รหัสโครงการ 2557A15662001

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปีงบประมาณ 2557

ความผันแปรในลักษณะปรากฏและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวเหนียวดำมีสีพันธุ์พื้นบ้านสายพันธุ์ดีเด่นภาคใต้: ข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่และข้าวเหนียวดำหมอ

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

จักรกริช อนันตศรัณย์
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

สนับสนุนโดย สำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัย
ในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

กิตติกรรมประกาศ

รายงานจากการศึกษางานวิจัยเรื่อง “ความผันแปรในลักษณะปรากฏและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวเหนียวดำมีสีพันธุ์พื้นบ้านสายพันธุ์ดีเด่นภาคใต้: ข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่และข้าวเหนียวดำหมอ” สำเร็จได้ ด้วยความอนุเคราะห์ของหน่วยงานและบุคคลหลายท่าน ซึ่งผู้มีพระคุณท่านแรกที่ผู้ศึกษาใคร่ขอกราบขอบพระคุณ คือ คุณสำเริง แช่ตัน ที่เป็นทั้งผู้ร่วมวิจัยและที่ปรึกษามีความชำนาญเกี่ยวกับข้าวพื้นเมืองในภาคใต้ที่อนุเคราะห์ให้คำแนะนำ คำปรึกษา และเป็นผู้ประสานงานอำนวยความสะดวกในการขอใช้พื้นที่แปลงนาทดลอง

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง ที่อนุเคราะห์ อำนวยความสะดวกพื้นที่ในการวิจัยภาคสนาม

ขอขอบพระคุณคุณขวัญใจ คชภักดี ที่เป็นผู้วิจัยร่วมและช่วยดำเนินงานในการทดลองภาคสนาม ประสานงานกลุ่มชุมชนและจัดเตรียมสายพันธุ์ข้าวเพื่อการศึกษา และรายงานความคืบหน้าเรื่อยมาทั้งในและนอกช่วงระยะเวลาทำวิจัย

ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลาที่เอื้อเฟื้อสถานที่ วัสดุอุปกรณ์ต่าง ๆ สำหรับทำวิจัยทั้งในส่วนของห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและสถานีปฏิบัติการพืชไร่

ขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัยที่ช่วยดำเนินงานและเก็บผลการทดลองได้ตามแผนการทดลองที่วางไว้

และที่สำคัญที่สุด ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ที่ให้โอกาสคณะผู้ทำวิจัยได้มีโอกาสทำงานชิ้นนี้เสร็จสมบูรณ์ ด้วยงานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณประจำปี 2557 เป็นทุนสนับสนุนการวิจัยจาก สำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

ท้ายที่สุดขอขอบคุณบุคลากรภายในและนอกคณะทุกท่านซึ่งไม่ได้กล่าวไว้ ณ ที่นี้

นาย จักรกริช อนันตศรัณย์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

พฤศจิกายน 2559

เลข Bib#......1139987
วันที่ 9 มี.ค. 2561
เลขเรียกหนังสือ ว 633.1836 จ111ค

ความผันแปรในลักษณะปรากฏและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวเหนียวดำมีสีพันธุ์พื้นบ้านสายพันธุ์ดีเด่นภาคใต้: ข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่และข้าวเหนียวดำหมอ

จักรกริช อนันตศรัณย์[1*], สำเริง แซ่ตัน [2]และขวัญใจ คชภักดี[2]

[1*]คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา, [2]ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง อ. เมือง จ. พัทลุง

บทคัดย่อ

ความผันแปรในลักษณะปรากฏของข้าวพื้นเมืองตามธรรมชาติเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความหลากหลายของสายพันธุ์ข้าว การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นเทคนิคหนึ่งในการเก็บรักษาสายพันธุ์เพื่อป้องกันการกลายพันธุ์ หรือเหนี่ยวนำให้เกิดกลายพันธุ์ได้ การวิจัยนี้จึงศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและตรวจสอบความผันแปรของลักษณะปรากฏที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและในหลอดทดลองของข้าวเหนียวดำมีสีพันธุ์พื้นบ้านสายพันธุ์ดีเด่นภาคใต้ 2 ชนิด คือ ข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่และข้าวเหนียวดำหมอ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว เริ่มจากนำเมล็ดสองพันธุ์ข้าวทำให้ปลอดเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 95% และโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ความเข้มข้น 1% และ 0.5% อย่างละ 10 นาที ตามลำดับ และปอกเปลือกข้าวออก แล้วเลี้ยงในอาหารสูตร สูตร LS (Linsmaier and Skoog, 1965) ที่เติม 2,4-D 1- 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 4 สัปดาห์ จะได้แคลลัสแล้วย้ายลงอาหารสูตร LS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ระยะเวลา 4 สัปดาห์ แคลลัสจะพัฒนาอวัยวะใหม่ คือ ราก (70%) และยอด (<25%) การชักนำให้เกิดอวัยวะใหม่และเอ็มบริโอใหม่จากแคลลัสโดยย้ายเลี้ยงแคลลัสลงในอาหารสูตร MS (Murashige & Skoog, 1962) ที่เติม kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นและอัตราการเกิดอวัยวะใหม่มากขึ้น แต่มีการเอ็มบริโอใหม่จากแคลลัสพบได้น้อยและถึงแม้มีการปรับสภาพแวดล้อม เช่น การลดความชื้นเนื้อเยื่อแคลลัสไม่ส่งผลกระตุ้นการเกิดอวัยวะใหม่หรือเอ็มบริโอได้ดี ส่วนการชักนอวัยวะใหมโดยตรงจากต้นจากต้นอ่อนจากเมล็ดข้าวจะเกิดยอดใหม่จำนวนมากได้ดีในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.1-0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนพืชเกิดยอดจำนวนมาก รากสั้น หลังจากนั้นตัดแบ่งยอดลงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์ อนุบาลย้ายเลี้ยงลงในบ่อทดลอง ณ สถานีพืชไร่ จนต้นข้าวออกร่วงต้นข้าวทั้งสองพันธุ์ที่ได้ทั้งหมดไม่มีความผันแปรในลักษณะปรากฏ เมื่อเทียบกับต้นข้าวที่ปลูกในแปลงนาสาธิต ณ ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง ข้าวทั้งสองสายพันธุ์พบต้นที่มีความผันแปรปรากฏ ข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่มีความผันแปรในลักษณะปรากฏ 1 กอข้าว คือ ต้นข้าวออกรวงเร็วกว่าปกติ น้ำหนักของเมล็ดข้าวและรวงเล็กลง ส่วนข้าวเหนียวดำหมอมีความผันแปรในลักษณะปรากฏ 3 กอข้าว ซึ่งความผันแปรที่ปรากฏ คือ ขนาดของเมล็ดข้าว สีสัณฐานของเปลือกข้าวและสีของเนื้อข้าวเปลี่ยน โดยอัตราส่วนต้นที่มีความผันแปรในลักษณะปรากฏทั้งสองพันธุ์ มีน้อยกว่า 1% แสดงให้เห็นว่า ความผันแปรในลักษณะปรากฏของข้าวทั้งสองมีค่าต่ำในธรรมชาติ เมื่อทำเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวจึงสามารถรักษาพันธุกรรมได้ดีทั้งพันธุ์แท้และพันธุ์ที่กลายจากธรรมชาติ และยังเป็นเทคนิคหนึ่งที่สามารถใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวพื้นเมืองได้ต่อไป

คำสำคัญ : ข้าวเหนียวดำหมอ, ข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว, ความผันแปรในลักษณะปรากฏของข้าว

Phenotypic variation and *in vitro Oryza sativa* var. *glutinosa* of Local outstanding colored glutinous rice cultivars in southern: "Cho Mai Phai Black Rice" and "Mo Black Rice"

Jackrit Anantasaran[1], Somreang Saeton[2], Kwanjai Kachaphukdee[2]

[1]Agricultural Technology faculty, Songkhla Rajabhat University, Songkla
[2]Phatthalung Rice Research Center, Phatthalung

Abstracts

Natural phenotypic variation of local rice is a cause of rice diversity. *In vitro* culture is a type of genetic-preservation technique to protect mutation or induce mutation. This research proposes are evaluated *in vitro* technique *and observed in vitro and ex vitro phenotypic variation of Oryza sativa* var. *glutinosa* of Local outstanding colored glutinous rice cultivars in southern: "Cho Mai Phai Black Rice" and "Mo Black Rice". The first step is sterilization of two rice seeds by soak with Ethyl alcohol 95% and sterile by Sodium hypochlorite 1% and 0.5% 10 min., respectively with peel seed coat. Next, seeds were cultured on LS (Linsmaier and Skoog, 1965) + 1-2 mg. /l 2, 4-D for 4 weeks. Callus was observed and then sub-cultured to free MS medium about 4 weeks. Organs were induced on callus: roots (70%) shoots (<25%). Indirect organogenesis and embryogenesis was investigated by MS (Murashige & Skoog, 1962) medium + 2 mg. /l kinetin + 0.5 mg. /l NAA. The growth of callus increased and indirect organogenesis were increased but indirect embryogenesis was rarely observed. Even though, the environment of induction was changed such as dehydration. There wasn't affected to indirect organogenesis and embryogenesis. Direct organogenesis was observed from rice seedling, cultured on MS medium + 0.1-0.2 mg. /l TDZ. There were multiple shoots, short roots on explants. After healthy rice explants was cultured on MS + 0.5 mg. /l NAA, they were incubated and *ex vitro* cultured in cement pond at farm crop station. No mutant rice was observed until its grains were produced. Compare with natural rice culture, There are phenotypic variation of two rice cultivars. A mutant of Cho Mai Phai Black Rice was observed. A period time of grains was early whereas Mo Black Rice had 3 mutants. Characteristic of phenotypic variation is size of seeds, color, morphology of seed coat and grains. The ratio of phenotypic variation was less 1% therefore natural of phenotypic variation was very low. Tissue culture technique appropriate to genetic preservation both wild type and mutants from field selection. And this technique can induce new variation of local rice.

Keywords: *Oryza sativa*, Cho Mai Phai black rice, Mo black rice, rice’s tissue culture, phenotypic variation

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญเรื่อง

เรื่อง **หน้า**

กิตติกรรมประกาศ ก

บทคัดย่อ ข

สารบัญเรื่อง จ

สารบัญตาราง ฉ

สารบัญภาพ ช

คำย่อที่ใช้ในงานวิจัย ณ

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง 3

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 6

บทที่ 4 ผลการทดลอง 11

บทที่ 5 วิเคราะห์ผล 40

บทที่ 6 สรุปผล 45

เอกสารอ้างอิง 46

ภาคผนวก 49

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. สูตรอาหาร MS ที่มีชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทออกซินและไซโตไคนินต่างๆ ที่ใช้ชักนำให้เกิดอวัยวะใหม่จากแคลลัส 8
2. สูตรอาหารสูตร MS ที่เติมออกซินและไซโทไคนินเลี้ยงในสภาพปกติและลดความชื้นสำหรับชักนำให้เกิดอวัยวะใหม่จากแคลลัส 8
3. สูตรอาหาร MS ที่เติมออกซินและไซโตไคนินระดับความเข้มข้นต่างๆ สำหรับชักนำให้เกิดอวัยวะใหม่จากเนื้อเยื่อข้าว 9
4. การชักนำให้เกิดแคลลัสข้าวเหนียวพันธุ์หมอดำและช่อไม้ไผ่ในอาหารสูตร LS ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้นต่างๆ ระยะเวลา 2 สัปดาห์ 13
5. การชักนำให้เกิดแคลลัสข้าวเหนียวพันธุ์หมอดำและช่อไม้ไผ่ในอาหารสูตร LS ที่เติม 2, 4-D ระยะเวลา 4 สัปดาห์ 14
6. ผลสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ การเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวและการเกิดอวัยวะใหม่ 20
7. การเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวเหนียวดำหมอที่เลี้ยงด้วยวิธีการปกติและลดความชื้นในสูตรอาหารต่างๆ หลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน 22
8. การเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่ที่เลี้ยงด้วยวิธีการปกติและลดความชื้นในสูตรอาหารต่างๆ หลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน 23
9. การเจริญเติบโตของข้าวเหนียวพันธุ์ดำหมอในอาหารสูตรต่างๆ หลังเลี้ยงระยะเวลา 30 วัน 27
10. การเจริญเติบโตของข้าวเหนียวพันธุ์ช่อไม้ไผ่ในอาหารสูตรต่างๆหลังเลี้ยงระยะเวลา 30 วัน 27
11. ผลของระดับความเข้มข้นของ TDZ ต่อการเจริญเติบโตของข้าวเหนียวดำหมอระยะเวลา 1 เดือน 30
12. ผลของระดับความเข้มข้นของ TDZ ต่อการเจริญเติบโตของข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่ระยะเวลา 1 เดือน 30
13. เปรียบเทียบลักษณะของข้าวเหนียวดำหมอและช่อไม้ไผ่พันธุ์พื้นเมืองและกลายพันธุ์ 37

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1. ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าว 1) คัดเมล็ดจากรวง 2) เมล็ดข้าวที่ผ่านการแช่แอลกอฮอล์ 3) เมล็ดข้าวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วย NaOCl 20% และ 10% ตามลำดับ 4) เมล็ดข้าวที่พร้อมย้ายเลี้ยง 12
2. แคลลัสของข้าวเหนียวดำหมอที่ย้ายเลี้ยงจากสูตร LS + 2,4-D (1-4 mg/l) (แถวที่ 1-4) ลงในอาหารสูตร LS + 2,4-D 0-4 mg/l (คอลัมภ์ที่ 1-5) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 17
3. แคลลัสของข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่ที่ย้ายเลี้ยงจากสูตร LS + 2,4-D (1-4 mg/l) (แถวที่ 1-4) ลงในอาหารสูตร LS + 2,4-D 0-4 mg/l (คอลัมภ์ที่ 1-5) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 18
4. น้ำหนักของแคลลัสของข้าวเหนียวดำหมอ (ก) และช่อไม้ไผ่ (ข) ที่ย้ายเลี้ยงจากสูตร LS + 2, 4-D (1-4 mg/l) (เส้นที่ 1-4) ลงในอาหารสูตร LS + 2, 4-D 0-4 mg/l (ค่าแกนนอน) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 19
5. เปอร์เซ็นต์การเกิดรากของแคลลัสข้าวเหนียวดำหมอ (ก) และช่อไม้ไผ่ (ข) ที่ย้ายเลี้ยง. จากสูตร LS + 2, 4-D 1-4 mg/l (เส้นที่ 1-4) ลงในอาหารสูตร LS + 2, 4-D 0-4 mg/l (ค่าแกนนอน) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 19
6. เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของแคลลัสข้าวเหนียวดำหมอ (ก) และช่อไม้ไผ่ (ข) ที่ย้ายเลี้ยงจากสูตร LS + 2,4-D 1-4 mg/l (เส้นที่ 1-4) ลงในอาหารสูตร LS + 2,4-D 0-4 mg/l (ค่าแกนนอน) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 19
7. พัฒนาการเกิดรากและยอดใหม่จากเนื้อเยื่อแคลลัสของข้าวเหนียวดำหมอ (ก-ง) ตามลำดับ 24
8. พัฒนาการเกิดรากและยอดใหม่จากเนื้อเยื่อแคลลัสของข้าวเหนียวช่อไม้ไผ่ (ก-จ) ตามลำดับ 24
9. การเกิดรากและยอดขนาดเล็กจำนวนมากบนแคลลัสข้าวเหนียวช่อไม้ไผ่ 25
10. การเกิดเฉพาะรากบนแคลลัส (ก) และยอดจำนวนมาก (ข) ของข้าวเหนียวช่อไม้ไผ่ 25
11. การเกิดเอ็มบริโอ (ลูกศร) จากเนื้อเยื่อแคลลัส (ก) และพัฒนาของเอ็มบริโอ (ข) ของข้าวเหนียวช่อไม้ไผ่ 26
12. การเจริญเติบโตของข้าวเหนียวพันธุ์ดำหมอ (บน)และช่อไม้ไผ่ (ล่าง) ในอาหารสูตร MS (1), MS+NAA 0.5 mg/l (2), MS+BA 1 mg/l (3), MS+BA 1 mg/l+NAA 0.5 mg/l (4), MS+TDZ 0.1 mg/l (5), MS+TDZ 0.1 mg/l+NAA 0.5 mg/l (6) ตามลำดับ 28
13. ผลของ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของข้าวเหนียวดำหมอ (ก) และช่อไม้ไผ่ (ข) ระยะเวลา 1 เดือน จากการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 31

14. ผลของ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของข้าวเหนียวดำหมอ (ก) และช่อไม้ไผ่ (ข) ระยะเวลา 1 เดือน หลังจากย้ายเลี้ยงจำนวน 3 ครั้ง 32
15. ข้าวเหนียวดำหมอและข้าวเหนียวช่อไม้ไผ่ที่เจริญเติบโตในนาทดลอง ณ ศูนย์พันธุ์ข้าว จ. พัทลุงประจำปี 2557 34
16. รวงข้าวเหนียวดำหมอพันธุ์พื้นเมือง (wild type) และพันธุ์กลายจากการปลูกในแปลงสาธิต (M1-M3) 34
17. เมล็ดข้าวเหนียวดำหมอพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์กลาย (M1-M3) 35
18. ต้นข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่ที่ออกรวงเร็วกว่าปกติ (ต้นตรงกลาง) 35
19. รวงข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่พันธุ์พื้นเมือง (wild type) และพันธุ์กลาย (Mutant type) 36
20. เมล็ดข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่พันธุ์พื้นเมือง (wild type) และพันธุ์กลาย (Mutant type) 36
21. ต้นข้าวสมบูรณ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่พร้อมย้ายเลี้ยง (ก) และกอข้าวที่เลี้ยงในบ่อทดลอง (ข) 38
22. ผู้สนใจและเกษตรกรลงทะเบียนและเข้าร่วมกิจกรรมถ่ายทอดงานวิจัยสู่ชุมชน 39
23. โปสเตอร์งานวิจัยที่นำเสนอในกิจกรรม 39

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

คำย่อที่ใช้ในงานวิจัย

คำย่อ **ชื่อเต็ม/ความหมาย**

2,4-D = 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

BA = Benzyl adenine

LS = สูตรอาหาร Linsmaier & Skoog (1965)

MS = สูตรอาหาร Murashige & Skoog (1962)

NAA = α-Naphthaleneacetic acid

TDZ = Thidiazuron

M1-M3 = ต้นที่กลายพันธุ์ต้นที่ 1-3

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ข้าวเป็นธัญพืชชนิดที่ได้รับความนิยมในการนำมาบริโภคเป็นหลักทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย ข้าวเป็นสายพันธุ์ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงมากในธรรมชาติ แต่เนื่องจากเป็นพืชเศรษฐกิจหลักที่สำคัญของไทยในการบริโภคภายในประเทศและส่งออกไปต่างประเทศ จึงได้มีการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ๆ ตลอดเวลาจากหน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชน จนได้สายพันธุ์ที่ดีมีคุณภาพและมีการส่งเสริมการปลูกอย่างแพร่หลาย เพื่อตอบสนองความต้องการของตลาดข้าวของโลก จึงมีลักษณะการปลูกข้าวเป็นพืชเชิงเดียวแบบอุตสาหกรรมเกิดขึ้น ทำให้ข้าวพื้นบ้านมีจำนวนสายพันธุ์ที่หลงเหลือตามธรรมชาติและปลูกโดยชุมชนเกษตรกรรมลดลง จนเกิดความน่าเป็นห่วงของการสูญพันธุ์ของข้าวท้องถิ่นไทย โดยเฉพาะภาคใต้ของประเทศไทย ที่มีพื้นที่การปลูกข้าวในสัดส่วนที่น้อยกว่าภาคอื่นของประเทศ ทำให้เกิดความเสียหายของความหลากหลายของพันธุกรรมสายพันธุ์ข้าวภายในประเทศ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องเก็บรักษาไว้ เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในอนาคตต่อไป

จากเก็บรักษาสายพันธุ์ข้าวที่ศูนย์วิจัยพันธุ์ข้าวจังหวัดพัทลุง พบว่า มีการสูญหายอย่างชัดเจน จากอดีตมีการเก็บรักษาพันธุ์ข้าวที่พบในภาคใต้เกือบ 1,000 ชนิด ปัจจุบัน (พ.ศ. 2556) เหลือสายพันธุ์ข้าวที่เก็บรักษาได้ 200 กว่าชนิดเท่านั้น และมีแนวโน้มลดลง เพราะการเก็บพันธุข้าวจะต้องมีการปลูกใหม่ทุกปี เพื่อเก็บรักษาสายพันธุ์อย่างต่อเนื่อง กอปรกับปัญหาอุทกภัยที่รุนแรงและบ่อยครั้งขึ้นในจังหวัดพัทลุง ทำให้เกิดการสูญเสียต้นกล้าข้าวท้องถิ่นในแปลงนาสาธิตภายในศูนย์วิจัย จึงเป็นที่มาของโครงการวิจัยในการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาช่วยในการเก็บรักษาพันธุ์ข้าวท้องถิ่นภาคใต้ โดยวิจัยหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ท้องถิ่น และตรวจสอบความผันแปรของลักษณะปรากฏจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อประเมินการเก็บรักษาอนุรักษ์พันธุ์ข้าวหรือการปรับปรุงพันธุ์ข้าวท้องถิ่นต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชข้าวเหนียวดำพันธุ์ท้องถิ่นภาคใต้
2. ศึกษาความผันแปรในลักษณะปรากฏของข้าวเหนียวดำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
3. อนุรักษ์พันธุ์ข้าวเหนียวดำท้องถิ่นภาคใต้ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ขอบเขตของการวิจัยครั้งนี้ครอบคลุมตามวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย เพื่อศึกษาข้าวข้าวเหนียวดำพันธุ์ท้องถิ่นภาคใต้ที่สำคัญ โดยทำการศึกษา 2 สายพันธุ์ คือ ข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่และข้าวเหนียวดำ

หมอ และศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในนาแปลงทดลองของศูนย์วิจัยพันธุ์ข้าวพัทลุง จังหวัดพัทลุง เป็นระยะเวลาหนึ่งปีในช่วงระยะเวลางานวิจัยที่ดำเนินการ

ทฤษฎี สมมุติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ถ้าเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถนำมาช่วยในการขยายพันธุ์ข้าวเหนียวดำพันธุ์ท้องถิ่นภาคใต้ เช่น ข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่และข้าวเหนียวดำหมอได้แล้ว จะสามารถหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวเหนียวดำได้และความผันแปรในลักษณะปรากฏจะมีค่าต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในนาข้าวตามธรรมชาติ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การวิจัยเรื่องนี้ ก่อให้เกิดประโยชน์หลายประการ ดังนี้

1. สามารถเก็บรักษาและเพิ่มจำนวนต้นกล้าข้าวพันธุ์ท้องถิ่น 2 สายพันธุ์
2. สามารถขยายพันธุ์เพื่อเก็บรักษาพันธุ์ข้าวท้องถิ่นนอกเหนือจากพันธุ์ที่ทำการวิจัย
3. มีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวพันธุ์ท้องถิ่น สำหรับการศึกษาของนักเรียน อาจารย์ และหน่วยงานเก็บรักษาพันธุ์ข้าว
4. มีแนวทางส่งเสริมการอนุรักษ์พันธุ์ข้าวท้องถิ่นด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
5. เป็นแหล่งเรียนรู้ในการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวท้องถิ่นภาคใต้ในงานวิจัยเรื่องต่อไป

แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

1. จัดนิทรรศการเผยแพร่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกับข้าวพันธุ์ท้องถิ่น

2. จัดฝึกอบรมและให้คำแนะนำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกับการอนุรักษ์พันธุ์ข้าวท้องถิ่นภาคใต้ แก่นักเรียน นักศึกษาและผู้สนใจทั่วไปพื้นที่ที่มีการปลูกข้าวท้องถิ่น เช่น อ. ปากพะยูน จังหวัดพัทลุง เป็นต้น

3. จัดทำรายงานและพิมพ์เผยแพร่ รายงานผลงานวิจัยต่อหน่วยงาน และบุคคลทั่วไป ในรูปแบบโปสเตอร์ แผ่นพับ และสื่อประกอบการเรียน

