บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การเตรียมต้นข้าวสำหรับการทดลอง

3.1.1 การขยายพันธุ์ข้าวในสภาพปลอดเชื้อ

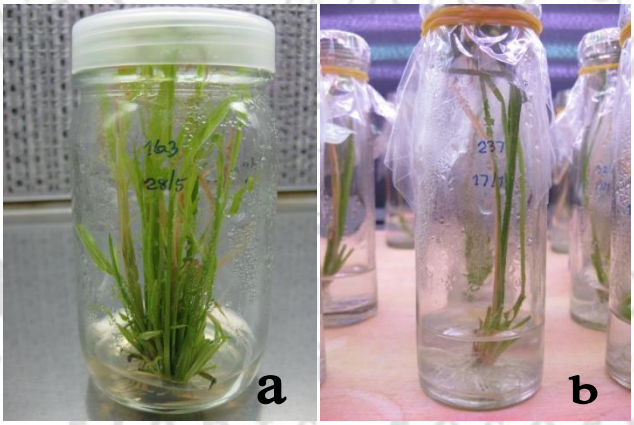
พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลองคือ ข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับรุ่นที่ BC_3F_6 ที่ได้จากคู่ผสม Rathu Heenati/KDML 105 จำนวน 10 สายพันธุ์ และข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับรุ่นที่ BC_4F_3 ที่ได้จาก Rathu Heenati/KDML 105//Chai Nat 1 จำนวน 2 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.1) ต้นข้าวที่ใช้เพื่อการทดลองทั้งหมดได้จากการนำมาขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อโดยนำเมล็ดข้าวมาแกะเปลือกด้วยมือแล้วฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที นำมาฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่หนึ่งด้วย Clorox (sodium hypochlorite 60 percent) ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ tween 20 จำนวน 2-3 หยดเป็นเวลา 14-16 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่า จากนั้นนำเมล็ดข้าวมาฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่สองด้วย Clorox ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นจึงนำเมล็ดข้าวลงบนผิวหน้าอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ค่า pH 5.7-5.8 และมี kalcogel ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์เป็นวัสดุค้ำจุน เพาะเมล็ดข้าวในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อหนึ่งวันจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนส์ เมื่อเมล็ดข้าวงอกเป็นต้นกล้าอายุ 2-3 สัปดาห์ เพิ่มปริมาณต้นข้าวด้วยวิธีการ sub culture บนอาหารแตกกอสูตร MS ที่เติม 6-Benzylaminopurine (BAP) ความเข้มข้น 5 มิลลิลิตรต่อลิตร เมื่อต้นข้าวมีอายุ 4 สัปดาห์จึงย้ายต้นกล้าดังกล่าววางบนอาหาร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน จากนั้นประมาณ 4 สัปดาห์ เลือกต้นข้าวที่แข็งแรงย้ายลงบนอาหาร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 2 มิลลิลิตรต่อลิตรเพื่อเพิ่มการเกิดรากอีกประมาณ 3-4 สัปดาห์จึงนำออกปลูกในกระถางเพื่อใช้ในการทดลอง

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.1 รายชื่อสายพันธุ์ข้าว ที่มา และแหล่งที่มา

สายพันธุ์ที่	ชื่อ	ที่มา	แหล่งที่มา
1	29(3)-(1)	BC_3F_6 (Rathu Heenati/KDML105)	Rice Gene Discovery Unit*
2	158(3)-(1)	BC_3F_6 (Rathu Heenati/KDML105)	Rice Gene Discovery Unit
3	163(4)-(1)	BC_3F_6 (Rathu Heenati/KDML105)	Rice Gene Discovery Unit
4	170-(1)	BC_3F_6 (Rathu Heenati/KDML105)	Rice Gene Discovery Unit
5	237(4)-(1)	BC_3F_6 (Rathu Heenati/KDML105)	Rice Gene Discovery Unit
6	282(3)-(1)	BC_3F_6 (Rathu Heenati/KDML105)	Rice Gene Discovery Unit
7	318(4)-(1)	BC_3F_6 (Rathu Heenati/KDML105)	Rice Gene Discovery Unit
8	325(3)-(1)	BC_3F_6 (Rathu Heenati/KDML105)	Rice Gene Discovery Unit
9	410(4)-(1)	BC_3F_6 (Rathu Heenati/KDML105)	Rice Gene Discovery Unit
10	437(2)(4)-(1)	BC_3F_6 (Rathu Heenati/KDML105)	Rice Gene Discovery Unit
11	CH71	BC_4F_3 (Rathu Heenati/KDML 105//Chai Nat 1)	Rice Gene Discovery Unit
12	CH75	BC_4F_3 (Rathu Heenati/KDML 105//Chai Nat 1)	Rice Gene Discovery Unit

