_{jk} + \gamma_{ijk} + \lambda_l + (\alpha\lambda)_{jl} + (\beta\lambda)_{kl} + (\alpha\beta\lambda)_{jkl} + \varepsilon_{ijkl}$$

เมื่อให้ i	= 1,2,3,...,t (t = จำนวน block)
j	= 1,2,3,...,n (n = จำนวน main plot)
k	= 1,2,3,...,r (r = จำนวน sub plot)
l	= 1,2,3,...,s (s = จำนวน sub-sub plot)
X_{ijkl}	= ค่าสังเกตที่ได้จากสิ่งทดลอง
μ	= ค่าเฉลี่ยทั้งหมดในการทดลอง
$B, \alpha, \beta,$	= ผลของ block, main plot, sub plot และ sub-sub plot ตามลำดับ
$\alpha\beta$	= ปฏิกริยาระหว่าง main plot และ sub plot
$\alpha\lambda$	= ปฏิกริยาระหว่าง main plot และ sub-sub plot
$\beta\lambda$	= ปฏิกริยาระหว่าง sub plot และ sub-sub plot
$\alpha\beta\lambda$	= ปฏิกริยาระหว่าง main plot sub plot และ sub-sub plot
$\delta_{ij}, \gamma_{ijk}, \varepsilon_{ijkl}$	= error ใน main plot sub plot และ sub-sub plot ตามลำดับ

2.2 การทดลองที่ 2 การคัดเลือกแคลลัสข้าวทนเค็มในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นระดับต่าง ๆ

(1) นำแคลลัสที่ผ่านการ subculture ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 ซม. วางเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับต่าง ๆ ได้แก่ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์

(2) ทำการคัดเลือก 4 รอบโดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ หลังจากคัดเลือกครบ 4 รอบจึงย้ายแคลลัสที่ยังเจริญเติบโตได้ลงบนอาหารที่ไม่มีเกลือเพื่อเพิ่มปริมาณของแคลลัสทนเค็ม วัดการเจริญเติบโตโดยการนับจำนวนแคลลัสที่รอดชีวิตบนอาหารที่มีเกลือ และให้คะแนนการพัฒนาของแคลลัสบนอาหารคัดเลือก คะแนนนี้ได้มาจากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสบนอาหารคัดเลือกซึ่งมีลักษณะการเปลี่ยนแปลง 6 แบบ จึงได้กำหนดให้แต่ละแบบแทนระดับคะแนน (ภาพผนวกที่ 1) ดังนี้

6 = แคลลัสมีสีเหลืองครีมทั้งก้อน

5 = แคลลัสมีสีเหลืองครีมคล้ำกว่าปกติหรือไม่สดใส

4 = แคลลัสมีสีเหลืองครีมแต่มีบางส่วนที่เป็นสีน้ำตาลหรือดำน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

3 = แคลลัสมีสีเหลืองครีมแต่มีบางส่วนที่เป็นสีน้ำตาลหรือดำ 50 เปอร์เซ็นต์

2 = แคลลัสมีสีเหลืองครีมแต่มีบางส่วนที่เป็นสีน้ำตาลหรือดำมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

1 = แคลลัสตาย

(3) วางแผนการทดลองแบบ split split plot in RCB (randomized complete block design) จำนวน 5 ซ้ำ โดยที่ main plot คือ พันธุ์ข้าว sub plot คือ ระยะเวลาที่ใช้คัดเลือก และ sub-sub plot คือ ความเข้มข้นเกลือ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม IRRISTAT Version 3/93 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT (Duncan's New Multiple Range Test) การทดลองมีแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ, 2540) ดังนี้

- แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของแผนการทดลองแบบ split-split plot ที่มี 3 แฟกเตอร์ ดังนี้

$$X_{ijk} = \mu + B_i + \alpha_j + \delta_{ij} + \beta_k + (\alpha\beta)_{jk} + \gamma_{ijk} + \lambda_l + (\alpha\lambda)_{jl} + (\beta\lambda)_{kl} + (\alpha\beta\lambda)_{jkl} + \varepsilon_{ijkl}$$

เมื่อให้ i	= 1,2,3,...,t (t = จำนวน block)
j	= 1,2,3,...,n (n = จำนวน main plot)
k	= 1,2,3,...,r (r = จำนวน sub plot)
l	= 1,2,3,...,s (s = จำนวน sub-sub plot)
X_{ijk}	= ค่าสังเกตที่ได้จากสิ่งทดลอง
μ	= ค่าเฉลี่ยทั้งหมดในการทดลอง
$B, \alpha, \beta, \lambda$	= ผลของ block, mainplot, subplot และ sub-subplot ตามลำดับ
$\alpha\beta$	= ปฏิกริยาระหว่าง main plot และ sub plot
$\alpha\lambda$	= ปฏิกริยาระหว่าง main plot และ sub-sub plot
$\beta\lambda$	= ปฏิกริยาระหว่าง sub plot และ sub-sub plot
$\alpha\beta\lambda$	= ปฏิกริยาระหว่าง main plot sub plot และ sub-sub plot
$\delta_{ij}, \gamma_{ijk}, \varepsilon_{ijkl}$	= error ใน main plot sub plot และ sub-sub plot ตามลำดับ

2.3 การทดลองที่ 3 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เกิดขึ้น

1. การชักนำต้นจากแคลลัส

(1) นำแคลลัสวางในจานแก้วเพื่อทำให้แห้ง (dehydration) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด แล้วย้ายลงอาหารชักนำต้น วางเลี้ยงในที่มืดแสง 16 ชั่วโมง อาหารชักนำต้น ได้แก่

MS + BA 2 mg/l + NAA 2 mg/l + sucrose 3% (A)

MS + BA 4 mg/l + NAA 1 mg/l + sucrose 3% (B)

MS + BA 1 mg/l + IAA 0.01 mg/l + sucrose 3% (C)

MS + kinetin 2 mg/l + NAA 0.5 mg/l + sucrose 3% (D)

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารให้มีค่าประมาณ 5.7 และใส่วุ้น 7.5 กรัม/ลิตร ก่อนนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่มีความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

(2) เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ บันทึกผลโดยการนับจำนวนยอดที่เกิดขึ้นต่อก้อนแคลลัส จำนวนแคลลัสที่พัฒนาไปเป็นยอด ราก และจุดสีเขียว

(3) วางแผนการทดลองแบบ split plot in RCB จำนวน 3 ซ้ำ โดยที่ main plot คือ พันธุ์ข้าว และ sub plot คือ สูตรอาหาร วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม IRRISTAT Version 3/93 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT (Duncan's New Multiple Range Test) การทดลองมีแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ, 2540) ดังนี้

- แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของแผนการทดลองแบบ split plot in RCB ที่มี 2 แฟกเตอร์ ดังนี้

$$X_{ijk} = \mu + B_i + \alpha_j + \delta_{ij} + \beta_k + (\alpha\beta)_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

เมื่อให้	i	= 1,2,3,.....,t (t = จำนวน block)
	j	= 1,2,3,.....,n (n = จำนวน main plot)
	k	= 1,2,3,.....,r (r = จำนวน sub plot)
	X_{ijk}	= ค่าสังเกตที่ได้จากสิ่งทดลอง
	μ	= ค่าเฉลี่ยทั้งหมดในการทดลอง
	B, α, β	= ผลของ block, main plot และ sub plot ตามลำดับ
	$\alpha\beta$	= ปฏิกริยาระหว่าง main plot และ sub plot
	δ_{ij} และ ε_{ijk}	= error ใน main plot และ sub plot ตามลำดับ

(4) ชักนำแคลลัสที่ผ่านการคัดเลือกทนเค็มให้เป็นต้นข้าวบนอาหารสูตรที่เหมาะสม แล้วจึงย้ายต้นข้าวที่ได้ออกปลูกในกระถางพลาสติกที่บรรจุดินอบฆ่าเชื้อ ก่อนที่จะย้ายปลูกลงในถังพลาสติกที่บรรจุดินนา

- (5) ปลูกเลี้ยงต้นข้าวต่อไปจนกระทั่ง ข้าวติดเมล็ดและเก็บเมล็ดไว้ใช้ทดสอบในขั้นต่อไป
- (6) นำรากข้าวจากทุกต้นมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวม
- (7) นำใบข้าวแต่ละต้นมาวิเคราะห์ปริมาณโซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม และคลอไรด์

2. การวิเคราะห์โปรตีนรวมในรากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

(1) การสกัดโปรตีน

- (1.1) นำรากจากต้นข้าวที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ และปลูกในสารละลายเกลือที่มีค่าการนำไฟฟ้า 12 dS/m นาน 2 สัปดาห์ ตัดประมาณ 300 mg บดในไนโตรเจนเหลวด้วยโกร่งที่แช่เย็น แล้วตัดใส่ในหลอด microfuge และแช่ไว้ในไนโตรเจนเหลว จากนั้นเติม homogenization buffer หลอดละ 1 ml และวางบนน้ำแข็ง
- (1.2) ใช้เครื่องผสมเพื่อให้ตัวอย่างพืชที่บดผสมกับ homogenization buffer ได้ทั่วถึง แล้วจึงวางบนน้ำแข็ง
- (1.3) นำไปปั่นเหวี่ยงโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่มีความเร็วรอบ 12000 rpm. ที่อุณหภูมิ 7-8 °C นาน 30 นาที
- (1.4) ใช้ pipetteman ดูดของเหลวใสด้านบน (supernatant) ใส่ในหลอด microfuge อันใหม่ เก็บไว้ในตู้เย็นหรือแช่ไว้ในน้ำแข็งจนกว่าจะใช้

(2) การหาปริมาณโปรตีนรวมโดยวิธี Bradford assay

- (2.1) ดูด supernatant 5 และ 10 μ l ใส่หลอด microfuge อันใหม่อย่างละ 1 หลอด ซึ่งหลอดที่มีตัวอย่าง 5 μ l ต้องใส่ homogenization buffer 5 μ l และ dH_2O 990 μ l ส่วนหลอดที่มีตัวอย่าง 10 μ l ใส่เพียง dH_2O 990 μ l เท่านั้น ได้ปริมาตร homogenate 1000 μ l ต่อหลอดและวางบนน้ำแข็ง
- (2.2) ดูดสารละลายที่เตรียมในข้อ 2.1 มาอย่างละ 400 μ l. และเติม Bradford reagent 100 μ l ได้ปริมาตรสุทธิ 500 μ l ต่อหลอด แล้วจึงวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที (ไม่ควรเกิน 1 ชั่วโมง)
- (2.3) ดูดสารละลายจากข้อ 2.2 ใส่ใน microtiterplate หลุมละ 200 μ l อย่างละ 2 หลุม เพื่อใช้หาค่าเฉลี่ย นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microtiterplate reader เปรียบเทียบกับ BSA standard ความเข้มข้น 0, 1, 2, 5, 10, 15 และ 20 μ g/ml
- (2.4) วาดกราฟของ BSA standard โดยให้แกน y เป็นค่าความเข้มข้นของ BSA standard และแกน x เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้
- (2.5) คำนวณ linear regression equation แทนค่าหาความเข้มข้นของโปรตีนที่ละลายใน buffer จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณโปรตีนต่อกรัมของตัวอย่างพืช

(3) การทำ electrophoresis โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE

- (3.1) ใช้ปริมาณโปรตีนที่ทราบจากการทำ Bradford assay ใช้อัตราส่วนของโปรตีนต่อ loading buffer เป็น 4 :1 โดยดูด homogenate 16 μ l ผสมกับ loading buffer 4 μ l ในหลอด microfuge แล้ววางบนน้ำแข็ง

- (3.2) ผสม protein standard (broad length) กับ loading buffer และ BSA กับ loading buffer ในอัตราส่วน 1 : 20 แล้ววางบนน้ำแข็ง
- (3.3) นำตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 3.1 และ 3.2 ใส่ใน floating rack นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วจึงวางบนน้ำแข็งทันที ก่อนที่จะนำไป run เจล ต้องผสมสารละลายในหลอดอีกครั้งด้วยเครื่องผสม
- (3.4) นำตัวอย่างแต่ละหลอด มา run เจลด้วยเครื่อง electrophoresis ยี่ห้อ BIO-RAD โดยการ load ตัวอย่างแต่ละหลอดใส่ในแผ่นเจล ที่อยู่ระหว่างแผ่นกระจกช่องละ 20 μ l เทียบกับ protein standard และ BSA โดยใช้ไฟฟ้า 180 V นาน 1 ชั่วโมง
- (3.5) นำแผ่นกระจกที่ run เสร็จแล้วออกจาก SDS-PAGE apparatus และแกะแผ่นกระจกที่ประกบอยู่ออกจากกันได้สารละลาย running buffer นำแผ่นเจลที่ได้มา ย้อมด้วยสารละลาย silver nitrate ตามวิธีการของ Racker, E.'s lab.
- (3.6) ทำเจลให้แห้งโดยนำแผ่น cellophane ที่ชุบน้ำมาประกบแผ่นเจลทั้งสองด้าน แล้วจึงให้ตั้งบนแผ่นกระจก
- (4) การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจากแผ่นเจล
 - (4.1) วัดระยะทางที่ molecular weight standard แต่ละ sub unit เคลื่อนที่ได้บนแผ่นเจล เป็นมิลลิเมตร นำค่าที่ได้มาเขียน standard curve เทียบกับค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลของ standard โดยให้แกน x เป็นค่าของระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่ได้บนแผ่นเจล และแกน y เป็นค่า log ของ molecular weight standard และได้สมการ linear regression
 - (4.2) วัดระยะทางของ band ที่สนใจ ที่เคลื่อนที่ได้บนแผ่นเจล แทนค่า x ในสมการ linear regression ได้ค่า y นำไปคำนวณค่า antilog จะได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของ band ที่สนใจ

3. การวิเคราะห์ปริมาณธาตุ โซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม และคลอไรด์ในใบข้าว

การวิเคราะห์ปริมาณโซเดียม โพแทสเซียม และแคลเซียม

- (1.1) อบตัวอย่างใบพืชที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือจนกระทั่งแห้ง นำตัวอย่างที่ได้มาบดให้มีขนาดเล็กที่สุด หรือร่อนด้วยตะแกรงให้มีขนาด 20-60 เมช(mesh)
- (1.2) ชั่งตัวอย่างพืช อย่างละ 0.5000 กรัม ใส่ในหลอดสำหรับย่อยตัวอย่าง แล้วเติมกรดไนตริกหลอดละ 10 มิลลิลิตร และกรดไฮโดรฟลูออริก 3 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ในเครื่อง Microwave Accelerated Reaction System เพื่อย่อยตัวอย่าง โดยใช้ความดัน 170 psi อุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

- (1.3) ได้สารละลายตัวอย่างพืชที่เป็นน้ำใส ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นและเขย่า แล้วจึงดูดของเหลวใสจากตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
- (1.4) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานของโซเดียม (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 ppm.) โพแทสเซียม (2, 4, 6, 8 ppm.) และแคลเซียม (5, 10, 15, 20 ppm.) และนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของธาตุ

การวิเคราะห์ปริมาณคลอไรด์

- (2.1) ชั่งน้ำหนักตัวอย่างพืชที่อบแห้งและบดละเอียด ตัวอย่างละ 2.000 กรัม ใส่ลงในถ้วยกระเบื้องทนไฟ และเติมแคลเซียมออกไซด์ 0.3 กรัม ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรและคนให้เข้ากัน
- (2.2) เผาตัวอย่างในเตาไฟฟ้า อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็น
- (2.3) เติมน้ำร้อน 10 มิลลิลิตร และอุ่นบนเตาไฟฟ้า อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที คนสารละลายด้วยแท่งแก้ว จากนั้นกรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 ลงในขวดลูกผสมพูนขนาด 50 มิลลิลิตร ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นร้อน และปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร
- (2.4) ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีไทเทรต (Mohr's method) โดยการหยดสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในสารละลายตัวอย่างพืช จนกระทั่งสารละลายมีฟิเอชประมาณ 7 (ถ้าปรับฟิเอชแล้วเป็นกรดมากเกินไปให้ใช้โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ปรับให้ได้ฟิเอชประมาณ 7)
- (2.5) หยดสารละลายโพแทสเซียมโครเมตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ 5 หยด และไทเทรตด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรดมาตรฐานความเข้มข้น 0.02 นอร์มอล จนกระทั่งเกิดตะกอนสีน้ำตาลแดง แล้วคำนวณปริมาณคลอไรด์จากสูตร

$$\frac{\text{ปริมาณคลอไรด์ในตัวอย่างพืช(\%)}}{\text{ปริมาณคลอไรด์ในตัวอย่างพืช(\%)}} = \frac{V \times N \times 0.0355 \times 100}{W}$$

V = ปริมาณสารละลายซิลเวอร์ไนเตรดมาตรฐานที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง
(มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรดมาตรฐานที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง
(มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่างพืช(กรัม)