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

ข้าวพันธุ์พื้นบ้าน เป็นข้าวพันธุ์ที่ขึ้นตามธรรมชาติในบริเวณหนึ่งบริเวณใดและชาวบ้านในพื้นที่ได้นำมาปลูกขยายเพื่อการบริโภคภายในครัวเรือนและชุมชมใกล้เคียง มีความเหมาะสมต่อสภาพแวดล้อมบริเวณนั้น อาจเกิดจากการกลายพันธุ์จากสายพันธุ์อื่นตามธรรมชาติหรือเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม ไม่จัดเป็นพืชเศรษฐกิจโดยตรง แต่มีความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมของข้าว ในช่วง 4 ทศวรรษที่ผ่านมา ข้าวไทยได้เป็นพืชเศรษฐกิจหลักของไทยจนมีช่วงระยะเวลาหนึ่งข้าวไทยเคยเป็นพืชที่ประเทศส่งออกมากเป็นอันดับที่ 1 ของโลก และจัดเป็นข้าวที่ดีที่สุดในโลก ทำให้เกิดการพัฒนาข้าวของไทยอย่างรวดเร็วที่เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง และส่งเสริมให้ปลูกเป็นพืชเชิงเดี่ยวโดยใช้สายพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์แล้ว ในพื้นที่บริเวณกว้างเพื่อตอบสนองความต้องการของตลาด สายพันธุ์ใหม่ที่ได้ปลูกเพื่อการค้าจึงมีไม่กี่สายพันธุ์ และทำให้ข้าวพื้นบ้านจำนวนมากในประเทศไทยที่มีมากกว่า 1,000 ชนิด (ข้อมูลจากศูนย์พันธุ์ข้าว) ได้สูญหายไปจากท้องนาของประเทศไทย ทำให้ความหลากหลายของพันธุ์ข้าวลดลงอย่างมาก เกิดความกังวลในการรักษาสายพันธุ์ของข้าวไทย จึงได้จัดตั้งหน่วยงานต่างๆ เพื่อช่วยแก้ปัญหา เช่น ศูนย์วิจัยพันธุ์ข้าวทั่วทุกภาคของประเทศ เป็นต้น ทำหน้าที่ในการอนุรักษ์พันธุกรรมของข้าว และเป็นแหล่งข้อมูลความหลากหลายของข้าวเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ประโยชน์ของข้าวพื้นบ้าน นอกจากเป็นแหล่งพันธุกรรมแล้ว ข้าวพื้นบ้านหลายชนิดมีคุณค่าอาหารมากกว่าพันธุ์ข้าวทางเศรษฐกิจ ดังรายงานของแผนงานฐานทรัพยากรอาหาร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ(สสส.) ร่วมกับมูลนิธิชีววิถี (BioThai) มูลนิธิเกษตรกรรมยั่งยืน เครือข่ายเกษตรกรรมทางเลือก และโครงการข้าวปลาอาหารอีสานมั่นยืน (มูลนิธิขวัญข้าว, 2556) พบว่า

- ข้าวหน่วยเขือ หอมมะลิแดง ข้าวเหนียวเล้าแตก มีวิตามินอีมากกว่าข้าวกล้อง 26.2 11.3 และ 10.3 เท่า
- ข้าวเหนียวก่ำเปลือกดำ มีลูทีน มากกว่าข้าวหอมมะลิ 25.3 เท่า
- ข้าวเหนียวก่ำเปลือกดำ มีเบต้าแคโรทีน มากกว่าข้าวหอมมะลิ 3.81 เท่า
- ข้าวหน่วยเขือ มีธาตุทองแดงมากกว่าข้าวหอมมะลิ 5 เท่า

จากการวิจัยของ ผศ.ดร.รัชนี คงคาฉุยฉาย (2556) จากสถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล ตรวจสอบสารอาหารในข้าวสายพันธุ์พื้นบ้าน พบว่าข้าวพื้นบ้านไม่ใช่มีประโยชน์สำหรับนักปรับปรุงพันธุ์พืชเท่านั้น แต่ประชาชนทั่วไปจะได้ทราบข้อมูลเพื่อการบริโภค และที่เลือกข้าวพื้นบ้านก็เนื่องจากข้าวขาวมีปริมาณสารอาหารเหลืออยู่น้อยมากถึงขั้นไม่มีเลย แต่ข้าวกล้องพื้นบ้านกลับเป็นแหล่งของสารอาหารหลากชนิด ไม่ว่าจะเป็นธาตุเหล็ก สังกะสี ทองแดง วิตามินอี และเบต้าแคโรทีน และพบว่า ข้าวแต่ละสายพันธุ์มีคุณค่าทางโภชนาการที่แตกต่างกัน ขึ้นกับสิ่งแวดล้อม อากาศ ปุ๋ย ดิน น้ำ รวมทั้งพันธุกรรมของข้าวชนิดนั้นๆ อาทิ ข้าวพื้นบ้านที่ปลูกทางภาคใต้ เช่น จังหวัดพัทลุง จะมีปริมาณธาตุเหล็กและสังกะสีสูงกว่าที่ปลูกในจังหวัดอื่น (ข้าวปทุมธานีหนึ่ง ที่ปลูกในจังหวัดพัทลุงมีธาตุเหล็ก 36 มิลลิกรัม/ 1 กิโลกรัมข้าวดิบ สูงกว่าข้าวพันธุ์เดียวกันซึ่งปลูกที่อื่น ที่มีธาตุเหล็กอยู่เพียง 25-27 มิลลิกรัม/ 1 กิโลกรัมข้าวดิบ) ขณะที่ เบต้าแคโรทีน ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และช่วยชะลอความเสื่อมของตาเนื่องจากวัย รวมทั้งลดความเสี่ยงเกิดต้อกระจก ผลวิจัยพบว่า ข้าวกล้องอีก่ำจากอุบลราชธานีและข้าวเหนียวดำจากพัทลุง มีปริมาณเบต้าแคโร

ทีนสูงที่สุด คือ 30.04 และ 34.76 ไมโครกรัม/ 100 กรัม นอกจากนี้ ยังพบด้วยว่าข้าวที่มีสีเข้มเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และสารแคโรทีนอยด์ (ลูทีน) อีกด้วย

ข้าวพื้นบ้าน จะเป็นอาหารทางเลือกสำหรับผู้บริโภคที่สนใจคุณค่าของสารอาหารมากกว่าราคาของข้าว เกิดกระแสผู้รักอาหารสุขภาพในการบริโภคข้าวพื้นบ้านชีวิตประจำวัน นอกจากนี้ข้าวพื้นบ้านยังสามารถพัฒนาเป็นสินค้าที่มีลักษณะลิขสิทธิ์ระดับสากลที่เรียกว่า สิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ เรียกย่อๆ ว่า จีไอ มาจาก Geographical Indication ทำให้หน่วยงานภาครัฐมีความตื่นตัวเรื่องข้าวพันธุ์พื้นบ้าน โดยส่งเสริมการนำข้าวพันธุ์พื้นบ้านจดทะเบียนกับกรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์ เพื่อที่ชุมชนที่เป็นแหล่งผลิตวัตถุดิบเฉพาะพื้นที่ได้รับประโยชน์ในการผลิตสินค้าท้องถิ่น ทำให้สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ที่มีคุณลักษณะพิเศษที่ผู้ผลิตถิ่นอื่นไม่สามารถผลิตสินค้าในชื่อเดียวกันมาแข่งขันได้ ข้อมูลปัจจุบัน พบว่ามี 'ข้าวจีไอ' หลายสายพันธุ์ อาทิ ข้าวหอมมะลิสุรินทร์, สังข์หยดเมืองพัทลุง, ข้าวหอมมะลิทุ่งกุลาร้องไห้, ข้าวฮางหอมทองสกลทวาปี นอกจากนี้ ยังมีข้าวที่อยู่ระหว่างดำเนินการจดทะเบียนจีไออีก 5 รายการ ได้แก่ ข้าวเจ๊กเชยเสาไห้, ข้าวเหนียวเขาวงกาฬสินธุ์, ข้าวหอมมะลิบุรีรัมย์, ข้าวเหลืองปะทิวชุมพร และข้าวก่ำล้านนา

คุณสมบัติพิเศษของข้าวจีไอ เช่น 'ข้าวสังข์หยดเมืองพัทลุง' เป็นข้าวที่ปลูกในจังหวัดพัทลุงกันมากว่า 100 ปี เป็นข้าวที่มีความนุ่ม น่ากิน สีของเมล็ดข้าวกล้องเป็นสีแดง ถ้าขัดสีจนเป็นข้าวสารจะมีสีชมพูและขาว ปัจจุบันเป็นที่นิยมในหมู่ผู้บริโภครักสุขภาพ เพราะในข้าวสังข์หยดเมืองพัทลุงซ้อมมือ 100 กรัม มีธาตุเหล็ก 0.52 มิลลิกรัม, ฟอสฟอรัส 165 มิลลิกรัม, วิตามินบี 1 0.18 มิลลิกรัม และไนอาซิน 3.97 มิลลิกรัม ส่วน 'ข้าวเหลืองปะทิวชุมพร' เป็นพันธุ์ข้าวเก่าแก่ของอำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร ปัจจุบันมีเกษตรกรปลูก 30 ราย ครอบคลุมที่นา 500 ไร่ เป็นข้าวที่หุงสุกจะแข็ง-ร่วน ขึ้นหม้อ เหมาะกับการทำข้าวราดแกง และเป็นวัตถุดิบสำหรับทำขนมจีน มีสารอาหารไนอะซีน (วิตามินบี 3) สูงถึง 9.32%

ข้าวเหนียวดำหมอ เป็นข้าวเหนียวดำไม่ไวต่อช่วงแสงปลูกได้ทั้งฤดูนาปีและนาปรัง จัดเป็นข้าวที่ต้องการน้ำน้อยเหมาะสมกับพื้นที่นาดอนปริมาณน้ำฝนน้อย และสามารถปลูกในสภาพข้าวไร่ได้หากไม่มีปัญหาเรื่องวัชพืช มีลักษณะเด่น คือ มีคุณภาพการสีดี ให้ผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 356 กก./ไร่ ทรงกอตั้ง ต้นสูง 139 ซม. อายุการเก็บเกี่ยว 140 วัน ใบสีเขียวผสมม่วง จำนวนรวง 7 รวง/กอ ข้าวเปลือกสีฟางกระน้ำตาล ข้าวกล้องสีดำ ปริมาณอะมิโลส 5.33% มีลักษณะด้อย คือ ค่อนข้างอ่อนแอต่อโรคไหม้และไม่ทนต่อสภาพน้ำท่วม ได้ปลูกพันธุ์ดักและคัดเลือกไว้ 3,500 รวง (นิธิศ แสงอรุณและคณะ, 2553)

ข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่ เป็นข้าวเหนียวดำไม่ไวต่อช่วงแสงปลูกได้ทั้งฤดูนาปีและนาปรังจัดเป็นข้าวที่ต้องการน้ำน้อยเหมาะสมกับพื้นที่นาดอนปริมาณน้ำฝนน้อย และสามารถปลูกในสภาพข้าวไร่ได้หากไม่มีปัญหาเรื่องวัชพืช มีลักษณะเด่น คือ เมล็ดเป็นกลุ่ม 1 ระแง้ มี 3 ดอก/เมล็ดแตกต่างจากพันธุ์ข้าวทั่วไป ให้ผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 363 กก./ไร่ ทรงกอตั้ง ต้นสูง 135 ซม. อายุการเก็บเกี่ยว 155 วัน ใบสีเขียวเข้ม จำนวนรวง 7 รวง/กอ ข้าวเปลือกสีฟางก้นจุด ข้าวกล้องสีม่วงดำ ปริมาณอะมิโลส 5.22% มีลักษณะด้อย คือ อ่อนแอต่อโรคใบไหม้ และไม่ทนต่อสภาพน้ำท่วม ได้ปลูกเป็นพันธุ์ดักและคัดเลือกไว้ 5,000 รวง (นิธิศ แสงอรุณและคณะ, 2553)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นการขยายพันธุ์พืชในอาหารสังเคราะห์ในสภาพที่สามารถควบคุมสิ่งแวดล้อม การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นการเพิ่มจำนวนพืชได้อย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับวิธีการอื่นๆ

ใช้พื้นที่ในการดำเนินงานน้อยเมื่อเทียบกับการเก็บรักษาพันธุพืชในโรงเรือน เป็นเทคนิคที่นิยมนำมาเก็บรักษาอนุรักษ์สายพันธุ์พืชชนิดต่างๆ ที่ใกล้สูญพันธุ์ ข้อดีเมื่อเทียบกับการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ คือ พืชจะอยู่ในลักษณะที่ยังมีชีวิตตลอดเวลาและเจริญเติบโตได้ช้าเร็วตามที่ต้องการได้ และพร้อมสำหรับการย้ายลงปลูกในแปลงตามธรรมชาติ ลดปัญหาการเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์เนื่องจากปัจจัยสภาพแวดล้อมที่ควบคุมไม่ได้ เช่น อุทกภัย ความแห้งแล้ง เป็นต้น ข้อเสียของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ จะต้องหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง มีความรู้ความชำนาญทางเทคนิค และค่าดำเนินการห้องปฏิบัติการ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้สามารถควบคุมถ้ามีการศึกษาองค์ความรู้ที่ดีพอและมีการจัดการที่ถูกต้อง ค่าใช้จ่ายก็จะใกล้เคียงกับการอนุรักษ์ด้วยวิธีการอื่นๆ แต่ให้ผลที่คุ้มค่ากว่า และประหยัดพื้นที่ใช้สอยมากกว่า จึงเป็นที่มาของการวิจัยของโครงการนี้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวได้มีการศึกษาเป็นจำนวนมากทั้งในและนอกประเทศในหลายมิติ เช่น การสร้างข้าวสายพันธุ์แท้จากเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น ความเค็ม ความแห้งแล้ง และน้ำท่วม เป็นต้น แต่การศึกษาเหล่านี้ล้วนมุ่งเน้นไปทางปรับปรุงพันธุ์ข้าวเศรษฐกิจ เพื่อการตอบสนองการผลิตข้าวเชิงเดี่ยวสู่ตลาดข้าว แต่การวิจัยโครงการนี้มุ่งเน้นหาวิธีการขยายพันธุ์ข้าวพื้นบ้านของภาคใต้ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อเป็นแนวทางส่งเสริมชุมชนที่สนใจในการอนุรักษ์เก็บพันธุ์ข้าวนอกเหนือจากการเก็บรักษาในลักษณะของเมล็ดที่มีโอกาสลีบตาย และต้องปลูกรักษาพันธุ์ทุกปี เสี่ยงต่อภัยพิบัติ เช่นเดียวกับศูนย์วิจัยพันธุ์ข้าวพัทลุงได้สูญเสียพันธุ์ข้าวพื้นบ้านที่เก็บรักษาจากน้ำท่วมมากกว่าครึ่งหนึ่งที่มีอยู่ในอดีต (มากกว่า 500 ชนิด) การวิจัยในครั้งนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับงานวิจัยของ ผศ.ดร. ศุภชัย สมัปปิโต ที่ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวหอมพื้นบ้านของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แต่ได้ศึกษาลักษณะความแปรผันปรากฏภายนอกที่ได้จากต้นที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในแปลงนาสาธิต เพื่อประเมินผลการอนุรักษ์สายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไป (Kinoshita & Mori, 2001)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้แบ่งเป็น 2 ส่วน ตามแหล่งที่ศึกษา คือ การวิจัยในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา และแปลงนาทดลองของศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง อ. เมือง จ. พัทลุง มีรายละเอียดของการศึกษาวิจัยแบ่งออกเป็นการทดลองย่อยๆ ดังต่อไปนี้

1. เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อข้าวให้ปลอดเชื้อจุลินทรีย์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชข้าว นิยมนำสายพันธุ์ข้าวจากแปลงนาธรรมชาติหรือแปลงนาสาธิตมาขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง โดยนิยมใช้เมล็ดข้าวที่เจริญเติบโตเต็มที่มาทำการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารละลายต่าง ๆ ด้วยจำนวนครั้งและระยะเวลาที่แตกต่าง แล้วบันทึกผลการติดเชื้อในอาหารทดลอง ปัจจัยที่ทำการศึกษา คือ

1.1 การทำความสะอาดเบื้องต้น ได้แก่ การทำความสะอาดภายนอกของเมล็ดก่อนก่อนการฟอกฆ่าเชื้อสารละลาย ได้กำหนดไว้ 3 วิธี คือ

1) ล้างภายนอกด้วยน้ำกลั่น

2) แช่เอธิลแอลกอฮอล์ 95% นาน 5 นาที

3) แช่เอธิลแอลกอฮอล์ 95% นาน 10 นาที

1.2 สารเคมีฆ่าเชื้อ ในการทดลองใช้สารละลายคลอร็อค (โซเดียมไฮโปคลอไรท์) ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 10 และ 20% ระยะเวลาแช่สารละลาย 0 – 20 นาที แบ่งเป็น 3 ชุดทดลอง คือ

1) แช่สารละลายคลอร็อค 20% 20 นาที

2) แช่สารละลายคลอร็อค 10% 20 นาที

3) แช่สารละลายคลอร็อค 20% 10 นาที และ 10% 10 นาที ตามลำดับ

1.3 รูปแบบการฟอกฆ่าเชื้อ ทำการฟอกฆ่าเชื้อ 2 ลักษณะ คือ ฟอกฆ่าเชื้อ 1 ครั้งและฟอกฆ่าเชื้อสองครั้งโดยมีการลอกเปลือกเมล็ดข้าว

ปัจจัยที่ทำการบันทึกผล ได้แก่

ลักษณะของการติดเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร สังเกตกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปรากฏว่าเป็นชนิดใด เกิดที่ชิ้นส่วนหรือผิวอาหาร และเกิดช้าเร็วหลังจากย้ายลงเลี้ยง

อัตราการงอกของเมล็ดข้าว นับจำนวนเมล็ดข้าวที่งอกปกติและตาย คิดเป็นสัดส่วนข้าวที่งอกต่อเมล็ดที่ฟอกเชื้อแล้วย้ายเลี้ยงทั้งหมด

ความสมบูรณ์ของเนื้อเยื่อข้าว สังเกตลักษณะต้นที่งอกปกติหรือไม่ และความเร็วในการงอกช้าหรือไม่

2. ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเอ็มบริโอของข้าวเหนียวดำหมอและช่อไม้ไผ่

การชักนำให้เกิดแคลลัสเป็นการเลี้ยงเมล็ดข้าวให้เกิดการสร้างแคลลัสลักษณะต่างๆ เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัส ใช้เป็นเนื้อเยื่อพืชตั้งต้นในการชักนำพืชต้นใหม่ในลำดับต่อไป ซึ่งมีวิธีการศึกษา ดังนี้

นำเทคนิคที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อจากการทดลองที่ 1 ทำให้เมล็ดข้าวดำหมอและช่อไม้ไผ่ปลอดเชื้อแล้วเลี้ยงในอาหารสูตร LS (Linsmaeir & Skoog, 1965) ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 1-4 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงบนชั้นไฟเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ อย่างละ 30 ขวดต่อสูตรอาหาร จำนวน 3 ซ้ำต่อพันธุ์ข้าว โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากเอ็มบริโอข้าวและลักษณะของแคลลัส การงอกของเอ็มบริโอ (เดิม) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์

3. ศึกษาการเกิดอวัยวะใหม่จากแคลลัสข้าวเหนียวดำหมอและช่อไม้ไผ่

หลังจากชักนำให้เกิดแคลลัสในการทดลองที่ 2 นำแคลลัสมาเป็นเนื้อเยื่อตั้งต้นในการเลี้ยงให้เกิดการพัฒนา โดยกระบวนการ organogenesis ดังนี้

ย้ายแคลลัสของข้าวดำหมอและช่อไม้ไผ่ไปเลี้ยงในอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1-4 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงบนชั้นไฟเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ อย่างละ 30 ขวดต่อสูตรอาหาร จำนวน 3 ซ้ำต่อพันธุ์ข้าว บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด รากและแคลลัส ลักษณะของแคลลัส น้ำหนักของแคลลัสเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของ 2,4-D แตกต่างกัน โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block design (RBD) หาความสัมพันธ์ของที่มาแคลลัสกับพัฒนาการของแคลลัสที่เกิดขึ้น โดยใช้สถิติ DMRT ในการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

หลังจากนั้นทดสอบย้ายเลี้ยงแคลลัสบางส่วนลงในอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญประเภทออกซินและไซโทไคนินที่มีชนิดและความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยปัจจัยที่ใช้ในการศึกษา คือ ชนิดของไซโทไคนินร่วมกับออกซิน โดยชนิดของออกซินที่ศึกษา คือ 2,4-D และ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนชนิดของไซโทไคนิน คือ BA และ kinetin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 1 บันทึกน้ำหนักสดแคลลัส และเปอร์เซ็นต์การเกิดอวัยวะใหม่ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) บันทึก โดยใช้สถิติ LSD ในการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

ตารางที่ 1 สูตรอาหาร MS ที่มีชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทออกซินและไซโตไคนินต่างๆ ที่ใช้ชักนำให้เกิดอวัยวะใหม่จากแคลลัส

สารควบคุมการเจริญเติบโต	ไซโทไคนิน		ออกซิน	
ชนิด ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	BA	Kinetin	NAA	2,4-D
T1	1	1	0	0
T2	0	0	1	1
T3	0.5	0	0.5	0
T4	0	0.5	0	0.5

4. ศึกษาการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติคเอ็มบริโอในข้าวเหนียวดำหมอและช่อไม้ไผ่

ย้ายแคลลัสที่เจริญเติบโตได้ดีที่เกิดจากการทดลองที่ 3 มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ ดังตารางที่ 2 วางเลี้ยงใน 2 สภาพการเพาะเลี้ยง คือ ปกติ และลดความชื้น หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วสังเกตการเกิดเอ็มบริโอหรืออวัยวะใหม่จากเนื้อเยื่อแคลลัส บันทึกภาพ และบันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอในแต่ละสูตรอาหาร โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block design (RBD)

ตารางที่ 2 อาหารสูตร MS ที่เติมออกซินและไซโทไคนินเลี้ยงในสภาพปกติและลดความชื้นสำหรับชักนำให้เกิดอวัยวะใหม่จากแคลลัส

สภาพแวดล้อม	ความเข้มข้น (มก./ลิตร) kinetin / NAA	1	2	2.5	3
ปกติ	0	T1	-	-	-
	0.5	T2	T4	T6	T7
	1	T3	T5	-	T8
ลดความชื้น	0	T9	-	-	-
	0.5	T10	T12	T14	T15
	1	T11	T13	-	T16

5. ศึกษาการชักนำยอดโดยตรงจากข้าวเหนียวดำหมอและช่อไม้ไผ่ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำเมล็ดข้าวทั้งสองสายพันธุ์ชักนำให้เกิดยอดใหม่โดยตรงไม่ผ่านการพัฒนาไปเป็นแคลลัส เรียกว่า direct organogenesis โดยชักนำให้เกิดต้นตามปกติในสูตรอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตแล้วตัดยอดข้าวที่ได้เลี้ยงอาหารสูตรต่างๆ เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก เป็นการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะได้ชนิดของออกซินและไซไทไคนินที่เหมาะสมนำมาเปรียบเทียบกับ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 0.05, 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 3 และ 4 เมื่อได้สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำยอดของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ชักนำยอดจำนวนมากจนเป็นต้นสมบูรณ์ หลังจากนั้นย้ายต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชลงบ่อเพาะต้นข้าว เพื่อบันทึกลักษณะสัณฐานของข้าวที่เจริญเติบโต เพื่อคัดกรองหาต้นที่มีลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมต่อไป

ตารางที่ 3 สูตรอาหาร MS ที่เติมออกซินและไซโตไคนินระดับความเข้มข้นต่างๆ สำหรับชักนำให้เกิดอวัยวะใหม่จากเนื้อเยื่อข้าว

ชุดทดลอง	T1	T2	T3	T4	T5	T6
ฮอร์โมน	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)					
ออกซิน	0	0.5	0	0	0.5	0.5
ไซไทไคนิน	0	0	0	1	1	0
TDZ	0	0	0.1	0	0	0.1

6. ศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวเหนียวดำหมอและช่อไม้ไผ่ในแปลงนา

ศึกษาความหลากหลายของภายนอกของลักษณะข้าวเหนียวดำหมอและช่อไม้ไผ่ในแปลงนา ที่ศูนย์วิจัยพันธุ์ข้าว จ. พัทลุง โดยทำการเพาะปลูกข้าวทั้งสองสายพันธุ์ตามฤดูกาลของการทำนา ในแปลงนาทดสอบขนาดประมาณ 400 ตารางเมตรต่อสายพันธุ์ และเก็บรักษาพันธุ์ โดยให้ปัจจัยตามสภาพธรรมชาติของนาดำ เลี้ยงจนกระทั่งข้าวออกรวงตามปกติ เก็บข้อมูลจำนวนวันที่เจริญเติบโตทางลักษณะและออกรวงข้าว ขนาดของรวง ความสูงของต้นโดยเฉลี่ย ขนาดและน้ำหนักของเมล็ดข้าว สังเกตและบันทึกต้นที่มีลักษณะการแสดงออกภายนอกที่ผิดปกติไปจากเดิม เช่น ลักษณะของต้น ใบ เวลาการออกรวงข้าวที่เปลี่ยนไป เป็นต้น

7. รวบรวมต้นข้าวเหนียวที่มีลักษณะผิดปกติจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

นำเมล็ดข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่ได้จากรวงข้าวของต้นที่มีลักษณะผิดปกติในการทดลองที่ 5 ส่วนหนึ่งนำมาขยายพันธุ์เพิ่มในกระถางหรือแปลงนา เพื่อดูความคงอยู่ของลักษณะผิดปกติไปจากเดิม และเมล็ดบางส่วนนำมาขยายพันธุ์เพิ่มในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้เกิดเป็นยอดจำนวนมากจากสูตรอาหารที่ได้จากการทดลองที่ 5

8. ถ่ายทอดข้อมูลวิจัยสู่ชุมชนเพื่อการเผยแพร่

นำข้อมูลวิจัยที่ได้จากการวิจัยถ่ายทอดสู่เกษตรกรและผู้สนใจในรูปแบบของบริการวิชาการแก่ชุมชนที่ปลูกข้าวพื้นเมืองในจังหวัดพัทลุง รูปแบบการถ่ายทอดมีทั้งแบบโปสเตอร์สรุปงานวิจัยและพูดคุยนำเสนอข้อมูลงานวิจัยและสอบถามลักษณะพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่ต้องการปรับปรุงพันธุ์

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ผลการทดลองแบ่งออกเป็นหัวข้อตามวิธีการทดลอง ได้ดังนี้

1. เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวให้ปลอดเชื้อจุลินทรีย์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

จากการศึกษาหาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยหลายวิธีการ พบว่า การแช่สารละลายแอลกอฮอล์ 95% 3-5 นาที ก่อนการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายอื่นๆ สามารถลดการติดเชื้อได้ โดยไม่ทำลายเนื้อเยื่อเอ็มบริโอ ไม่มีการละลายของสารแอนโทรไซยานินในเมล็ดข้าว และเมื่อทดสอบฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี พบว่า ไม่มีความจำเป็นต้องใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อสูง แต่เป็นอันตรายต่อผู้วิจัย เช่น $HgCl_2$ (Mohammad, 2013; Puhan, 2013) ในการวิจัยนี้ พบว่า สารละลายคลอร๊อกสามารถใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อได้ แต่มีการปนเปื้อนของเชื้อ เมื่อใช้การฟอกฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง ทุกความเข้มข้นของสารละลายระยะเวลาต่างๆ กัน จึงได้ทดลองฟอกฆ่าเชื้อโดยหลังฟอกฆ่าเชื้อครั้งแรก ได้มีการแกะผนังเปลือกที่หุ้มข้าวออก แล้วทำการฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วยความเข้มข้นที่ลดลงด้วยระยะเวลาที่เท่ากัน สามารถลดอัตราการติดเชื้อได้เกือบทั้งหมด โดยที่เอ็มบริโอไม่เกิดความบอบช้ำจนตายจากการฟอกฆ่าเชื้อ และสามารถกำจัดสารแอนโทไซยานินในเนื้อข้าวที่จะละลายออกจากในสูตรอาหาร ทำให้อาหารปนเปื้อนได้ง่าย จึงสามารถสรุปขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อข้าว ได้ดังนี้

1. เลือกข้าวเปลือกที่เมล็ดสมบูรณ์ เปลือกไม่แตก มีเนื้อข้าว ไม่ลีบ แช่น้ำแล้วจม
2. แช่เมล็ดข้าวในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% นาน 5 นาที
3. ย้ายเมล็ดข้าวลงในสารละลายคลอร๊อก 20% ที่เติม tween 20 1-2 หยด นาน 10 นาที เขย่าเป็นระยะๆ
4. ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ภายในตู้ย้ายเลี้ยง
5. ลอกเปลือกข้าวออก แล้วฟอกด้วยคลอร๊อก 10% นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ย้ายเลี้ยงลงในสูตรอาหารที่ศึกษาต่อไป

ภาพที่ 1 ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าว 1) คัดเมล็ดจากรวง 2) เมล็ดข้าวที่ผ่านการแช่แอลกอฮอล์ 3) เมล็ดข้าวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วย NaOCl 20% และ 10% ตามลำดับ 4) เมล็ดข้าวที่พร้อมย้ายเลี้ยง

2. ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเอ็มบริโอของข้าวเหนียวดำหมอและช่อไม้ไผ่

เมื่อย้ายเอ็มบริโอของข้าวเหนียวดำหมอ และช่อไม้ไผ่ที่ฟอกฆ่าเชื้อตามวิธีการตอนที่ 1 ลงอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1-4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลานาน 4 สัปดาห์ เก็บผลการทดลองได้ดังตารางที่ 1 พบว่า 2, 4-D มีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำให้เอ็มบริโอข้าวมีการพัฒนาเจริญเติบโตไปเป็นแคลลัสแทนการเจริญเติบโตงอกเป็นต้นอ่อนตามปกติหรือตาย โดยไม่มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้น 2,4-D ทุกสูตรอาหารสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวสองสายพันธุ์ในเปอร์เซ็นต์ที่สูง (มากกว่า 80%) โดยที่ข้าวเหนียวดำหมอสามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ดีกว่าข้าวเหนียวช่อไม้ไผ่ และเอ็มบริโอของข้าวเหนียวดำหมอมีตอบสนองต่อ 2,4-D ได้ดีกว่าข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่ ทำการงอกเป็นต้นจากเอ็มบริโอเกิดเฉพาะเอ็มบริโอที่เลี้ยงในอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนความเข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้นจะทำให้เกิดการตายของเอ็มบริโอเดิมมากขึ้น ส่วนในข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่มีการงอกของเอ็มบริโอเดิมทุกความเข้มข้นของ 2,4-D อย่างไม่นัยสำคัญทางสถิติ และการชักนำให้เกิดต้นใหม่จากแคลลัสไม่มีปรากฏในทุกชุดการทดลอง

ตารางที่ 4 การชักนำให้เกิดแคลลัสข้าวเหนียวพันธุ์หมอดำและช่อไม้ไผ่ในอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ ระยะเวลา 2 สัปดาห์

พันธุ์ข้าว	2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	การเกิดแคลลัส (%)	เอ็มบริโอเดิมงอก (%)	เอ็มบริโอเดิมไม่งอก (%)	การติดเชื้อ (%)
ดำหมอ	1	96.00^{a} ± 4.00	1.33 ± 2.31	1.33^{cd} ± 2.31	1.33 ± 2.31
	2	93.33^{ab} ± 4.62	0.00 ± 0.00	4.00^{bcd} ± 0.00	2.67 ± 4.62
	3	98.67^{a} ± 2.31	0.00 ± 0.00	0.00^{d} ± 0.00	1.33 ± 2.31
	4	92.00^{ab} ± 6.93	1.33 ± 2.31	2.67^{bcd} ± 2.31	4.00 ± 6.93
	เฉลี่ย	92.63 ± 4.24	1.33 ± 2.31	2.21 ± 1.38	2.29 ± 3.79
ช่อไม้ไผ่	1	85.33^{b} ± 6.11	5.33 ± 6.11	5.33^{bc} ± 2.31	4.00 ± 6.93
	2	86.67^{ab} ± 2.31	1.33 ± 2.31	10.67^{a} ± 2.31	1.33 ± 2.31
	3	86.67^{ab} ± 6.11	2.67 ± 2.31	6.67^{ab} ± 2.31	4.00 ± 6.93
	4	93.33^{ab} ± 4.62	2.67 ± 4.62	4.00^{bcd} ± 0.00	0.00 ± 0.00
	เฉลี่ย	86.24 ± 4.84	2.94 ± 3.76	6.60 ± 2.10	2.45 ±3.92
F-test		**	ns	**	ns
C.V.		5.35	172.49	42.13	204.04

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดย DMRT

เมื่อเลี้ยงต่อจนครบระยะเวลา 4 สัปดาห์ เก็บผลได้ดังตารางที่ 5 พบว่า แคลลัสของข้าวเหนียวทั้งสองพันธุ์สามารถชักนำในอาหารสูตรที่มี 2, 4-D ความเข้มข้นสูง (4 มิลลิกรัมต่อลิตร) ได้ดี และแคลลัสบางส่วนมีการพัฒนาของรากซึ่งพบในแคลลัสของข้าวเหนียวดำหมอ (16.31%) มากกว่าข้าวเหนียวช่อไม้ไผ่ (8.55%) อย่างไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมในการชักนำราก คือ 2-3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการชักนำยอดใหม่จากแคลลัสไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติทั้งของข้าวเหนียวดำทั้งสายพันธุ์และความเข้มข้นของ 2,4-D โดยมีค่าสูงสุดประมาณ 8% นอกจากนี้เอ็มบริโอเดิมที่ใช้มีการเจริญเติบโต

ส่วนของต้นอ่อนเดิมของข้าวเหนียวดำหมอและข้าวเหนียวช่อไม้ไผ่อย่างไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเลี้ยงในอาหารชนิดเดียวกัน

ตารางที่ 5 การชักนำให้เกิดแคลลัสข้าวเหนียวพันธุ์หมอดำและช่อไม้ไผ่ในอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D ระยะเวลา 4 สัปดาห์

พันธุ์ข้าว	2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	แคลลัส (%)	แคลลัส+ราก (%)	แคลลัส+ยอด (%)	แคลลัล+ต้นอ่อน (%)
ดำหมอ	1	8.00^{c} ± 10.58	9.33^{b} ± 10.07	2.67 ± 4.62	76.00^{a} ± 4.00
	2	30.67^{abc} ± 14.05	16.00^{ab} ± 13.86	8.00 ± 13.86	38.67^{ab} ± 10.07
	3	60.00^{ab} ± 10.58	29.33^{a} ± 15.14	4.00 ± 0.00	5.33^{b} ± 6.11
	4	68.00^{a} ± 16.00	13.33^{ab} ± 2.31	8.00 ± 13.86	2.67^{b} ± 4.62
	เฉลี่ย	39.58 ± 12.16	16.3 ± 10.06	5.33 ± 10.90	32.3 ± 6.07
ช่อไม้ไผ่	1	18.67^{bc} ± 6.11	5.33^{b} ± 9.24	0.00 ± 0.00	61.33^{a} ± 8.33
	2	37.33^{abc} ± 33.31	22.67^{ab} ± 12.22	4.00 ± 4.00	22.67^{b} ± 39.26
	3	69.33^{a} ± 22.03	5.33^{b} ± 9.24	6.67 ± 6.11	4.00 ± 6.93
	4	77.33^{a} ± 16.65	2.67^{b} ± 4.62	8.0 ± 8.00	1.00 ± 0.33
	เฉลี่ย	49.65 ± 15.62	8.55 ± 7.85	6.35 ± 6.04	22.25 ±13.67
F-test		**	**	ns	**
C.V.		38.95	80.19	156.44	56.87

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดย DMRT

จากการทดสอบเลี้ยงเป็นนานกว่า 4 สัปดาห์ พบว่า เนื้อเยื่อเจริญเดิมจะเจริญเติบโตรบกวนการเจริญเติบโตของแคลลัส ปริมาณอาหารที่ลดลงมากและการสะสมของเสียจากเนื้อเยื่อพืช จึงต้องดำเนินการแยกแคลลัสลงเลี้ยงในอาหารสูตรใหม่ เพื่อชักนำให้เกิดอวัยวะใหม่ (ในการทดลองที่ 3) และเอ็มบริโอใหม่ (ในการทดลองที่ 4) ต่อไป

3. ศึกษาการเกิดอวัยวะใหม่จากแคลลัสข้าวเหนียวดำหมอและช่อไม้ไผ่

หลังจากชักนำให้เกิดแคลลัสในการทดลองที่ 2 นำแคลลัสมาเป็นเนื้อเยื่อตั้งต้นในการเลี้ยงให้พัฒนาการเกิดเป็นอวัยวะต่างๆ โดยย้ายแคลลัสของข้าวดำหมอและช่อไม้ไผ่ปลอดเชื้อเลี้ยงในอาหารสูตร LS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1-4 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงบนชั้นไฟเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกผลเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 พบว่า การเลี้ยงชักนำอวัยวะใหม่ด้วยสูตรอาหารที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน มีผลการเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวทั้งสองพันธุ์ โดยมีแนวโน้มการเจริญเติบโตที่เหมือนกัน กล่าวคือ เมื่อย้ายเลี้ยงแคลลัสในอาหารใหม่ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D สูง (4 มิลลิกรัมต่อลิตร) อัตราการเจริญเติบโตมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับอาหารที่มีความเข้มข้น 2,4-D ต่ำหรือไม่มี แคลลัสที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่เติม 2,4-D แล้วย้ายมาเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม 2,4-D จะมีน้ำหนักแคลลัสเพิ่มมากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า แคลลัสที่ย้ายมาจากสูตรอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้นแตกต่างกันจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสที่ย้ายเลี้ยงในสูตรเดียวกัน โดยแคลลัสที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่มี 2,4-D สูงมาก่อนนำมาเลี้ยงในสูตรอาหารใหม่ที่ 2,4-D ลดลงจะเกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสได้ดีในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ (เส้นกราฟสีม่วงในภาพที่ 4-5) และเมื่อสังเกตการเกิดรากและยอดใหม่ พบว่า เมื่อย้ายเลี้ยงแคลลัสจากอาหารที่เติม 2,4-D ลงในอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้นต่ำหรือไม่มี จะทำให้แคลลัสพัฒนาการเกิดรากได้ (50-7%) โดนเฉพาะแคลลัสที่ย้ายเลี้ยงจากสูตรอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (เส้นกราฟสีเหลือง ภาพที่ 6-7) เกิดรากได้ระหว่าง 50-0 % ในข้าวเหนียวดำหมอและ 70- 0% ข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่ สูตรอาหารที่ดีที่สุดในการชักนำรากของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ คือ แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร มาก่อนแล้วย้ายลงอาหารสูตรที่ไม่เติม 2,4-D แคลลัสของข้าวทั้งสองสายพันธุ์จะเกิดรากฝอยจำนวนมากรอบแคลลัสจนแคลลัสมีขนาดเล็กและหายไปในที่สุด (ภาพที่ 10 และ 12) และเมื่อสังเกตการพัฒนาของยอด ก็ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับการเกิดราก แต่ความเข้มข้น 2,4-D ที่มากกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่เกิดพัฒนาของยอด และการเกิดยอดจะมากเมื่อเลี้ยงแคลลัสในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรก่อน แล้วย้ายลงอาหารสูตรที่ไม่เติม 2,4-D แคลลัสจะพัฒนาการเกิดรากจำนวนมากและเริ่มเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวที่ต่อพัฒนากลายเป็นยอดตามลำดับ (ภาพที่ 11) โดยเกิดยอดประมาณ 9% ในข้าวเหนียวดำหมอและ 25% ในข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่ (เส้นกราฟสีเหลือง ภาพที่ 8-9) ดังนั้น การเพิ่มขนาดของแคลลัสก็มีความแตกต่างกัน เปอร์เซ็นต์การเกิดรากและยอดที่แตกต่างกันขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่

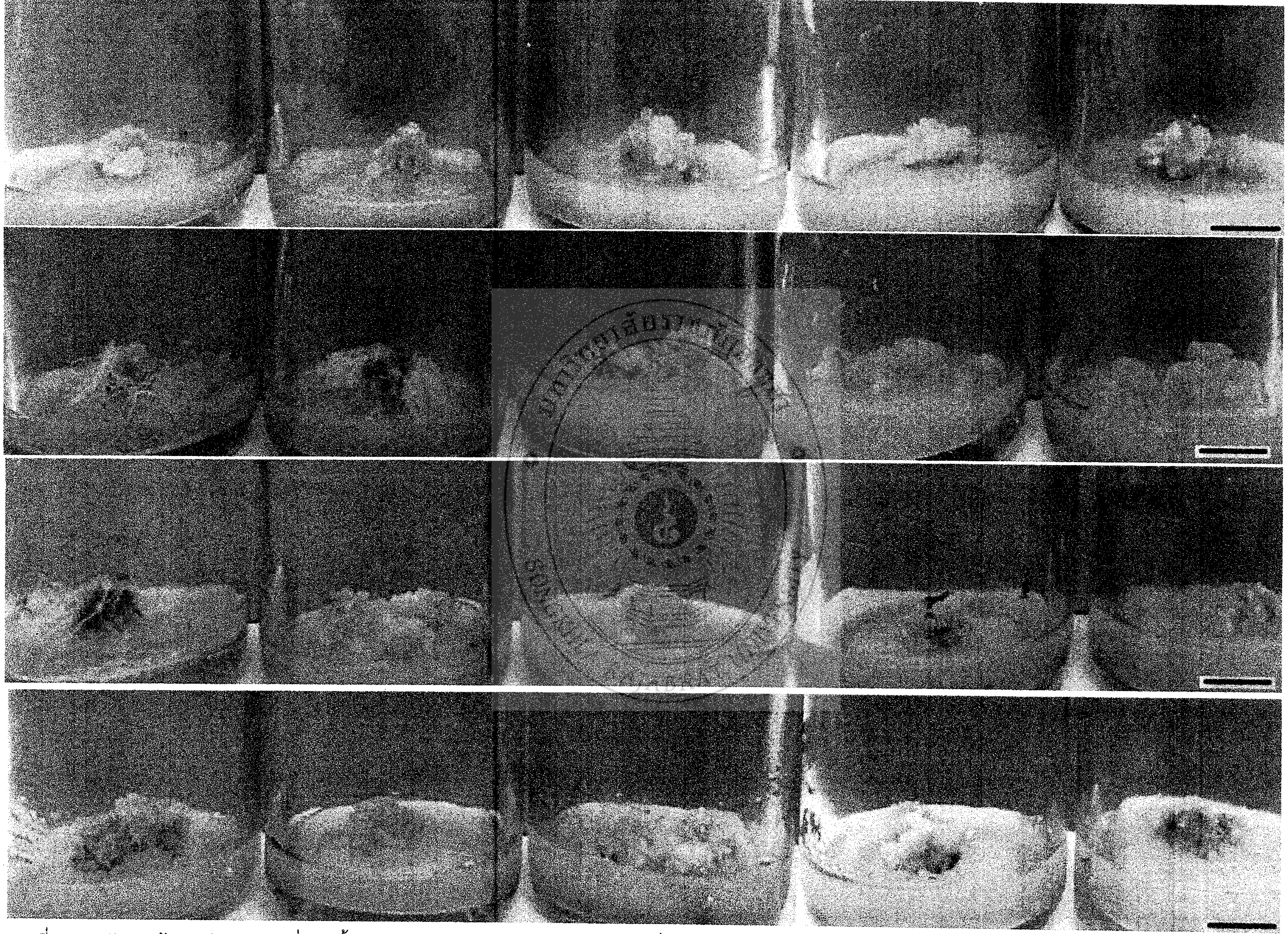
1) สายพันธุ์ของข้าว พบว่า แคลลัสที่ได้จากข้าวเหนียวพันธุ์ช่อไม้ไผ่มีการตอบสนองต่อสูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ดีกว่าแคลลัสที่ได้จากข้าวเหนียวพันธุ์ดำหมอ (ภาพที่ 2 และ 3) ทำให้เกิดการพัฒนาอวัยวะ คือ ยอดและรากได้เปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่า กล่าวคือ การเกิดรากและยอดจากแคลลัสข้าว

เหนียวพันธุ์ช่อไม้ไผ่สูงสุด เท่ากับ 70% และ 25% ตามลำดับ (ภาพที่ 7 และ 9) ขณะที่การเกิดรากและยอดจากแคลลัสข้าวเหนียวพันธุ์ดำหมอ มีค่าเท่ากับ 50% และ 8.5% ตามลำดับ (ภาพที่ 8 และ 10) แสดงว่าข้าวเหนียวพันธุ์ช่อไม้ไผ่ เกิด indirect organogenesis ได้ดีกว่าข้าวเหนียวพันธุ์ดำหมอ สอดคล้องกับ การเกิดอวัยวะใหม่ของข้าวขึ้นการสายพันธุ์ด้วย ส่วนการเจริญเติบโตของแคลลัสไม่มีความแตกต่างกัน

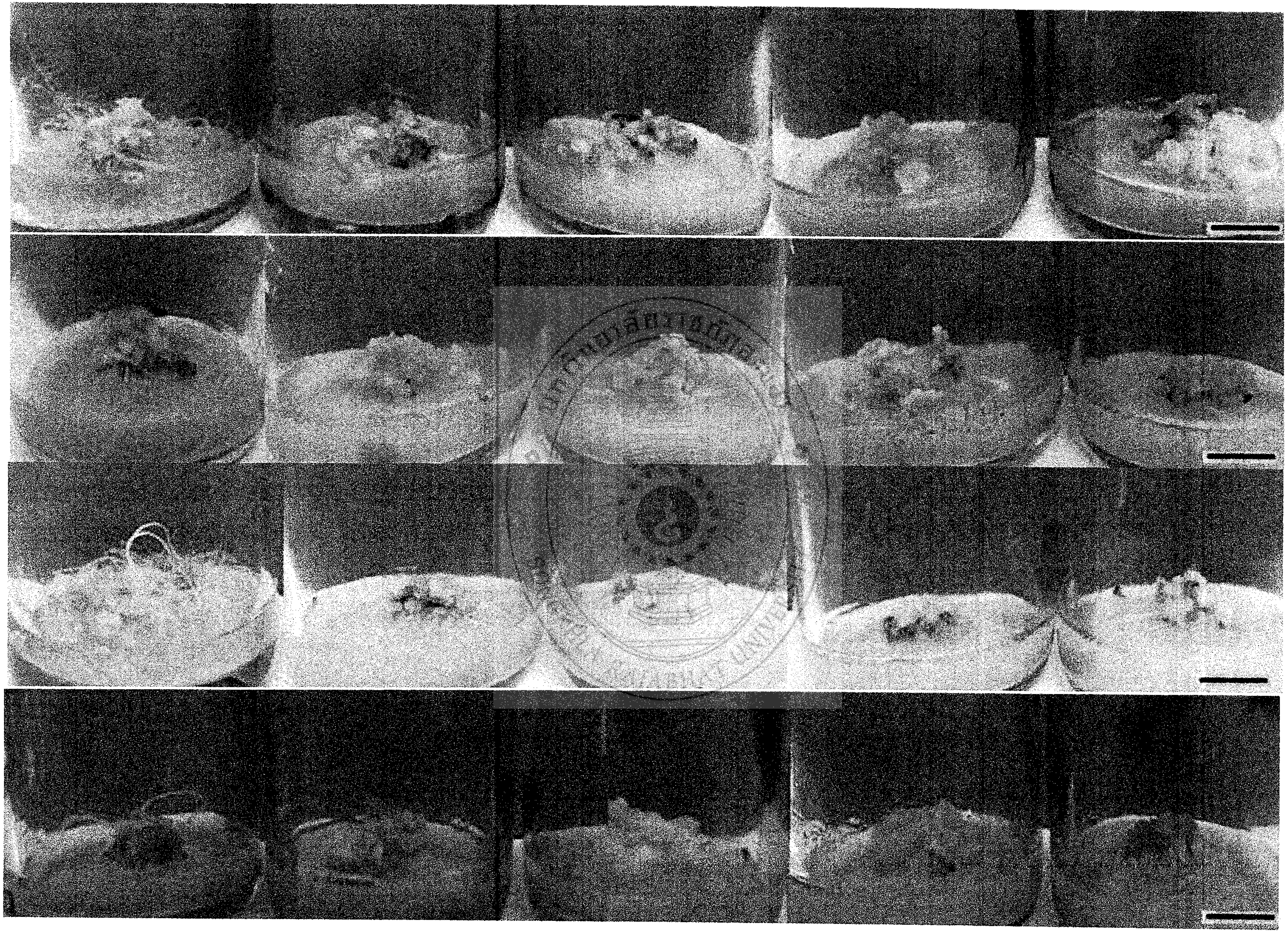
2) สูตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสตั้งต้น เมื่อย้ายแคลลัสเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกัน แคลลัสมีโอกาสตอบสนองในการชักนำให้เกิดอวัยวะได้แตกต่างกันด้วย ขึ้นอยู่กับเนื้อเยื่อแคลลัสได้ย้ายเลี้ยงมาจากอาหารสูตรใด เนื่องจากแคลลัสได้สะสมสารอาหารภายในเซลล์ที่แตกต่างกันโดยเฉพาะชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อย้ายเลี้ยงแคลลัสลงในอาหารสูตรใหม่ที่แตกต่างจากเดิมทำให้สมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตมีการเปลี่ยนแปลงขึ้น เป็นเหตุเหนี่ยวนำให้มีการพัฒนาและเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชที่แตกต่าง จากการศึกษา พบว่า เมื่อย้ายเลี้ยงแคลลัสจากอาหารสูตร LS ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D สูง (3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร) จะมีการตอบสนองได้ดีกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่ความเข้มข้นของ 2,4-D ต่ำ (1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร) ทั้งปริมาณแคลลัสที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4-5) เปอร์เซ็นต์การเกิดราก (ภาพที่ 6-7) และยอดใหม่ (ภาพที่ 8-9) ซึ่งสอดคล้องกันทั้งสองสายพันธ์ของข้าวที่เพาะเลี้ยง

3) ลักษณะของแคลลัสก็มีผลต่อการเพิ่มจำนวนและเกิดอวัยวะใหม่ แคลลัสที่เลี้ยงได้มี 2 ลักษณะ คือ แคลลัสที่มีลักษณะฉ่ำน้ำ นิ่ม ฟู และแคลลัสที่เกาะกลุ่มกันแน่น สีของแคลลัสประกอบด้วย ขาว ขาวอมเหลืองและเหลือง แคลลัสที่อายุมากจะกลายเป็นสีน้ำตาลเข้ม แคลลัสที่พัฒนาเกิดรากและยอดจะมีลักษณะขาวอมเหลืองหรือเหลือง เกาะกลุ่มแน่น (ภาพที่ 4-5)

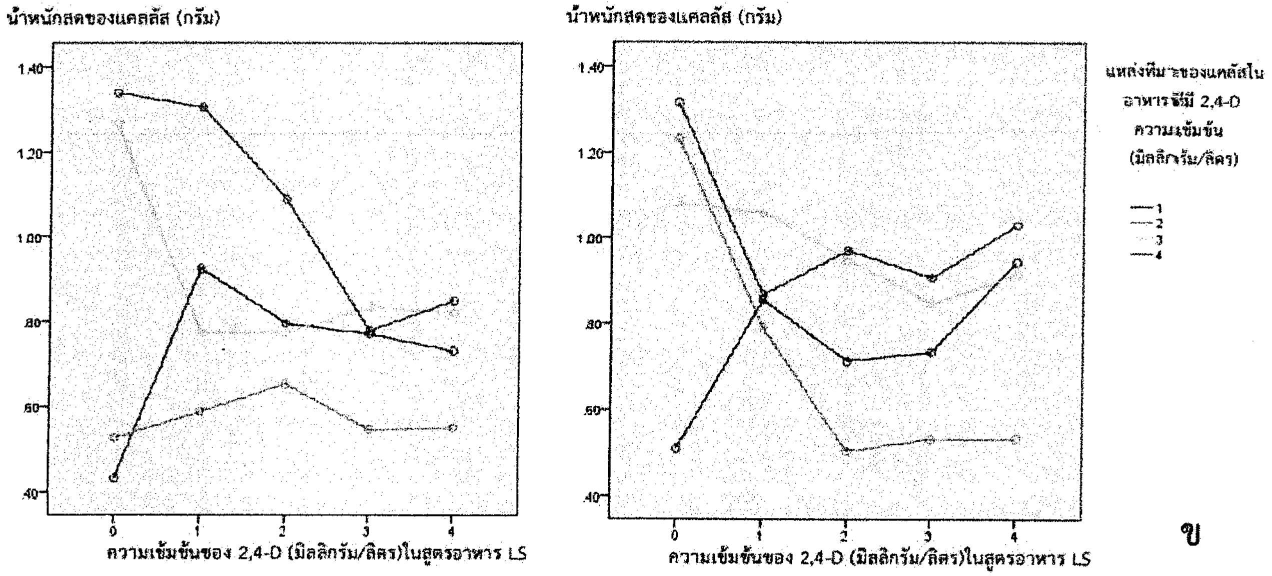
4) สูตรอาหารที่เลี้ยงแคลลัส สูตรอาหารใหม่ที่เลี้ยงมีส่วนสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาและเพิ่มขึ้นของแคลลัส ถ้าสูตรอาหารที่ย้ายเลี้ยงมีชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตเดียวกันแต่ความเข้มข้นเปลี่ยนแปลงจะส่งผลกระตุ้นการเกิดพัฒนารากและยอดได้ดี ยิ่งมีความแตกต่างความเข้มข้นมากเท่าไรแคลลัสจะมีการตอบสนองมากขึ้นเท่านั้น จากภาพที่ 4-5 พบว่า แคลลัสที่ย้ายเลี้ยงจากอาหารที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D สูง (4 มิลลิกรัมต่อลิตร) ลงในอาหารที่มีความเข้มข้นต่ำๆ หรือไม่มี แคลลัสจะมีการเพิ่มจำนวนมากที่สุด และลดลงเมื่อย้ายแคลลัสเลี้ยงในอาหารที่ความเข้มข้นของ 2,4-D สูง โดยเฉพาะแคลลัสที่ย้ายจากอาหารที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D ต่ำไปที่ความเข้มข้นสูง แคลลัสมีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ลดลงมากที่สุด และเมื่อสังเกตจากภาพที่ 6-9 พบว่า จะเกิดการพัฒนาของรากและยอดได้ดีในอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยเฉพาะแคลลัสที่ย้ายมาจากอาหารที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D สูง แสดงว่า ความแตกต่างของความเข้มข้น 2,4-D ที่สะสมภายในเซลล์และในอาหารใหม่มีความสัมพันธ์โอกาสการเหนี่ยวนำให้เกิดอวัยวะจากแคลลัส ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีการพัฒนาอวัยวะใหม่ของแคลลัส



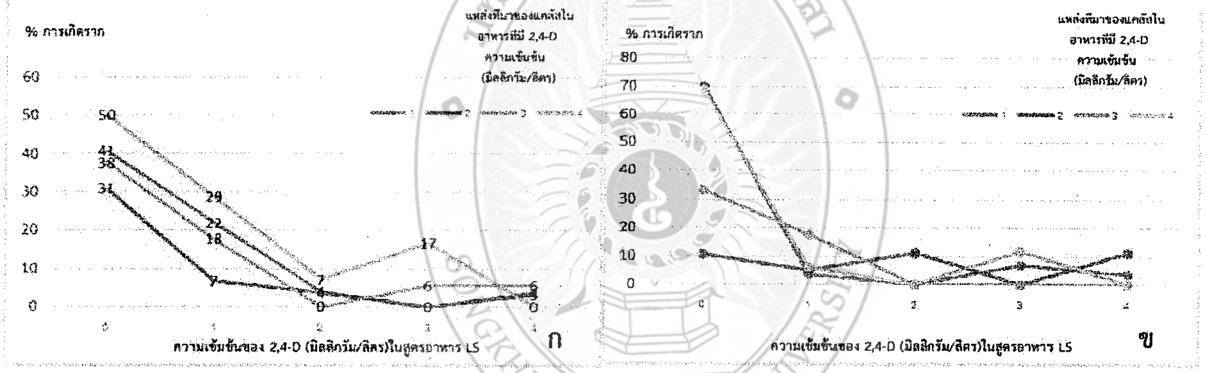
ภาพที่ 2 แคลลัสของข้าวเหนียวดำหมอที่ย้ายเลี้ยงจากสูตร LS + 2,4-D (1-4 mg/l) (แถวที่ 1-4) ลงในอาหารสูตร LS + 2,4-D 0-4 mg/l (คอลัมภ์ที่ 1-5) เป็นเวลา 4 สัปดาห์



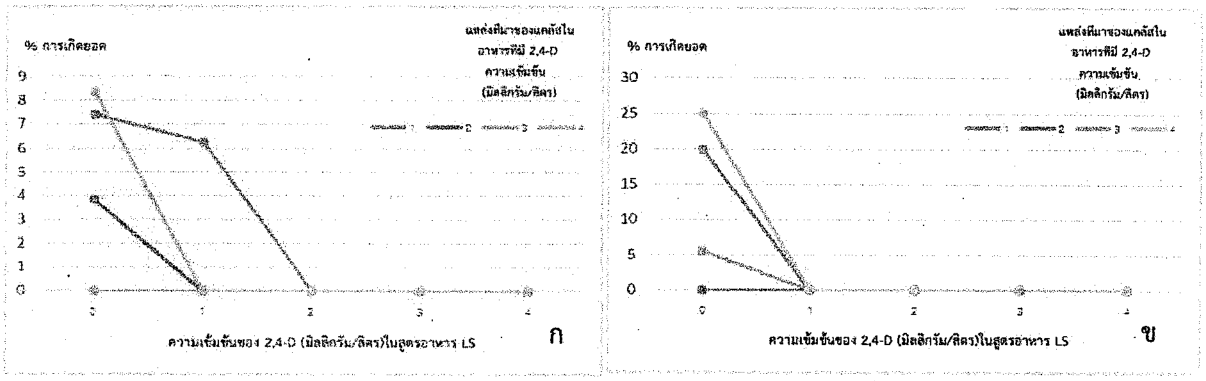
ภาพที่ 3 แคลลัสของข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่ที่ย้ายเลี้ยงจากสูตร LS + 2,4-D (1-4 mg/l) (แถวที่ 1-4) ลงในอาหารสูตร LS + 2,4-D 0-4 mg/l (คอลัมภ์ที่ 1-5) เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 4 น้ำหนักของแคลลัสของข้าวเหนียวดำหมอ (ก) และช่อไม้ไผ่ (ข) ที่ย้ายเลี้ยงจากสูตร LS + 2, 4-D (1-4 mg/l) (เส้นที่ 1-4) ลงในอาหารสูตร LS + 2, 4-D 0-4 mg/l (ค่าแกนนอน) เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 5 เปอร์เซ็นต์การเกิดรากของแคลลัสข้าวเหนียวดำหมอ (ก) และช่อไม้ไผ่ (ข) ที่ย้ายเลี้ยงจากสูตร LS + 2, 4-D 1-4 mg/l (เส้นที่ 1-4) ลงในอาหารสูตร LS + 2, 4-D 0-4 mg/l (ค่าแกนนอน) เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 6 เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของแคลลัสข้าวเหนียวดำหมอ (ก) และช่อไม้ไผ่ (ข) ที่ย้ายเลี้ยงจากสูตร LS + 2,4-D 1-4 mg/l (เส้นที่ 1-4) ลงในอาหารสูตร LS + 2,4-D 0-4 mg/l (ค่าแกนนอน) เป็นเวลา 4 สัปดาห์

หลังจากทดสอบผลของ 2,4-D ต่อการเกิดอวัยวะใหม่ของข้าวทั้งสองพันธุ์ พบว่า ไม่สามารถชักนำการเกิดยอดและรากใหม่ได้ดีมาก จึงได้นำแคลลัสบางส่วนมาทดสอบร่วมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่น ได้แก่ สารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโทไคนิน ได้แก่ BA Kinetin ร่วมกับออกซินชนิด NAA 2,4-D เพื่อบันทึกอัตราการเกิดยอดและรากที่เปลี่ยนไปจากการใช้ 2,4-D เพียงชนิดเดียว (ตารางที่ 6) พบว่า การใช้ชนิดออกซินและชนิดไซไทไคนินที่แตกต่างรวมกันจะทำให้แคลลัสเจริญเติบโตได้ดีกว่าการใช้ 2,4-D ชนิดเดียวในทุกระดับความเข้มข้น น้ำหนักของแคลลัสของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติทั้งสายพันธุ์และชนิดของสูตรอาหารโดยมีค่าน้ำหนักเพิ่มขึ้นประมาณ 1.90-2.26 กรัม ขณะที่การใช้ 2,4-D มีค่าน้ำหนักแคลลัส 1.3-0.5 กรัม (ภาพที่ 4)

ตารางที่ 6 ผลสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ การเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวและการเกิดอวัยวะใหม่

ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต		น้ำหนักสดของแคลลัส (กรัม)		% การเกิดราก	
ไซโทไคนิน 1 มิลลิกรัม/ลิตร	ออกซิน 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร	ดำหมอ	ช่อไม้ไผ่	ดำหมอ	ช่อไม้ไผ่
BA	NAA	1.90±0.82	1.99 ± 1.24	30.23	40.91
BA	2,4-D	1.99±0.91	2.16 ± 1.34	21.96	17.57
Kinetin	NAA	2.07±0.98	2.05 ± 1.14	35.44	52.63
Kinetin	2,4-D	2.08±0.92	2.26 ± 1.54	16.67	29.17
F-test		ns	ns	ns	ns
C.V. (%)		45.15	60.03	32.11	43.04

ns: ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

การชักนำให้เกิดยอดโดยการใช้ชนิดออกซินและชนิดไซไทไคนินที่แตกต่างรวมกัน ทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดไม่มีความแตกต่างจากการเติม 2,4-D เพียงชนิดเดียว กล่าวคือ สามรถชักนำยอดได้น้อยมากจนไม่สามารถหาค่าได้ แต่การเกิดราก พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเพิ่มมากขึ้นในทุกชุดการทดลองที่เติมออกซินร่วมกับไซโทไคนินเมื่อเทียบกับการเติมออกซินชนิด 2,4-D ในอาหารเพียงชนิดเดียว (ตารางที่ 5 และ 6) โดยข้าวเหนียวดำหมอมีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 16.67- 35.44 (2,4-D เท่ากับ 0-29%, ตารางที่ 6) และข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 17.57- 52.63 (2,4-D เท่ากับ 0-18%, ตารางที่ 6) โดยชนิดของไซโทไคนินและออกซินที่ใช้ร่วมกันที่เหมาะต่อการชักนำให้เกิดอวัยวะใหม่ คือ Kientin ร่วมกับ NAA เพราะชักนำให้เกิดรากได้ดีในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ จึงนำ Kinetin และ NAA มาทำการศึกษาต่อเนื่องด้วยการเตรียมอาหารที่มีความเข้มข้นของ Kinetin ร่วมกับ NAA ที่ระดับต่างๆกัน และเลี้ยงในสภาวะที่มีความชื้นแตกต่างกัน ทำการทดลองดัดแปลงจากวิธีการของ Tsukāhara และ Hirosawa (1992) โดยชุดการทดลองที่ลดความชื้นจะย้ายแคลลัสวางบนกระดาษ

กรองฆ่าเชื้อแห้งที่อยู่ในจานเพาะเชื้อ วางเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 2 วัน แล้วจึงย้ายเลี้ยงลงในสูตรอาหารตามปกติ ได้ผลการทดลอง ดังตารางที่ 8-9

การชักนำอวัยวะใหม่จากแคลลัสของข้าวเหนียวดำหมอด้วย kinetin และ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับลดความชื้น พบว่า น้ำหนักแคลลัสที่ได้ 5.47-7.71 กรัม ซึ่งค่าที่ได้มากกว่าการทดลองชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ร่วมกัน (2.07 กรัม, ตารางที่ 7) แสดงให้เห็นว่า ระดับความเข้มข้นที่ใช้ร่วมกันมีผลต่อการอัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสแต่ไม่มีนัยสำคัญความแตกต่างทางสถิติ ส่วนการเลี้ยงในสภาวะที่ลดความชื้นแคลลัสมีลักษณะเนื้อเยื่อเกาะกันอย่างหนาแน่นมากกว่าการเลี้ยงปกติ เซลล์มีลักษณะฉ่ำน้ำน้อยกว่าและเมื่อนำแคลลัสมาชั่งน้ำหนัก พบว่า แคลลัสมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นทุกสูตรอาหารที่เลี้ยง (5.47- 7.71 กรัม) แคลลัสโดยทั่วไปของข้าวจะเป็นสีน้ำตาลอ่อน ฉ่ำน้ำ แต่เมื่อทำการทดลองเลี้ยงเสร็จสิ้น มีแคลลัสที่เกิดใหม่บางส่วนมีลักษณะเปลี่ยนไป เช่น เกิดแคลลัสสีขาวใส แคลลัสสีเข้มคล้ำ บางส่วนเกิดรากหรือยอด จึงบันทึกผลได้ดังตารางที่ 8-9 พบว่า ชุดการทดลองที่ลดความชื้นเกิดแคลลัสสีขาวใส ไม่มีแคลลัสสีเข้ม มีการเกิดรากจากแคลลัสเกือบทุกชุดการทดลอง ตั้งแต่ 33-100% แต่ไม่ชุดใดเกิดยอดใหม่ แต่เมื่อเทียบกับการเลี้ยงในสูตรอาหารปกติที่ไม่ลดความชื้น พบว่า มีแคลลัสมีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่า แต่มีความหลากหลายของพัฒนาการที่เกิดขึ้น แคลลัสมีทั้งลักษณะสีขาวและดำ เกิดรากทุกชุดการทดลอง และบางชุดการทดลองมีการเกิดยอดใหม่พัฒนาขึ้นมา โดยชุดที่เกิดยอดได้ดีที่สุด คือ MS ที่เติม Kinetin 3 มิลิลกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลิลกรัมต่อลิตร มีค่าประมาณ 13% (ตารางที่ 8)

การชักนำอวัยวะใหม่จากแคลลัสของข้าวเหนียวช่อไม้ไผ่ ให้ผลการทดลองที่คล้ายคลึงกับข้าวเหนียวดำหมอ แตกต่างกันเพียงค่าที่วัดได้ แต่แนวโน้มการเกิดเช่นเดียวกัน คือ แคลลัสที่เลี้ยงในสภาวะลดความชื้นมีค่าน้ำหนักที่วัดได้ (5.4-7.34 กรัม) มากกว่าแคลลัสที่เลี้ยงปกติ (4.12-4.67 กรัม) แคลลัสที่เลี้ยงได้มีแต่ลักษณะสีขาวและเกิดแต่ราก (20-60%) แต่ไม่เกิดยอด ส่วนการเลี้ยงแคลลัสในสภาวะปกติมีการเกิดรากใหม่ (37.9-57.1%) และยอดใหม่ (0-7.7%) โดยชุดที่เกิดยอดได้ดีที่สุด คือ MS ที่เติม kinetin 1 มิลิลกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าประมาณ 7.7% แต่ค่าที่วัดได้ทุกตัวแปรไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 8)

เมื่อแคลลัสเกิดการพัฒนาของรากและยอดตามลำดับ ทำการย้ายเลี้ยงอาหารในสูตรเดิมของเนื้อเยื่อ แล้วบันทึกภาพติดตามการเจริญเติบโต พบว่า รากฝอยที่เกิดขึ้นจะเพิ่มจำนวนและความยาวมากขึ้นจนปกคลุมแคลลัสมิด และแคลลัสไม่มีการเจริญเติบโตเพิ่มขนาด (ภาพที่ 7 ก-ง) ส่วนของยอดใหม่ที่เกิดขึ้นมาจะเริ่มจากเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวเข้มแล้วพัฒนาเป็นยอดอ่อนของ ข้าวเหนียวดำหมอจำนวนเล็กน้อย (1-3 ยอดต่อก้อนแคลลัส) (ภาพที่ 10) ส่วนข้าวเหนี่ยวดำช่อไม้ไผ่เกิดยอดขนาดเล็กจำนวนมากกว่า (ภาพที่ 8-10) ยอดเจริญเติบโตยืดยาว เกิดเป็นใบขนาดเล็กๆ โดยฐานชิ้นส่วนประกอบด้วยรากจำนวนมาก ใบข้าวส่วนใหญ่จะฉ่ำน้ำ (ภาพที่ 8)

ตารางที่ 7 การเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวเหนียวดำหมอที่เลี้ยงด้วยวิธีการปกติและลดความชื้นในสูตรอาหารต่างๆ หลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน

วิธีการ	MS เติมสวบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)		น้ำหนักสดแคลลัส (กรัม)	%การเกิดแคลลัส		%การเกิดอวัยวะ	
	Kinetin	NAA		ขาว	ดำ	ราก	ต้นอ่อน
ปกติ	1	0	4.07 ± 1.14	40.9	4.5	40.9	4.5
	1	0.5	3.94 ± 0.96	39.1	4.3	39.1	7.2
	1	1	3.69 ±1.45	56.5	0.0	46.5	2.0
	2	0.5	4.61 ± 1.35	54.5	4.5	40.5	4.7
	2	1	3.98 ± 1.36	66.7	8.3	66.7	9.5
	2.5	0.5	3.72 ± 1.19	71.4	9.5	65.4	7.2
	3	0.5	3.57 ± 1.01	58.3	0.0	46.3	0.0
	3	1	4.04 ± 0.95	56.5	13.0	53.5	15.0
เฉลี่ย			4.01±1.17	55.4	5.5	49.8	6.3
ความชื้น	1	0	5.47 ± 0.46	0.0	0.0	0.0	0.0
	1	0.5	6.22 ± 0.30	50.0	0.0	43.0	0.0
	1	1	7.71 ± 1.66	66.7	0.0	61.4	0.0
	2	0.5	5.49 ± 0.35	70.0	0.0	73.0	0.0
	2	1	6.25 ± 1.34	30.0	0.0	33.3	0.0
	2.5	0.5	6.59 ± 1.52	0.0	0.0	0.0	0.0
	3	0.5	6.77 ± 1.35	65.0	0.0	66.7	0.0
	3	1	5.65 ± 0.63	100.0	0.0	100.0	0.0
เฉลี่ย			6.26±0.95	47.7	0.0	47.1	0.0
F-test			Ns	-	-	-	

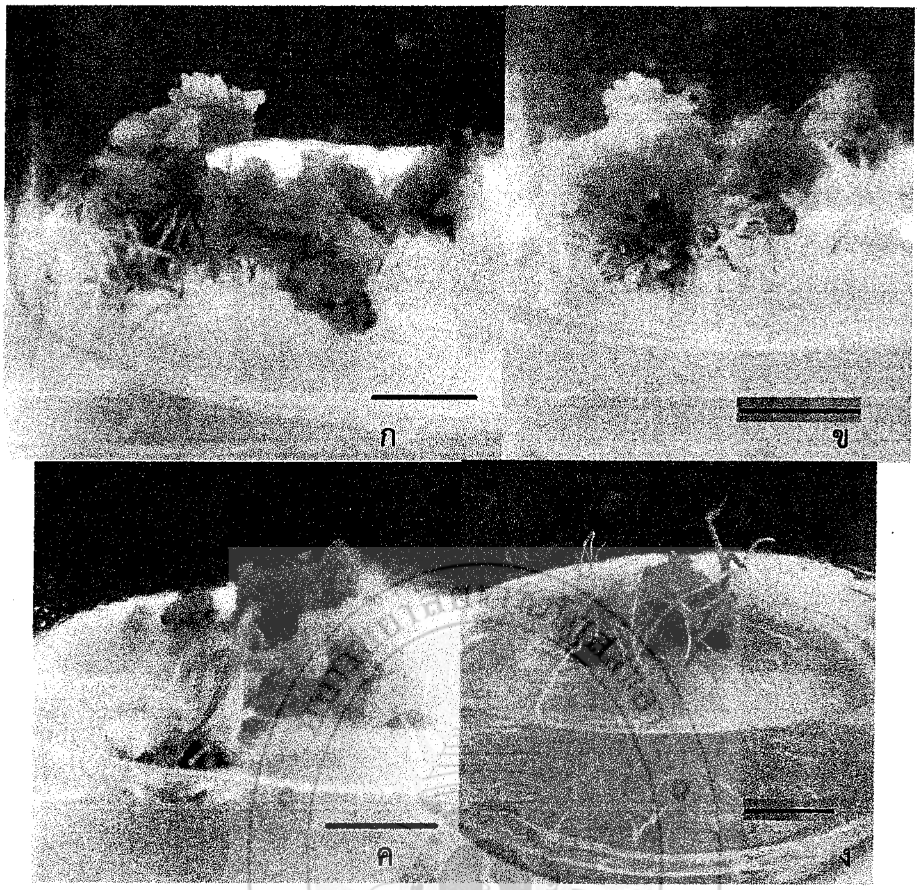
ns: ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

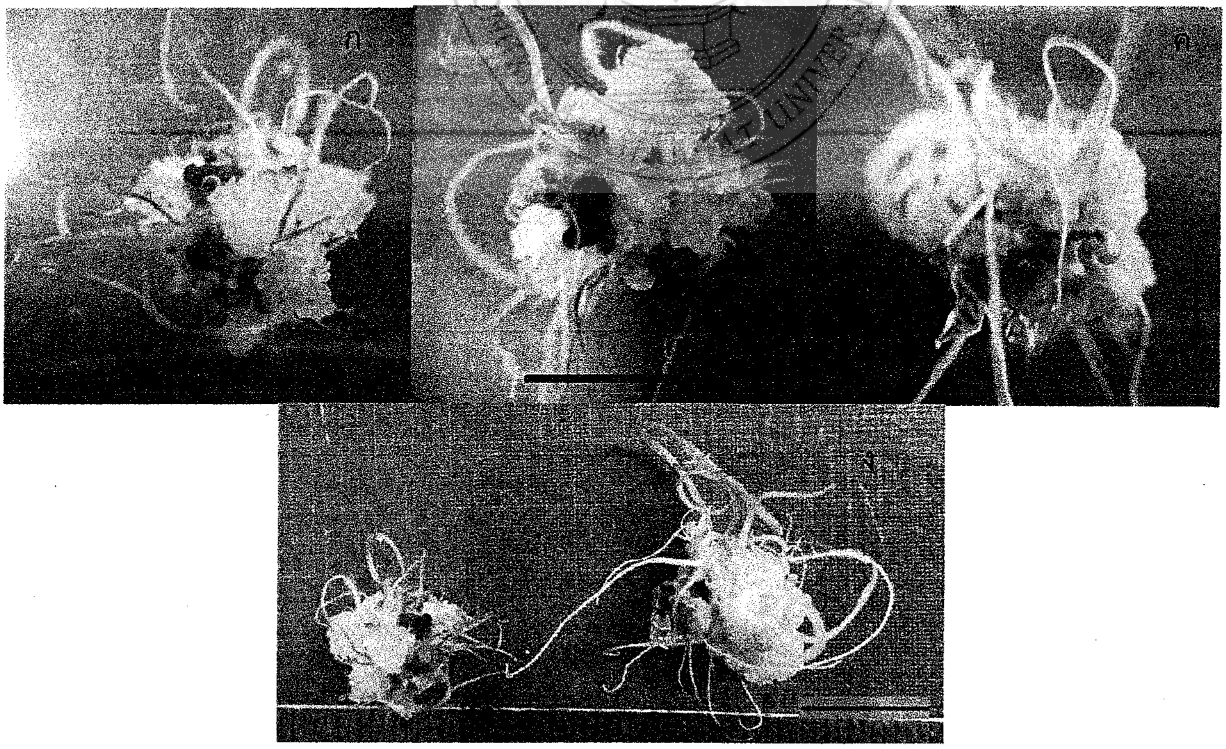
ตารางที่ 8 การเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่ที่เลี้ยงด้วยวิธีการปกติและลดความชื้นในสูตรอาหารต่างๆ หลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน

วิธีการ	MS เติมสวบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)		น้ำหนักสด แคลลัส	% การเกิดแคลลัส		% การเกิดอวัยวะ	
	Kinetin	NAA		ขาว	ดำ	ราก	ต้นอ่อน
ปกติ	1	0	4.18 ± 1.43	39.3	0.0	39.3	0.0
	1	0.5	4.67 ± 1.13	57.1	0.0	57.1	0.0
	1	1	4.35 ± 0.84	46.2	0.0	43.2	7.7
	2	0.5	4.59 ± 1.57	44.8	0.0	40.0	3.4
	2	1	4.30 ± 1.35	53.3	0.0	47.2	6.7
	2.5	0.5	4.12 ± 1.05	41.4	0.0	40.9	3.4
	3	0.5	3.76 ± 1.00	37.9	0.0	35.7	0.0
	3	1	4.19 ± 1.14	43.3	0.0	41.4	3.3
เฉลี่ย			4.27 ± 1.18	45.4	0.0	43.1	3.06
ลดความชื้น	1	0	5.40 ± 0.78	28.6	0.0	24.7	0.0
	1	0.5	5.74 ± 0.65	50.0	0.0	48.0	0.0
	1	1	6.25 ± 1.25	50.0	0.0	52.0	0.0
	2	0.5	5.97 ± 0.76	33.3	0.0	33.3	0.0
	2	1	7.34 ± 1.34	20.0	0.0	21.0	0.0
	2.5	0.5	5.71 ± 0.41	28.6	0.0	27.2	0.0
	3	0.5	5.97 ± 0.23	50.0	0.0	50.0	0.0
	3	1	5.80 ± 1.67	60.0	0.0	55.0	0.0
เฉลี่ย			6.02 ± 0.88	40.1	0.0	38.9	0.0
F-test			ns	-	-	-	-

ns: ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

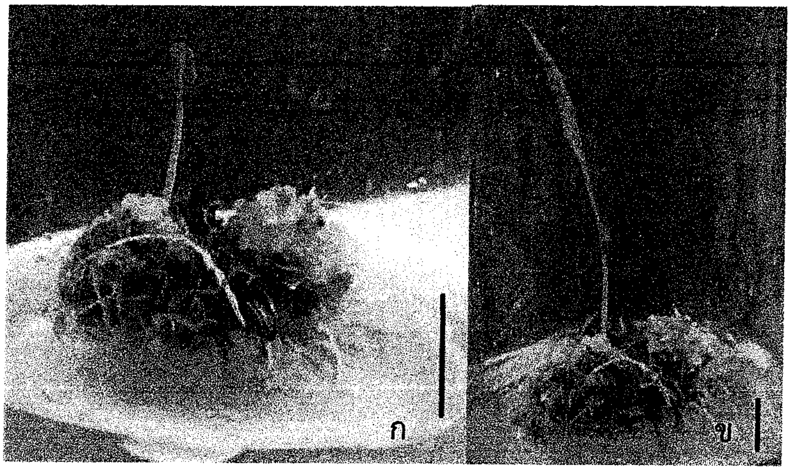


ภาพที่ 7 พัฒนาการเกิดรากและยอดใหม่จากเนื้อเยื่อแคลลัสของข้าวเหนียวดำหมอ (ก-ง) ตามลำดับ (บาร์ = 1 ซม.)

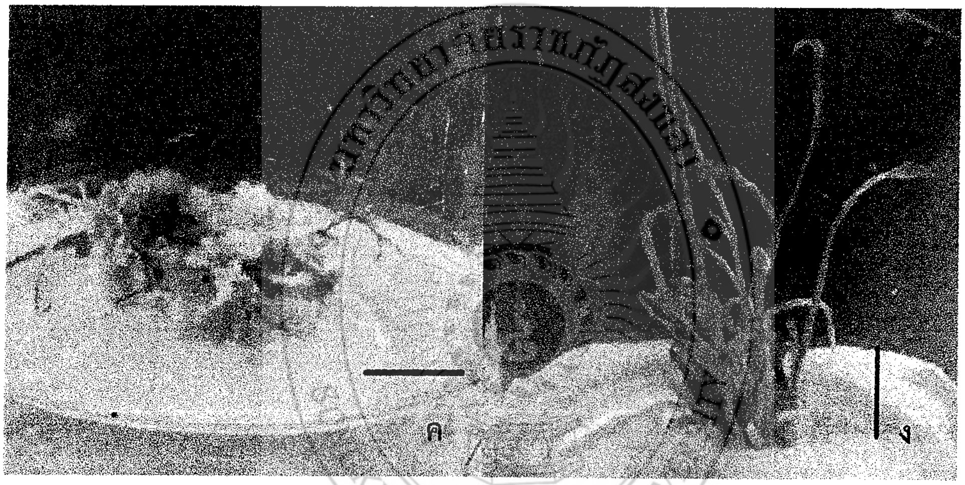


ภาพที่ 8 พัฒนาการเกิดรากและยอดใหม่จากเนื้อเยื่อแคลลัสของข้าวเหนียวซ่อไม้ไผ่ (ก-จ) ตามลำดับ (บาร์ = 1 ซม.)

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา



ภาพที่ 9 การเกิดรากและยอดขนาดเล็กจำนวนมากบนแคลลัสข้าวเหนียวช่อไม้ไผ่ (เส้นบาร์ = 1 ซม.)



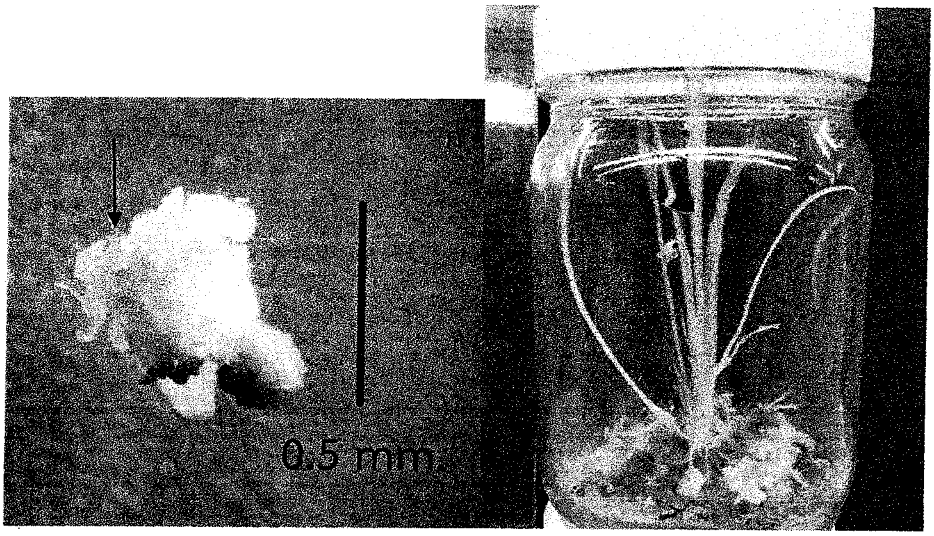
ภาพที่ 10 การเกิดเฉพาะรากบนแคลลัส (ก) และยอดจำนวนมาก (ข) ของข้าวเหนียวช่อไม้ไผ่ (บาร์ = 1 ซม.)

4. ศึกษาการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอใหม่จากแคลลัส (embrygenesis) ข้าวเหนียวดำหมอและช่อไม้ไผ่

จากสูตรอาหารที่ใช้ร่วมกับการทดลองตอนที่ 3 พบว่า มีบางแคลลัส เกิดการพัฒนาลักษณะคล้ายต้นอ่อน (ภาพที่ 11) แต่ยังสรุปไม่ได้และไม่สามารถเก็บผลการทดลองเป็นข้อมูลเชิงปริมาณเพียงพอและรายงานผลทางสถิติได้ เนื่องจากมีปริมาณการเกิดที่ค่อนข้างต่ำ ยังไม่มีความสม่ำเสมอของการเกิดเอ็มบริโอใหม่

ว
633.1836
จ111ค

- 9 มี.ค. 2561



ภาพที่ 11 การเกิดเอ็มบริโอ (ลูกศร) จากเนื้อเยื่อแคลลัส (ก) และพัฒนาของเอ็มบริโอ (ข) ของข้าวเหนียวช่อไม้ไผ่

5. ศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวเหนียวดำหมอในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดในหลอดทดลองโดยไม่ผ่านการสร้างแคลลัส ย้ายลงอาหารสูตรต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบผลสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA ร่วมกับ NAA ซึ่งมีงานวิจัยหลายเรื่องที่นำใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว กับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด TDZ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 10-11 พบว่า การใช้ BA รวมกับ NAA และ TDZ รวมกับ NAA มีผลต่อการเจริญเติบโตต่อข้าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \le 0.05$) ในทั้งข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ในทุกตัวแปรที่เก็บข้อมูล ได้แก่ ความสูงของข้าว จำนวนยอด รากและใบที่เกิดขึ้นหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยข้าวเหนียวดำหมอที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ลักษณะของต้นที่มีความสูงมากที่สุด ระบบรากจะเจริญเติบโตได้ดี มีใบจำนวนมากและเกิดยอดต่อต้นน้อยที่สุดเช่นเดียวกับสูตรอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ลักษณะต้นข้าวที่ได้จะใหญ่แข็งแรงสมบูรณ์ แต่มีลักษณะเป็นต้นเดียวๆ มากกว่ามีลักษณะเป็นกอข้าว (ภาพที่ 12) เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลามากกว่า 4 สัปดาห์ จะมีการแตกกอช้าหรือไม่เกิดการแตกกอเมื่อเทียบกับต้นข้าวในสูตรอาหารอื่นๆ ชุดอาหารที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกชุดมีแนวโน้มการเกิดรากได้ทำให้มีจำนวนรากมาก ส่วนการเกิดยอดนั้น พบว่ามีความสัมพันธ์กับชนิดและการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนิน โดย TDZ สามารถชักนำยอดให้เกิดได้ดีกว่า BA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \le 0.05$) และการเติมออกซิน NAA ร่วมกับสารทั้งสองทำให้จำนวนยอดลดลง ส่วนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับข้าวเหนียวดำหมอทั้งความสูงของต้น จำนวนยอด รากและใบ โดยให้ผลการเปรียบเทียบที่เหมือนกัน แตกต่างกันแต่เพียงค่าตัวแปรที่บันทึกได้ แสดงให้เห็นว่า TDZ มีศักยภาพที่ดีที่สุดในการชักนำให้เกิดยอดของข้าวจำนวนมากในหลอดทดลอง

ตารางที่ 9 การเจริญเติบโตของข้าวเหนียวพันธุ์ดำหมอในอาหารสูตรต่างๆ หลังเลี้ยงระยะเวลา 30 วัน

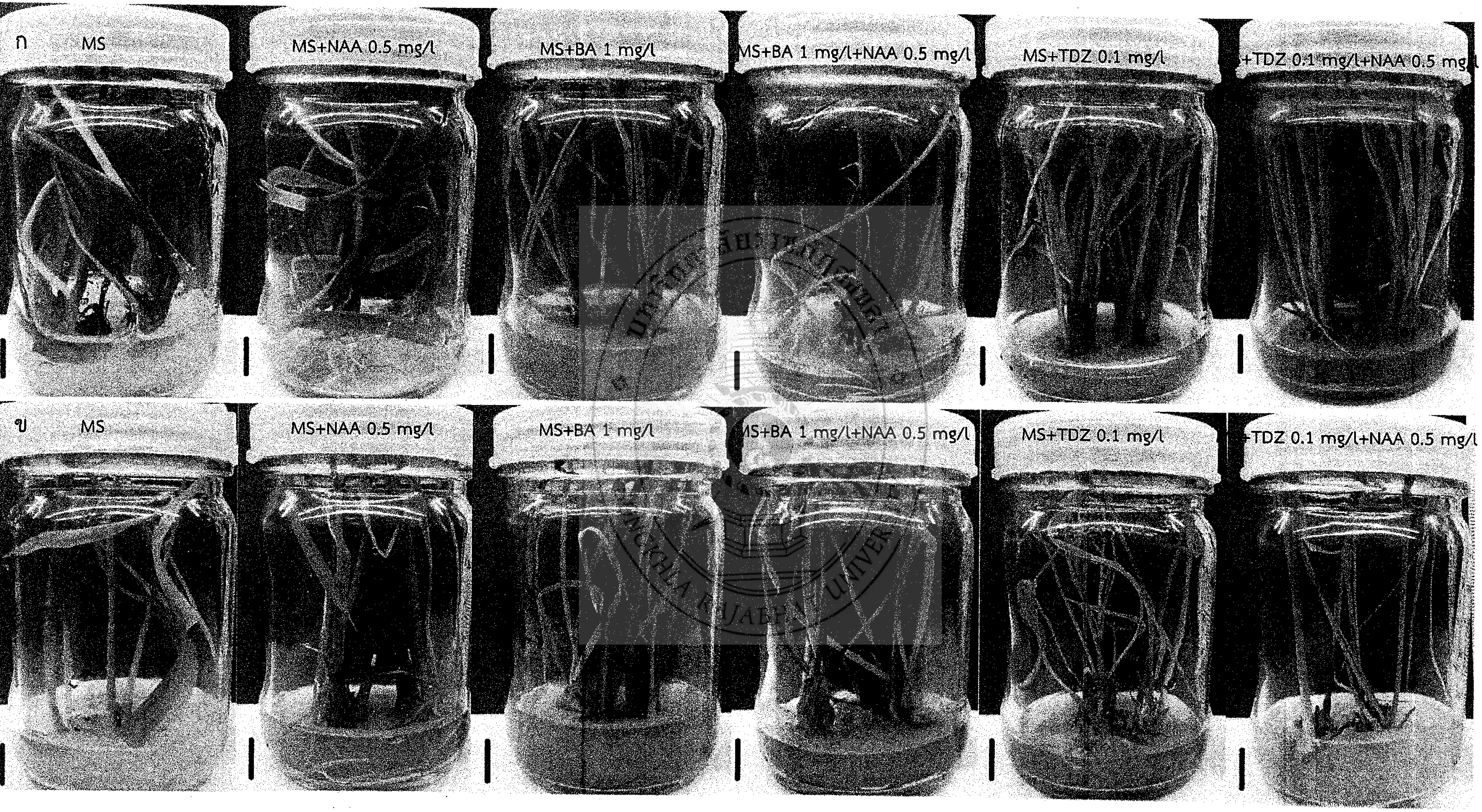
ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ความสูงต้น (ซม.)	จำนวนยอด	จำนวนราก	จำนวนใบ
NAA	BA	TDZ				
0	0	0	13.77±0.74^{cd}	1.10±0.07^{d}	13.47±0.42^{c}	4.57±0.12^{a}
0.5	0	0	20.89±0.69^{a}	1.13±0.08^{d}	23.10±0.75^{a}	4.43±0.11^{a}
0	1	0	12.98±0.74^{d}	1.70±0.14^{c}	3.23±0.47^{e}	3.03±0.18^{d}
0	0	0.1	15.01±0.42^{c}	3.00±0.16^{a}	10.40±0.53^{d}	3.53±0.09^{c}
0.5	1	0	18.09±0.56^{b}	1.60±0.10^{c}	20.03±0.73^{b}	4.57±0.11^{a}
0.5	0	0.1	13.77±0.33^{cd}	2.60±0.16^{b}	18.63±1.11^{b}	3.96±0.19^{b}
F-test			*	*	*	*
C.V.			3.77	6.57	5.93	3.47

ตารางที่ 10 การเจริญเติบโตของข้าวเหนียวพันธุ์ช่อไม้ไผ่ในอาหารสูตรต่างๆหลังเลี้ยงระยะเวลา 30 วัน

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ความสูงต้น (ซม.)	จำนวนยอด	จำนวนราก	จำนวนใบ
NAA	BA	TDZ				
0	0	0	26.69±0.90^{a}	1.56±0.68^{bc}	14.30±0.65^{b}	4.23±0.16^{a}
0.5	0	0	27.39±1.66^{a}	1.23±0.10^{c}	19.43±1.48^{a}	4.13±0.24^{b}
0	1	0	14.96±0.79^{c}	2.30±0.24^{a}	5.37±0.62^{c}	3.93±0.18^{b}
0	0	0.1	17.16±0.55^{ab}	2.40±0.86^{a}	6.80±0.39^{c}	4.30±0.14^{a}
0.5	1	0	19.42±1.87^{b}	1.13±0.68^{c}	15.47±1.76^{b}	3.87±0.31^{b}
0.5	0	0.1	15.32±0.97^{c}	1.73±0.07^{b}	13.10±1.44^{b}	3.90±0.28^{b}
F-test			*	*	*	*
C.V.			5.65	27.03	8.65	5.43

* = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

^{ab} อักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดย DMRT


ก
MS
MS+NAA 0.5 mg/l
MS+BA 1 mg/l
MS+BA 1 mg/l+NAA 0.5 mg/l
MS+TDZ 0.1 mg/l
+TDZ 0.1 mg/l+NAA 0.5 mg/l
ข
MS
MS+NAA 0.5 mg/l
MS+BA 1 mg/l
MS+BA 1 mg/l+NAA 0.5 mg/l
MS+TDZ 0.1 mg/l
+TDZ 0.1 mg/l+NAA 0.5 mg/l

ภาพที่ 12 การเจริญเติบโตของข้าวเหนียวพันธุ์ดำหมอ (บน)และช่อไม้ไผ่ (ล่าง) ในอาหารสูตร MS (1), MS+NAA 0.5 mg/l (2), MS+BA 1 mg/l (3), MS+BA 1 mg/l+NAA 0.5 mg/l (4), MS+TDZ 0.1 mg/l (5), MS+TDZ 0.1 mg/l+NAA 0.5 mg/l (6) ตามลำดับ (บาร์ = 1 ซม.)

หลังจากนั้นจึงนำสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด TDZ มาทำการศึกษาความเข้มข้นที่ส่งผลต่อการเกิดยอดของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ เมื่อนำยอดของข้าวทั้งสองสายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้นต่างๆ (0-0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวเหนี่ยวดำหมอนั้น การเติม TDZ ในอาหารส่งผลต่อความสูงของต้น จำนวนรากเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติม TDZ มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และที่ระดับความเข้มข้น TDZ แตกต่างกันส่งผลต่อความสูงต้น จำนวนยอด ใบและรากให้มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ระดับความเข้มข้นของ TDZ ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวเหนียวดำหมอ คือ 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร เพราะเป็นระดับความเข้มข้นที่ชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้จำนวนมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และส่งให้เกิดใบจำนวนมาก แต่ลักษณะของข้าวที่ได้จะมีลักษณะเป็นกอ แต่มีความสูงของต้นน้อยกว่าสูตรอาหารอื่น เนื้อเยื่อข้าวเน้นการเจริญเติบโตไปที่ยอดส่งผลให้ส่วนของระบบเจริญเติบโตได้น้อยกว่าสูตรอาหารอื่นเช่นเดียวกัน จำนวนรากที่วัดได้จึงมีค่าที่ต่ำ (ตารางที่ 11) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการเจริญเติบโตของข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่ แต่ค่าที่วัดได้ในข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่ไม่มีความแตกต่างอย่างชัดเจนเช่นเดียวกับข้าวเหนียวดำหมอ แต่มีแนวโน้มผลการทดลองไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 12) และลักษณะต้นข้าวภายนอกที่สังเกตได้ก็มีลักษณะคล้ายคลึงกับข้าวเหนียวดำหมอ (ภาพที่ 13 และ 14) ดังนั้น สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดของข้าวทั้งสายพันธุ์ คือ MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเมื่อได้ยอดที่ต้องการแล้วควรนำไปย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อให้ข้าวเกิดการพัฒนาส่วนของระบบรากและกลายเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ก่อนไปนำไปย้ายเลี้ยงในบ่อสาธิตต่อไป

ตารางที่ 11 ผลของระดับความเข้มข้นของ TDZ ต่อการเจริญเติบโตของข้าวเหนียวดำหมอระยะเวลา 1 เดือน

ความเข้มข้น TDZ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักสดแคลลัส (กรัม)	ความสูงต้น (ซม.)	จำนวนยอด	จำนวนใบ	จำนวนราก
0.00	0.61 ± 0.46^{b}	18.35 ± 5.09^{c}	1.31 ± 0. 55	3.85 ± 1.85^{b}	6.54 ± 2.90^{b}
0.05	0.30 ± 0.20^{a}	13.15 ± 5.61^{b}	1.31 ± 0.48	3.19 ± 1.20^{ab}	5.69 ± 2.94^{b}
0.10	0.15 ± 0.10^{a}	8.04 ± 2.47^{a}	1.38 ± 0.57	2.62 ±0.85^{a}	2.73 ± 1.89^{a}
0.20	0.09 ± 0.04^{a}	7.07 ± 1.44^{a}	1.57 ± 0.94	2.86 ± 1.41^{ab}	2.21 ± 1.42^{a}
f-test	*	*	ns	*	*
C.V.	63.2	30.7	44.9	41.8	57.3

* = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

^{ab} อักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดย DMRT

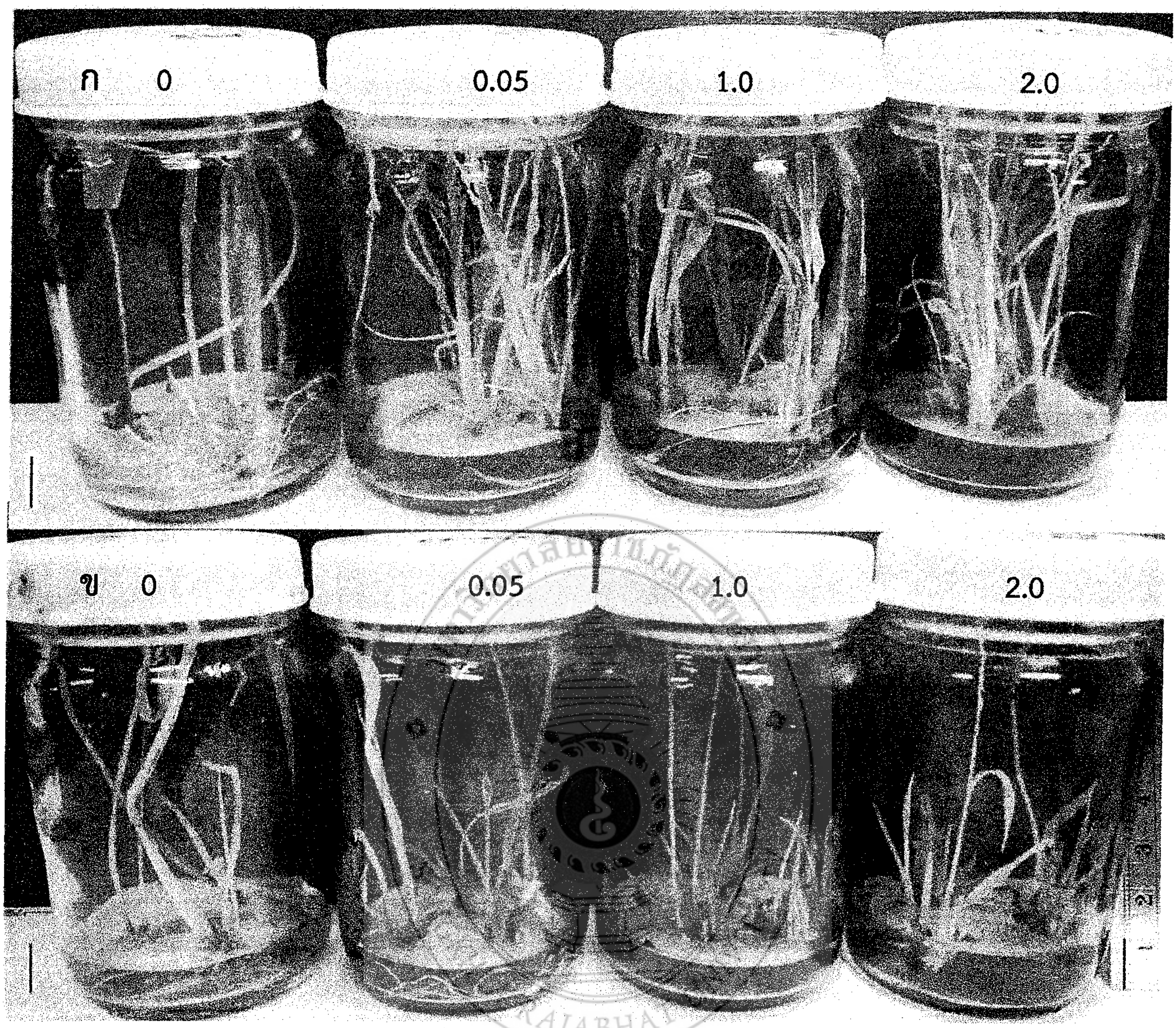
ตารางที่ 12 ผลของระดับความเข้มข้นของ TDZ ต่อการเจริญเติบโตของข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่ระยะเวลา 1 เดือน

ความเข้มข้น TDZ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักสดแคลลัส (กรัม)	ความสูงต้น (ซม.)	จำนวนยอด	จำนวนใบ	จำนวนราก
0.00	0.51 ± 0.35	21.90 ± 5.37^{c}	1.06 ± 0.23^{a}	3.96 ± 1.40^{ab}	5.46 ± 2.12^{c}
0.05	0.26 ± 0.21	11.21 ± 5.54^{ab}	1.17 ± 0.54^{a}	3.22 ± 1.70^{a}	3.18 ± 2.60^{b}
0.10	0.76 ± 2.34	12.48 ± 4.90^{b}	1.25 ± 0.54^{a}	4.33 ± 1.72^{ab}	2.83 ± 2.30^{b}
0.20	0.95 ± 2.20	09.22 ± 2.73^{a}	1.73 ± 1.36^{b}	5.09 ± 3.73^{ab}	0.87 ± 1.04^{a}
f-test	*	*	*	*	*
C.V.	172.2	35.6	47.4	50.2	80.3

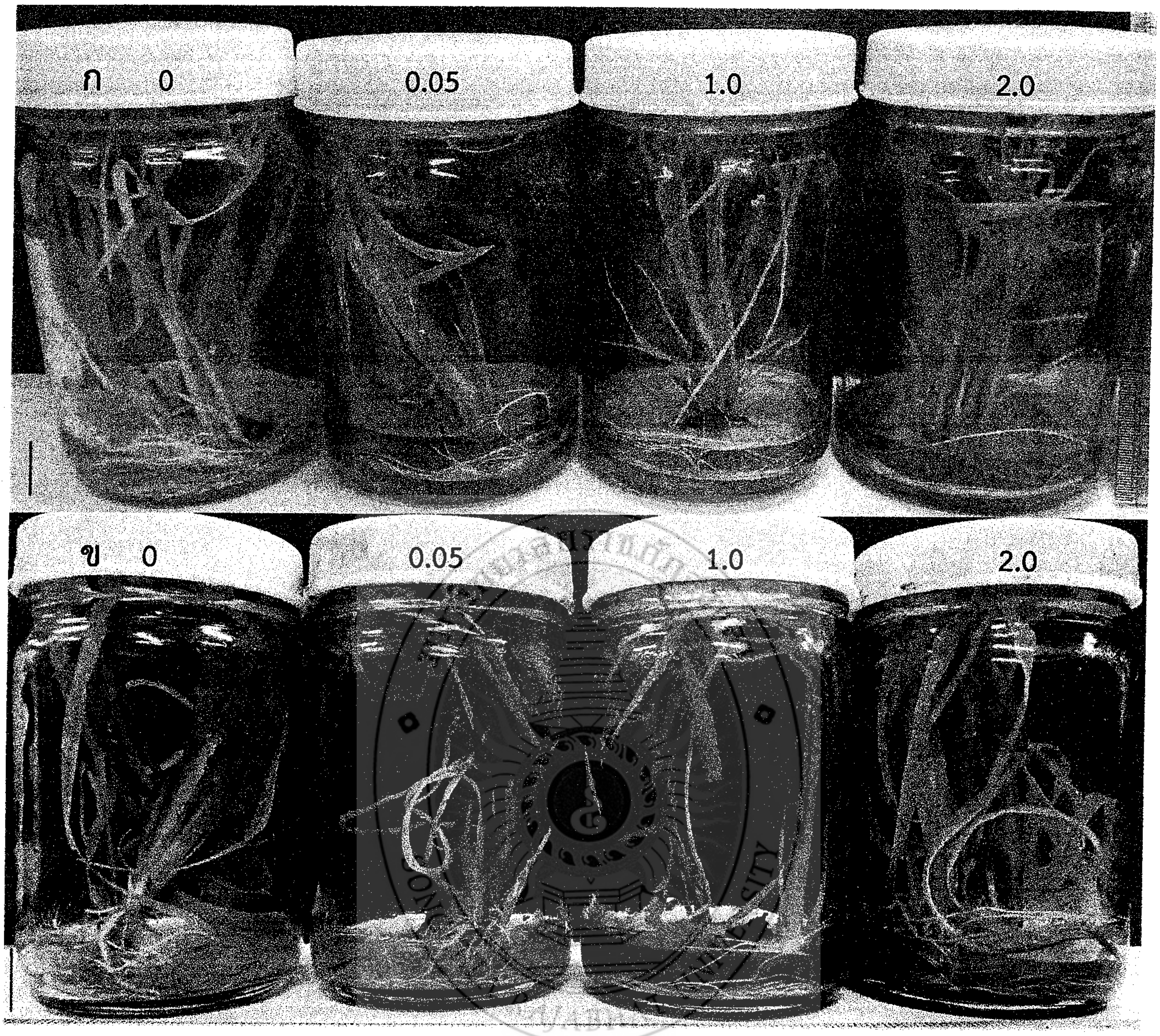
* = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

^{ab} อักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดย DMRT

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY


ก 0
0.05
1.0
2.0
ข 0
0.05
1.0
2.0

ภาพที่ 13 ผลของ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของข้าวเหนียวดำหมอ (ก) และช่อไม้ไผ่ (ข) ระยะเวลา 1 เดือน จากการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 (เส้นบาร์ = 1 ซม.)


ก
0
0.05
1.0
2.0
ข
0
0.05
1.0
2.0

ภาพที่ 14 ผลของ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของข้าวเหนียวดำหมอ (ก) และช่อไม้ไผ่ (ข) ระยะเวลา 1 เดือน หลังจากย้ายเลี้ยงจำนวน 3 ครั้ง (บาร์ = 1 ซม.)

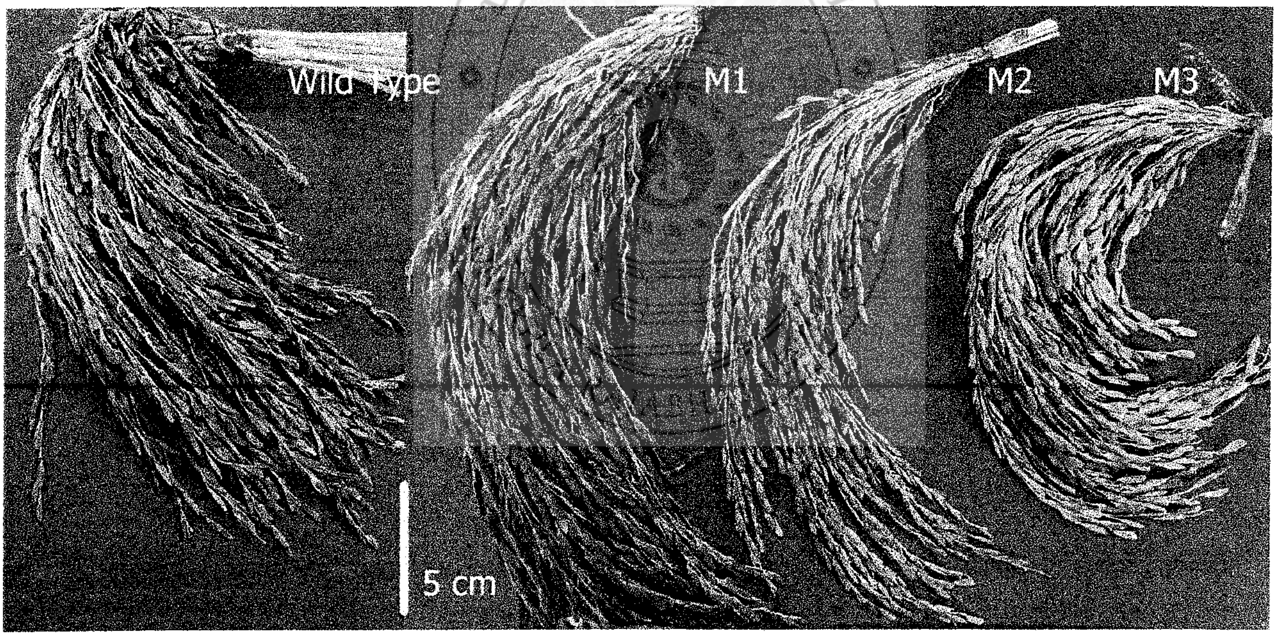
6. ศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวเหนียวดำหมอและช่อไม้ไผ่ในแปลงนาตามธรรมชาติ

ได้ดำเนินปลูกข้าวนาดำในแปลงนาทดลอง ณ ศูนย์วิจัยพันธุ์ข้าว จ. พัทลุง ตั้งแต่ต้นเดือนปลาย เดือนกันยายน 2557 (ภาพที่ 15) แต่ละพันธุ์ใช้ระยะปลูก 40x40 เซนติเมตร ขนาดพื้นที่ปลูกประมาณ 400 ตารางเมตร จนถึงระยะการเก็บเกี่ยวข้าว พบว่า ข้าวทั้งสองสายพันธุ์มีบางกอมีลักษณะผิดปกติไปจากเดิม ดังนี้

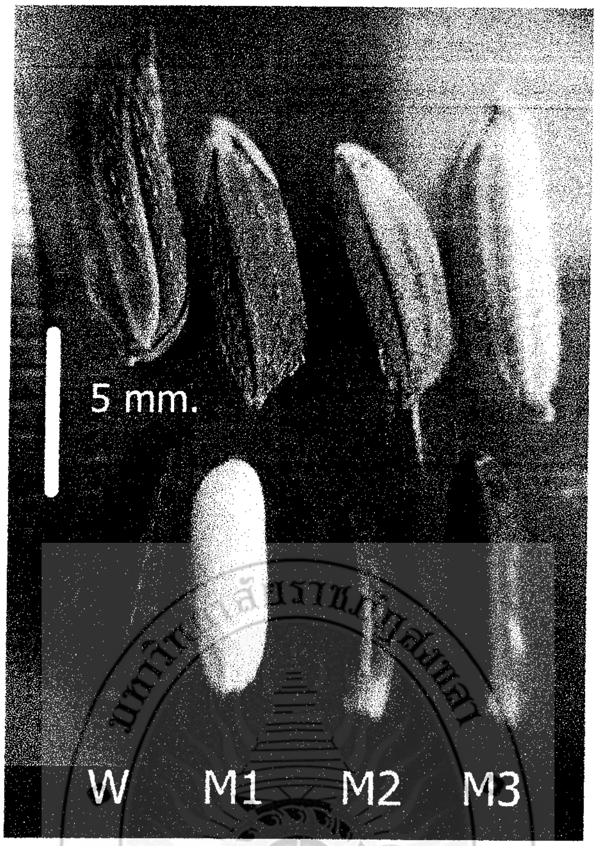
ต้นข้าวเหนียวดำหมอไม่มีกอใดตั้งท้องรวงข้าวช้าหรือเร็วกว่าปกติ แต่จะมีกอข้าวจำนวน 3 กอข้าวที่ลักษณะของรวงข้าวที่ได้แปลกไปจากเดิม (ภาพที่ 16) โดยลักษณะรวงข้าวจากทั้งสามกอก็มีความแตกต่างกัน (M1-M3) และแตกต่างจากพันธุ์พื้นเมือง โดยรวงข้าวทั้งหมดมีขนาดของรวงเล็กกว่าพันธุ์พื้นเมือง แต่ความยาวรวงข้าวจากกอข้าว M1 จะมีความยาวมากกว่าปกติ และลักษณะของเมล็ดข้าวภายนอกและภายใน (ภาพที่ 17) จะแตกต่างจากรวงข้าวกออื่นๆ เปลือกข้าวของ M1 จะมีลักษณะสีน้ำตาลเข้ม ขณะที่พันธุ์พื้นเมืองจะมีสีดำ ส่วน M2 และ M3 จะมีสีที่คล้ายกัน คือ สีเปลือกข้าวเป็นสีน้ำตาลอ่อน ขนาดและเปลือกใหญ่ (lemma) ของเมล็ดข้าว M3 จะใกล้เคียงพันธุ์พื้นเมืองมากที่สุด ส่วน M1 และ M2 จะมีขนาดเล็กกว่าพันธุ์พื้นเมือง เปลือกใหญ่และเปลือกเล็ก (palea) ไม่มีความแตกต่างกัน ส่วน M2 จะมีลักษณะเด่น คือ มีหาง (awn) ของเมล็ดข้าวยาวแหลม ซึ่งผิดจากลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวสายพันธุ์ชนิดนี้ (ภาพที่ 17) เมื่อลอกเปลือกข้าวสังเกตเนื้อข้าว พบว่า M2-M3 มีลักษณะเนื้อข้าวเหมือนพันธุ์พื้นเมือง ยกเว้น M1 ที่มีสีผิดไปจากเดิม คือ มีเนื้อข้าวสีข้าว จึงตั้งข้อสังเกตอาจเกิดจากปลอมปนข้าวจากสายพันธุ์อื่นๆ ในการปลูก แต่เมื่อสังเกตลักษณะกอต้นที่เจริญเติบโตไม่แตกต่างจาก พันธุ์พื้นเมือง คือ กาบต้นข้าวมีสีเข้มตามลักษณะเด่นของกอข้าวสายพันธุ์ชนิดนี้ จึงมีความเป็นไปได้ที่กอข้าวนี้เกิดจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ และเมื่อนำมาปลูกใหม่เปรียบเทียบการเจริญเติบโตกับพันธุ์พื้นเมือง กอข้าวมีแนวโน้มการเจริญเติบโตเร็วกว่า แต่ลักษณะเนื้อสัมผัส รสชาติไม่ได้ทำการทดสอบ เพราะจำนวนเมล็ดข้าวที่ได้ต่ำและเก็บไว้ทดสอบสายพันธุ์ต่อไป เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางสถิติของรวงข้าวและเมล็ดข้าว พบว่า เมล็ดข้าวจากต้นที่กลายพันธุ์มีรูปร่างแตกต่างจากเมล็ดข้าวพันธุ์พื้นเมือง โดยเมล็ดข้าวที่วัดได้ความยาวสั้นกว่า เนื้อข้าวที่ได้มีปริมาณลดส่งผลให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งต่อเมล็ดข้าว 100 เมล็ด ลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แต่ความชื้นของข้าว เปอร์เซ็นต์เมล็ดดีในรวงไม่มีความแตกต่างกัน ลักษณะกอข้าวภายนอก ระยะเวลาตั้งท้องข้าว และความสูงไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 13)

ต้นข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่ที่มีปลูกในแปลงนาสาธิตมีการเจริญเติบโตปกติ มีเพียง 1 กอข้าวที่เจริญเติบโตผิดแปลกจากกอข้าวอื่น กล่าวคือ กอข้าวเริ่มออกรวงเร็วกว่ากอข้าวต้นอื่น (ภาพที่ 18) และเมื่อปลูกต่อไปจนข้าวตั้งท้องทั้งหมดจนฤดูเก็บเกี่ยว นำรวงข้าวที่ได้ทั้งรวงข้าวจากต้นที่ผิดปกติมาเปรียบเทียบกับพันธุ์พื้นเมือง รวงข้าวพันธุ์ที่กลายมีลักษณะของเมล็ดข้าวที่เรียงตัวกันแน่นกว่าพันธุ์พื้นเมือง ทำให้ขนาดของรวงเล็กกว่า (ภาพที่ 19) ลักษณะของเมล็ด (ภาพที่ 20) เล็กกว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองอย่างเห็ดได้ชัด เมื่อวัดความกว้างและความยาวของเมล็ดข้าวทำให้ทราบว่ามีขนาดเล็กกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แต่ลักษณะสีเนื้อเมล็ด สีของเปลือกข้าว เปลือกใหญ่ เปลือกเล็ก หางของเปลือกและกลีบรองเมล็ดไม่มีความแตกต่างกัน แต่คุณภาพของเมล็ดข้าวภายในรวงมีความแตกต่างกัน คือ น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งรวมทั้งความชื้นของเมล็ดข้าวมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์เมล็ดข้าวดีในรวงมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 13)

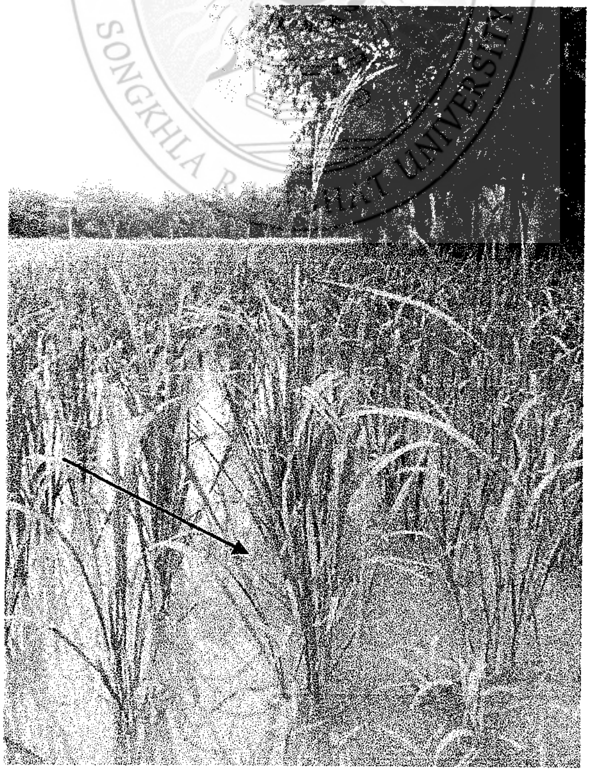
ภาพที่ 15 ข้าวเหนียวดำหมอและข้าวเหนียวช่อไม้ไผ่ที่เจริญเติบโตในนาทดลอง ณ ศูนย์พันธุ์ข้าว จ. พัทลุง ประจำปี 2557



ภาพที่ 16 รวงข้าวเหนียวดำหมอพันธุ์พื้นเมือง (wild type) และพันธุ์กลายจากการปลูกในแปลงสาธิต (M1-M3)

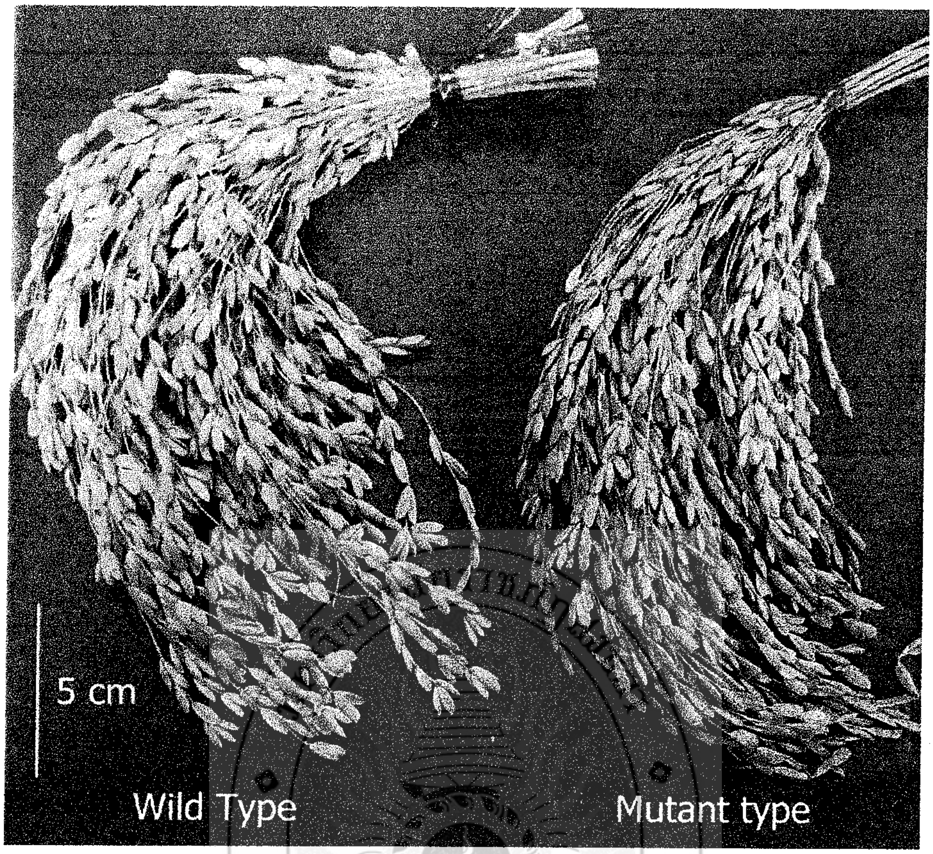


ภาพที่ 17 เมล็ดข้าวเหนียวดำหมอพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์กลาย (M1-M3)

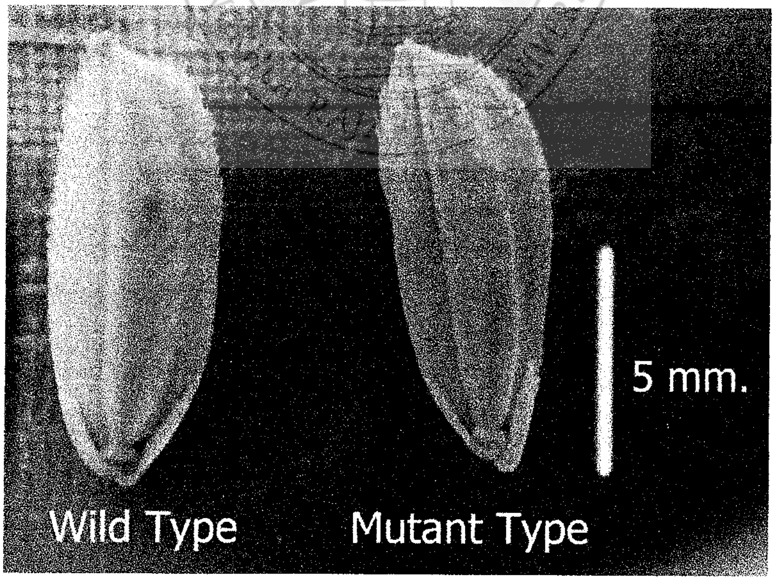


ภาพที่ 18 ต้นข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่ที่ออกรวงเร็วกว่าปกติ (ต้นตรงกลาง)

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY


5 cm
Wild Type
Mutant type

ภาพที่ 19 รวงข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่พันธุ์พื้นเมือง (wild type) และพันธุ์กลาย (Mutant type)


5 mm.
Wild Type
Mutant Type

ภาพที่ 20 เมล็ดข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่พันธุ์พื้นเมือง (wild type) และพันธุ์กลาย (Mutant type)

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบลักษณะของข้าวเหนียวดำหมอและช่อไม้ไผ่พันธุ์พื้นเมืองและกลายพันธุ์

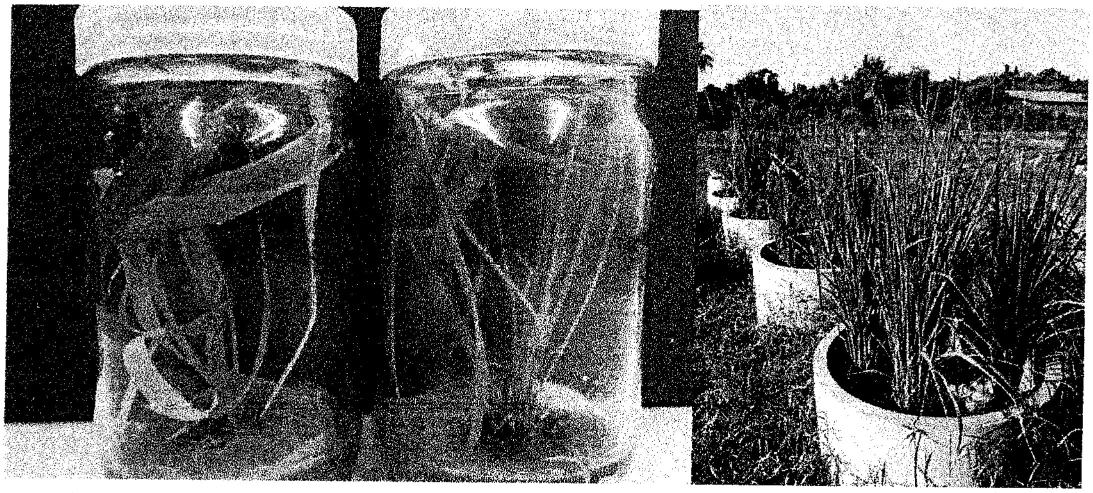
สายพันธุ์		ดำหมอ		ช่อไม้ไผ่		F-test
ลักษณะพันธุ์		ต้นปกติ	กลายพันธุ์	ต้นปกติ	กลายพันธุ์	
เมล็ดข้าว 1 เมล็ด	ความกว้าง	0.30 ± 0.00^{a}	0.30 ± 0.01^{a}	0.35 ± 0.05^{b}	0.31 ± 0.02^{a}	*
	ความยาว	1.04 ± 0.05^{c}	0.90 ± 0.03^{a}	0.97 ± 0.03^{b}	0.87 ± 0.05^{a}	*
เมล็ดข้าว 100 เมล็ด	น้ำหนักสด	3.03 ± 0.17^{b}	2.61 ± 0.20^{a}	3.54 ± 0.34^{c}	2.90 ± 0.33^{b}	*
	น้ำหนักแห้ง	2.73 ± 0.20^{b}	2.33 ± 0.20^{a}	3.01 ± 0.32^{c}	2.61 ± 0.34^{b}	*
	ความชื้น	0.30 ± 0.20^{a}	0.29 ± 0.10^{a}	0.53 ± 0.31^{b}	0.29 ± 0.09^{a}	*
รวงข้าว	% เมล็ดดี	80.52 ± 6.87^{ab}	82.30 ± 9.84^{ab}	90.83 ± 5.65^{b}	79.73 ± 10.11^{a}	*
	ความยาว	26.10 ± 4.32	23 ± 0.85	26.50 ± 1.32	25.30 ± 0.00	ns
ลำต้น	ความสูง	137.85 ± 9.53^{a}	130 ± 1.20^{a}	150.40 ± 5.89^{b}	148 ± 0.00^{b}	*

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

^{ab} อักษรเหมือนกันในแถวเดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดย DMRT

7. รวบรวมต้นข้าวเหนียวที่มีลักษณะผิดปกติจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

นำต้นข้าวสมบูรณ์พันธุ์ข้าวเหนียวดำหมอและช่อไม้ไผ่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชลงเลี้ยงในบ่อทดลอง เพื่อสังเกตการเจริญเติบโตของกอข้าว พบว่า กอข้าวของทั้งสองสายพันธุ์เจริญเติบโตปกติทั้งหมด ไม่มีลักษณะผิดปกติไปจากต้นพันธุ์พื้นเมืองที่ปลูกในแปลงนา และเมื่อนำเมล็ดข้าวที่กลายพันธุ์ทั้งสองสายพันธุ์มาฟอกฆ่าเชื้อและเลี้ยงในหลอดทดลอง พบว่า เนื้อเยื่อข้าวมีการตอบสนองต่อสูตรอาหารไม่แตกต่างจากการทดลองที่ผ่านมา (ภาพที่ 21)

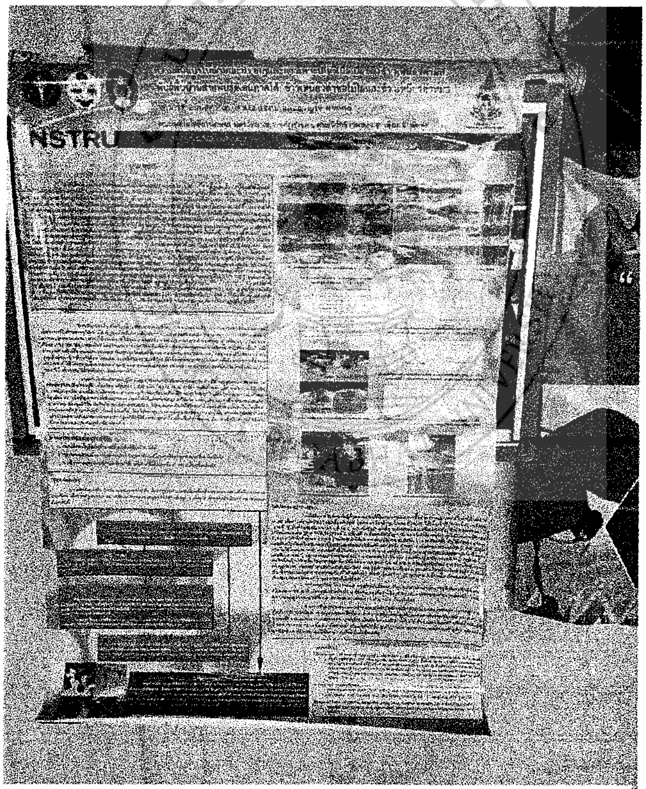


ภาพที่ 21 ต้นข้าวสมบูรณ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่พร้อมย้ายเลี้ยง (ก) และกอข้าวที่เลี้ยงในบ่อทดลอง (ข)

8. ถ่ายทอดข้อมูลวิจัยสู่ชุมชนที่สนใจ

นำข้อมูลวิจัยที่ได้จากการวิจัยถ่ายทอดสู่เกษตรกรและผู้สนใจในรูปแบบของบริการวิชาการแก่ ชุมชนที่ปลูกข้าวพื้นเมือง ได้แก่ เกษตรกรและผู้สนใจ ตำบลหารเทา อำเภอปากพะยูน จังหวัดพัทลุง ที่ปลูกข้าวพื้นเมืองหลายชนิด เช่น ข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่ ข้าวสังข์หยด เป็นต้น การถ่ายทอดข้อมูลมีพบปะพูดคุยนำเสนอข้อมูลงานวิจัย (ภาพที่ 22) และนำเสนอโปสเตอร์สรุปงานวิจัย (ภาพที่ 23) พบว่า มีผู้สนใจและเกษตรกรลงทะเบียนและเข้าร่วมกิจกรรม เป็นจำนวน 36 คน (ภาคผนวกที่ 2) และจากสอบถามลักษณะพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่ต้องการปรับปรุง พบว่าประสบปัญหาขาดแคลนน้ำในบางช่วงของการทำนา จึงมีความต้องการพันธุ์ข้าวพื้นเมืองเดิมที่ทนแล้งได้ดีขึ้น และให้ผลผลิตมากขึ้นหรือเท่าเดิม ส่วนเนื้อหาข้อมูลงานวิจัยที่นำเสนอ ผู้เข้าร่วมมีความเข้าใจปานกลาง และเนื้อหายากในบางประการ เช่น การพัฒนาของเนื้อเยื่อข้าวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว แต่ผู้สนใจเข้าใจวัตถุประสงค์ของงานวิจัย และเห็นงานเป็นรูปธรรมจากต้นข้าวที่กลายพันธุ์ไปจากเดิม และผู้สนใจยังมีคนใจอย่างต่อเนื่องถ้าไปบริการต่อในครั้งต่อไป

ภาพที่ 22 ผู้สนใจและเกษตรกรลงทะเบียนและเข้าร่วมกิจกรรมถ่ายทอดงานวิจัยสู่ชุมชน



ภาพที่ 23 โปสเตอร์งานวิจัยที่นำเสนอในกิจกรรม

บทที่ 5

วิเคราะห์ผล

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวเหนียวสายพันธุ์ดำหมอและช่อไม้ไผ่ที่ได้จากศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง สามารถมาผ่านกระบวนการปลอดเชื้อเพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้ด้วยการใช้สารละลายคลอร็อกโดยไม่ต้องสารเคมีที่มีความเป็นพิษสูง เช่น HgCl2 แต่การฟอกฆ่าเชื้อเพียงครั้งเดียวยังปรากฏการณ์ติดเชื้อของข้าวที่ได้ จึงทำการฟอกฆ่าเชื้อร่วมกับการลอกเปลือกข้าว ทำให้เนื้อเยื่อมีปลอดเชื้อสูง (95%) และวิธีการที่เหมาะสมดังปรากฏในผลการทดลองตอนที่ 1

เมื่อย้ายเมล็ดข้าวทั้งสองสายพันธุ์เลี้ยงในอาหาร LS ที่เติม 2, 4-D เพื่อชักนำแคลลัส จะมีการตอบสนองที่แตกต่างกันบ้าง โดยข้าวเหนียวดำหมอมีการตอบสนองต่อ 2,4-D ได้ดีกว่าส่งผลให้ยับยั้งการงอกของเอ็มบริโอ แต่กระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของแคลลัสแทน ความเข้มข้นของ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตรก็เพียงพอต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสตั้งต้นในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เพิ่มขึ้น ทำให้โอกาสเกิดพัฒนาของแคลลัสหรือเอ็มบริโอเดิมพัฒนาเป็นยอดและรากมีเปอร์เซ็นต์ที่ลดลง ดังนั้น การชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ด้วยความเข้มข้นของ 2,4-D ที่แตกต่างไม่มีผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างแคลลัสตั้งต้นในระยะเวลา 4 สัปดาห์ แต่มีผลต่อการพัฒนาของอวัยวะต่าง ๆ จากแคลลัสหรือเนื้อเยื่อเดิมเจริญเติบโตเป็นยอด รากหรือเอ็มบริโอ ในการเลี้ยงเพียงครั้งเดียว จึงจำเป็นต้องมีการย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรอื่นๆ ต่อไป เพื่อให้เหมาะสมต่อการชักนำอวัยวะหรือเอ็มบริโอใหม่ โดยไม่มีการรบกวนการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเดิม ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Karthikeyan (2009) ชักนำการเกิดแคลลัสข้าว *indica* rice cv. ADT 43 ด้วย 2, 4-D ความเข้มข้นต่างๆ แล้วต้องนำแคลลัสไปชักนำให้เกิดยอดและรากในสูตรอาหารที่เติม BAP และ NAA ต่อไป

การย้ายแคลลัสข้าวสองสายพันธุ์จากสูตรอาหารที่แตกต่างกันลงในอาหารสูตรใหม่ แคลลัสมีการพัฒนาเป็นยอด รากและเอ็มบริโอแตกต่างกัน ปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการเกิดอวัยวะใหม่หรือเอ็มบริใหม่ขึ้นกับ 1) สายพันธุ์ของข้าว 2) สูตรอาหารก่อนชักนำ 3) ลักษณะของแคลลัส และ 4) สูตรอาหารที่เลี้ยงชักนำ สอดคล้องกับการวิจัยของ Henke และคณะ (1978) การเกิดรากใหม่เป็นการพัฒนาของเนื้อเยื่อที่มากที่สุด และแคลลัสบางส่วนจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวแล้วพัฒนาต่อมากลายเป็นยอด มีแคลลัสเพียงส่วนน้อยที่มีการพัฒนาคล้ายคลึงการเกิดเอ็มบริโอ จึงมีการพัฒนาสูตรอาหารให้ดีขึ้น โดยศึกษาชนิดขององออกซินและไซโทไคนินร่วมกันในสูตรอาหาร MS ซึ่งมีรายงานวิจัยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว (Manickavelu และคณะ 2006; Wijesekera และคณะ 2007; Anita และคณะ 2012) พบว่า 2,4-D สามารถชักนำแคลลัสได้ดีแต่การเกิดยอดและรากใหม่จากแคลลัสต้องเปลี่ยนชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทออกซินและไซโทไคนิน แคลลัสของข้าวเหนียวดำหมอและช่อไม้ไผ่ตอบสนองต่อสูตรอาหาร MS ที่เติมไซโทไคนินชนิด kinetin ร่วมกับ NAA ได้ดีกว่าการใช้ BA และ 2,4-D ในการชักนำให้เกิดยอดและรากใหม่ มีรายงานวิจัยหลายฉบับแสดงให้เห็นว่า ข้าวแต่ละกลุ่มสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกัน (Revathi และ Pillai, 2011) แต่ส่วนใหญ่จะต้องเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองประเภทร่วมกัน (Raghavendra และคณะ 2009) จึงนำ Kinetin และ NAA มาศึกษาความเข้มข้นของสารความควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองในสภาวะปกติและลดความชื้น เนื่องจากมีงานวิจัย (Tsukahara และ Hirosawa, 1992) รายงานว่า การลดปริมาณน้ำภายในกลุ่มเซลล์แคลลัสด้วยวิธีการดูดซับน้ำผ่านกระดาษกรองฆ่าเชื้อระยะเวลาสั้นๆ ก่อนนำมาเลี้ยงสามารถกระตุ้นการเกิดพัฒนาแคลลัสได้ดีขึ้นเพิ่มขึ้นจาก 5% ไปเป็น 47% เพราะแรงดันออสโมติกภายในเซลล์แคลลัสมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดยอดใหม่จากแคลลัสข้าว

ดังนั้น การลดน้ำภายในเซลล์แคลลัสหรือเพิ่มแรงดันออสโมติกช่วยเพิ่มโอกาสเกิดยอดมากยิ่งขึ้น (และ Lee และ Huang, 2014) แต่เมื่อทำการทดลองแคลลัสข้าวเหนียวดำหมอและช่อไม้ไผ่ให้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ไม่เกิดการสร้างยอดใหม่ และอัตราการเกิดยอดใหม่ลดลงเมื่อเทียบกับชุดการทดลองปกติ ที่ไม่ลดความชื้น แต่การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อแคลลัสดีขึ้น แคลลัสมีลักษณะแน่นขึ้น ไม่ฉ่ำช้ำ ซึ่งเป็นลักษณะทั่วไปของแคลลัสที่ดีในการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอใหม่ ซึ่งความแตกต่างอาจเกิดจากสายพันธุ์ข้าวที่ต่างกัน และรายละเอียดปลีกย่อยของวิธีการที่แตกต่างกัน เช่น ชนิดของกระดาษดูดซับ เนื้อเยื่อตั้งต้นของแคลลัส และสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง เป็นต้น จากการทดลองย่อยทั้งสองชุดทำให้ทราบว่า ข้าวทั้งสองสายพันธุ์ชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจากแคลลัสได้ต่ำมาก ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่า แคลลัสข้าวมีโอกาสเกิดเอ็มบริโอใหม่ได้ในอัตราส่วนที่หลากหลายมากน้อยขึ้นกับสายพันธุ์ของข้าว ไม่สามารถระบุสูตรอาหารได้ จึงต้องขึ้นอยู่กับข้าวแต่ละสาย พันธุ์ (Karthikeyan และคณะ 2009 ; Zuraida และคณะ 2011) แต่ข้าวข้าวเหนียวทั้งสองสายพันธุ์สามารถชักนำให้เกิดรากได้ง่ายตามคุณลักษณะพื้นฐานของการพัฒนาของแคลลัส และแคคลัสสามารถพัฒนาให้เกิดยอดใหม่ได้ แต่อัตราการเพิ่มไม่สูงมากเมื่อเทียบกับข้าวบางสายพันธุ์ ดังนั้น ข้าวเหนียวทั้งสองสายพันธุ์อาจมีการพัฒนาของยอดได้มากขึ้นอีก ถ้ามีการพัฒนาสูตรอาหารโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่นที่นอกเหนือจากงานวิจัย และในสภาวะแวดล้อมที่หลากหลายกว่างานวิจัยกำหนด

เมื่องานวิจัยชักนำเอ็มบริโอและยอดจากแคลลัสเกิดได้ในปริมาณต่ำ จึงอาศัยต้นกล้าจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวจากการเอ็มบริโอของเมลณดข้าว โดยการเพาะเมล็ดให้เกิดการเจริญเติบโตเป็นกอข้าว แล้วย้ายเลี้ยงยอดข้าวลงในอาหารสูตรต่างๆ สังเกตการตอบสนองการเกิดยอดรวมในหลอดทดลอง โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจากอวัยวะโดยตรง คือ BA และ NAA ในอาหารสูตร MS เปรียบเทียบกับ TDZ ที่ไม่มีรายงานการทดลองการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวมาก่อน เลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน เพื่อบันทึกผลและย้ายลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 4 เดือน เพื่อสังเกตลักษณะสัณฐานของเนื้อเยื่อข้าวที่ได้ พบว่า สูตรอาหารที่เติมออกซิน(NAA) ร่วม ช่วยให้เกิดรากของยอดข้าวได้เร็วกว่า ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีของหน้าที่ออกซิน แต่ถ้าเลี้ยงระยะยาวทุกชุดการทดลองก็จะเกิดรากได้ เพราะยอดข้าวสามารถสร้างออกซินได้เองตามธรรมชาติ แต่การเกิดรากเร็วทำให้เกิดการสร้างระบบการลำเลียงเกิดขึ้นเพื่อการดูดซึมสารอาหารได้ดี ช่วยทำให้ส่วนยอดเจริญเติบโตได้ดีกว่าชุดการทดลองที่เกิดรากช้า และเมื่อเปรียบเทียบชนิดไซโทไคนินที่ใช้ BA กับ TDZ จะพบว่า TDZ มีฤทธิ์กระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นยอดและเกิดยอดใหม่ได้ดีกว่า แสดงว่า TDZ เป็นไซโทไคนินที่มีศักยภาพในการชักนำให้เกิดยอดใหม่ของข้าวได้ดี เพราะใช้ความเข้มข้นต่ำ ซึ่งเป็นลักษณะพื้นฐานของการใช้ TDZ กับเนื้อเยื่อข้าว (Din และคณะ, 2016; Ge และคณะ, 2006; Dey และคณะ, 2012) เช่น การเติม TDZ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสายพันธุ์ข้าวบนเขาของจีน “Handao 297” สามารถชักนำเนื้อเยื่อให้เกิดการพัฒนายอดรวมได้ถึง 81.2% และ Dey M. และคณะ (2012) ได้สรุปงานวิจัยว่า TDZ มีศักยภาพสูงในการชักนำให้เกิดยอดใหม่ของเนื้อเยื่อข้าว (*Oryza sativa*) อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวเหนียวทั้งสองสายพันธุ์ในงานวิจัยนี้ ส่วนยอดข้าวที่เลี้ยงสูตรอาหารไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีอัตราการแตกยอดช้า แต่ต้นที่เจริญเติบโตสมบูรณ์ปกติ ส่วนการตอบสนองของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ต่อสูตรอาหารมีนัยสำคัญทางสถิติและแนวโน้มตอบสนองเหมือนกัน แต่มีความแตกต่างกันของค่าที่วัดได้ เมื่อทราบว่า TDZ มีผลต่อการเกิดยอดใหม่ของเนื้อเยื่อข้าว จึงได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของ TDZ ต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อข้าว ทำให้ทราบว่า ข้าวทั้งสองสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อความเข้มข้น TDZ ที่แตกต่างกันเล็กน้อย โดยการเกิดยอดใหม่ของข้าวเหนียวดำหมอมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TDZ คือ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ข้าวเหนียวดำ

ช่อไม้ไผ่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ลักษณะของเนื้อเยื่อข้าวทั้งพันธุ์ต่อความเข้มข้นของ TDZ คล้ายคลึงกัน คือ เมื่อความเข้มข้นของ TDZ เพิ่มขึ้น การเกิดรากมีจำนวนน้อยลง รากสั้น ความสูงของยอดข้าวมีค่าลดลง ยอดข้าวมีลักษณะเป็นกอ จำนวนใบแปรผันตามจำนวนยอดข้าว ใบเล็กลง ดังนั้น สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ คือ MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วจึงย้ายเลี้ยงยอดใหม่ที่ได้ลงอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือจะเติมสารทั้งสองในสูตรเดียวกันเพื่อเลี้ยงเพียงขั้นตอนเดียวก็ได้ แต่อัตราการเกิดเพิ่มจำนวนต้นข้าวจะช้า

เมื่อนำเมล็ดพันธุ์ข้าวทั้งสองสายพันธุ์มาปลูกในแปลงนาสาธิต ข้าวมีการเจริญเติบโตปกติตามการปลูกในฤดูกาลแบบข้าวนาดำ ข้าวมีการตั้งท้อง ออกรวงข้าว ตามระยะเวลาปกติของลักษณะประจำสายพันธุ์ เมื่อทำการสำรวจต้นข้าวในแปลงระหว่างปลูก พบว่า มีข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่ 1 กอ ลักษณะต้นความสูงไม่แตกต่างจากต้นอื่น แต่ตั้งท้องและออกรวงข้าวเร็วกว่าปกติ ซึ่งเป็นลักษณะกลายพันธุ์ โดยช่วงแรกคาดการณ์เป็นข้าวอื่นปนเปื้อนมา แต่เมื่อปลูกจนข้าวออกรวงเก็บเกี่ยว นำข้าวที่ได้มาตรวจสอบ พบว่า ข้าวที่ได้เป็นข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่เนื่องจากมีลักษณะของรวงข้าว เมล็ดข้าวและเนื้อข้าวคล้ายคลึงกับพันธุ์พื้นเมือง แต่รวงข้าวที่ได้มีการเรียงตัวของข้าวหนาแน่นกว่า มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดข้าวดีน้อยกว่าและเมล็ดข้าวเล็กกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนแปลงข้าวเหนียวดำหมอไม่มีต้นใดออกรวงข้าวผิดแปลกไป แต่มีต้นข้าวจำนวน 3 กอ ที่ลักษณะต้นปกติ แต่ออกรวงข้าวที่ผิดปกติไปจากเดิม โดยมีขนาดเมล็ดข้าวเล็กจากพันธุ์พื้นเมือง ส่งผลต่อน้ำหนักข้าวที่น้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ เปอร์เซ็นต์ข้าวดีและร่วงไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อสังเกตลักษณะสัณฐานของเมล็ดข้าวทั้งสามกอมีความแตกต่างจากพันธ์แท้ชัดเจน บางกอเมล็ดข้าวมีส่วนหาง (awn) ของเปลือกข้าวยาวซึ่งไม่ใช่ลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวพันธุ์นี้ ในขณะที่อีกกอจะมีเนื้อข้าวสีขาว ส่วนสีเปลือกข้าวบางกอที่กลายพันธุ์จะมีสีเปลี่ยนไปจากเดิม คือ จากสีดำเข้มกลายเป็นสีน้ำตาลอ่อน แสดงว่า ข้าวเหนียวดำหมอมีโอกาสการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติจากการปลูกดำสูงกว่าข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่ แต่โดยคิดเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์ต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ (คิดจากจำนวนต้นกลายพันธุ์ที่ได้ต่อต้นที่ปลูกทั้งหมด) โดยลักษณะการกลายพันธุ์ที่ปรากฏ คือ ระยะเวลาการตั้งท้อง ลักษณะของสัณฐานเมล็ดข้าว สีของเปลือกข้าวและเนื้อข้าว เปลี่ยนไปจากเดิม โดยจะมีปรากฏในต้นข้าวที่ปลูกทุกฤดูกาล เกษตรกรจึงต้องสังเกตทุกครั้งเมื่อเก็บเกี่ยว เพื่อให้ได้สายพันธุ์พื้นเมืองไม่มีการกลายพันธุ์ โดยจะมีต้นที่กลายพันธุ์น้อยมาก (จากการสัมภาษณ์และเก็บผลการทดลองนอกขอบเขตเวลางานวิจัย) จึงได้เก็บรวงข้าวที่กลายพันธุ์ไว้ศึกษาลักษณะพันธุ์ต่อไป