*Rice Gene Discovery Unit, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand



ภาพที่ 3.1 การเตรียมต้นข้าวในสภาพปลอดเชื้อเพื่อใช้ในการทดลอง (a) ต้นข้าวบนอาหาสูตรแตกกอ (b) ต้นข้าวบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดราก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.2 การย้ายออกปลูกในกระถาง

นำข้าวที่ได้จากการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อย้ายลงปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว โดยผ่านการปรับสภาพปรับสภาพก่อนย้ายออกปลูก ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 หลังปลูก 7 วัน หลังจากต้นข้าวมีอายุ 1 เดือนเพิ่มความสมบูรณ์ของต้นข้าวด้วยปุ๋ยละลายน้ำโดยใช้ปุ๋ยสูตร 17-17-17 จำนวน 36 กรัม 13-0-46 จำนวน 8 กรัม 0-0-60 จำนวน 12 กรัม KH_2PO_4 จำนวน 8 กรัม H_3BO_3 จำนวน 0.5 กรัม และ Fetrilon®- Combi 1 จำนวน 12.5 กรัม ต่อน้ำ 100 ลิตร ให้ทางดินทุก 10 วัน (ภาพที่ 3.2) สำหรับข้าวสายพันธุ์ลูกผสมกลับ BC_3F_6 (Rathu Heenati/KDML 105) เมื่อต้นข้าวมีอายุประมาณ 50 วัน ย้ายเข้าห้องควบคุมแสงเพื่อกระตุ้นให้เกิดดอกประมาณ 20 วัน เมื่อต้นข้าวเข้าสู่ระยะตั้งท้อง (booting stage) แล้วจึงนำดอกมาใช้ในการทดลอง สำหรับในช่วงวันที่มีช่วงแสงสั้นต้องเปิดไฟให้แสงสว่างเพื่อยับยั้งการออกดอกของข้าว

ภาพที่ 3.2 การเตรียมต้นข้าวสำหรับใช้เพื่อการทดลองที่ปลูกในกระถาง และเพิ่มความสมบูรณ์ของต้นข้าวด้วยปุ๋ยละลายน้ำทุก 10 วัน