2.4 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (F1และF3) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการทดลองที่ 1 การชักนำแคลลัสจากเมล็ดข้าวในอาหารชักนำสูตรต่าง ๆ

1. จำนวนแคลลัส

จากผลการทดลองเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวในอาหารสูตรชักนำแคลลัส ประมาณ 4 วันจะเริ่มสังเกตเห็นความเปลี่ยนแปลงบริเวณคัพพะและเริ่มเกิดแคลลัสในสัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยง ตารางที่ 4.1.1 แสดงจำนวนแคลลัสที่ชักนำได้จากข้าว 5 พันธุ์ ในจำนวนพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลองทั้งสิ้น 6 พันธุ์ ทั้งในสภาพที่มีแสงและไม่มีแสง ข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 มีปริมาณการเกิดแคลลัสสูงที่สุด (58.37%) รองลงมาได้แก่ พันธุ์เหลืองประทิว 123 (54.64%) และกข 27 (52.70%) พันธุ์น้ำสะกุก 19 มีปริมาณการเกิดแคลลัสปานกลาง (30.57%) พันธุ์หอมคลองหลวง 1 มีปริมาณการเกิดแคลลัสต่ำที่สุดเพียง 12.70% ส่วนพันธุ์หอมสุวรรณิรินทร์นั้นไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้จากอาหารทุกสูตร จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า พันธุ์ข้าว สูตรอาหาร และสภาพการให้แสง มีผลต่อการเกิดแคลลัสของข้าวอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) โดยพบว่าข้าวแต่ละพันธุ์ อาหารเพาะเลี้ยงแต่ละสูตร และสภาพการให้แสงมีอิทธิพลต่อปริมาณการเกิดแคลลัสที่แตกต่างกันของข้าวทุกพันธุ์ (ตารางผนวกที่ 1)

เมื่อศึกษาปฏิกริยาระหว่างพันธุ์ข้าวและสูตรอาหารที่มีผลต่อปริมาณการเกิดแคลลัส (ตารางที่ 4.1.2) แสดงว่า ข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ตอบสนองดีที่สุดต่ออาหารชักนำสูตร 1D1N, 1D1K และ 2D พันธุ์เหลืองประทิว 123 และกข 27 ตอบสนองดีที่สุดต่ออาหารสูตร 1D1N ส่วนพันธุ์น้ำสะกุก 19 ตอบสนองดีที่สุดต่ออาหารสูตร 0.5D และ MCH และพันธุ์หอมคลองหลวง 1 ตอบสนองดีที่สุดต่ออาหารสูตร 0.5D

ตารางที่ 4.1.3 แสดงปฏิกริยาระหว่างพันธุ์ข้าวและสภาพการให้แสง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในที่มืด พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ให้ปริมาณแคลลัสมากที่สุด (57.07%) รองลงมาได้แก่ พันธุ์เหลืองประทิว 123 (49.80%), กข 27 (47.33%), น้ำสะกุก 19 (29.13%) และหอมคลองหลวง 1 (15.53%) ตามลำดับ แต่ในสภาพที่มีแสงนั้น ข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (59.67%), เหลืองประทิว 123 (59.47%) และกข 27 (58.07%) ให้ปริมาณแคลลัสมากที่สุดเท่ากัน รองลงมาคือพันธุ์น้ำสะกุก 19 ส่วนพันธุ์หอมคลองหลวง 1 นั้นให้ปริมาณแคลลัสน้อยที่สุด (9.87%) จากค่าเฉลี่ยของจำนวน

แคลลัสข้าวที่ชักนำในอาหารสูตรต่าง ๆ ทั้งในสภาพที่มีแสงและไม่มีแสง (ตารางที่ 4.1.4) พบว่า ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ให้จำนวนแคลลัสเฉลี่ยสูงที่สุดในอาหารสูตร 1D1N และ 1D1K ทั้งสองสภาพการเพาะเลี้ยง คือ 34.80-37.40 ก่อน พันธุ์เหลืองประทิว 123 และ กข 27 ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนแคลลัสสูงที่สุดในอาหารสูตร 1D1N ทั้งในสภาพมีแสงและไม่มีแสงคือ 33.40-40.00 ก่อน และ 34.80-39.40 ก่อน ตามลำดับ ส่วนข้าวพันธุ์น้ำสะกดย 19 มีค่าเฉลี่ยจำนวนแคลลัสสูงที่สุดในอาหารสูตร 0.5D และ MCH ทั้งสองสภาพการให้แสงคือ 18.40-21.20 ก่อน และ พันธุ์หอมคลองหลวง 1 มีค่าเฉลี่ยจำนวนแคลลัสสูงที่สุดทั้งสองสภาพการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 0.5D แคลลัสที่ชักนำได้จากข้าวทุกพันธุ์มีสีเหลืองครีม แต่แคลลัสที่ชักนำได้จากอาหารสูตร 1D1K และ 0.5D มีจุดสีเขียวเกิดขึ้นบนก้อนแคลลัสด้วย (ภาพผนวกที่ 2)

เมื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารที่ทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับของสุรินทร์ ปิยะโชคนากุล และคณะ (2537) ที่ชักนำแคลลัสจากเมล็ดข้าวพันธุ์เดียวกัน สูตรอาหารใกล้เคียงกัน ได้ปริมาณแคลลัสมากที่สุด 62.50 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS ที่มีน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เคซีนไฮโดรไลเซต 1 กรัมต่อลิตร 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่สูตรอาหารที่ผู้วิจัยทดลองนี้มี 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.1.1) ให้อัตราการเกิดแคลลัสดีประมาณ 72 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลดีกว่า และสูตรที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้ใช้ได้กับข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ เหลืองประทิว 123, กข 27 และ น้ำสะกดย 19

เมื่อเปรียบเทียบการชักนำแคลลัสในสภาพแสง พบว่า สอดคล้องกับงานวิจัยของเพติมระติสุนทร และคณะ (2536) ตรงที่ว่าอัตราการเกิดแคลลัสของข้าวทุกสายพันธุ์เจริญได้ดีในสภาพที่มีแสง โดยเฉพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีอัตราการเกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ใช้สูตรอาหารต่างกันกับการทดลองนี้ แต่พันธุ์หอมคลองหลวง 1 มีอัตราการเกิดแคลลัสได้ดีในที่มืด สอดคล้องกับงานวิจัยของสุริยันต์ จะอุ่ม และคณะ (2540) ที่ศึกษาพบว่าข้าวพันธุ์นางมลอเอส-4 มีอัตราการเกิดแคลลัสได้ดีในที่มืด ดังนั้นอัตราการเกิดแคลลัสได้ดี น่าจะขึ้นกับชนิดของพันธุ์ข้าว สูตรอาหารและสภาพแสง

จากการทดลองครั้งนี้ ชนิดของแคลลัสที่ได้ พบ 2 ชนิด ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และคณะ (2537), พรทิพย์ ชีวะเศรษฐธรรม (2537) และ สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล และคณะ (2537) ได้แก่ ชนิด compact callus และ friable callus ซึ่ง friable callus เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลานานหรือผ่านการเปลี่ยนอาหารหลายครั้ง

จากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมาแล้ว การทดลองนี้ได้นำสูตรอาหารเหล่านั้นมาทดลองพบว่า ให้ผลไม่สอดคล้องตามงานวิจัยที่ได้กล่าวอ้าง อาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมที่ทำให้พันธุ์ข้าวต่างกันในแต่ละปี ในด้านโรคและแมลง ความสมบูรณ์ของดิน และสภาพอากาศ ด้วยเหตุผล

ดังกล่าวข้างต้น ทำให้งานวิจัยนี้ต้องการพัฒนาสูตรอาหารใหม่ เพื่อให้เหมาะสมกับสภาพปัจจุบัน นอกจากนี้ สูตรอาหารที่ใช้ในการชักนำแคลสไมคองที่ ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่เติมลงในอาหาร ได้แก่ กรดอะมิโน สารควบคุมการเจริญเติบโต แหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจน สารสกัด อินทรี เป็นต้น

ตารางที่ 4.1.1 จำนวนก้อนแคลลัสทั้งหมดและเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส(ตัวเลขในวงเล็บ) ที่ชักนำจากอาหารสูตรต่าง ๆ ในสภาพที่มีแสงและไม่มีแสง

พันธุ์	สภาพ	จำนวนเมล็ด เริ่มต้น	สูตรอาหาร						ค่าเฉลี่ย ของพันธุ์(%)
			2D ^{1/}	1D1N	1D1K	2.5D	0.5D	MCH	
KDML ^{2/}	ไม่มีแสง	250	148 (59.2)	177 (70.8)	187 (74.8)	137 (54.8)	100 (40.0)	107 (42.8)	57.07
	มีแสง	250	182 (72.8)	185 (74.0)	174 (69.6)	141 (56.4)	111 (44.4)	102 (40.8)	59.67
LPT	ไม่มีแสง	250	145 (58.0)	167 (66.8)	143 (57.2)	130 (52.0)	93 (37.2)	69 (27.6)	49.80
	มีแสง	250	172 (68.8)	200 (80.0)	167 (66.8)	166 (66.4)	87 (34.8)	100 (40.0)	59.47
RD	ไม่มีแสง	250	125 (50.0)	174 (69.6)	133 (53.2)	130 (52.0)	75 (30.0)	73 (29.2)	47.33
	มีแสง	250	149 (59.6)	199 (79.6)	189 (75.6)	167 (66.8)	86 (34.4)	81 (32.4)	58.07
NSK	ไม่มีแสง	250	57 (22.8)	53 (21.2)	83 (33.2)	59 (23.6)	92 (36.8)	93 (37.2)	29.13
	มีแสง	250	86 (34.4)	69 (27.6)	61 (24.4)	61 (24.4)	106 (42.4)	97 (38.8)	32.00
HKL	ไม่มีแสง	250	44 (17.6)	34 (13.6)	32 (12.8)	22 (8.8)	74 (29.6)	27 (10.8)	15.53
	มีแสง	250	20 (8.0)	19 (7.6)	21 (8.4)	18 (7.2)	43 (17.2)	27 (10.8)	9.87

^{1/}สูตรอาหาร 2D = MS + 2,4-D 2 mg/l + casein hydrolysate 0.3 g/l + sucrose 3%

1D1N = MS + 2,4-D 1 mg/l + NAA 1 mg/l + kinetin 0.1 mg/l + sucrose 3%

1D1K = MS + 2,4-D 1 mg/l + NAA 1 mg/l + kinetin 1 mg/l + sucrose 3%

2.5D = MS + 2,4-D 2.5 mg/l + sucrose 3%

0.5D = MS + 2,4-D 0.5 mg/l + NAA 2.5 mg/l + kinetin 0.5 mg/l + sucrose 3%

MCH = MS + 2,4-D 2 mg/l + myo-inositol 0.9 g/l + casein hydrolysate 0.03 g/l + maltose 3%

^{2/}พันธุ์ข้าว KDML = ขาวดอกมะลิ 105

LPT = เหลืองประทิว 123

RD = กข 27

NSK = น้ำสะก๊วย 19

HKL = หอมคลองหลวง 1

ตารางที่ 4.1.2 ปฏิกริยาระหว่างพันธุ์ข้าวและสูตรอาหารต่อปริมาณการเกิดแคลลัส

สูตรอาหาร	พันธุ์ข้าว ^z				
	KDML	LPT	RD	NSK	HKL
	เปอร์เซ็นต์ -----				
2D	66.00 a ^u	63.40 b	54.80 c	28.60 b	12.80 b
1D1N	72.40 a	73.40 a	74.60 a	24.40 b	10.60 b
1D1K	72.20 a	62.00 b	64.40 b	28.80 b	10.60 b
2.5D	55.60 b	59.20 b	59.40 bc	24.00 b	8.00 b
0.5D	42.20 c	36.00 c	32.20 d	39.60 a	23.40 a
MCH	41.80 c	33.80 c	30.80 d	38.00 a	10.80 b
เฉลี่ย	58.37	54.63	52.70	30.57	12.70

^u ตัวเลขจำนวนแคลลัสที่ชักนำจากเมล็ดข้าวเริ่มต้น 500 เมล็ด จำนวน 5 ซ้ำ

^z ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT (Duncan's New Multiple Range Test)

ตารางที่ 4.1.3 ปฏิกริยาระหว่างพันธุ์ข้าวและสภาพแสงที่มีต่อปริมาณการเกิดแคลลัส(ขึ้น)และเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส (ค่าในวงเล็บ)

พันธุ์ข้าว	สภาพแสง ^z		เฉลี่ย
	ไม่มีแสง	มีแสง	
KDML	171.20 a ^u (57.07)	179.00 a (59.67)	175.10
LPT	149.40 b (49.80)	178.40 a (59.47)	163.90
RD	142.00 b (47.33)	174.20 a (58.07)	158.10
NSK	87.40 c (29.13)	96.00 b (32.00)	91.70
HKL	46.60 d (15.53)	29.60 c (9.87)	38.10
เฉลี่ย	119.32	131.44	125.38

^u ตัวเลขจำนวนแคลลัสที่ชักนำจากเมล็ดข้าวเริ่มต้น 1500 เมล็ด

^z ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.1.4 ค่าเฉลี่ยของจำนวนแคลลัสข้าว(จีน) ที่ชักนำในอาหารสูตรต่างๆ ทั้งในสภาพที่มีแสงและไม่มีแสง (ค่าในวงเล็บเป็นเปอร์เซ็นต์)

พันธุ์ข้าว/สูตรอาหาร	สภาพแสง ^z		เฉลี่ย
	ไม่มีแสง	มีแสง	
KDML			
2D	29.60 b ^{1/} (59.2)	36.40 a (72.8)	33.00 a
1D1N	35.40 a (70.8)	37.00 a (74.0)	36.20 a
1D1K	37.40 a (74.8)	34.80 a (69.6)	36.10 a
2.5D	27.40 b (54.8)	28.20 b (56.4)	27.80 b
0.5D	20.00 c (40.0)	22.20 c (44.4)	21.10 c
MCH	21.40 c (42.8)	20.40 c (40.8)	20.90 c
LPT			
2D	29.00 ab (58.0)	34.40ab (68.8)	31.70 b
1D1N	33.40 a (66.8)	40.00 a (80.0)	36.70 a
1D1K	28.60 ab (57.2)	33.40 b (66.8)	31.00 b
2.5D	26.00 b (52.0)	33.20 b (66.4)	29.60 b
0.5D	18.60 c (37.2)	17.40 c (34.8)	18.00 c
MCH	13.80 c (27.6)	20.00 c (40.0)	16.90 c
RD			
2D	25.00 b (50.0)	29.80 c (59.6)	27.40 c
1D1N	34.80 a (69.6)	39.80 a (79.6)	37.30 a
1D1K	26.60 b (53.2)	37.80ab (75.6)	32.20 b
2.5D	26.00 b (52.0)	33.40bc (66.8)	29.70 bc
0.5D	15.00 c (30.0)	17.20 d (34.4)	16.10 d
MCH	14.60 c (29.2)	16.20 d (32.4)	15.40 d

^{1/} ค่าเฉลี่ยจำนวนแคลลัสที่ชักนำจากเมล็ดข้าวเริ่มต้น 250 เมล็ด จำนวน 5 ซ้ำ

^z ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.1.4 (ต่อ) ค่าเฉลี่ยของจำนวนแคลลัสข้าว(จีน) ที่ชักนำในอาหารสูตรต่างๆ ทั้งในสภาพที่มีแสงและไม่มีแสง (ค่าในวงเล็บเป็นเปอร์เซ็นต์)

พันธุ์ข้าว/สูตรอาหาร	สภาพแสง ^z		เฉลี่ย
	ไม่มีแสง	มีแสง	
NSK			
2D	11.40 b ^u (22.8)	17.20abc (34.4)	14.30 b
1D1N	10.60 b (21.2)	13.80bc (27.6)	12.20 b
1D1K	16.60 ab (33.2)	12.20 c (24.4)	14.40 b
2.5D	11.80 b (23.6)	12.20 c (24.4)	12.00 b
0.5D	18.40 a (36.8)	21.20 a (42.4)	19.80 a
MCH	18.60 a (37.2)	19.40ab (38.8)	19.00 a
HKL			
2D	8.80 b (17.6)	4.00 a (8.0)	6.40 b
1D1N	6.80 b (13.6)	3.80 a (10.6)	5.30 b
1D1K	6.40 b (12.8)	4.20 a (8.4)	5.30 b
2.5D	4.40 b (8.8)	3.60 a (7.2)	4.00 b
0.5D	14.80 a (29.6)	8.60 a (17.2)	11.70 a
MCH	5.40 b (10.8)	5.40 a (10.8)	5.40 b
เฉลี่ย	19.89	21.91	20.90