เมื่อนำเมล็ดข้าวจากต้นที่กลายพันธุ์มาเลี้ยงในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวที่ได้ในข้างต้น เมล็ดข้าวที่ดีจะเจริญเติบโตได้ปกติและมีการตอบสนองต่อสูตรอาหารเช่นเดียวกับในการทดลองที่ผ่านมา ดังนั้น ข้าวที่กลายพันธุ์สามารถนำเก็บรักษาพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ เพราะธรรมชาติของเมล็ดข้าวจะมีอายุการเก็บรักษาพันธุ์ได้เพียง 1 ฤดูกาลปลูกหรือ 1 ปี ถ้าเก็บนานกว่านี้เมล็ดข้าวจะมีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ลดลงอย่างรวดเร็ว

ต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตอนต้นของงานวิจัย เมื่อเลี้ยงจนเป็นต้นสมบูรณ์แล้วนำมาอนุบาลย้ายเลี้ยงลงในบ่อทดลองตามลักษณะการปลูกแบบนาดำ ข้าวทั้งสองพันธุ์มีการเจริญเติบโตปกติไม่แตกต่างจากกอข้าวปลูกในแปลงนาธรรมชาติ ต้นข้าวมีการเจริญเติบโตจนข้าวตั้งท้องและออกรวง เมื่อสังเกตลักษณะของต้นและรวงข้าว รวมทั้งเมล็ดข้าวที่ได้ ข้าวทั้งสองสายพันธุ์มีลักษณะเหมือนพันธุ์พื้นเมืองทุกประการ ไม่พบต้นที่เจริญเติบโตผิดปกติเหมือนการปลูกในแปลงนา อาจเกิดเนื่องมาจากจำนวนต้นข้าวที่ปลูกมีจำนวนน้อยลงเมื่อ

เทียบกับการปลูกในนา ทำให้โอกาสค้นพบต้นข้าวกลายพันธุ์มีต่ำมาก ซึ่งมีบางงานวิจัย (Xiuli และคณะ, 2007) รายงานว่า มีข้าวที่เลี้ยงในหลอดทดลองกลายพันธุ์ในอัตราที่แตกต่างกันมากตั้งแต่ 2.6% จนถึง 40.4% ขึ้นกับสายพันธุ์ของข้าวและเทคนิคของการเพิ่มจำนวนต้น เมื่อย้ายกล้าข้าวออกจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชปลูกลงบ่อทดลองในงานวิจัยได้แสดงให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวสามารถเก็บรักษาพันธุ์พื้นเมืองทั้งสองสายพันธุ์ได้โดยไม่ทำให้พันธุ์เกิดการกลายพันธุ์ สนับสนุนแนวความคิดในการเก็บรักษาพันธุ์ข้าวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และสามารถช่วยลดภาระการเก็บรักษาพันธุ์ข้าวด้วยการปลูกด้วยแปลงนาได้ และความรู้นี้สามารถนำไปถ่ายทอดให้เกษตรกรและผู้สนใจทราบได้ จึงได้ดำเนินการนำความรู้ที่ได้ไปเผยแพรแก่เกษตรกรที่ปลูกข้าวพื้นบ้านในรูปแบบบริการวิชาการสู่ชุมชน ณ ตำบลหารเทา อำเภอปากพะยูน จังหวัดพัทลุง ซึ่งมีการปลูกข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่และข้าวพื้นเมืองอื่นๆ เพื่อรับประทานในครัวเรือน และได้สอบถามข้อมูลเพื่อการดำเนินงานวิจัยต่อเนื่อง พบว่า การปลูกข้าวพื้นเมืองสามารถดำเนินงานปลูกได้ง่ายเพราะเหมาะสมกับพื้นที่อยู่แล้ว แต่ผลผลิตที่ได้ไม่สม่ำเสมอเพราะไม่เพียงพอในบางครั้ง จึงมีความต้องการลักษณะพันธุ์ข้าวที่ให้ผลผลิตคงที่หรือมากขึ้นแม้มีสภาวะแล้งในบางช่วงของการปลูก และได้ทราบว่า ข้าวเหนียวดำหมอกำลังได้รับการส่งเสริมให้ปลูกมากขึ้นในพื้นที่เพราะข้าวพันธุ์นี้ได้รับความสนใจจากบริษัทเอกชน ภาครัฐในจังหวัดพัทลุงกำลังดำเนินการจดทะเบียนเป็นข้าว GI ชนิดที่สองของจังหวัดพัทลุง จึงเป็นสายพันธุ์ข้าวที่น่าสนใจในการทำวิจัยต่อยอดในด้านต่างๆ เพื่อรองรับการปลูกข้าวและชื่อเสียงของข้าวสายพันธุ์นี้ในอนาคต

บทที่ 6

สรุปผล

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวเหนียวดำหมอและช่อไม้ไผ่สามารถเริ่มต้นได้จากการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวที่แก่สมบูรณ์ทำความสะอาดภายนอกด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 95% แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร๊อก 2 ครั้ง ความเข้มข้น 1.0 และ 0.5% อย่างละ 10 นาที ตามลำดับ ร่วมกับการปอกเปลือกข้าว แล้วเลี้ยงในอาหารสูตร LS ที่มี 2,4-D 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 4 สัปดาห์ แล้วย้ายเลี้ยงในสูตรอาหารที่ไม่เติม 2,4-D จะชักนำให้เกิดอวัยวะใหม่จากแคลลัส โดยเกิดรากมากที่สุด ยอดและเอ็มบริโอ ตามลำดับ เมื่อนำแคลลัสชักนำให้เกิดอวัยวะด้วยสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่นๆ สูตรอาหาร MS ที่เติม kinetin ร่วมกับ NAA ชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสได้ดีกว่าสูตรอาหารเดิม การลดความชื้น ทำให้เกิดแคลลัสมีลักษณะที่ดีต่อการชักนำอวัยวะใหม่ แต่ไม่ได้ทำให้การเกิดอวัยะใหม่ได้ดีขึ้น

การชักนำยอดใหม่จากเนื้อเยื่อยอดเดิมที่ได้จากการงอกของเมล็ดข้าว โดยการเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1-0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดมากกว่า BA และเมื่อเติม NAA ในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ เมื่อตัดแยกไปเพาะเลี้ยงในอาหารเพิ่มเติม NAA แทน ส่งเสริมการสร้างรากได้เร็วขึ้นให้ต้นข้าวที่สมบูรณ์แข็งแรงพร้อมย้ายปลูกและให้ลักษณะปกติเหมือนข้าวที่ปลูกในบ่อทดลอง

ในขณะที่การปลูกในแปลงนาก็อัตราการกลายพันธุ์ต่ำ (น้อยกว่า 1%) ลักษณะการกลายพันธุ์ เช่น การออกรวงเร็วและผิดไปจากเดิม (กรณีข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่) สัณฐานของข้าว อาทิเช่น สีและขนาดของเมล็ดข้าว สีและลักษณะเปลือกข้าว (กรณีข้าวเหนียวดำหมอ) ข้อมูลเหล่านี้ได้นำเสนอแก่ชุมชนในรูปแบบของการบริการวิชาการให้ความรู้ด้านการกลายพันธุ์ การปรับปรุงพันธุ์ การเก็บรักษาพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว พร้อมได้ข้อมูลสะท้อนกลับในลักษณะของการนำไปพัฒนาเป็นโจทย์วิจัยในครั้งต่อไป

เอกสารอ้างอิง

นิธิศ แสงอรุณ ราตรี รัตนสำเนียง บุญนะ หนูคง จรัญ ทับทิมทอง จรูญ ศรีสุวรรณ กัณธิกานต์ ปลอดปล้อง สำเริง แซ่ตัน ขวัญใจ คชภักดี รุจิรา ปรีชา โอรักษ์ ทองเด็จ รชนิศ พานิชกิจ กัญญา เชื้อพันธุ์ สุนันทา วงศ์ปิยชนและสุนิยม ตาปราบ. 2553. **ข้าวเหนียวดำมีสีพันธุ์พื้นบ้านสายพันธุ์ดีเด่นภาคใต้ ข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่ (PTNC96004-49) ข้าวเหนียวดำหมอ (PTNC 96051-37) ข้าวเหนียวดำต้นดำใบดำ (PTNC96071-39) และข้าวเหนียวแดงกรามแรด (PTNC96059-61)**. เอกสารประกอบการนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการข้าวกลุ่มศูนย์วิจัยข้าวภาคใต้ ประจำปี 2553. วันที่ 25-26 พฤษภาคม 2553 ณ โรงแรม วี.แอล. อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา. 19-35.

มูลนิธิขวัญข้าว. 2556. **คุณค่าทางโภชนาการของสายพันธุ์ข้าวท้องถิ่น**. http://www.khaokwan.org/localseed.html สืบค้นเมื่อ 18 สิงหาคม 2556.

รัชนี คงคาฉุยฉาย 2556. **โครงการบูรณาการเทคโนโลยีชีวภาพในการสร้างพันธุ์ข้าวเพื่อเพิ่มมูลค่าและคุณค่าสูง.** สถาบันวิจัยโภชนาการ. มหาวิทยาลัยมหิดล. สืบค้นเมื่อ 18 สิงหาคม 2556.

ศุภชัย สมัปปิโต. 2542. **รายงานการวิจัยเรื่องการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวหอมพื้นบ้านของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (*In vitro* culture of traditional aromatic rice (*oryza sativa* of Northeastern, Thailand)**. มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 25 หน้า.

สำเริง แซ่ตัน. 2550. **ข้าวพันธุ์พื้นบ้านภาคใต้ เล่ม 1**. ศูนย์วิจัยพันธุ์ข้าวพัทลุง. สำนักวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าว. กรมการข้าว. 175 หน้า.

สำเริง แซ่ตัน. 2553. **ข้าวพันธุ์พื้นบ้านภาคใต้ เล่ม 2**. ศูนย์วิจัยพันธุ์ข้าวพัทลุง. สำนักวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าว. กรมการข้าว. 180 หน้า.

ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว. 2556. **ข้าวพันธุ์พื้นบ้าน ของดีที่ (เกือบ) ถูกลืม.** http://dna.kps.ku.ac.th/index.php/ข่าว-ข้าว/ข้าวพันธุ์พื้นบ้าน-ของดีที่-เกือบ-ถูกลืม.html. สืบค้นเมื่อ 18 สิงหาคม 2556.

Anita R., Aich S.S. and Mukherjee S. 2012. **Differential reponses to indirect organogenesis in rice cultivars**. International Journal of Scientific and Research Publications 2 (9): 1-5.

Din A. R. J. M., Ahmad F. L., Wagiran A., Samad A. A., Rahmat Z. and Sarmidi M. R. 2016. **Improvement of efficient in vitro regeneration potential of mature callus induced from Malaysian upland rice seed (*Oryza sativa* cv. *Panderas*).** Saudi Journal of Biological Sciences 23: S69–S77.

Dey M., Bakshi S., Galiba G., Sahoo L., Panda S.K., 2012. **Development of a genotype independent and transformation amenable regeneration system from shoot apex in rice (*Oryza sativa* spp. *indica*) using TDZ.** Biotechnology 2: 233–240.

Ge X.J., Chu Z.H., Lin Y.J. and Wang S.P. 2006. **A tissue culture system for different germplasms of indica rice.** Plant Cell Reports 25: 392–402.

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*).** Physiologia Plantarum 44(1): 11-15.

Karthikeyan A., Thevar S., Pandian K. and Ramesh M. 2009. **High frequency plant regeneration from embryogenic callus of a popular indica rice (*Oryza sativa* L.).** Physiology and Molecular Biology of Plants 15(4): 371-375.

Kinoshita T. and Mori K.. 2001. ***In vitro* techniques for genomic alteration in rice plants.** Euphytica 120: 367–372.

Lee S. T. and Huang W. L. 2014. **Osmotic stress stimulates shoot organogenesis in callus of rice (*Oryza sativa* L.) via auxin signaling and carbohydrate metabolism regulation.** Plant Growth Regulation 73(2): 193–204.

Linsmaier E.M. and Skoog F. 1965. **Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures.** Physiologia Plantarum 18: 100-127.

Manickavelu A., Nadarajan N., Ganesh S.K., Ramalingam R. and Raguraman S. and Gnanamalar R.P. 2006. **Organogenesis induction in rice callus by cyanobacterial extracellular product.** African Journal of Biotechnology 5(5); 437-439.

Mohammad A.M., Tushar C.S., Towhida A., Ahmad H.K. and Mohammad F.A. 2013. **Indirect plant regeneration in aromatic rice (*Oryza sativa* L.) var. '*Kalijira*' and '*Chinigura*'.** Acta agriculturae Slovenica, 101 - 2, september 2013. 231-238.

Murashige T. and Skoog F. 1962. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures**. Physiologia Plantarum 15: 473-479.

Premvaranon P., Vearasil S., Thanapornpoonpong S., Karladee D. and Gorinstein S. 2011. ***In vitro* studies to produce double haploid in Indica hybrid rice**. Biologia, Section Cellular and Molecular Biology 66 (6): 1074-1081.

Puspasree P. and Ebrahimali A.S. 2013. **Protocol optimization and evaluation of rice varieties response to *in vitro* regeneration**. Advances in Bioscience and Biotechnology 4: 647-653.

Raghavendra G., Kumaraswamy G.K., Ramya B., Sandesh S.H., Yogendra K.N. Deepak N. and Gowda P.H. R. 2009. **Direct Multiple Shoot Regeneration of indica Rice (*Oryza sativa*) var. 'Rasi'** The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology, The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology. 4 (1): 71-73.

Revathi S. and Pillai M. A. 2011. ***In vitro* callus induction in rice (*Oryza sativa* L.)**. Research in Plant Biology. 1(5): 13-15.

Tsukahara M. and Hirosawa T. 1992. **Simple dehydration treatment promotes plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus**. Plant Cell Reports. Oct, 11(11): 550-553.

Wijesekera T.P., Iqbal M.C.M. and Bandara D.C. 2007. **Plant Regeneration *in vitro* by Organogenesis on Callus Induced from Mature Embryos of Three Rice Varieties (*Oryza sativa* L., ssp. indica).** Tropical Agricultural Research 19: 25-35.

Xiuli S., Jianjun C., Michael E., Richard K. and Henny J. 2007. **Assessment of somaclonal variation in Dieffenbachia plants regenerated through indirect shoot organogenesis.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture 91: 21–27.

Zuraida A. R., Naziah B., Zamri Z., Sreeramanan S. 2011. **Efficient plant regeneration of Malaysian indica rice MR 219 and 232 via somatic embryogenesis system.** Acta Physiol Plant (2011) 33: 1913–1921.

Zhao W., Zheng S. and Ling H. 2011. **A regeneration system and Agrobacterium-mediated transformation of Chinese upland rice cultivar Handao297.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture 106: 475–483.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 ส่วนประกอบสูตรอาหาร MS และ LS

สารเคมี	Murashige & Skoog (MS) (1962) (mg/l)	Linsmaier & Skoog (LS) (1965) (mg/l)
$CaCl_2$ $2H_2O$	440	400
$CuSO_4$ $6H_2O$	0.025	0.025
$FeSO_4$ $7H_2O$	27.8	27.8
H_3BO_3	6.2	6.2
KH_2PO_4	170	170
KI	0.83	0.83
KNO_3	1,900	1,900
$MgSO_4$ $7H_2O$	370	370
$MnSO_4$ $4H_2O$	22.3	22.3
Na_2MoO_4 $2H_2O$	0.25	0.25
Na_2 EDTA $2H_2O$	37.3	37.3
NH_4NO_3	1,650	1,650
$ZnSO_4$ $7H_2O$	8.6	8.6
Inositol	100	100
Nicotinic Acid	0.5	
Thiamine HCl	0.1	0.4
Pyridoxine HCl	0.5	
Glycine	2.0	
Sucrose	30,000	30,000

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาคผนวกที่ 2 รายชื่อผู้เข้าอบรม

ลงทะเบียน

กิจกรรมนิทรรศการ “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกับการอนุรักษ์ข้าวท้องถิ่นภาคใต้”

(โครงการวิจัยเรื่อง ความผันแปรในลักษณะปรากฏและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวเหนียวดำมีสีพันธุ์พื้นบ้านสายพันธุ์ดีเด่นภาคใต้: ข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่และข้าวเหนียวดำหมอ)

ณ ตำบลหารเทา อ. ปากพะยูน จ. พัทลุง

ที่	ชื่อ-สกุล	ที่อยู่	ลายมือชื่อ	
			08.30 - 12.00 น.	13.00 - 17.30 น.
1.	น.ส. โสภิณ กิจคม	86 ม.9 ต.หารเทา อ.ปากพะยูน	โสภิณ	โสภิณ
2.	นาง จิโพก ดงสี	113/1 ม.9 ต.หารเทา	จิโพก	จิโพก
3.	นาง แพร ทองพิบูรณ์	146 ม.9 ต.หารเทา	แพร	แพร
4.	นาง สุภาพ แจ้งกระจ่าง	92/2 ม.9 ต.หารเทา อ.ปากพะยูน จ.พัทลุง		
5.	นาง เอี่ยม ปิ่นแก้ว	418 ม.9 ต.หารเทา อ.ปากพะยูน จ.พัทลุง	เอี่ยม	เอี่ยม
6.	นางสุพจน์ บุญนุ้ย	62 ม.9 ต.หารเทา อ.ปากพะยูน จ.พัทลุง	สุพาส์	สุพาส์
7.	นาง หอง ต้อปะ	17 ม.9 ต.หารเทา	หอง	หอง
8.	นาง ปราณี ไชยพม	104 ม.9 ต.หารเทา	ปราณี	ปราณี
9.	นาง นิตยา ชูศิลป์	93 ม.9 ต.หารเทา	นิตา	นิวตา
10.	นางสมพร หวังหม	265 ม.9 ต.หารเทา	สมพร	สมพร
11	นาง หยอม บัวแก้ว	30 ม.9 ต.หารเทา	หยอม	หยอม

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ลงทะเบียน

กิจกรรมนิทรรศการ “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกับการอนุรักษ์ข้าวท้องถิ่นภาคใต้”

(โครงการวิจัยเรื่อง ความผันแปรในลักษณะปรากฏและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวเหนียวดำมีสีพันธุ์พื้นบ้านสายพันธุ์ดีเด่นภาคใต้: ข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่และข้าวเหนียวดำหมอ)

ณ ตำบลหารเทา อ. ปากพะยูน จ. พัทลุง

ที่	ชื่อ-สกุล	ที่อยู่	ลายมือชื่อ	
			08.30 - 12.00 น.	13.00 - 17.30 น.
12.	นายกันต์ชนันท์ กิมาคม	112 ม.9 ต.หารเทา	กันต์ชนันท์	กันต์ชนันท์
13.	นางเจิม ใหม่แก้ว	441 ม.๙ ต.หารเทา	เจิม	เจิม
14.	นางแพ แก้วมณี	14 ม.๙ ต.หารเทา	แพ	แพ
15.	นายละมัย มิ่นแก้ว	418/1 ต.หารเทา	ละมัย	ละมัย
16.	นางพิชยา คงพูล	86/2 ม.9 ต.หารเทา	พิศ	พิศ
17.	นางแอว ควนเพ็ชร	86/1 ม.9 ต.หารเทา	แอว	แอว
18.	นาย ปร.เสริฐ พรหมเมศ	91/1 ม.๙ ต.หารเทา	ปร.เสริฐ	เสริฐ
19.	นางกิ้มอิ้น ทุยื่น	139 ม.๙ ต.หารเทา	กิ้มอิ้น	กิ้มอิ้น
20.	นาย ยศพร สงเที่ยว	100/1 ม.9 ต.หารเทา	ยศพร	ยศพร
21.	นาง ละออง ~~พอ~~ ~~คงสี่ปาน~~ คงสี่ปาน	68 ม.๙ ต.หารเทา	ละออง	ละออง
22.	นาง กานดา ทุ่มน่ม	22/2 ม.๙ ต.หารเทา	กานดา	กานดา

ลงทะเบียน

กิจกรรมนิทรรศการ “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกับการอนุรักษ์ข้าวท้องถิ่นภาคใต้”

(โครงการวิจัยเรื่อง ความผันแปรในลักษณะปรากฏและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวเหนียวดำมีสีพันธุ์พื้นบ้านสายพันธุ์ดีเด่นภาคใต้: ข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่และข้าวเหนียวดำหมอ)

ณ ตำบลหารเทา อ. ปากพะยูน จ. พัทลุง

ที่	ชื่อ-สกุล	ที่อยู่	ลายมือชื่อ	
			08.30 - 12.00 น.	1 3.00 - 17.30 น.
23.	นางอ้อย ขัวแก้ว	55 ม.9 ต.หารเทา	อ้อย	อ้อย
24.	นาง ฉะอ้อน เกิดเอียด	19 ม. 9 ต. หารเทา	ฉะอ้อน	ฉะอ้อน
25.	นาย [illegible] [illegible]	419 ม.9 ต.หารเทา		
26	นางตรี ชลสุวรรณ	113/3 ต.หารเทา	ตรี	ตรี
27	นางสุภา เกตุแก้ว	160/1 ม.9 ต.หารเทา	สุภา	สุภา
28	นาง ประคอม ใหม่แก้ว	102/1 ม.9 ต.หารเทา.		
29	น.ส. กิตติยา เกตรักทอง	22/1 ม.9 ต. หารเทา	กิตติยา	กิตติยา
30.	อนงค์ อ่อนอินทร์	104 ม.9 ต.หารเทา	อนงค์	อนงค์
31	นายเฉลิมชัย พรหมเมศ	69 ม.9 ต.หารเทา		
32.	นางไพ สุขเอียด	101/2 ม.9 ต.หารเทา	ไพ	ไพ
33.	นาย ล้อม เกตุรักทอง	22 หมู่ 9. ต.หารเทา	ล้อม	ล้อม

ลงทะเบียน

กิจกรรมนิทรรศการ “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกับการอนุรักษ์ข้าวท้องถิ่นภาคใต้”

(โครงการวิจัยเรื่อง ความผันแปรในลักษณะปรากฏและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวเหนียวดำมีสีพันธุ์พื้นบ้านสายพันธุ์ดีเด่นภาคใต้: ข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่และข้าวเหนียวดำหมอ)

ณ ตำบลหารเทา อ. ปากพะยูน จ. พัทลุง

ที่	ชื่อ-สกุล	ที่อยู่	ลายมือชื่อ	
			08.30 - 12.00 น.	13.00 - 17.30 น.
๒๔.	กันตภโทษ จินดา	2 ม.๑ ต.หารเทา อ.ปากพยูน		
25	[illegible]	100/3 ม.๑ ต.หารเทา อ.ปากพยูน		
๒๖	นาง ส่าย คาริยา	33 ม.๑ ต.หารเทา	ส่าย	ส่าย

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

รายงานสรุปการเงิน ประจำปีงบประมาณ 2557

เลขที่โครงการ 2557A15662001

โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

ชื่อมหาวิทยาลัย : มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

ชื่อโครงการ : ความผันแปรในลักษณะปรากฏและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของข้าวเหนียวดำมีสีพันธุ์พื้นบ้านสายพันธุ์ดีเด่นภาคใต้: ข้าวเหนียวดาช่อไม้ไผ่และข้าวเหนียวดำหมอ

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร. จักรกริช อนันตศรัณย์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 17 กรกฎาคม 2557 ถึงวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2560

ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี 7 เดือน ตั้งแต่วันที่ 17 กรกฎาคม 2557 ถึงวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2560

			รายจ่าย	
	หมวด	งบประมาณรวมทั้งโครงการ	ค่าใช้จ่ายงวดปัจจุบัน	คงเหลือ (หรือเกิน)
1.	ค่าตอบแทน	25,000	24,970.00	30.00
2.	ค่าจ้าง	-	-	
3.	ค่าวัสดุ	76,760	75,477.01	1,282.99
4.	ค่าใช้สอย	148,240	94,980.00	53,260.00
5.	ค่าใช้จ่ายอื่นๆ	-	-	
	รวม	250,000	195,427.01	54,572.99

จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1	150,000	บาท	เมื่อ	17 กรกฎาคม 2557
งวดที่ 2	50,000	บาท	เมื่อ	18 มกราคม 2558
รวม	200,000	บาท		

....

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

วันที่ ....

....

ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการ

วันที่ ....