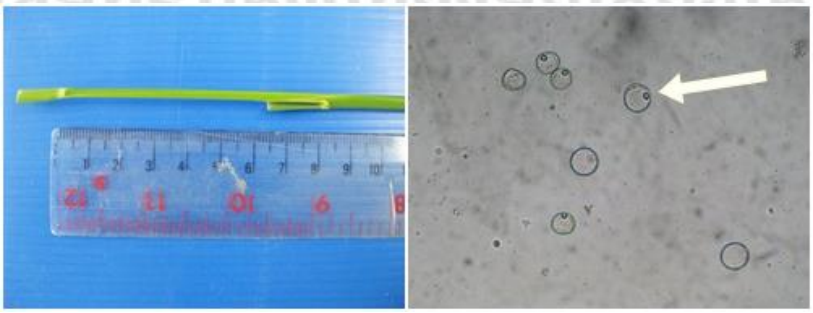
3.1.3 การเตรียมดอกข้าวสำหรับการทดลอง

เลือกเก็บช่อดอกจากต้นหลักที่มีระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นที่เหมาะสม อยู่ในระยะตั้งท้อง ปราศจากโรคและแมลง มีระยะห่างระหว่างข้อใบธงกับข้อใบที่อยู่ถัดลงมา (auricle) ประมาณ 8-12 และ 12-16 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.3) โดยตัดดอกในช่วงเวลา 08.00-10.00 น. ซึ่งละอองเรณูมีระยะการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พัฒนาในช่วงกลางถึงช่วงท้ายของการเกิดนิวเคลียสเดียว (mid-late uninucleate) (ภาพที่ 3.4) ทำความสะอาดช่อดอกโดยฉีดพ่นด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วบรรจุใส่ถุงพลาสติกซึ่งมีกระดาษทิชชูชุบน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 8-12 องศาเซลเซียส เพื่อทำ cold pretreatment นาน 8-12 วัน จากนั้นจึงทำความสะอาดช่อดอกด้วยการฉีดพ่นแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ฉีกกาบใบออกแล้วฉีดพ่นด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์อีกครั้งจนชุ่ม คัดเลือกดอกข้าวที่มีกลีบดอกเป็นสีเขียวอ่อนปนขาว ซึ่งจะอยู่ระหว่างกึ่งกลางช่อดอก และมีอับเรณูที่มีความสูงไม่เกินครึ่งหนึ่งของความยาวช่อดอก (ยี่โถ, 2540) ใช้มีดตัดกลีบรองดอก (sterile lemma) แล้วแยกเปลือกข้าวออกจากกัน ใช้ปากคีมคีบอับเรณูออกจากดอกและใช้มีดตัดแยกอับเรณูออกจากรังไข่ นำอับเรณูและรังไข่ไปใช้ในการทดลอง

ภาพที่ 3.3 ลักษณะดอกจากต้นหลักในระยะตั้งท้องมีระยะห่างระหว่างข้อใบธงกับข้อใบที่อยู่ถัดลงมาประมาณ 8-12 และ 12-16 เซนติเมตร



ภาพที่ 3.4 ระยะห่างระหว่างข้อใบธงกับข้อใบที่อยู่ถัดลงมาที่ 8-12 ซม. และละอองเรณูมีระยะการพัฒนาช่วงกลางถึงช่วงท้ายของการเกิดนิวเคลียสเดียว

3.2 การทดสอบผลของการ pretreatment ที่มีผลต่อความอยู่รอดของรังไข่เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร

3.3.1 การทดสอบผลของการแช่ BAP ร่วมกับความเย็นก่อนนำรังไข่มาเพาะเลี้ยงบนอาหารต่ออัตราการอยู่รอดของรังไข่

ทดสอบความเข้มข้นของ BAP ที่ระดับความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 0 0.1 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้ข้าวสายพันธุ์ 437(2)(4)-(1) ในการทดลอง ใช้ช่อดอกที่มีระยะห่างระหว่างข้อใบธงกับข้อใบที่อยู่ถัดลงมา 8-12 เซนติเมตร โดยตัดแยกดอกข้าวออกจากช่อดอกใส่ในจานแก้ว (plate) ที่บรรจุด้วย BAP ความเข้มข้นต่างๆ พันรอบจานแก้วด้วยพาราฟิล์ม นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตัดแยกรังไข่ออกจากดอกแล้ววางบนอาหารสูตร O2 (N6 ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrolysate (CH) 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และ sucrose 40 กรัมต่อลิตร) และ A2 (N6 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร CH 500 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ maltose 50 กรัมต่อลิตร) บันทึกผลการทดลองทุก 2 วัน

3.2.2 ทดสอบผลของการตัดส่วนของ stigma ออกจากรังไข่ที่มีผลต่อความอยู่รอดและการพัฒนาของรังไข่

เนื่องจากในการทดลองเบื้องต้น พบว่าการตัดส่วนของ stigma ออกจากรังไข่ทำให้เกิดบาดแผลมีผลทำให้เกิดสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจส่งผลต่ออัตราการอยู่รอดและพัฒนาของรังไข่ จึงทดลองเพาะเลี้ยงรังไข่ในลักษณะที่ตัดและไม่ตัดแยก stigma ออก โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร 3 สูตร คือ O2 A2 และA4 (MS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร CH 500 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ maltose 50 กรัมต่อลิตร) ในสภาพมีแสง สังเกต และบันทึกผล