^u ค่าเฉลี่ยจำนวนแคลลัสที่ชักนำจากเมล็ดข้าวเริ่มต้น 250 เมล็ด จำนวน 5 ซ้ำ

^z ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

2. ขนาดแคลลัส

การทดลองนี้ได้เลือกศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสจากการวัดขนาดแทนการชั่งน้ำหนัก ซึ่งต่างจากการวิจัยของผู้อื่นที่ได้ศึกษาไว้แล้ว ทั้งนี้เพื่อป้องกันปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อโรคต่อก้อนแคลลัส เนื่องจากการวัดน้ำหนักนั้นอุปกรณ์ทุกชิ้นต้องควบคุมในห้องปลอดเชื้อทั้งหมด และขณะโยกย้ายแคลลัสมีโอกาสนปนเปื้อนเชื้อโรคได้สูง ถึงแม้ว่าการวัดการเจริญเติบโตสามารถทำได้ทั้งการวัดขนาดและน้ำหนักก็ตาม แต่การวัดขนาดนั้นมีโอกาสปนเปื้อนเชื้อโรคน้อยกว่าเพราะไม่ต้องโยกย้ายแคลลัส

ขนาดของแคลลัสที่ชักนำในอาหารแต่ละสูตรทั้งในสภาพที่มีแสงและไม่มีแสงมีความแตกต่างเมื่ออายุ 2 และ 4 สัปดาห์ (ตารางผนวกที่ 2, ภาพผนวกที่ 5) ซึ่งพบว่า พันธุ์ข้าว สูตรอาหาร และสภาพแสง มีอิทธิพลต่อขนาดของแคลลัสข้าวอายุ 2 และ 4 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) (ตารางผนวกที่ 1) โดยข้าวทุกพันธุ์ตอบสนองต่อสภาพแสงไม่แตกต่างกัน คือมีขนาดแคลลัสใหญ่เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง (ตารางที่ 4.1.5 และ 4.1.6) พันธุ์ที่มีขนาดแคลลัสใหญ่ที่สุดเมื่ออายุ 2 สัปดาห์ คือขาวดอกมะลิ 105 รองลงมา ได้แก่ พันธุ์กข 27, น้ำสะกวย 19, เหลืองประทิว 123 และหอมคลองหลวง 1 แต่เมื่ออายุ 4 สัปดาห์ พันธุ์ที่มีขนาดแคลลัสใหญ่ที่สุดคือขาวดอกมะลิ 105 รองลงมา ได้แก่ พันธุ์กข 27, เหลืองประทิว 123, น้ำสะกวย 19 และหอมคลองหลวง 1 ตามลำดับ กล่าวโดยรวมแล้ว การเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวทุกพันธุ์ควรเลี้ยงในที่มืด เพราะไม่สิ้นเปลืองไฟฟ้า แม้ว่าในสภาพที่มีแสงทำให้แคลลัสมีขนาดใหญ่กว่าในที่มืดเล็กน้อยก็ตาม

เมื่อพิจารณาปฏิกริยาระหว่างพันธุ์ข้าวและสูตรอาหาร ต่อขนาดแคลลัสข้าวอายุ 2 และ 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 4.1.7 และ 4.1.8) พบว่าข้าวแต่ละพันธุ์ตอบสนองต่อสูตรอาหารไม่เหมือนกัน โดยที่พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ตอบสนองได้ดีที่สุดต่ออาหารสูตร 1D1N และ 2D พันธุ์เหลืองประทิว 123 ตอบสนองได้ดีต่ออาหารสูตร 1D1N และ 2D เมื่ออายุ 2 สัปดาห์ และสูตร 1D1N, 1D1K และ 2D เมื่ออายุ 4 สัปดาห์ พันธุ์กข 27 ตอบสนองได้ดีต่ออาหารสูตร 1D1N, 2.5D และ 2D เมื่ออายุ 2 สัปดาห์ และสูตร 1D1N และ 2D เมื่ออายุ 4 สัปดาห์ พันธุ์น้ำสะกวย 19 ตอบสนองได้ดีต่ออาหารสูตร 1D1N, 2D, 1D1K และ MCH เมื่ออายุ 2 สัปดาห์ และสูตร 2D, 1D1N, และ 1D1K เมื่ออายุ 4 สัปดาห์ และพันธุ์หอมคลองหลวง 1 ตอบสนองได้ดีต่ออาหารสูตร 1D1N, 2D และ 1D1K เมื่ออายุ 2 สัปดาห์ และสูตร 1D1N เมื่ออายุ 4 สัปดาห์ โดยรวมแล้วอาหารสูตร 1D1N และ 2D เหมาะที่สุดสำหรับพันธุ์ข้าวส่วนใหญ่ และทั้งสองสูตรนี้ทำให้ขนาดของแคลลัสของแต่ละพันธุ์ไม่ต่างกัน ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวพันธุ์ดังกล่าว จึงสามารถใช้สูตรใดสูตรหนึ่งได้

จากปฏิกริยาร่วมระหว่างพันธุ์ข้าว สภาพแสง และสูตรอาหาร ต่อขนาดแคลลัสข้าวอายุ 2 และ 4 สัปดาห์ (ตารางผนวกที่ 1) พบว่า ทุกปัจจัยมีผลต่อขนาดแคลลัสอายุ 2 สัปดาห์อย่างมีนัย

สำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างเมื่อแคลัสอายุ 4 สัปดาห์ อาจเนื่องมาจาก ที่อายุ 2 สัปดาห์ เป็นช่วงที่แคลัสกำลังเจริญเติบโต จึงตอบสนองต่อปัจจัยต่าง ๆ ได้มาก แต่เมื่ออายุ 4 สัปดาห์ เป็นช่วงที่อัตราการเจริญเติบโตเริ่มคงที่แล้ว จึงทำให้ปัจจัยต่าง ๆ ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ไม่มีผลเท่าที่ควรต่อขนาดแคลัสอายุ 4 สัปดาห์ ตารางที่ 4.1.9 แสดงปฏิกิริยาร่วมระหว่างพันธุ์ข้าว สภาพแสง และสูตรอาหารต่อขนาดแคลัสอายุ 2 สัปดาห์ พบว่า พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105, พันธุ์เหลืองประทิว 123, น้ำสะกุก 19 และ หอมคลองหลวง 1 มีขนาดแคลัสใหญ่ที่สุดเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร 1D1N และ 2D ทั้งสองสภาพแสง ส่วนพันธุ์กข 27 นั้น มีแคลัสขนาดใหญ่เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร 1D1N และ 2.5D ทั้งสองสภาพแสง สำหรับขนาดแคลัสอายุ 4 สัปดาห์ พบว่า พันธุ์ข้าว สภาพแสง และสูตรอาหาร มีผลต่อขนาดแคลัส ดังนี้ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ น้ำสะกุก 19 มีแคลัสขนาดใหญ่เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร 1D1N และ 2D ทั้งสองสภาพแสง ส่วน พันธุ์เหลืองประทิว 123, กข 27 และหอมคลองหลวง 1 มีขนาดแคลัสใหญ่เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร 1D1N ทั้งสองสภาพแสง (ตารางที่ 4.1.10)

เมื่อพิจารณาทั้งสองปัจจัยกับขนาดของแคลัส ไม่ว่าเมื่ออายุ 2 หรือ 4 สัปดาห์ กล่าวได้ว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแคลัสข้าวทุกพันธุ์ คือ 1D1N และ 2D ซึ่งข้าวแต่ละพันธุ์ให้ขนาดของแคลัสใกล้เคียงกันไม่ว่าจะมีแสงหรือไม่มีแสงก็ตาม (ตารางผนวกที่ 2) แต่อย่างไรก็ตาม ขนาดแคลัสพันธุ์หอมคลองหลวง 1 มีขนาดเล็กมากเกินกว่าที่จะนำมาเพิ่มจำนวนแคลัสสำหรับการคัดเลือกแคลัสทนเค็ม ดังนั้นการคัดเลือกแคลัสทนเค็มจึงเหลือเพียง 4 พันธุ์ที่ใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.1.5 ปฏิกริยาระหว่างพันธุ์ข้าวและสภาพแสงที่มีต่อขนาดเฉลี่ยของแคลลัสข้าวอายุ 2 สัปดาห์ (มิลลิเมตร)

พันธุ์ข้าว	สภาพแสง ^z		เฉลี่ย
	ไม่มีแสง	มีแสง	
KDML	5.69	5.95	5.82
LPT	5.05	5.43	5.24
RD	5.57	5.91	5.74
NSK	5.31	5.57	5.44
HKL	2.03	2.63	2.33
เฉลี่ย	4.73	5.10	4.91

ตารางที่ 4.1.6 ปฏิกริยาระหว่างพันธุ์ข้าวและสภาพแสงที่มีต่อขนาดเฉลี่ยของแคลลัสข้าวอายุ 4 สัปดาห์ (มิลลิเมตร)

พันธุ์ข้าว	สภาพแสง ^z		เฉลี่ย
	ไม่มีแสง	มีแสง	
KDML	7.16 a	7.52 a	7.34
LPT	6.72 b	7.10 bc	6.91
RD	6.93 ab	7.15 b	7.04
NSK	6.83 b	6.86 c	6.85
HKL	3.17 c	3.83 d	3.50
เฉลี่ย	6.16	6.49	6.33

^z ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.1.7 ปฏิกริยาระหว่างพันธุ์ข้าวและสูตรอาหารต่อขนาดแคลลัสข้าวอายุ 2 สัปดาห์ (มิลลิเมตร)

สูตรอาหาร	พันธุ์ข้าว ^z				
	KDML	LPT	RD	NSK	HKL
2D	6.09 ab	5.55 ab	5.75 ab	5.89 a	2.60 ab
1D1N	6.42 a	6.00 a	6.33 a	5.96 a	2.90 a
1D1K	5.50 bc	5.15 bc	5.13 c	5.61 ab	2.40 abc
2.5D	5.74 bc	4.65 c	6.26 a	4.69 c	2.20 bc
0.5D	5.73 bc	4.90 c	5.66 bc	5.04 bc	2.00 bc
MCH	5.43 c	5.20 bc	5.31 bc	5.44 ab	1.90 c
เฉลี่ย	5.82	5.24	5.74	5.44	2.33

^z ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.1.8 ปฏิกริยาระหว่างพันธุ์ข้าวและสูตรอาหารต่อขนาดแคลลัสข้าวอายุ 4 สัปดาห์ (มิลลิเมตร)

สูตรอาหาร	พันธุ์ข้าว ^z				
	KDML	LPT	RD	NSK	HKL
2D	8.25 a	7.06 ab	7.39 ab	7.22 a	3.50 b
1D1N	8.19 a	7.52 a	7.77 a	7.18 ab	4.10 a
1D1K	7.31 b	7.12 ab	6.46 c	6.84 abc	3.40 b
2.5D	7.65 b	7.01 b	7.23 b	6.42 c	3.40 b
0.5D	6.45 c	6.37 c	6.67 c	6.70 bc	3.50 b
MCH	6.18 c	6.39 c	6.70 c	6.72 bc	3.10 b
เฉลี่ย	7.34	6.91	7.04	6.85	3.50

^z ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.1.9 ค่าเฉลี่ยของขนาดเซลล์ส่วอายุ 2 สัปดาห์ (มิลลิเมตร) ที่ชักนำในอาหารสูตรต่างๆ
ทั้งในสภาพที่มีแสงและไม่มีแสง

พันธุ์ข้าว/สูตรอาหาร	สภาพแสง ^z	
	ไม่มีแสง	มีแสง
KDML		
2D	6.00 ab	6.18 a
1D1N	6.44 a	6.40 a
1D1K	5.10 c	5.90 ab
2.5D	5.62 bc	5.86 ab
0.5D	5.36 bc	6.10 a
MCH	5.60 bc	5.26 b
LPT		
2D	5.50 ab	5.60 b
1D1N	5.60 a	6.40 a
1D1K	4.70 c	5.60 b
2.5D	5.00 abc	4.30 c
0.5D	4.80 bc	5.00 b
MCH	4.70 c	5.70 b
RD		
2D	5.70 a	5.80 bc
1D1N	5.76 a	6.90 a
1D1K	4.70 b	5.56 c
2.5D	6.16 a	6.36 ab
0.5D	5.66 a	5.66 bc
MCH	5.46 a	5.16 c

^z ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.1.9(ต่อ) ค่าเฉลี่ยของขนาดเซลล์สีขาวอายุ 2 สัปดาห์(มิลลิเมตร) ที่ชักนำในอาหาร
สูตรต่างๆ ทั้งในสภาพที่มีแสงและไม่มีแสง

พันธุ์ข้าว/สูตรอาหาร	สภาพแสง ^z	
	ไม่มีแสง	มีแสง
NSK		
2D	5.76 a	6.02 ab
1D1N	5.76 a	6.16 a
1D1K	5.60 a	5.62 ab
2.5D	4.72 b	4.66 c
0.5D	4.70 b	5.38 b
MCH	5.32 ab	5.56 ab
HKL		
2D	2.00 ab	3.20 ab
1D1N	2.40 a	3.40 a
1D1K	2.20 ab	2.60 bc
2.5D	2.00 ab	2.40 c
0.5D	2.00 ab	2.00 c
MCH	1.60 b	2.20 c

^z ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.1.10 ค่าเฉลี่ยของขนาดแคลลัสข้าวอายุ 4 สัปดาห์ (มิลลิเมตร) ที่ชักนำในอาหารสูตรต่างๆ ทั้งในสภาพที่มีแสงและไม่มีแสง

พันธุ์ข้าว/สูตรอาหาร	สภาพแสง ^z	
	ไม่มีแสง	มีแสง
KDML		
2D	8.10 a	8.40 ab
1D1N	7.76 a	8.62 a
1D1K	7.02 bc	7.60 c
2.5D	7.50 ab	7.80 bc
0.5D	6.40 cd	6.50 d
MCH	6.16 d	6.20 d
LPT		
2D	7.10 a	7.02 bc
1D1N	7.12 a	7.92 a
1D1K	6.92 ab	7.32 ab
2.5D	6.86 ab	7.16 b
0.5D	6.32 bc	6.42 c
MCH	6.00 c	6.78 bc
RD		
2D	7.46 a	7.32 bc
1D1N	7.48 a	8.06 a
1D1K	6.26 c	6.66 c
2.5D	7.00 ab	7.46 ab
0.5D	6.72 bc	6.62 c
MCH	6.64 bc	6.76 c

^z ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.1.10(ต่อ) ค่าเฉลี่ยของขนาดแคลสซ์ข้าวอายุ 4 สัปดาห์ (มิลลิเมตร) ที่ชักนำในอาหาร
สูตรต่างๆ ทั้งในสภาพที่มีแสงและไม่มีแสง

พันธุ์ข้าว/สูตรอาหาร	สภาพแสง ^z	
	ไม่มีแสง	มีแสง
NSK		
2D	7.06 a	7.38 a
1D1N	6.98 a	7.38 a
1D1K	7.02 a	6.66 b
2.5D	6.62 a	6.22 b
0.5D	6.58 a	6.82 ab
MCH	6.72 a	6.72 ab
HKL		
2D	3.20 ab	3.80 b
1D1N	3.60 a	4.60 a
1D1K	3.20 ab	3.60 b
2.5D	3.00 ab	3.80 b
0.5D	3.40 a	3.60 b
MCH	2.60 b	3.60 b

^z ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

4.2 ผลการทดลองที่ 2 การคัดเลือกแคลลัสข้าวทนเค็มในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น ระดับต่าง ๆ

เมื่อทำการ subculture แคลลัสข้าวบนอาหารสูตร MS + 2,4-D 2 mg/l + NAA 1 mg/l + casein hydrolysate 0.1 g/l + proline 1 g/l + sucrose 2% เพื่อเพิ่มจำนวนและขนาดของแคลลัสให้เหมาะสมต่อการคัดเลือกแคลลัสทนเค็ม ในระหว่างการคัดเลือกแคลลัสทนเค็ม ข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และ กข 27 ไม่สามารถพัฒนาบนอาหารคัดเลือกได้จนครบจำนวนวันที่ทดลอง ดังนั้นจึงเหลือข้าว 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ น้ำสะกูด 19 ได้ผลดังนี้

1. จำนวนแคลลัสบนอาหารคัดเลือก

จำนวนแคลลัสข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่วางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีปริมาณเกลือ 5 ระดับ เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 วัน ปรากฏผลดังตารางที่ 4.2.1 และตารางผนวกที่ 4 ซึ่งพบว่าในระยะ 15 วันแรก อาหารที่มีเกลือ 0 และ 0.5% มีจำนวนแคลลัสเหลือรอดมากที่สุด ที่ 2.0% รองลงมา ส่วนที่ 1.0 และ 1.5% มีแคลลัสเหลือน้อยที่สุด สำหรับข้าวพันธุ์น้ำสะกูด 19 นั้น 15 วันแรกมีจำนวนแคลลัสเฉลี่ยมากที่สุดบนอาหารที่มีเกลือทุกความเข้มข้น แต่เมื่อคัดเลือกลาน 30, 45 และ 60 วัน เหลือแคลลัสน้อยที่สุดบนอาหารคัดเลือกที่มีเกลือ 2.0% ในแต่ละวันคัดเลือก (ตารางที่ 4.2.1 และตารางผนวกที่ 5) จากการวิเคราะห์ทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 3) พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างพันธุ์ข้าว แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) ของจำนวนวันที่ใช้ในการคัดเลือกและความเข้มข้นเกลือในอาหารคัดเลือก โดยเฉลี่ยข้าวทั้งสองพันธุ์มีจำนวนแคลลัสเหลือรอดชีวิตมากที่สุดบนอาหารคัดเลือกที่มีเกลือ 0 และ 0.5% รองลงมาคือ 1.0, 1.5 และ 2.0% ตามลำดับ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับจำนวนวันที่ใช้ในการคัดเลือก โดยคัดเลือกลาน 15 วันจะเหลือจำนวนแคลลัสรอดชีวิตมากที่สุด และเหลือแคลลัสรอดชีวิตน้อยที่สุดเมื่อคัดเลือกลาน 60 วัน (ตารางที่ 4.2.2 และ 4.2.3) ส่วนแคลลัสข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และ กข 27 นั้นไม่สามารถมีชีวิตรอดได้บนอาหารคัดเลือกที่มีเกลือทุกระดับเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 30 วัน และข้าวพันธุ์หอมคลองหลวง 1 นั้นมีแคลลัสขนาดเล็กมากจึงไม่นำมาใช้ในการคัดเลือกแคลลัสทนเค็ม การวิจัยครั้งนี้ได้ผลใกล้เคียงกับ Chanprame (1985), Hanning and Nabors (1989), Vajrabhaya *et al.* (1989) และ Krishnaraj and Sreerangasamy (1993)

2. พัฒนาการของแคลลัสข้าวบนอาหารคัดเลือก

ในระหว่างการคัดเลือกมีการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสโดยการให้เป็นคะแนน ซึ่งพบว่า แคลลัสข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีระดับคะแนนการพัฒนาของแคลลัสบนอาหารคัดเลือก ดังแสดงในตารางผนวกที่ 6 กล่าวคือ อาหารที่ไม่มีเกลือ จะมีคะแนนการพัฒนาของแคลลัส

สูงที่สุดไม่ว่าจะคัดเลือกนานเท่าใด เมื่อคัดเลือกลาน 30 วันบนอาหารที่มีเกลือ 0.5-2.0% มีระดับคะแนนการพัฒนาใกล้เคียงกัน ซึ่งแสดงว่าความเค็มของเกลือยังไม่แสดงผลต่อการเจริญเติบโตในช่วง 1 เดือนแรก แต่เมื่อคัดเลือกลาน 45 และ 60 วัน พบว่าแคลัสบนอาหารที่มีเกลือ 0.5% มีคะแนนสูงกว่าแคลัสบนอาหารที่มีเกลือ 1.0-2.0% ส่วนข้าวพันธุ์น้ำสะกดย 19 (ตารางผนวกที่ 7) มีระดับคะแนนการพัฒนาของแคลัสบนอาหารคัดเลือกลานที่มีเกลือทุกระดับความเข้มข้นไม่แตกต่างกันมากเมื่อคัดเลือกลาน 15 วัน และมีคะแนนสูงที่สุดในอาหารที่มีเกลือ 0% ไม่ว่าจะวางเลี้ยงนานเท่าใด แต่มีคะแนนลดลงเมื่อคัดเลือกได้ 30, 45 และ 60 วัน บนอาหารที่มีเกลือ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% ตามลำดับ แคลัสที่อยู่บนอาหารคัดเลือกลานจะมีลักษณะของเนื้อเยื่อที่ถูกเกลือทำลาย ซึ่งมีสีคล้ำจนถึงสีน้ำตาลตรงบริเวณที่สัมผัสกับอาหาร หรือมีสีขาวและตาย แต่มีบางก้อนที่เหลือบริเวณที่ไม่ถูกเกลือทำลาย และอาจพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ที่ทนเค็มได้ เมื่อเปรียบเทียบข้าวทั้งสองพันธุ์ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 สามารถทนเค็มได้มากกว่าพันธุ์น้ำสะกดย 19 ดังนั้นการทนเค็มของข้าวขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าว ความเข้มข้นของเกลือและระยะเวลาของการคัดเลือก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chanpramee (1985)

3. ระดับคะแนนการพัฒนาของแคลัสที่ผ่านการคัดเลือกและที่ไม่ได้ผ่านการคัดเลือก

เมื่อนำแคลัสที่ผ่านการคัดเลือกมาทำการคัดเลือกซ้ำอีกรอบ เพื่อเปรียบเทียบกับแคลัสที่ไม่ได้คัดเลือกลานอาหารที่มีเกลือ 5 ระดับ นาน 1 เดือน ได้ผลดังตารางผนวกที่ 8 และ 9 แคลัสของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ผ่านการคัดเลือก เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารที่มีเกลือ 0.5% มีระดับคะแนนการพัฒนาสูงกว่าแคลัสที่ไม่ได้ผ่านการคัดเลือก แต่คะแนนการพัฒนาของแคลัสที่ผ่านการคัดเลือกที่ 1.0% ไม่แตกต่างกันมากกับพวกที่ไม่ผ่านการคัดเลือก และได้ผลเช่นเดียวกับแคลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารที่มีเกลือ 1.5 และ 2.0 % สำหรับแคลัสข้าวพันธุ์น้ำสะกดย 19 ที่ผ่านการคัดเลือกลานอาหารที่มีเกลือ 0.5% เท่านั้นที่มีคะแนนน้อยกว่าแคลัสที่ไม่ผ่านการคัดเลือก แต่แคลัสที่ผ่านการคัดเลือกลานอาหารที่มีเกลือ 1.0-2.0% มีระดับคะแนนสูงกว่าแคลัสที่ไม่ผ่านการคัดเลือก ซึ่งแสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงของแคลัสทำให้เกิดความทนเค็ม จึงสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่านั่นเอง

แคลัสข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ผ่านการคัดเลือก เมื่อย้ายลงเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีเกลือ 1 เดือน ทำให้แคลัสได้มีการปรับสภาพให้เทียบเคียงกับแคลัสที่ไม่ได้ผ่านการคัดเลือก เมื่อทำการทดลองซ้ำจึงได้ผลไม่แตกต่างกัน ส่วนพันธุ์น้ำสะกดย 19 ให้ผลตรงข้ามกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ดังนั้นการศึกษารุ่นนี้จึงน่าจะขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าว

ตารางที่ 4.2.1 ค่าเฉลี่ยของจำนวนแคลลัสข้าว 2 พันธุ์(ขึ้น) ที่คัดเลือกบนอาหารที่มีความเข้มข้น
เกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 ระดับและวางเลี้ยงเป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 วัน (ค่าใน
วงเล็บเป็นเปอร์เซ็นต์)

ความเข้มข้นเกลือ (%)	พันธุ์ข้าว ^z		ความเข้มข้นเกลือ (%)	พันธุ์ข้าว ^z	
	KDML	NSK		KDML	NSK
15 วัน			45 วัน		
0.0	29.75a ^{1/} (59.5)	28.50 a (57.0)	0.0	20.75 a (41.5)	24.75 a (49.5)
0.5	29.50 a (59.0)	29.00 a (58.0)	0.5	21.25 a (42.5)	22.00 b (44.0)
1.0	24.50 b(49.0)	27.00 a (54.0)	1.0	15.00 b (30.0)	21.25 b (42.5)
1.5	24.50 b (49.0)	27.25 a (54.5)	1.5	14.75 b (29.5)	18.00 c (36.0)
2.0	27.00ab (54.0)	24.25 b (48.5)	2.0	16.25 b (32.5)	9.75 d (19.5)
30 วัน			60 วัน		
0.0	27.00 a (54.0)	27.25 a (54.5)	0.0	19.00 a (38.0)	23.00 a (46.0)
0.5	26.75 a (53.5)	26.00ab (52.0)	0.5	18.25 a (36.5)	19.75 b (39.5)
1.0	20.50 c (41.0)	25.75ab (51.5)	1.0	13.50 b (27.0)	17.75 c (35.5)
1.5	17.75 d (35.5)	24.00 b (48.0)	1.5	11.75 b (23.5)	13.50 d (27.0)
2.0	22.50 b (45.0)	19.50 c (39.0)	2.0	7.25 c (14.5)	7.00 e (14.0)

^{1/} ค่าเฉลี่ยจำนวนแคลลัสที่คัดเลือกจากจำนวนเริ่มต้น 200 ขึ้น จำนวน 5 ซ้ำ

^z ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.2.2 ปฏิกริยาระหว่างพันธุ์ข้าวและความเข้มข้นเกลือ (%) ที่มีต่อจำนวนแคลลัสข้าว
2 พันธุ์ (จีน) บนอาหารคัดเลือก (ค่าในวงเล็บเป็นเปอร์เซ็นต์)

ความเข้มข้นเกลือ (%)	พันธุ์ข้าว ^z		เฉลี่ย
	KDML	NSK	
0.0	96.50 a ^{1/} (48.25)	103.50 a (51.75)	100.00 a
0.5	95.00 a (47.50)	96.75 ab (48.38)	95.88 a
1.0	73.50 b (36.75)	91.75 ab (45.88)	82.63 b
1.5	68.75 b (34.38)	82.75 b (41.38)	75.75 bc
2.0	73.00 b (36.50)	60.50 c (30.25)	66.75 c
เฉลี่ย	81.35	87.05	84.20

^{1/} ตัวเลขจำนวนแคลลัสที่คัดเลือกจากจำนวนเริ่มต้น 200 ชิ้น จำนวน 5 ซ้ำ

^z ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.2.3 ปฏิกริยาระหว่างพันธุ์ข้าวและจำนวนวันที่ใช้คัดเลือกที่มีผลต่อจำนวนแคลลัสข้าว
2 พันธุ์ (จีน) บนอาหารคัดเลือก (ค่าในวงเล็บเป็นเปอร์เซ็นต์)

จำนวนวัน	พันธุ์ข้าว ^z		เฉลี่ย
	KDML	NSK	
15	135.25 a ^{1/} (54.10)	136.00 a (54.40)	135.63 a
30	114.50 b (45.80)	122.50 b (49.00)	118.50 b
45	88.00 c (35.20)	95.75 c (38.30)	91.88 c
60	69.75 d (27.90)	81.00 d (32.40)	75.38 d
เฉลี่ย	101.88	108.81	105.34

^{1/} ตัวเลขผลรวมของค่าเฉลี่ยจำนวนแคลลัสที่คัดเลือกจากจำนวนเริ่มต้น 1000 ชิ้น จำนวน 5 ซ้ำ

^z ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

4.3 ผลการทดลองที่ 3 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เกิดขึ้น

นำแคลลัสข้าวอายุ 3 เดือนนับจากเริ่มเพาะเลี้ยงจากเมล็ดและที่ผ่านการ subculture มาทำให้แห้งโดยวางบนจานแก้วปิดฝา นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด แล้วจึงวางเลี้ยงบนอาหารชักนำต้น 4 สูตร ๆ ละ 3 ขั้ว นาน 6 สัปดาห์ ในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกลักษณะการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสข้าว ได้แก่ จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดสีเขียว จำนวนแคลลัสที่เกิดราก จำนวนแคลลัสที่เกิดยอด จำนวนยอดทั้งหมด จำนวนยอดเฉลี่ยต่อก้อนแคลลัส และเปอร์เซ็นต์การเกิดขึ้น จากการทดลองพบว่า เมื่อวางเลี้ยงแคลลัสได้ประมาณ 4 สัปดาห์ แคลลัสบางก้อนเริ่มมีการเปลี่ยนแปลง คือมีจุดสีเขียวเกิดขึ้นบนก้อนแคลลัสก่อนที่จะพัฒนาไปเป็นยอด บางแคลลัสเกิดเฉพาะราก หรือมีรากและจุดสีเขียวบนก้อนเดียวกัน และมีเพียงส่วนน้อยที่มีทั้งยอดและรากบนก้อนแคลลัสเดียวกัน(ภาพผนวกที่ 14) อย่างไรก็ตาม เมื่อแยกต้นข้าวเหล่านี้เป็นต้นเดี่ยวและเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม ต้นข้าวสามารถเกิดรากได้เองโดยไม่ต้องเปลี่ยนชนิดของอาหาร ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสข้าวบนอาหารชักนำต้นมีดังนี้

1. จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดสีเขียวและแคลลัสที่เกิดเฉพาะราก

แคลลัสข้าวทั้ง 4 พันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงก่อนที่จะพัฒนาไปเป็นยอด โดยมีจุดสีเขียวเกิดขึ้นบนก้อนแคลลัสก่อน ซึ่งลักษณะเช่นนี้พบว่าเกิดได้กับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำต้นทุกสูตร และการพัฒนาไปเป็นเฉพาะรากเกิดได้กับอาหารทุกสูตรเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 4.3.1) ลักษณะการพัฒนาของแคลลัสทั้งสองแบบนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของสูตรอาหารและพันธุ์ข้าวที่ใช้ (ตารางผนวกที่ 10)

2. จำนวนแคลลัสที่เกิดยอด จำนวนยอด และเปอร์เซ็นต์การเกิดขึ้น

จำนวนก้อนแคลลัสที่เกิดยอด จำนวนยอดรวม จำนวนยอดเฉลี่ยต่อก้อนแคลลัส และเปอร์เซ็นต์การเกิดขึ้น แสดงในตารางที่ 4.3.1 ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และน้ำสะกุก 19 มีการเกิดยอดมากที่สุดในอาหารสูตร MS ที่มี BA 1 mg/l IAA 0.01 mg/l และ sucrose 3% (สูตร C) คือ 26 ก้อน (63.42%) และ 31 ก้อน (67.39%) ตามลำดับ ส่วนข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และ กข 27 ได้จำนวนแคลลัสที่เกิดยอดมากที่สุดในอาหารสูตร MS ที่มี BA 4 mg/l NAA 1 mg/l และ sucrose 3% (สูตร B) 25 ก้อน (60.98%) และ 23 ก้อน (53.49%) ตามลำดับ ซึ่งจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความแตกต่างของพันธุ์ข้าวและสูตรอาหารมีผลต่อการเกิดยอดบนก้อนแคลลัส โดยที่พันธุ์ข้าวมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และสูตรอาหารชักนำต้นมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) ดังตารางผนวกที่ 10 เมื่อพิจารณาปฏิกริยาระหว่างพันธุ์ข้าวและสูตรอาหาร (ตารางที่ 4.3.2) พบว่า พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ตอบสนองได้ดีต่ออาหารชักนำต้นสูตร

MS ที่มี BA 2 mg/l NAA 2 mg/l และ sucrose 3% (สูตร A), สูตร MS ที่มี BA 4 mg/l NAA 1 mg/l และ sucrose 3% (สูตร B) และสูตร MS ที่มี BA 1 mg/l IAA 0.01 mg/l และ sucrose 3% (สูตร C) ส่วนพันธุ์เหลืองประทิว 123, กข 27 และน้ำสะกวย 19 ตอบสนองได้ดีต่ออาหารชักนำต้นสูตร B และ C จะเห็นได้ว่าอาหารชักนำต้นที่มีประสิทธิภาพในการทำให้แคลลัสข้าวทั้ง 4 พันธุ์เกิดยอดได้ดีคืออาหารสูตร B และ C อาหารทั้งสองสูตรนี้ ทำให้แคลลัสมีจำนวนยอดรวมและจำนวนยอดเฉลี่ยต่อก้อนแคลลัสของข้าวทั้ง 4 พันธุ์สูงที่สุดด้วย พันธุ์ข้าวและสูตรอาหารชักนำต้นที่ต่างกันมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) (ตารางผนวกที่ 10) พบว่า ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นสูงที่สุด 63.42% เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำต้นสูตร C รองลงมา 58.97 และ 55.00% ในอาหารสูตร B และ A ตามลำดับ ส่วนข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123, กข 27 และน้ำสะกวย 19 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นสูงที่สุดในอาหารสูตร B, C และ A ตามลำดับ และข้าวทุกพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นต่ำที่สุดในอาหารสูตร MS ที่มี kinetin 2 mg/l NAA 0.5 mg/l และ sucrose 3% (D) (ตารางที่ 4.3.1) เมื่อพิจารณาปฏิกริยาระหว่างพันธุ์ข้าวกับสูตรอาหาร (ตารางที่ 4.3.2) พบว่าข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และน้ำสะกวย 19 ตอบสนองต่ออาหารสูตร A, B และ C ได้ดี ส่วนข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และกข 27 ตอบสนองต่ออาหารสูตร B และ C ได้ดี แต่อาหารชักนำต้นสูตรที่ดีที่สุดที่ทำให้ข้าวทั้ง 4 พันธุ์มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นสูงที่สุดคืออาหารสูตร B (ตารางที่ 4.3.3) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของประภา ศรีพิจิตต์ และพรทิพย์ ชีวะเศรษฐกรรม (2537) อย่างไรก็ตาม การพัฒนาเป็นต้นจากแคลลัสมีปัจจัยต่าง ๆ ควบคุม เช่น อายุของแคลลัส ซึ่งประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และคณะ (2537) พบว่าแคลลัสที่มีอายุน้อยมีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นได้ดีกว่าแคลลัสที่มีอายุมาก หรือเปอร์เซ็นต์ในการเกิดต้นจะลดลงเมื่อมีการเปลี่ยนอาหารหลายครั้ง นอกจากนี้ สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล และคณะ (2537) พบว่าชนิดของแคลลัสมีผลต่อการพัฒนาไปเป็นต้นเช่นเดียวกัน ซึ่งแคลลัสที่ประกอบไปด้วยเซลล์ที่เกาะกันแน่น จะสามารถพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้ดีกว่าแคลลัสที่เกาะกัน แบบหลวม ๆ (friable cellus) ดังภาพผนวกที่ 4

3. จำนวนต้นที่ชักนำได้จากแคลลัสที่ผ่านการคัดเลือกทนเค็ม

นำแคลลัสข้าวที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 60 วัน มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ จากนั้นจึงนำมาทำให้แห้งโดยวางบนจานแก้วมีฝาปิด นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด ก่อนที่จะนำมาชักนำต้นในอาหารสูตร MS ที่มี BA 4 mg/l IAA 1 mg/l และ sucrose 3% (สูตร B) จากตารางที่ 4.3.4 ได้ต้นข้าวจากแคลลัสที่ผ่านการคัดเลือกทนเค็มของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 % จำนวน 3 และ 19 ยอด และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 4.11 และ 35.19% ตามลำดับ และต้นจากแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารไม่มีเกลือ 16 ต้น (21.05%) ต้นข้าวที่ชักนำ

ได้จากแคลลัสทนเค็ม 1.0% มี 1 ต้นที่เป็นต้นเผือก (1.85%) เมื่อย้ายออกปลูกในกระถาง เหลือต้นข้าวที่รอดชีวิต 2 และ 15 ต้นจากแคลลัสทนเค็ม 0.5 และ 1.0% ตามลำดับ ส่วนแคลลัสที่ทนเค็ม 1.5 และ 2.0% ไม่มีต้นเกิดขึ้น ข้าวพันธุ์น้ำสะกอย 19 สามารถชักนำให้เกิดต้นได้จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีเกลือ 38 ต้น (41.30%) ซึ่งในจำนวนนี้เป็นต้นเผือก 27 ต้น (29.35%) และไม่สามารถชักนำต้นจากแคลลัสที่ผ่านการคัดเลือกทนเค็มที่ความเข้มข้นเกลือทุกระดับได้ ถึงแม้แคลลัสที่ทนเค็ม 0.5% จะมีจุดสีเขียวเกิดขึ้นบนก้อนแคลลัส แต่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นยอด ต้นข้าวที่ชักนำได้ทั้งหมดเหล่านี้มีรากเกิดขึ้นเองเมื่อเพาะเลี้ยงไประยะหนึ่งโดยไม่ต้องเปลี่ยนชนิดอาหาร (ภาพผนวกที่ 6)

จากการศึกษางานวิจัยของ Vajrabhaya *et al.* (1989) ให้ผลเทียบเคียงกับการวิจัยครั้งนี้ โดยความเค็มมีผลต่อการชักนำให้เกิดต้นได้น้อย การชักนำต้นครั้งนี้ได้พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่เป็นต้นเผือกจากแคลลัสทนเค็ม 1.0% และได้ต้นเผือกทั้งต้นจากแคลลัสพันธุ์น้ำสะกอย 19 ที่ไม่ทนเค็มเป็นจำนวนมาก (29.35%) ซึ่งได้ผลเหมือนกับงานวิจัยของ Chanprame (1985) ที่ได้ต้นเผือกทั้งต้นจากพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105

จากตารางที่ 4.3.5 (ภาพผนวกที่ 7-8) ต้นจากแคลลัสข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่ไม่ทนเค็ม ต้นที่เพาะจากเมล็ด และที่ทนเค็ม 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลจากการทดลองปลูกเมื่อวันที่ 25 พฤษภาคม 2545 มีลักษณะการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตโดยเฉลี่ยของจำนวนต้นทั้งหมดของแต่ละกลุ่ม พบว่า ทุกกลุ่มมีจำนวนหน่อต่อต้นเฉลี่ยเท่ากับ 14 หน่อ จำนวนรวงเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มมีค่า 13, 12, 9, 12 รวง ความสูงของต้น 156, 155, 145, 152 เซนติเมตร น้ำหนัก 100 เมล็ดเท่ากับ 2.47, 2.36, 1.98, 2.40 กรัม น้ำหนักเมล็ดทั้งหมดเฉลี่ย 30.95, 31.53, 13.69, 27.42 กรัม และมีการออกดอกในช่วง 27 กันยายน-4 ตุลาคม, 27 กันยายน-5 ตุลาคม, 11-15 ตุลาคม, 24 กันยายน-13 ตุลาคม 2545 ตามลำดับ

พบการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืช คือ หนอนกอแถบลาย (*Chilo suppressalis*) ในระยะแรกของการปลูก และโรคที่เข้าทำลาย คือ โรคเมล็ดด่าง ที่เกิดจากเชื้อ *Trochoconis padwickii*, *Helminthosporium oryzae*, *Curvularia lunata*, *Fusarium semitectum* และ *Sarocladium oryzae* ซึ่งพบในช่วงที่ข้าวเริ่มออกรวงจนถึงเก็บเกี่ยว จากการทดลองนี้ พบการเข้าทำลายที่รุนแรงของโรคในช่วงเดือนตุลาคมเป็นต้นไป ดังนั้นรวงใดที่เกิดในช่วงนี้ จะมีการหลุดเมล็ดสีน้ำตาลที่เปลือกเมล็ด และรุนแรงมากถึงขั้นเมล็ดลีบทั้งรวง สมคิด ดิสถาพร (2532) รายงานว่า โรคเมล็ดด่างเกิดจากเชื้อราหลายชนิดเข้าทำลาย มักจะเกิดในช่วงที่ดอกข้าวผสมแล้ว อยู่ในช่วงเป็นน้ำนมและกำลังสุก หลังจากนั้นประมาณเกือบเดือน (ใกล้เก็บเกี่ยว) อาการเมล็ดด่างจะปรากฏเด่นชัด ซึ่งเป็นผลจูดสีน้ำตาลถึงดำบนเมล็ดเต็มส่วนใหญ่ และทำให้เกิดเมล็ดลีบด้วย ซึ่งต้นข้าวในการทดลองนี้ ต้นที่ประสบปัญหาการเข้าทำลายของโรคที่รุนแรง ได้แก่ ต้นจากแคลลัสทนเค็ม 0.5

เปอร์เซ็นต์ทั้ง 2 ต้น (ต้นที่ 16 และ 17) และต้นจากแคลิฟอร์เนีย 1.0 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่ 4, 8, 10 และ 13

สำหรับลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ด ต้นที่มีน้ำหนักเมล็ดมากที่สุดคือ ต้นที่ 14 (2.85 กรัม) และมีน้ำหนักเมล็ดทั้งหมดมากที่สุด (48.16 กรัม) ส่วนต้นอื่น ๆ มีน้ำหนัก 100 เมล็ดใกล้เคียงกัน ยกเว้นต้นที่ 8 และ 16 ซึ่งมีน้ำหนัก 100 เมล็ดน้อย คือ 1.95 และ 1.85 กรัม ตามลำดับ ส่วนต้นที่ 13 และ 16 เป็นต้นที่ให้น้ำหนักเมล็ดต่อต้นน้อย มีน้ำหนัก 9.37 และ 11.23 กรัม ตามลำดับ เนื่องจากต้นข้าวเหล่านี้ มีดอกที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์จำนวนมาก หรือถูกโรคเมล็ดด่างเข้าทำลาย และสภาพแวดล้อมอาจไม่เหมาะสมสำหรับการผสมพันธุ์ จึงทำให้มีน้ำหนัก 100 เมล็ดน้อย (ตารางที่ 4.3.5)

ตารางที่ 4.3.1 จำนวนแคลลัสรวมของข้าว 4 พันธุ์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำต้นสูตรต่าง ๆ นาน 6 สัปดาห์

พันธุ์ข้าว	สูตรอาหาร	จำนวน	จำนวนแคลลัสที่เกิดการเปลี่ยนแปลง (ก้อน)			จำนวนยอด	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น
		แคลลัสเริ่มต้น				รวม	
		(ก้อน)	จุดสีเขียว	ราก	ยอด	(จำนวนเฉลี่ย/ก้อน)	
KDML	A	40	22	11	22	66 (3.00)	55.00
	B	39	24	17	23	70 (3.04)	58.97
	C	41	27	14	26	92 (3.54)	63.42
	D	39	19	23	12	33 (2.75)	30.77
LPT	A	38	13	11	11	34 (3.09)	28.95
	B	41	27	13	25	95 (3.80)	60.98
	C	43	23	8	23	83 (3.61)	53.49
	D	37	19	19	8	13 (1.63)	21.62
RD	A	37	16	13	13	19 (1.46)	35.14
	B	39	23	5	23	57 (2.48)	58.97
	C	41	25	12	20	64 (3.20)	48.78
	D	40	16	20	7	16 (2.29)	17.50
NSK	A	32	21	13	19	60 (3.16)	59.38
	B	32	30	16	27	106 (3.93)	84.38
	C	46	33	7	31	99 (3.19)	67.39
	D	38	24	19	18	44 (2.44)	47.37

หมายเหตุ A = MS + BA 2 mg/l + NAA 2 mg/l + sucrose 3%
 B = MS + BA 4 mg/l + IAA 1 mg/l + sucrose 3%
 C = MS + BA 1 mg/l + IAA 0.01 mg/l + sucrose 3%
 D = MS + kinetin 2 mg/l + NAA 0.5 mg/l + sucrose 3%

ตารางที่ 4.3.2 ปฏิกริยาระหว่างพันธุ์ข้าวและสูตรอาหารต่อจำนวนการเกิดยอดจากแคลลัสของข้าว 4 พันธุ์ บนอาหารชักนำต้น 4 สูตร เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์(ค่าในวงเล็บเป็นเปอร์เซ็นต์)

สูตรอาหาร	พันธุ์ข้าว ^z				เฉลี่ย
	KDML	LPT	RD	NSK	
A	7.33a (55.00)	3.67b (28.95)	4.33bc (35.14)	6.33b (59.38)	5.42b
B	7.67a (58.97)	8.33a (60.98)	7.67a (58.97)	9.00ab(84.38)	8.17a
C	8.67a (63.42)	7.67a (53.49)	6.67ab (48.78)	10.33a (67.39)	8.33a
D	4.00b (30.77)	2.67b (21.62)	2.33c (17.50)	6.00b (47.37)	3.75c
เฉลี่ย	6.92	5.58	5.25	7.92	6.42

หมายเหตุ ดูคำอธิบายได้ตารางที่ 4.3.1

^z ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.3.3 ปฏิกริยาระหว่างพันธุ์ข้าวและสูตรอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นจากแคลลัสของข้าว 4 พันธุ์ บนอาหารชักนำต้น 4 สูตร เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์

สูตรอาหาร	พันธุ์ข้าว ^z				เฉลี่ย
	KDML	LPT	RD	NSK	
A	54.44 ab	30.57 bc	32.78 bc	60.00 ab	44.44 b
B	60.47 a	60.69 a	60.35 a	84.87 a	66.60 a
C	64.26 a	54.13 ab	48.90 ab	68.15 ab	58.87 a
D	32.95 b	21.67 c	16.67 c	48.33 b	29.91 c
เฉลี่ย	53.03	41.77	39.68	65.34	6.42

หมายเหตุ ดูคำอธิบายได้ตารางที่ 4.3.1

^z ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.3.4 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสชาวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และน้ำสะกดย
19 ที่ผ่านการคัดเลือกบนอาหารชักนำต้นสูตร MS+ BA 4 mg/l + IAA
1 mg/l + sucrose 3% เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์

พันธุ์ ข้าว	%	จำนวนแคล ลัสเริ่มต้น (ชิ้น)	จำนวนแคลลัสที่เกิดการเปลี่ยน			% การ เกิดต้น	หมายเหตุ
			แปลง (ก้อน)				
			จุดสีเขียว	ราก	ยอด		
KDML	0.0	76	18	1	16	21.05	ได้ต้นเผือก
	0.5	73	10	5	3	4.11	1 ต้น
	1.0	54	6	11	19	35.19	(1.85%)จาก
	1.5	47	4	18	0	0	แคลลัสทน
	2.0	25	0	0	0	0	เต็ม 1.0%
NSK	0.0	92	20	5	38	41.30	ได้ต้นเผือก
	0.5	79	37	19	0	0	27 ต้น
	1.0	71	4	0	0	0	(29.35%)
	1.5	54	0	2	0	0	จากแคลลัส
	2.0	28	0	0	0	0	ไม่ทนเต็ม

ตารางที่ 4.3.5 ลักษณะการเจริญเติบโตและพัฒนาของต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้จาก
แคลลัสไมโททเน็มและแคลลัสทเน็ม 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ในกระถางปลูก

ต้น ที่	จำนวน หน่อ ต่อต้น	จำนวน รวง	จำนวนรวง ย่อยเฉลี่ยต่อ รวง	ความสูงต้น (เซนติเมตร)	วันออก ดอกแรก	น้ำหนัก 100 เมล็ด (กรัม)	น้ำหนัก เมล็ดทั้ง หมด (กรัม)
1	14	14	9.57	147	27/9/45	2.45	37.87
2	14	12	9.75	142	27/9/45	2.54	25.53
3	14	11	9.00	138	24/9/45	2.43	17.39
4	16	14	9.21	157	8/10/45	2.09	23.86
5	16	11	9.82	158	29/9/45	2.22	17.23
6	13	11	10.27	145	20/9/45	2.58	27.25
7	12	10	10.00	155	4/10/45	2.44	21.05
8	16	11	10.45	157	9/10/45	1.95	20.28
9	16	14	10.86	150	11/10/45	2.36	39.28
10	15	14	10.14	160	21/9/45	2.09	26.99
11	13	13	11.82	159	25/9/45	2.59	32.47
12	18	16	11.13	158	13/10/45	2.33	42.57
13	8	6	9.33	157	5/10/45	2.37	9.37
14	19	18	9.17	159	25/9/45	2.85	48.16
15	12	10	8.40	148	29/9/45	2.60	22.02
16	14	10	8.90	142	15/10/45	1.85	11.23
17	14	9	9.78	148	11/10/45	2.10	16.14

หมายเหตุ ต้นที่ 1-15 เป็นต้นจากแคลลัสทเน็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์
ต้นที่ 16-17 เป็นต้นจากแคลลัสทเน็ม 0.5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.3.5(ต่อ) ลักษณะการเจริญเติบโตและพัฒนาของต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้
จากแคลลัสไมโททเน็มและแคลลัสทเน็ม 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ในกระถางปลูก

ต้น ที่	จำนวน หน่อ ต่อต้น	จำนวน รวง	จำนวนรวง ย่อยเฉลี่ยต่อ รวง	ความสูงต้น (เซนติเมตร)	วันออก ดอกแรก	น้ำหนัก 100 เมล็ด (กรัม)	น้ำหนัก เมล็ดทั้ง หมด (กรัม)
N1	16	15	10.82	157	4/10/45	2.47	35.23
N2	12	11	9.57	155	4/10/45	2.34	29.87
N3	14	12	11.00	156	27/9/45	2.59	27.74
C1	16	11	10.45	158	27/9/45	2.24	26.47
C2	13	12	8.58	155	5/10/45	2.30	29.87
C3	14	13	10.38	152	29/9/45	2.54	38.24

หมายเหตุ ต้น N1-N3 เป็นต้นที่เพาะจากเมล็ด

ต้น C1-C3 เป็นต้นจากแคลลัสไมโททเน็ม

4. การวิเคราะห์โปรตีนรวมในรากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมในรากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยวิธีของ Bradford assay แบ่งเป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรก ได้แก่ ต้นไม้ทนเค็ม 3 ต้น ต้นที่เพาะจากเมล็ด 3 ต้น ต้นจากแคลสทนเค็ม 0.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ต้น และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 15 ต้น ซึ่งปลูกในสภาพปกติ ส่วนอีกกลุ่มเป็นต้นชนิดเดียวกันกับกลุ่มแรก แต่ปลูกในสารละลายเกลือ ที่มีค่าการนำไฟฟ้า 12 เดซิซีเมนต่อเมตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นนำรากมาสกัดหาปริมาณโปรตีน พบว่า ต้นจากแคลสทนเค็มส่วนใหญ่ เมื่อปลูกในสารละลายเกลือ มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างมาก รวมทั้งจากแคลสที่ไม่ผ่านการคัดเลือก ในขณะที่ต้นจากแคลสทนเค็มต้นที่ 2, 4, 5, 12, 14 และ 17 รวมทั้งต้นที่เพาะจากเมล็ด มีเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (ตารางที่ 4.3.6) สำหรับบางต้นที่ปลูกในสารละลายเกลือพบปริมาณโปรตีนมาก อาจเป็น stress protein ที่ข้าวสร้างขึ้นเมื่อพบกับสภาพที่มีความเค็ม แต่ต้นที่ได้จากแคลสที่ไม่ผ่านการคัดเลือก มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นด้วยนั้น อาจเป็นโปรตีนอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ stress protein เพราะโปรตีนที่ได้จากการทดลองเป็นโปรตีนรวม ส่วนบางต้นที่พบว่ามีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย อาจเป็นเพราะผลจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่ทำให้บางต้นตอบสนองต่อสภาพเครียดได้น้อยจึงพบ stress protein ได้น้อย จากนั้นนำโปรตีนมาทดลองหาขนาดโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE เปรียบเทียบกับ molecular weight standard ขนาด 97.4, 66.2, 45, 31, 21.5 และ 14.4 กิโลดาลตัน ผลการทดลองพบว่า มีเฉพาะรากจากต้นทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่ 1 มีโปรตีนขนาด 89.33 กิโลดาลตัน(ภาพที่ 4.3.1)จากต้นที่ปลูกในสภาพธรรมดา และขนาด 90.22 และ 96.27 กิโลดาลตันจากต้นที่ปลูกในสารละลายเกลือ(ภาพที่ 4.3.2) แต่กัลยา กองเงินและคณะ (2544) ได้ทดลองกับข้าวหลายพันธุ์ที่ปลูกจากเมล็ด พบโปรตีนขนาด 90 กิโลดาลตัน ในรากของข้าวพันธุ์ทนทาน (พอกคาลี) และพันธุ์ทนทานปานกลาง แต่ไม่พบในพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอต่อความเค็ม ส่วนข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ผู้วิจัยใช้ศึกษานี้ ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อาจเกิดการแปรปรวนทางพันธุกรรม จึงทำให้ได้ผลแตกต่างจากกัลยา กองเงินและคณะ (2544)

ตารางที่ 4.3.6 ปริมาณโปรตีนรวม (มิลลิกรัมต่อกรัม) จากรากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูก
ในสภาพธรรมชาติและปลูกในสารละลายเกลือ

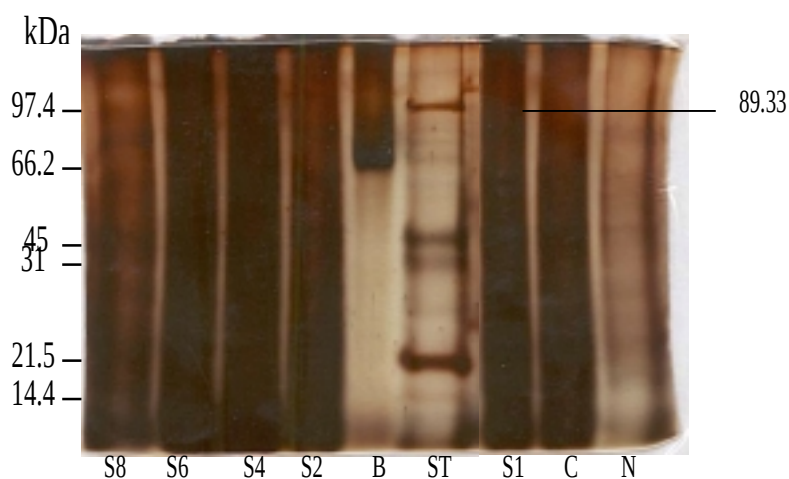
ต้นที่	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อกรัม)		ต้นที่	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อกรัม)	
	สภาพธรรมชาติ	สารละลายเกลือ		สภาพธรรมชาติ	สารละลายเกลือ
1	0.273	1.500	13	0.941	3.703
2	0.477	0.797	14	0.561	0.767
3	0.693	1.676	15	1.050	2.328
4	0.746	1.265	16	0.352	1.573
5	0.273	0.469	17	0.909	1.303
6	1.942	2.629	N1	0.313	0.710
7	0.468	1.735	N2	2.842	3.397
8	1.822	3.022	N3	0.703	0.942
9	1.147	3.178	C1	0.438	2.006
10	0.719	2.142	C2	0.250	0.874
11	0.271	0.776	C3	0.231	1.523
12	3.256	3.400			

หมายเหตุ ต้นที่ 1-15 เป็นต้นจากแคลลัสทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์

ต้นที่ 16-17 เป็นต้นจากแคลลัสทนเค็ม 0.5 เปอร์เซ็นต์

ต้น N1-N3 เป็นต้นที่เพาะจากเมล็ด

ต้น C1-C3 เป็นต้นจากแคลลัสไม่ทนเค็ม



ภาพที่ 4.3.1 เจลที่ย้อมด้วยเทคนิค silver stain แสดง band ของโปรตีนในรากข้าวที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ

ST : Molecular weight standard

B : BSA standard

N : รากจากต้นที่เพาะเมล็ด

C : รากจากต้นไม่ทนเค็ม

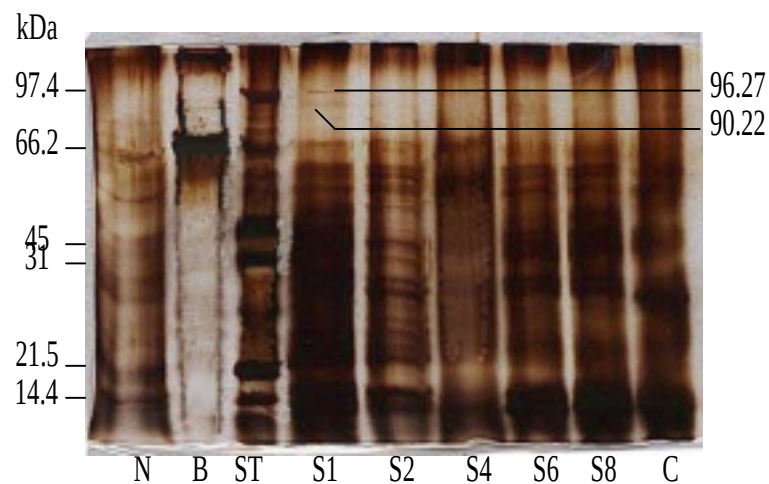
S1 : รากจากต้นทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่ 1

S2 : รากจากต้นทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่ 2

S4 : รากจากต้นทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่ 4

S6 : รากจากต้นทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่ 6

S8 : รากจากต้นทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่ 8



ภาพที่ 4.3.2 เจลที่ย้อมด้วยเทคนิค silver stain แสดง band ของโปรตีนในรากข้าวที่ปลูกในสารละลายเกลือ

ST : Molecular weight standard

B : BSA standard

N : รากจากต้นที่เพาะเมล็ด

C : รากจากต้นไม่ทนเค็ม

S1 : รากจากต้นทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่ 1

S2 : รากจากต้นทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่ 2

S4 : รากจากต้นทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่ 4

S6 : รากจากต้นทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่ 6

S8 : รากจากต้นทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่ 8

5. การวิเคราะห์ปริมาณธาตุ โซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม และคลอไรด์ ในใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ โซเดียม โพแทสเซียม และแคลเซียม ในใบข้าวโดยวิธี atomic absorption ด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer และวิเคราะห์ปริมาณคลอไรด์ ตามวิธีการของ Mohr (ศรีสม สุวรรณวงศ์, 2542) ผลการวิเคราะห์สามารถแบ่งพืชเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่สะสมโซเดียมมากกว่าโพแทสเซียม ได้แก่ ต้นที่เพาะจากเมล็ด ต้นจากแคลลัสทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่ 1, 5, 6, 7, 8, 10, 12 และ 14 และต้นจากแคลลัสทนเค็ม 0.5 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่ 17 ส่วนอีกกลุ่ม มีการสะสมโพแทสเซียมมากกว่าโซเดียม ได้แก่ ต้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ไม่ทนเค็ม ต้นจากแคลลัสทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่ 2, 3, 4, 9, 11, 13 และ 15 ต้นจากแคลลัสทนเค็ม 0.5 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่ 16 และต้นจากแคลลัสทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์ที่ปลูกในสารละลายเกลือ ซึ่งทำให้อัตราส่วนระหว่างโซเดียมต่อโพแทสเซียม (Na/K ratio) ของข้าวกลุ่มแรกมีค่ามากกว่า 1 แต่กลุ่มที่ 2 มีค่าน้อยกว่า 1 ส่วนปริมาณคลอไรด์ในข้าวทั้งสองกลุ่มนั้น มีการสะสมในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้นต้นจากแคลลัสทนเค็ม 0.5 เปอร์เซ็นต์ทั้งสองต้น และต้นไม่ทนเค็มที่มีปริมาณคลอไรด์น้อยกว่าต้นอื่น ๆ สำหรับแคลเซียมนั้น พบต้นที่มีการสะสมต่ำกว่าต้นอื่น ๆ ได้แก่ ต้นจากแคลลัสทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่ 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14 ต้นจากแคลลัสทนเค็ม 0.5 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่ 16 ต้นไม่ทนเค็ม และต้นที่เพาะจากเมล็ด ดังตารางที่ 4.3.7

Yeo and Flowers (1986), Gregorio and Senadhira (1993) และกัลยา กองเงินและคณะ (2544) ได้รายงานเกี่ยวกับการสะสมโซเดียมน้อยกว่าโพแทสเซียม ในข้าวที่ปลูกในสภาพที่มีสารละลายเกลือและข้าวพันธุ์พอกคาลี (พันธุ์ทนทาน) เพื่อเป็นการรักษา Na/K ratio ให้ต่ำ ป้องกันความเป็นพิษของโซเดียมไอออนที่จะมีต่อพืช และสรุปว่าข้าวมีกลไกการทนเค็มแบบไม่ดูดโซเดียม (Na exclusion) นอกจากนี้ Gregorio and Senadhira (1993) รายงานอีกว่า ข้าวพันธุ์ทนทานจะรักษาความเข้มข้นของโซเดียมและคลอไรด์ให้ต่ำ แต่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมและสังกะสีสูง มีอัตราส่วนของโซเดียม-โพแทสเซียม และอัตราส่วนสังกะสี-ฟอสฟอรัสในยอดต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อ่อนแอ และสรุปว่าพืชไม่ดูด (exclusion) โซเดียมและคลอไรด์ในส่วนยอด และมีการเพิ่มความเข้มข้นของโพแทสเซียมในเนื้อเยื่อ เป็นกลไกที่สำคัญในการทนเค็มของข้าว Lauchli and Schubert (1989) พบอีกว่า การที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูง จะช่วยยับยั้งการสะสมโซเดียม และช่วยรักษาอัตราส่วนโซเดียม-โพแทสเซียมให้ต่ำด้วย

สำหรับการวิจัยครั้งนี้ ต้นข้าวที่ใช้ทดลองเป็นต้นที่เกิดจากแคลลัสทนเค็ม 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ และนำมาปลูกในสารละลายเกลือ ดังนั้น มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) เกิดขึ้น ต้นข้าวที่ได้จากแคลลัสจึงมีความแตกต่างกันในการดูดธาตุอาหาร ซึ่งทำให้ผลการวิเคราะห์เนื้อเยื่อพืชมีผลต่างกัน ปริมาณธาตุโซเดียม โพแทสเซียมและคลอไรด์

ตารางที่ 4.3.7 ปริมาณโซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม และคลอไรด์เป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
แห้ง(%Wt) ในใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และค่าอัตราส่วนโซเดียมต่อ
โพแทสเซียม (Na/K ratio)

ต้นที่	โซเดียม	โพแทสเซียม	แคลเซียม	คลอไรด์	โซเดียม/โพแทสเซียม
1	3.05	2.40	0.347	0.123	1.27
2	1.29	2.73	0.124	0.148	0.47
3	2.13	2.77	0.132	0.133	0.77
4	2.04	2.67	0.124	0.140	0.76
5	3.76	2.49	0.184	0.112	1.51
6	3.15	1.95	0.026	0.111	1.61
7	3.28	2.68	0.065	0.107	1.22
8	4.29	2.32	0.054	0.147	1.85
9	1.25	2.01	0.090	0.133	0.62
10	4.30	2.10	0.372	0.112	2.05
11	1.21	2.45	0.363	0.107	0.49
12	3.27	1.78	0.019	0.133	1.84
13	1.34	2.57	0.061	0.149	0.52
14	3.55	2.34	0.060	0.154	1.52
15	1.89	2.22	0.102	0.158	0.85
16	0.71	1.55	0.021	0.088	0.46
17	2.53	1.94	0.116	0.089	1.30
N	2.65	2.04	0.027	0.112	1.30
C	0.57	1.45	0.078	0.073	0.39
S	1.68	1.89	0.323	0.140	0.88

หมายเหตุ ต้นที่ 1-15 เป็นต้นจากแคลลัสทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์

ต้นที่ 16-17 เป็นต้นจากแคลลัสทนเค็ม 0.5 เปอร์เซ็นต์

ต้น N เป็นต้นที่เพาะจากเมล็ด

ต้น C เป็นต้นจากแคลลัสไม่ทนเค็ม

ต้น S เป็นต้นจากแคลลัสทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์ต้นที่ 1 ที่ปลูกในสารละลายเกลือ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสข้าวจากคัพพะ ได้แก่ พันธุ์ข้าว สูตรอาหาร และสภาพการให้แสง ซึ่งมีผลต่อจำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้นและขนาดของแคลลัส
2. ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สามารถเกิดแคลลัสได้ดีกว่าข้าวพันธุ์อื่นๆ ในอาหารสูตรชักนำแคลลัสทุกสูตร ทั้งในสภาพการเพาะเลี้ยงที่มีแสงและไม่มีแสง และแคลลัสที่ได้มีขนาดใหญ่ ซึ่งสังเกตได้จากค่าเฉลี่ยของพันธุ์ (ตารางที่ 4.1.1) ส่วนพันธุ์ข้าวที่ให้จำนวนแคลลัสและขนาดแคลลัสรองลงมา ได้แก่ พันธุ์เหลืองประทิว 123 กข 27 และน้ำสะกวย 19 พันธุ์หอมคลองหลวง 1 ให้จำนวนแคลลัสและขนาดแคลลัสน้อยที่สุด ส่วนพันธุ์หอมสุวรรณบุรีไม่สามารถชักนำแคลลัสได้ในสภาพการเพาะเลี้ยงเหล่านี้
3. สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้ข้าวส่วนใหญ่เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด คือสูตร MS + 2,4-D 1 mg/l + NAA 1 mg/l + kinetin 0.1 mg/l + sucrose 3% (1D1N) และสภาพการเพาะเลี้ยงที่สามารถชักนำให้ข้าวเกิดแคลลัสมากที่สุด คือสภาพการเพาะเลี้ยงให้ได้รับแสง 16 ชั่วโมง มีด 8 ชั่วโมง
4. แคลลัสที่ชักนำได้มีลักษณะเป็น compact callus ซึ่งมีลักษณะเซลล์เกาะกันแน่นเป็นก้อนแข็ง และมีสีเหลืองครีม หากทำให้เกิดบาดแผลโดยการ subculture แคลลัสส่วนใหญ่จะเปลี่ยนสีเริ่มจากบริเวณบาดแผลจนกระทั่งเป็นสีน้ำตาลทั้งก้อน (browning) แต่ถ้าหากเปลี่ยนอาหารหลังจาก subculture จะลดปัญหานี้ได้ และจะเกิดน้อยลงในการ subculture ครั้งต่อไป
5. ความเข้มข้นของเกลือและจำนวนวันที่ใช้ในการคัดเลือกมีผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์น้ำสะกวย 19 ซึ่งการเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวบนอาหารคัดเลือกจะลดลงตามระดับความเข้มข้นของเกลือในอาหารที่เพิ่มขึ้นและระยะเวลาการคัดเลือกที่นานขึ้น
6. สูตรอาหารสูตรชักนำต้นที่ทำให้ข้าวทุกพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นสูงที่สุด คือ สูตร MS ที่มี BA 4 mg/l, IAA 1 mg/l และ sucrose 3%
7. สามารถชักนำต้นจากแคลลัสของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ระดับเกลือ 0, 0.5 และ 1.0 % ได้ 16(21.05%), 3 (4.11%) และ 19 (35.19%) ต้น ตามลำดับ และได้ต้นเผือกจากแคลลัสทนเค็ม 1.0% จำนวน 1 ต้น(1.85%) เมื่อย้ายต้นข้าวเหล่านี้ปลูกในกระถาง เหลือต้นที่รอดชีวิต 16, 2 และ 15 ต้นตามลำดับ ส่วนพันธุ์น้ำสะกวย 19 สามารถชักนำได้เฉพาะจากแคลลัสที่ไม่ทนเค็ม 38 ต้น

(41.30%) ซึ่งเป็นต้นเผือกถึง 27 ต้น (29.35%)

8. ต้นข้าวที่ชักนำได้จากแคลลัสทนเค็ม 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ สามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตได้

9. การหาโปรตีนรวมในรากข้าว พบเฉพาะต้นจากแคลลัสทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่ 1 มีโปรตีนขนาด 89.33 กิโลดาลตัน จากต้นที่ปลูกในสภาพธรรมดา และขนาด 90.22 และ 96.27 กิโลดาลตัน จากต้นที่ปลูกในสารละลายเกลือ

10. ต้นข้าวจากแคลลัสทนเค็มมีการสะสมธาตุโซเดียมและโพแทสเซียมแตกต่างกันไป แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีการสะสมโซเดียมมากกว่าโพแทสเซียม และกลุ่มที่สะสมโพแทสเซียมมากกว่าโซเดียม

ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาวิจัยในหัวข้อต่อไปนี้

1. ศึกษาการรอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในพื้นที่ดินเค็มตามธรรมชาติ
2. ศึกษาคุณค่าทางอาหาร ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

รายการอ้างอิง

- กัลยา กองเงิน, ปิยะดา ธีระกุลพิศุทธิ์, สุมณฑิพย์ บุญนาค และมานิตย์ โหมยิตตระกูล. (2544). การ
ทนเค็มในข้าว : การทดสอบในเรือนทดลอง, ภาคสนาม และโปรตีนที่ถูกชักนำด้วยความ
เค็ม. วารสารวิจัย มข.(บศ.) 1(2) : 26-32.
- กรมพัฒนาที่ดิน. (2527). ความรู้เรื่องดินเค็มภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. ฝ่ายเผยแพร่และประชาสัมพันธ์,
สำนักงานเลขาธิการกรม, กรุงเทพฯ.
- กองกัญและสัตววิทยา. (2541). คำแนะนำการป้องกันกำจัดแมลงและสัตว์ศัตรูพืช ปี 2541. กรม
วิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ชาญ มงคล. (2536). ข้าว. ตำรา-เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 63. ภาคพัฒนาตำราและเอกสารวิชาการ
หน่วยศึกษานิเทศน์, กรมการฝึกหัดครู.
- ชาญวิทย์ ม่วงมิตร. (2537). การชักนำให้เกิดพันธุ์อ้อยทนเค็มโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ถวัลย์รัตน์ ผ่องใส. (2528). การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์มะเขือเทศทน
เค็ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ถวิล กระจุกกุล. (2531). ดิน ปุ๋ย เพื่อการเพาะปลูก. พิมพ์ครั้งที่ 3. ภาควิชาปฐพีวิทยา. มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- เบญจวรรณ ยันต์วิเศษภักดิ์, อุปถัมภ์ มีสวัสดิ์ และกาญจนา กาญจนภูมิ. (2543). เนื้อเยื่อวิทยาของการ
เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.). ว. สงขลานครินทร์.
22(1): 1-6.
- ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เพลิม ระติสุนทร, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล, เลิศลักษณ์
เงินศิริ, เบญจมาศ ศิลาชัย, พรณณิ รอดแรงบุญ, กาญจนา กล้าแข็ง และรังสิต เส็งหะ
พันธุ์. (2537). การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในข้าวโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตอนที่ 1.
ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 28: 381-389.
- ประพาส วีระแพทย์. (2526). ความรู้เรื่องข้าว. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ประภา ศรีพิจิตร และพรทิพย์ ชีวะเศรษฐธรรม. (2537). การพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสที่เจริญ
มาจากคัพพะของข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 28: 27-37.
- เพลิม ระติสุนทร, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล และเลิศ
ลักษณ์ เงินศิริ. (2536). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ. ว. เกษตรศาสตร์(วิทย.)
27: 278-285.
- พรทิพย์ ชีวะเศรษฐธรรม. (2537). ความผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว
หอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- เพิ่มพูน กীরติกสิกร. (2527). ดินภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. คณะเกษตรศาสตร์: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ไพศาล เหล่าสุวรรณ. (2540). สถิติเพื่อการวิจัยและวางแผนการทดลอง. พิมพ์ครั้งที่ 8. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ขงยุทธ โอสดสภา. (2524). ดินเค็มและดินโซดิก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- เขวภา จิระเกียรติกุล. (2536). การชักนำให้หม่อนเกิดการกลายพันธุ์และคัดพันธุ์ทนเค็มโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศรีสม สุวรรณวงศ์. (2542). การวิเคราะห์ธาตุอาหารพืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 87-88.
- สมคิด ดิสถาพร. (2532). ชาวนา ปราบ โรคข้าว. กลุ่มงานวิจัยโรคข้าวและธัญพืชเมืองหนาว. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 17.
- สมศรี อรุณินท์. (2534). การปรับปรุงดินเค็มและดินโซดิก. หน้า 5-10. ใน สมศรี อรุณินท์. เอกสารคู่มือเจ้าหน้าที่ของรัฐเรื่องดินเค็ม. กรมพัฒนาที่ดิน. กรุงเทพฯ.
- สมศรี อรุณินท์. (2539). แผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 6 (พ. ศ. 2530-2534) กับโครงการพัฒนาดินเค็มภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. หน้า 14-17. ใน สมศรี อรุณินท์. เอกสารคู่มือเจ้าหน้าที่ของรัฐโครงการพัฒนาพื้นที่ดินเค็ม ความรู้เรื่องดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. กรมพัฒนาที่ดิน. กรุงเทพฯ.
- สุภัทรา สุขเมธี. (2533). การชักนำให้กล้วยเกิดการกลายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุริยันต์ ฉะอุ่ม, ศรีสม สุรวัฒนานนท์, กมลพรรณ นามวงศ์พรหม และเฉลิมชัย วงศ์วัฒนา. (2540). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวพันธุ์นางมลอเอส-4. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 31:166-174.
- สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เพลิม ระติสุนทร, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, เลิศลักษณ์ เงินศิริ และพรรณฉวี รอดแรงบุญ. (2537). การเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์หอมดอกมะลิ 105 ในสภาพปลอดเชื้อ. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 28: 92-98.
- สำนักงานเศรษฐกิจแห่งชาติ สำนักนายกรัฐมนตรี. (2540). สมุดสถิติรายปีประเทศไทย 2540 (ฉบับย่อ).
- อรพิน ถิระวัฒน์, เจริญ จีนเจียม, ดวงกมล เกษกร, วิโรจน์ สุนทรภัก, จันทนา บุญประภาพัทย์, พิระ นิยมจันทร์, ชาดิชา ชุมสาย ณ อยุธยา และวิเชียร พรหมด้วง. (2537). คู่มือโครงการป้องกันและกำจัดโรคข้าว ประจำปีงบประมาณ 2537. กลุ่มงานโรคพืช กองป้องกันและกำจัดศัตรูพืช. กรมส่งเสริมการเกษตร. 41 หน้า.

- อังคณา สีตะโกเศศ. (2528). การเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโพดเพื่อเพิ่มระดับความทนเค็ม. วิทยานิพนธ์
ปริญญาโทมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อารีย์ วรรณวิวัฒน์. (2540). บทปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. นครราชสีมา. 63 หน้า.
- Ashwani, P., Singla, S. and Anil, G. (1998). Protein alterations associated with salinity, desiccation, high and low temperature stresses and abscisic acid application in seedling of Pusa 169, a high yielding rice (*Oryza sativa* L.) cultivar. **Current Science**. 75(10): 1023-1035.
- Ashwani, P., Singla, S. and Anil, G. (1998). Protein alterations associated with salinity, desiccation, high and low temperature stresses and abscisic acid application in Lal nakanda, a drought-tolerant rice cultivar. **Current Science**. 75(11): 1170-1174.
- Cano, E. A., Perez-Alfocea, F., Moreno, V., and Bolarin, M. C. (1996). Responses to NaCl stress of cultivated and wild tomato species through *in vitro* shoot apex culture. **Plant Cell Reports** 15: 791-794.
- Cano, E. A., Perez-Alfocea, F., Moreno, V., and Bolarin, M. C. (1998). Evaluation of salt tolerance in cultivated and wild tomato species through *in vitro* shoot apex culture. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 53: 19-26.
- Chand, S. and Sahrawat, A. K. (2001). Stimulatory effect of partial desiccation on plant regeneration in Indica rice (*Oryza sativa* L.). **J. Plant Biochem. Biotechnol** 10: 43-47.
- Chanprame, S. (1985). Selection of NaCl tolerant rice (*Oryza sativa* L.) through anther culture. MS Thesis. Kasetsart University.
- Chaudhary, M. T., Wainwright, S. J., and Merette, M. J. (1996). Comparative NaCl tolerance of lucerne plants regenerated from salt-selected suspension cultures. **Plant Sci.** 114: 221-232.
- Chaudhary, M. T., Wainwright, S. J., and Merette, M. J. (1997). Ion accumulation in lucerne plants regenerated from salt-adapted suspension cultures compared with recultured cells from these plants. **Plant Cell Reports** 17: 145-149.
- Chowdhry, C. N., Tyagi, A. K., Maheshwari, N. and Maheshwari, S. C. (1993). Effect of L-proline and L-tryptophan on somatic embryogenesis and plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L. cv. Pusa 169). **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 32: 357-361.

- Dubay, R. S. (1999). Protein synthesis by plants under stressful conditions. p. 365-397. In Perrarakli, M. (editor). Handbook of plant and crop stress; revised and expanded. 2nd edition. Marcel Dekker, Inc. New York. 1254 p.
- Flower, T. J., Troke, P. E., and Yeo, A. R. (1977). The mechanism of salt tolerance in halophytes. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 28: 89-121.
- Garcia-Agustin, P. and Primo-Millo, E. (1995). Selection of a NaCl-tolerant *Citrus* plant. **Plant Cell Reports** 14: 314-318.
- Gregorio, G. B. and Senadhira, D. (1993). Genetic analysis of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.** 86: 333-338.
- Gulati, A. and Jaiwal, P. K. (1993). *In vitro* selection and characterization of tran-4-hydroxyl L-proline resistance callus lines of *Vigna radiata* : Tolerance to NaCl. **Plant Physiol. Biochem.** 31(5): 699-705.
- Hanning, G. and Nabors, M. (1989). *In vitro* tissue culture selection for sodium chloride(NaCl) tolerance in rice and the performance of the regenerants under saline conditions. Tissue Culture for Crop Project (TCCP) Colorado State University. Fort Collins. Colorado. USA.
- Henke, R. R., Mansur, M. A. and Constantin, M. J. (1978). Organogenesis and plantlet formation from organ and seedling derived calli of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Physiol.** 44: 11-14.
- Jain, R. K., Jain, S. and Wu, R. (1996). Stimulatory effect of water stress on plant regeneration in aromatic Indica rice varieties. **Plant Cell Reports** 15: 449-454.
- Krishnaraj, S. and Sreerangasamy, S. R. (1993). *In vitro* salt tolerance screening in long-term anther culture of rice (*Oryza sativa* L.) variety IR 50. **Plant Physiol.** 142: 754-758.
- Kumar, V. and Sharma, D. R. (1988). Isolation and characterization of sodium chloride-resistant callus culture of *Vigna radiata* (L.) Wilczek var. *radiata*. **J. Exp. Bot.** 40: 143-147.
- Lauchli, A. and Schubert, S. (1989). The role of calcium in the regulation of membrane and cellular growth processes under salt stress. In Cherry, J. H. (ed.) NATO ASI Series, Series G: Ecological sciences, vol. 19. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. p. 131-138.
- Lin, C. C. and Kao, C. H. (1996). Proline accumulation is associated with inhibition of rice seedling root growth caused by NaCl. **Plant Sci.** 114: 121-128.

- Lynch, P. T., Finch, R. P., Davey, M. R. and Cocking, E. C. (1991). Rice tissue culture and its application. In Khush, G. S. and Toenniessen, G. H. (eds). Rice Biotechnology. CAB International, IRRI, p. 135-155.
- Martinez, C. A., Maestri, M. and Lani, E. G. (1996). *In vitro* salt tolerance and proline accumulation in Andean potato (*Solanum* spp.) differing in frost resistance. **Plant Sci.** 116: 177-184.
- Morabito, D., Jolivet, Y., Prat, D. and Dizengremel, P. (1995). Difference in the physiological responses of two clones of *Eucalyptus microtheco* selected for their salt tolerance. **Plant Sci.** 114: 129-139.
- Morita, M., Xing, X.-H. and Uno, H. (1999). Synchronized shoot regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) calli on solid medium by adjustment of intracellular 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentration. **Plant Cell Reports** 18: 633-639.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant.** 15: 473-497.
- Peterson, G. and Smith, R. (1991). Effect of abscisic acid and callus size on regeneration of American and international rice varieties. **Plant Cell Reports** 10: 35-38.
- Pierik, R. L. M. (1987). *In vitro* culture of higher plant. Martinus Nijhoff Publisher, Boston. 344p.
- Rance, I. M., Tian, W., Mathewa, H., Alexandre de Kochko, Beachy, R. N. and Fauquet, C. (1994). Partial desiccation of mature embryo-derived calli, a simple treatment that dramatically enhances the regeneration ability of Indica rice. **Plant Cell Reports** 13: 647-651.
- Raven, P. H., Evert, R. F. and Eichhorn, S. E. (1992). Biology of plants. 5th edition. Worth Publishers, New York. 791 p.
- Rueb, S., Leneman, M., Schilperoort, R.A. and Hensgens, L. A. M. (1994). Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 36: 259-264.
- Tsukahara, M. and Hirosawa, T. (1992). Simple dehydration treatment promotes plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus. **Plant Cell Reports** 11: 550-553.
- Tsukahara, M., Hirosawa, T. and Murayama, H. (1996). Effect of culture methods on the regeneration of albino rice (*Oryza sativa* L.) plantlets. **Plant Cell Reports** 15: 597-600.

- Vajrabhaya, M., Thanapaisa, T. and Vajrabhaya, T. (1989). Development of salt tolerant lines of KDML and LPT rice cultivars through tissue culture. **Plant Cell Reports** 8: 411-414.
- Wang, M.S., Zapata, F. J. and De Castro, D. C. (1987). Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature seed and young inflorescence of wild rice (*Oryza perennis* Moench). **Plant Cell Reports** 6: 294-296.
- Yamada, Y. (1982). The significance for rice improvement of studying regeneration in plant tissue culture. p 41-46. In Rice Tissue Culture Planning Conference. IRRI. Manila.
- Yeo, A. R. and Flowers, T. J. (1986). Salinity resistance in rice (*Oryza sativa* L.) and a pyramiding approach to breeding varieties for saline soils. **Aust. J. Plant Physiol.** 13: 161-173.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของจำนวนและขนาดแคลลัสอายุ 2 สัปดาห์และ 4 สัปดาห์ที่ชักนำในอาหารสูตรต่างๆ ในสภาพที่มีแสงและไม่มีแสง

Source of variation	df	Mean Squares		
		จำนวนแคลลัส	ขนาดแคลลัสอายุ 2 สัปดาห์	ขนาดแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์
Main plot (V = พันธุ์ข้าว)	4	5741.09 **	128.13 **	151.95 **
Error a	16	18.31	0.15	0.12
Sub plot (L = สภาพแสง)	1	306.03 **	10.12 **	8.33 **
V x L	4	163.25 **	0.29 ns	0.82 ns
Error b	20	36.35	0.30	0.35
Sub sub plot (M = สูตรอาหาร)	5	743.92 **	6.33 **	9.39 **
V x M	20	340.91 **	0.90 **	1.20 **
L x M	5	22.05 ns	0.70 ns	0.58 ns
V x L x M	20	25.66 ns	0.56 *	0.19 ns
Error c	200	20.73	0.31	0.27
CV (%) a		20.5	8.0	5.5
CV (%) b		28.8	11.1	9.3
CV (%) c		21.8	11.4	8.2

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

* = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 2 ขนาดเฉลี่ยของแคลัสข้าวพันธุ์ต่างๆ อายุ 2 สัปดาห์และ 4 สัปดาห์ (มิลลิเมตร) ในสภาพที่มีแสงและไม่มีแสง

พันธุ์ข้าว	สภาพ	สูตรอาหาร											
		2D		1D1N		1D1K		2.5D		0.5D		MCH	
		2 wk.	4 wk.	2 wk.	4 wk.	2 wk.	4 wk.	2 wk.	4 wk.	2 wk.	4 wk.	2 wk.	4 wk.
KDML	ไม่มีแสง	6.0	8.1	6.4	7.8	5.1	7.0	5.6	7.5	5.4	6.4	5.6	6.2
	มีแสง	6.2	8.4	6.4	8.6	5.9	7.6	5.9	7.8	6.0	6.5	5.3	6.2
LPT	ไม่มีแสง	5.5	7.1	5.6	7.1	4.7	6.9	5.0	6.9	4.8	6.3	4.7	6.0
	มีแสง	5.6	7.0	6.4	7.9	5.6	7.3	4.3	7.2	5.0	6.4	5.7	6.8
RD	ไม่มีแสง	5.7	7.5	5.8	7.5	4.7	6.3	6.1	7.0	5.7	6.7	5.5	6.6
	มีแสง	5.8	7.3	6.9	8.1	5.6	6.7	6.4	7.5	5.7	6.6	5.2	6.8
NSK	ไม่มีแสง	5.8	7.0	5.8	7.0	5.6	7.0	4.7	6.7	4.7	6.6	5.3	6.7
	มีแสง	6.0	7.4	6.2	7.4	5.6	6.7	4.7	6.2	5.4	6.8	5.6	6.7
HKL	ไม่มีแสง	2.0	3.2	2.4	3.6	2.2	3.2	2.0	3.0	2.0	3.4	1.6	2.6
	มีแสง	3.2	3.8	3.4	4.6	2.6	3.6	2.4	3.8	2.0	3.6	2.2	3.6

หมายเหตุ คู่อธิบายใต้ตารางที่ 4.1.1

2 wk. = อายุ 2 สัปดาห์

4 wk. = อายุ 4 สัปดาห์

ตารางผนวกที่ 3 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของจำนวนแคลลัสที่คัดเลือกบนอาหารที่มีความเข้มข้น
เกลือ 5 ระดับและวางเลี้ยงเป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 วัน

Source of variation	df	Mean square
Block (R= จำนวนซ้ำ)	3	70.77 ns
Main plot (V= พันธุ์ข้าว)	1	77.01 ns
Error a	3	30.42
Sub plot(D= ระยะเวลาคัดเลือก)	3	1157.11**
V x D	3	7.82 ns
Error b	18	5.20
Sub sub plot (S= ความเข้มข้นเกลือ)	4	386.60**
V x S	4	72.66**
D x S	12	25.39*
V x D x S	12	8.63 ns
Error c	96	11.23
CV (%) b		10.8
CV (%) c		15.9

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

* = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 4 จำนวนแคลลัสข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารคัดเลือกที่มีความเข้มข้น
เกลือ 5 ระดับ วางเลี้ยงเป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 วัน

ความ เข้มข้น เกลือ (%)	จำนวน วันคัด เลือก	จำนวนแคล ลัสเริ่มต้น (ชิ้น)	ข้าว				จำนวน รวม	จำนวน เฉลี่ย
			1	2	3	4		
0.0	15	32	32	30	27	30	119	29.75
	30	32	30	27	23	28	108	27.00
	45	32	21	20	20	22	83	20.75
	60	32	20	17	20	19	76	19.00
0.5	15	32	32	29	29	28	118	29.50
	30	32	26	26	27	28	107	26.75
	45	32	21	20	22	22	85	21.25
	60	32	18	18	20	17	73	18.25
1.0	15	32	24	25	21	28	98	24.50
	30	32	21	21	17	23	82	20.50
	45	32	12	16	13	19	60	15.00
	60	32	8	15	12	19	54	13.50
1.5	15	32	15	26	28	29	98	24.50
	30	32	9	18	20	24	71	17.75
	45	32	8	17	19	15	59	14.75
	60	32	8	15	14	10	47	11.75
2.0	15	32	24	24	30	30	108	27.00
	30	32	19	18	29	24	90	22.50
	45	32	8	13	24	20	65	16.25
	60	32	4	7	12	6	29	7.25

ตารางผนวกที่ 5 จำนวนแคลลัสข้าวพันธุ์น้ำสะอูย 19 บนอาหารคัดเลือกที่มีความเข้มข้นเกลือ
5 ระดับ วางเลี้ยงเป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 วัน

ความ เข้มข้น เกลือ(%)	จำนวน วันคัด เลือก	จำนวน แคลลัส เริ่มต้น (ชิ้น)	ชำ				จำนวน รวม	จำนวน เฉลี่ย
			1	2	3	4		
0.0	15	32	29	30	27	28	114	28.50
	30	32	26	29	26	28	109	27.25
	45	32	20	28	24	27	99	24.75
	60	32	19	28	19	26	92	23.00
0.5	15	32	27	32	27	30	116	29.00
	30	32	23	29	25	27	104	26.00
	45	32	15	29	22	22	88	22.00
	60	32	10	28	21	20	79	19.75
1.0	15	32	28	27	24	29	108	27.00
	30	32	25	26	23	29	103	25.75
	45	32	20	24	20	21	85	21.25
	60	32	17	24	16	14	71	17.75
1.5	15	32	27	26	31	25	109	27.25
	30	32	23	22	26	25	96	24.00
	45	32	18	18	18	18	72	18.00
	60	32	16	14	15	9	54	13.50
2.0	15	32	22	25	27	23	97	24.25
	30	32	18	19	22	19	78	19.50
	45	32	12	9	9	9	39	9.75
	60	32	9	4	8	7	28	7.00

ตารางผนวกที่ 6 คะแนนการพัฒนาของแคลลัสข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารคัดเลือกที่มีความเข้มข้นเกลือ 5 ระดับ วางเลี้ยงเป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 วัน

ความเข้มข้นเกลือ(%)	จำนวนวันคัดเลือก	ชำ				คะแนนรวม	ค่าเฉลี่ย
		1	2	3	4		
0.0	15	96 ^z	84	91	92	363	90.75±4.99
	30	88	83	88	87	346	86.50±2.38
	45	82	76	77	73	308	77.00±3.74
	60	74	66	66	69	275	68.75±3.78
0.5	15	66	68	83	89	306	76.50±11.27
	30	64	63	71	77	275	68.75±6.55
	45	54	54	62	59	229	57.25±3.95
	60	54	51	61	50	216	54.00±4.97
1.0	15	83	75	73	89	320	80.00±7.39
	30	72	62	47	79	260	65.00±13.88
	45	44	49	36	54	183	45.75±7.61
	60	34	44	32	51	161	40.25±8.88
1.5	15	58	84	82	85	309	77.25±12.89
	30	41	72	75	73	261	65.25±14.75
	45	29	43	48	48	168	42.00±8.98
	60	22	41	45	34	142	35.50±10.08
2.0	15	72	68	87	82	309	77.25±8.77
	30	60	49	77	70	256	64.00±12.19
	45	35	45	59	46	185	46.25±9.84
	60	26	32	44	42	144	36.00±8.49

^z คะแนนการพัฒนาของแคลลัสคิดจากระดับคะแนน 1-6 ของแคลลัสที่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกนาน 15, 30, 45 และ 60 วัน

ตารางผนวกที่ 7 คะแนนการพัฒนาของแคลิฟอร์เนียของทารกคลอดก่อนกำหนด 19 บนมารคัดเลือกว่ามีความ
ความเข้มข้นเกลือ 5 ระดับ วางเลี้ยงเป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 วัน

ความ เข้มข้น เกลือ(%)	จำนวน วันคัด เลือก	ซ้ำ				คะแนน รวม	ค่าเฉลี่ย
		1	2	3	4		
0.0	15	95 ^z	82	85	90	352	88.00±5.72
	30	90	71	78	83	322	80.50±8.02
	45	78	68	72	68	286	71.50±4.73
	60	66	66	68	65	265	66.25±1.26
0.5	15	74	68	76	92	310	77.50±10.25
	30	63	55	72	78	268	67.00±10.10
	45	50	43	57	61	211	52.75±7.93
	60	45	36	53	48	182	45.50±7.14
1.0	15	78	84	83	85	330	82.50±3.11
	30	61	72	70	73	276	69.00±5.48
	45	46	46	50	57	199	49.75±5.19
	60	37	43	42	53	175	43.75±6.70
1.5	15	79	74	73	78	304	76.00±2.94
	30	60	55	59	49	223	55.75±4.99
	45	40	43	39	30	152	38.00±5.63
	60	36	36	31	28	131	32.75±3.95
2.0	15	85	79	79	82	325	81.25±2.87
	30	36	45	36	47	164	41.00±5.83
	45	29	27	31	31	118	29.50±1.91
	60	28	25	25	24	102	25.50±1.73

^z คะแนนการพัฒนาของแคลิฟอร์เนียจากระดับคะแนน 1-6 ของแคลิฟอร์เนียที่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อ
วางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกว่านาน 15, 30, 45 และ 60 วัน

ตารางผนวกที่ 8 ระดับคะแนนการพัฒนาของแคลลัสข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารคัดเลือกเมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน เปรียบเทียบกับแคลลัสที่ไม่ได้ผ่านการ คัดเลือกมาก่อน

ความเข้มข้นเกลือ (%)	ชนิดของ แคลลัส	Plate no.															รวม	เฉลี่ย
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
0.5	Control	88	79	88													255	85.00
	Reselected	96	67	73	67	118	120	96	86	95	96	96	81	110	88	88	1377	91.80
1.0	Control	80	72	72													224	74.67
	Reselected	92	52	60	76	81	72	96	90	69	80	64	76	80			988	76.00
1.5	Control	64	64	64													192	64.00
	Reselected	68	64	88	64	64	64	64	54	80							610	67.78
2.0	Control	26	26	56													108	36.00
	reselected	29	45	22	38												134	33.50

หมายเหตุ control = แคลลัสที่ไม่เคยคัดเลือกทนเค็ม

reselected = แคลลัสที่ผ่านการคัดเลือกทนเค็ม

ตารางผนวกที่ 9 ระดับคะแนนการพัฒนของแคลลัสข้าวพันธุ์น้ำสะกูด 19 บนอาหารคัดเลือกเมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน เปรียบเทียบกับ
แคลลัสที่ไม่ได้ผ่านการคัดเลือกมาก่อน

ความเข้มข้น เกลือ (%)	ชนิดของ แคลลัส	Plate no.							รวม	เฉลี่ย
		1	2	3	4	5	6	7		
0.5	Control	90	73	78	74	92			407	81.40
	Reselected	84	84	71	54	80	80	96	549	78.43
1.0	Control	56	64	64	71				255	63.75
	Reselected	54	90	90	96	96			426	85.20
1.5	Control	96	41	100	44	76			357	71.40
	Reselected	96	60	74	86				316	79.00
2.0	Control	31	26	78	76				211	52.75
	Reselected	96	100	70					266	88.67

หมายเหตุ control = แคลลัสที่ไม่เคยคัดเลือกทดแทน
reselected = แคลลัสที่ผ่านการคัดเลือกทดแทน

ตารางผนวกที่ 10 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของจำนวนแคลลัสที่เกิดจุดสีเขียว ราก ยอด และเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นของข้าว 4 พันธุ์
บนอาหารชักนำต้น 4 สูตร

Source of variation	df	MS			
		จำนวนแคลลัสที่เกิด	จำนวนแคลลัสที่เกิด	จำนวนแคลลัสที่เกิด	เปอร์เซ็นต์การเกิด
		จุดสีเขียว(ก้อน)	ราก(ก้อน)	ยอด(ก้อน)	ต้น
จำนวนซ้ำ	2	1.08 ns	12.25 ns	4.33ns	116.42 ns
Main plot (V= พันธุ์ข้าว)	3	7.74 ns	3.17 ns	18.22*	1675.74**
Error a	6	63.22	3.08	2.89	63.86
Sub plot (M= สูตรอาหาร)	3	8.74 ns	22.06 ns	59.39**	3155.21**
V x M	9	1.26 ns	3.48 ns	2.46 ns	89.84 ns
Error b	24	3.13	9.21	3.19	230.98
CV (%) a		44.5	37.0	26.5	16.0
b		31.6	63.9	27.9	30.4

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

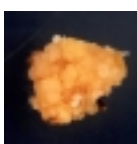
* = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

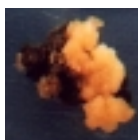
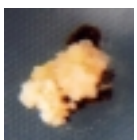
ภาพผนวกที่ 1 ภาพแสดงระดับคะแนนการพัฒนาของแคลลัสข้าวบนอาหารคัดเลือก



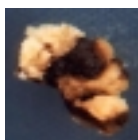
6 = แคลลัสมีสีเหลืองครีมทั้งก้อน



5 = แคลลัสมีสีเหลืองครีมคล้ำกว่าปกติหรือไม่สดใส



4 = แคลลัสมีสีเหลืองครีมแต่มีบางส่วนที่เป็นสีน้ำตาลหรือดำน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์



3 = แคลลัสมีสีเหลืองครีมแต่มีบางส่วนที่เป็นสีน้ำตาลหรือดำ 50 เปอร์เซ็นต์



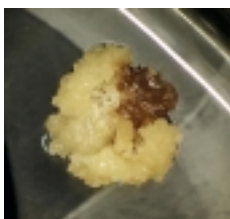
2 = แคลลัสมีสีเหลืองครีมแต่มีบางส่วนที่เป็นสีน้ำตาลหรือดำมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์



1 = แคลลัสตาย



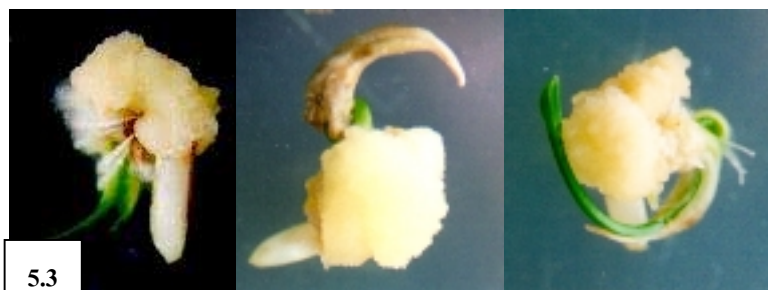
ภาพผนวกที่ 2 แคลลัสที่มีจุดสีเขียวเกิดขึ้นบนก้อนแคลลัสเมื่อชักนำบนอาหาร
สูตร 1D1K และ 0.5D



ภาพผนวกที่ 3 แคลลัสที่มีขนาดที่เหมาะสมจะถูกแยกยอดและรากออกเพื่อนำ
ไปเพิ่มปริมาณและคัดเลือกแคลลัสต้นเต็ม



ภาพผนวกที่ 4 แสดงแคลลัสชนิด friable ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน



ภาพผนวกที่ 5 ขนาดของแคลลัสข้าวบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส

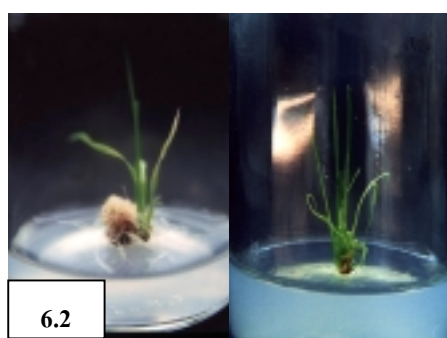
5.1 แคลลัสที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.1, 0.2 และ 0.4 เซนติเมตร

5.2 แคลลัสที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-0.6 เซนติเมตร

5.3 แคลลัสที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.7-0.9 เซนติเมตร



6.1



6.2



6.3

ภาพผนวกที่ 6 ต้นข้าวที่ชักนำได้จากแคลลัสทนเค็มและแคลลัสที่ไม่ได้คัดเลือกทนเค็ม

- 6.1 ต้นข้าวจากแคลลัสข้าวพันธุ์น้ำสะกูด 19 ที่คัดเลือกบนอาหารที่ไม่มีเกลือ โซเดียมคลอไรด์ ซึ่งสามารถชักนำได้ทั้งต้นปกติและต้นเหี่ยว
- 6.2 ต้นข้าวจากแคลลัสข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่คัดเลือกบนอาหารที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์
- 6.3 ต้นข้าวจากแคลลัสทนเค็ม 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และได้ต้นข้าวเหี่ยว 1 ต้น จากแคลลัสทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์



ภาพผนวกที่ 7 ต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ชักนำได้จากแคลสัทนเค็ม



ภาพผนวกที่ 8 ต้นข้าวที่เกิดจากแคลล์สแทนเค็มสามารถสืบพันธุ์และติดเมล็ด

ประวัติผู้เขียน

นางสาวพิจา ทิมสุกใส เกิดเมื่อวันที่ 14 พฤศจิกายน พ.ศ. 2519 ที่ อ.เมือง จ.สกลนคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 2540 ภายหลังสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี ได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 2541 สถานที่ติดต่อได้สะดวก 449 ถ.ชมราช ต.ในเมือง อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000