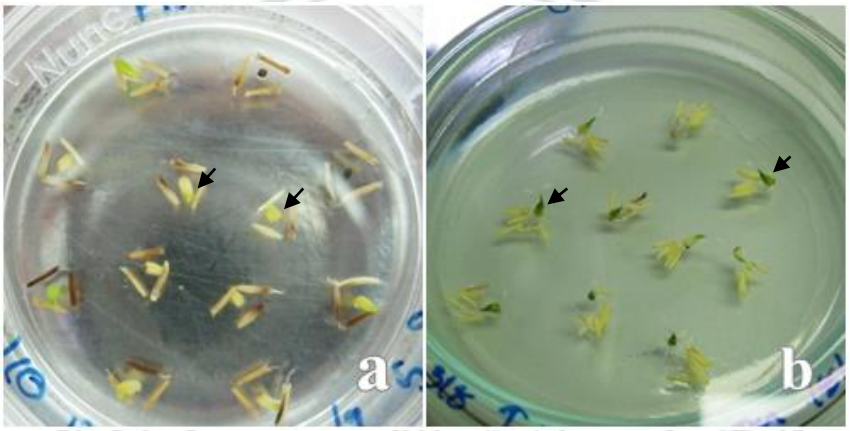
3.3 ทดสอบผลของแสงต่อความอยู่รอดและการพัฒนาของรังไข่

ทดสอบโดยเปรียบเทียบอัตราการอยู่รอด การเจริญและพัฒนาของรังไข่ ในสภาพมีแสงและไม่มีแสง ในสภาพมีแสงให้แสง 16 ชั่วโมง และมืด 8 ชั่วโมง ส่วนในสภาพไม่มีแสงคือไม่มีแสงสว่างตลอดเวลาบนอาหารสูตร O2 โดยใช้ข้าวสายพันธุ์ 163(4)-(1) และ 237(4)-(1) ในการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 ทดสอบผลของการเลี้ยงร่วมกันระหว่างรังไข่และอับเรณู

เนื่องจากผลการทดลองเบื้องต้น พบว่ารังไข่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารร่วมกับอับเรณูมีลักษณะการพัฒนาแตกต่างจากการเลี้ยงรังไข่เพียงอย่างเดียว จึงนำมาศึกษาทดลองโดยเพาะรังไข่เลี้ยงร่วมกับอับเรณูบนอาหาร 3 สูตร คือ O2 A2 และ A4 ในสภาพมีแสงเปรียบเทียบลักษณะการเจริญและพัฒนาของรังไข่ ทั้งแบบตัดแยกออกจากกันวางบนอาหารแยกชิ้นกันและไม่ตัดแยกออกจากกันโดยให้ส่วนของก้านชูอับเรณูติดอยู่กับฐานของรังไข่ (ภาพที่ 3.5)



ภาพที่ 3.5 การเพาะเลี้ยงอับเรณูร่วมกับรังไข่ (ลูกศรดำ) (a) แบบตัดแยกออกจากกัน และ (b) ไม่ตัดแยกออกจากกันโดยให้ส่วนของก้านชูอับเรณูยังติดอยู่กับฐานของรังไข่

3.5 การทดลองสูตรอาหารสำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสจากรังไข่และอับเรณู

การทดลองนี้ใช้อาหารสูตร MS N6 และ Chu-2 (Chu *et al*., 1977) เป็นอาหารสูตรพื้นฐาน อาหารทุกสูตรเติม phytagel 2.5 กรัมต่อลิตร CH 500 กรัมต่อลิตร และปรับระดับ pH 5.8 โดยแบ่งออกเป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงทั้งรังไข่และอับเรณูทั้งหมด 8 สูตร ดังนี้ 1) A1 คือ N6 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ maltose 50 กรัมต่อลิตร 2) A2 คือ N6 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ maltose 50 กรัมต่อลิตร 3) A3 คือ N6 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ maltose 40 กรัมต่อลิตร 4) A4 คือ MS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ maltose 50 กรัมต่อลิตร 5) A5 คือ Chu-2 ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ maltose 50 กรัมต่อ 6) A6 คือ N6 ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร sorbitol 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และ sucrose 40 กรัมต่อลิตร 7) O1 คือ N6

ที่เติม BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ sucrose 40 กรัมต่อลิตรและ 8) O2 คือ N6 ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ sucrose 40 กรัมต่อลิตร

3.6 การทดลองสูตรอาหารสำหรับการชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสที่ได้จากรังไข่และอับเรณู

การทดลองในส่วนนี้ใช้อาหารสูตร MS เป็นอาหารสูตรพื้นฐาน อาหารทุกสูตรเติม phytagel 2.5 กรัมต่อลิตร และปรับระดับ pH 5.8 โดยใช้แคลลัสที่มีขนาด 2-3 มิลลิเมตร และแคลลัสที่มีขนาดใหญ่กว่า 3 มิลลิเมตรขึ้นไปวางลงบนอาหารเพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมแสงและอุณหภูมิ ให้ได้รับแสง 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส โดยใช้อาหารสำหรับการชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสจำนวน 4 สูตรดังนี้ 1) AR1 คือ MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร CH 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และ sucrose 30 กรัมต่อลิตร 2) AR2 คือ MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ sucrose 20 กรัมต่อลิตร 3) AR3 คือ อาหารสูตร N6 ที่เติม NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ sucrose 30 กรัมต่อลิตร และ 4) AR4 คือ อาหารสูตร N6 ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ sucrose 30 กรัมต่อลิตร

3.7 การเพิ่มจำนวนโครโมโซม

การเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยใช้สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.01 0.05 0.01 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยการแช่ลำต้นส่วนที่เป็นข้อและมีส่วนของตาข้าง วางไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวางบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมน บันทึกผลการรอดชีวิตและการตายของต้นข้าว เลี้ยงต้นข้าวที่รอดชีวิตจนเป็นต้นที่สมบูรณ์และมีการแตกหน่อเพิ่มขึ้น แล้วนำไปออกปลูกเพื่อศึกษาต่อไป

3.8 การศึกษาจำนวนโครโมโซม และตรวจสอบเซลล์ชั้นผิวของใบ

การศึกษาจำนวนโครโมโซมโดยตัดปลายรากข้าว (root tips) ยาว 1 เซนติเมตร แช่สารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) นาน 2-3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียสในที่มืด จากนั้นนำมาแช่ใน 0.075 M KCl ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำมาแช่ในสารละลายเอนไซม์ (4 เปอร์เซ็นต์ cellulase และ 1 เปอร์เซ็นต์ pectolyase, pH 4.2) ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35-50 นาที นำเนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายรากมาวางบนสไลด์ทำให้เนื้อเยื่อแตกแล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover-slips) กดให้เซลล์อยู่ระนาบเดียวกัน (squash technique) ปล่อยให้แห้ง แล้วย้อมด้วยสี Giemsa Staine (4 เปอร์เซ็นต์ Giemsa solution, pH 6.8) เป็นเวลา 30 นาที ตรวจนับจำนวน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โครโมโซมในระยะเมทตาเฟสภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า ดัดแปลงจาก Kharabian and Darabi (2005)

ตรวจสอบเซลล์ชั้นผิวของใบ (epidermis) โดยลอกผิวใบด้านบนออกให้เหลือเพียงเนื้อเยื่อบางๆ วางบนสไลด์ หยดน้ำกลั่นลงบนชิ้นส่วนใบ และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายขนาด 1,000 เท่า

3.9 การศึกษาลักษณะทางการสัณฐานวิทยา และลักษณะทางการเกษตรของต้นข้าวแฮพลอยด์

นำต้นข้าวที่ได้จากการชักนำให้เกิดต้นทั้งจากอับเรณูและรังไข่ ไปขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อเช่นเดียวกันการเตรียมต้นพืชในขั้นตอนที่ 1 แล้วย้ายออกปลูกในกระถางขนาด 12 นิ้ว ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 หลังจากปลูก 7 วัน

การวัดผลลักษณะทางการเกษตรของต้นข้าวปกติและต้นข้าวแฮพลอยด์

1) ความสูงต้น
2) จำนวนต้นต่อกอ
3) จำนวนวันออกดอก
4) ความยาวช่อดอก
5) จำนวนรวงต่อกอ
6) เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด
7) น้ำหนัก 100 เมล็ด
8) จำนวนเมล็ดต่อช่อดอก

สถานที่ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านพืช มูลนิธิโครงการหลวง มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved