บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

1. พืชทดลอง คือ อ้อยพันธุ์ F156 (Saccharum officinarum Linn. cv. F156) ได้รับจากสถานีอ้อย บางพระ เป็นลูกผสมของ F141 และ CP 34-79 มีลักษณะทางเกษตรที่สำคัญคือ เติบโตเร็ว กอไม่ล้ม ผลผลิตต่อไร่และความหวานสูง (เกษม สุขสถาน, และคณะ 2520) แต่ไวต่อโรคแส้ดำ (ธนาคร จารุพัฒน์ และคณะ, 2526)

2. สารเคมี ได้แก่ สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์

2.1 สารอินทรีย์

disodium ethylenediaminetetraacetate (Na_2EDTA)

ethyl methanesulphonate (EMS)

glycine

myo-inositol

nicotinic acid

pyridoxine.HCl

thiamine.HCl

2,4-dichloroacetic acid (2,4-D)

sucrose

เอทธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

น้ำมะพร้าว

วุ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 สารอนินทรีย์

NH_4NO_3	KI
H_3BO_3	$Na_2MoO_4.2H_2O$
$CaCl_2.2H_2O$	$ZnSO_4.6H_2O$
$CoCl_2.6H_2O$	คลอร็อกซ์
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	tween 20
$FeSO_4.7H_2O$	ยาฆ่าเชื้อราและแบคทีเรียที่มีชื่อทางการค้าว่า
$MgSO_4.7H_2O$	"นาทริฟิน"
$MgSO_4$	ยาฆ่าแมลงที่มีชื่อทางการค้าว่า "ไดเม่"
$MnSO_4.4H_2O$	
$MnCl_2.4H_2O$	
KNO_3	
KH_2PO_4	

2.3 เครื่องแก้ว

Erlenmayor flask ขนาด 25 มิลลิลิตร

pipette ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร

Petri dish

ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อพร้อมฝาแบคคาไลท์ขนาด 100 มิลลิลิตร

ขวดใส่สารเคมี ขนาด 1 ลิตร

กระบอกตวงขนาด 10 50 100 และ 1000 มิลลิลิตร

แท่งแก้วคน 12 นิ้ว

ตะเกียงแอลกอฮอล์

2.4 อุปกรณ์อื่น

aluminum foil

pH metre

vermiculite

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เตาไฟฟ้า

หม้อเคลือบ

หม้อนึ่งความดัน

เทอร์โมมิเตอร์

เครื่องวัดความชื้น

ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อแบบธรรมดาหรือ larmina flow

ด้ามมีดและใบมีดเบอร์ 11

ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อ

หลอดฟลูออเรสเซนต์ชนิด grolux และ day light หลอดละ 40 วัตต์

ถ้วยพลาสติกขนาด 300 มิลลิลิตร

ถุงพลาสติกขนาด 6 x 12 นิ้ว

ดิน ปุ๋ยคอกและทราย

เข็มฉีดยาและกระบอกฉีด

กระบอกฉีดน้ำ

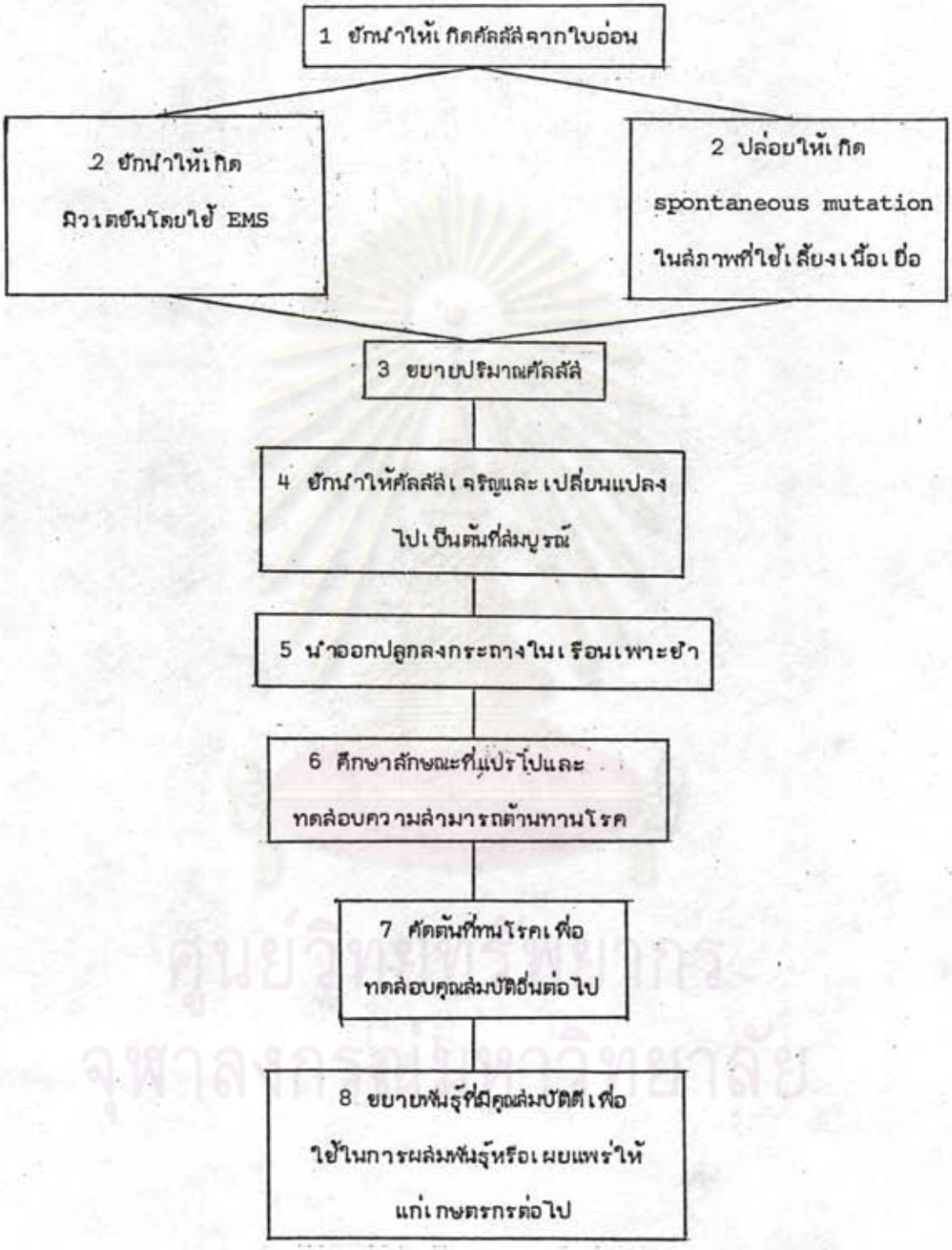
กระดาษกรอง millipore ขนาด 1 μ

วิธีดำเนินการทดลอง

1. แผนดำเนินงานทดลอง

เพื่อศึกษามิวเตชันของอ้อยที่เกิดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้งที่เกิดขึ้นเองและโดยการชักนำด้วยสารเคมี เนื่องจากการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ มีโอกาสแสดงออกได้ยาก นอกจากมิวเตชันจะเกิดที่จุดสำคัญ เช่น เนื้อเยื่อเจริญของตายอด ตาข้าง ฯลฯ จึงจะเห็นลักษณะเหล่านี้ได้ชัดเจน แต่เซลล์ที่เกิดมิวเตชันจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อมีโอกาสแสดงออกได้มากกว่า เพราะแต่ละเซลล์หรือกลุ่มเซลล์เล็ก ๆ นี้ สามารถชักนำให้เจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ จากทฤษฎีนี้ จึงนำมาประยุกต์ใช้กับการทดลองโดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ (แผนภาพที่ 1)

แผนภาพที่ 1 แสดงขั้นตอนการดำเนินงานทดลอง



ขั้นตอนที่ 1-7 เป็นงานวิจัยที่ได้ศึกษาในวิทยานิพนธ์นี้ ขั้นตอนที่ 8 ทางสถานีอ้อย กาญจนบุรี จะเป็นผู้ดำเนินการต่อไป

2. การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองนี้เลือกตามสูตรที่ใช้ได้ผลแล้วของ Heinz และคณะ (1977); Nickell และคณะ (1973) และ Nadar และคณะ (1978) ดังนี้

2.1 สูตรอาหารที่ใช้ชักนำให้เกิดคัลลัส (callus induction medium) ในการชักนำให้เกิดคัลลัส ใช้อาหารสูตรดัดแปลงของ Murashige และ Skoog ตามวิธีของ Heinz และคณะ (1977) โดยเติม 2,4-D เข้มข้น 3 ppm. น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรและน้ำตาล 20 กรัม (ตารางที่ 1) บรรจุลงในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 100 มิลลิลิตร ขวดละประมาณ 25 มิลลิลิตร เพื่อความสะดวกจะเรียกอาหารสูตรนี้ว่า MSC

2.2 สูตรอาหารที่ใช้เพิ่มปริมาณคัลลัส (callus multiplication medium) ใช้สูตร MSC ตามข้อ 2.1

2.3 สูตรอาหารที่ใช้ชักนำให้คัลลัสเจริญและเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ (plant regenerating medium) ใช้สูตรของ Murashige และ Skoog (1962) ที่ลดปริมาณน้ำตาลลงเป็น 20 กรัมต่อลิตรและวุ้นเป็น 9 กรัมต่อลิตร (Nickell และคณะ, 1973 และ Nadar และคณะ 1978) (ตารางที่ 1) บรรจุลงใน Erlenmayor flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละประมาณ 75 มิลลิลิตร เพื่อความสะดวกจะเรียกอาหารสูตรนี้ว่า MS

นำเชื้ออาหารสูตรต่าง ๆ ด้วยหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 สูตรอาหารที่ใช้ชักนำให้เกิดคัลลัส (MSC) และชักนำให้คัลลัสเจริญและเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ (MS).

สารเคมี	สูตรอาหาร	
	MSC (มก./ล.)	MS (มก./ล.)
Macronutrient		
NH_4NO_3	1,650	1,650
KNO_3	1,900	1,900
$CaCl_2.2H_2O$	440	440
$MgSO_4.7H_2O$	370	370
KH_2PO_4	170	170
Micronutrient		
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	27.8
$MnSO_4.4H_2O$	22.3	22.3
KI	0.83	0.83
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.025
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	8.6
H_3BO_3	6.2	6.2
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.25
Na_2EDTA	37.3	37.3
Organic Constituent		
Glycine	-	2
Myo-inositol	100	100
Nicotinic acid	-	0.5
Pyridoxine. HCl	-	0.5
Thiamine. HCl	-	0.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 (ต่อ)

	สารเคมี	สูตรอาหาร	
		MSC (มก./ล.)	MS (มก./ล.)
	น้ำมะพร้าว	10 % (v/v)	-
	2,4-D	3	-
	Sucrose	20,000	20,000
	วุ้น	8,000	9,000

pH = 5.6 ปรับด้วย NaOH เข้มข้น 1 N.

2.4 การเตรียม Stock Solution ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อความสะดวก ถูกต้องและรวดเร็ว เตรียมส่วนผสมของธาตุหลัก ธาตุย่อยและฮอร์โมนเป็น stock solution ก่อน หลังจากนั้น ในการเตรียมอาหารแต่ละครั้งจึงตวงอาหารจาก stock solution ตามสัดส่วนที่ได้คำนวณไว้ (ตารางที่ 2)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของ stock solution และปริมาณที่ใช้ต่ออาหาร 1 ลิตร และอุณหภูมิที่เก็บ

Stock Solution	สารเคมี	ความเข้มข้นของ stock solution ต่อความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ	ปริมาณ (มล.) ที่ใช้ต่ออาหาร 1 ลิตร	อุณหภูมิที่เก็บ (^{o} ซ)
A	NH_4NO_3	50 x	20	4
B	KNO_3	50 x	20	4
	H_3BO_3			
	KH_2PO_4			
C	KI	200 x	5	4
	$Na_2MoO_4.2H_2O$			
	$CoCl_2.6H_2O$			
D	$CaCl_2.2H_2O$	200 x	5	4
E	$MgSO_4.7H_2O$			
	$MnSO_4.4H_2O$	200 x	5	4
	$ZnSO_4.7H_2O$			
	$CaSO_4.5H_2O$			
F	Na_2EDTA	200 x	5	4
	$FeSO_4.7H_2O$			
Organic constituent	Glycine	100 x	10	-10
	Nicotinic acid			
	Pyridoxine.HCl			
	Thiamine.HCl	100 x	10	-10
Auxin	2,4-D	100 x	1	4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การเตรียมสารละลายที่ใช้ชักนำให้เกิดมิวเตชัน

สารที่ใช้ชักนำให้เกิดมิวเตชันในการทดลองนี้ คือ EMS (ethyl methanesulphonate) ในความเข้มข้น 25 และ 50 ppm. (น้ำหนักต่อปริมาตร) เตรียมโดยละลาย EMS หนัก 25 และ 50 มิลลิกรัมในน้ำกลั่นแก้ว 200 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรอง millipore ขนาด 1 µ เติมสารละลาย EMS ที่ได้ลงในอาหารเหลวปริมาตร 800 มิลลิลิตร (มีปริมาณธาตุอาหารเท่ากับ 1 ลิตร) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จะได้สารละลาย EMS ในความเข้มข้นที่ต้องการ

4. การเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ศึกษาวิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อตามขั้นตอนต่าง ๆ ตามลำดับ ดังนี้

4.1 ศึกษาการฆ่าเชื้อที่ผิวของชิ้นส่วนอ้อย ส่วนของอ้อยที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ เป็นหน่อใหม่ที่เจริญได้สูงประมาณ 1 เมตร (วัดจากโคนต้นถึงคอใบที่ 1) ซึ่งปลูกในแปลงทดลอง ชิ้นส่วนของอ้อยที่นำมาใช้จึงมีโอกาสสัมผัสกับเชื้อราและแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมมาก หน่อที่นำมาใช้ลอกกาบใบออกจนได้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร ตัดให้ยาวประมาณ 4 เซนติเมตร ส่วนยอดนี้ประกอบด้วยตายอด ใบอ่อนที่หุ้มตายอดและข้อใต้ตายอด 2-3 ข้อ ส่วนของอ้อยนี้ทำความสะอาดโดยขูดขนที่กาบใบออกแล้วแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ที่ผสม tween 20 1-2 หยดต่อสารละลายคลอร็อกซ์ 100 มิลลิลิตร ในเวลา 10 และ 20 นาทีตามลำดับ ล้างส่วนตายอด ข้อและใบอ่อน แล้ววางบนอาหารวุ้นสูตร MSC

4.2 ศึกษาวิธีลดปริมาณ phenolic compound ในชิ้นส่วนอ้อย เนื่องจากชิ้นส่วนของอ้อยที่ตัดมาเพื่อใช้ในการทดลอง ผลิต phenolic compound ออกมามาก โดยเฉพาะตรงบริเวณตายอด ซึ่งเห็นเป็นสารสีน้ำตาลที่เนื้อเยื่อและในวุ้นอาหาร สารนี้มีพิษต่อเนื้อเยื่ออ้อยที่นำมาเลี้ยง ในงานทดลองนี้จึงได้ศึกษาการลด phenolic compound โดยใช้วิธีต่าง ๆ 3 วิธี ดังนี้

4.2.1 L-cysteine. HCl แช่ชิ้นส่วนอ้อยได้แก่ ตายอด ข้อและใบอ่อน ในสารละลาย L-cysteine. HCl เข้มข้น 100 ppm. เป็นเวลา 2-3 นาที

จึงย้ายยื่นส่วนลงในวุ้นอาหารสูตร MSC ที่มีส่วนผสม L-cysteine. HCl 50 ppm. และวาง culture บนยื่นที่มีแสงสว่าง (Liu, 1981)

4.2.2 Physical condition เป็นวิธีที่ใช้ลดปฏิกริยา oxidation โดยไม่ใช้สารเคมี ดังนี้

4.2.2.1 ที่มืด นำส่วนของตายอด ข้อและใบอ่อนมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MSC เก็บ culture ไว้ในที่มืด อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จึงย้าย culture ออกสู่แสงสว่าง (Liu, 1981)

4.2.2.2 น้ำกลั่นแก้วและที่มืด ทำการผ่าตัดยื่นส่วนอ้อยในน้ำกลั่นแก้ว แล้วเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MSC ในที่มืด อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จึงย้าย culture สู่แสงสว่างเช่นเดียวกับข้อ 4.2.2.1

4.2.3 Control นำส่วนของตายอด ข้อและใบอ่อน มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MSC โดยตรง แล้ววาง culture บนยื่นที่มีแสงสว่าง

เก็บผลการทดลองหลังจากเลี้ยงเนื้อเยื่อบนวุ้นอาหารแล้ว 4 สัปดาห์

4.3 การชักนำให้เกิดคัลลัส นำยื่นส่วนอ้อยที่ผ่านการลดปริมาณ phenolic compound ในอาหารสูตร MSC เลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ 23 ± 4 องศาเซลเซียส ให้แสงวันละ 12 ชั่วโมงด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซ็นซ์นิด gro-lux และ daylight อย่างละ 2 หลอด แสงนี้มีความเข้ม 2,300 lux.

เมื่อยื่นส่วนเจริญให้คัลลัส จึงนำไปชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยสาร EMS ต่อไป

5. การใช้สาร EMS ชักนำให้เกิดมิวเตชันในคัลลัส

นำคัลลัสที่มีอายุ 5-6 สัปดาห์ ซึ่งได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อบนวุ้นอาหารสูตร MSC มาแช่ในสารละลาย EMS เข้มข้น 25 และ 50 ppm. เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยมีคัลลัสที่ไม่แช่ EMS เป็น control ดังนี้

5.1 แช่คัลลัสใน EMS เข้มข้น 25 ppm. (น้ำหนักต่อปริมาตร) นาน 24 ชั่วโมง

5.2 แช่คัลลัสใน EMS เข้มข้น 25 ppm. (น้ำหนักต่อปริมาตร) นาน 48 ชั่วโมง

5.3 แช่คัลลัสใน EMS เข้มข้น 50 ppm. (น้ำหนักต่อปริมาตร) นาน 24 ชั่วโมง

5.4 แช่คัลลัสใน EMS เข้มข้น 50 ppm. (น้ำหนักต่อปริมาตร) นาน 48 ชั่วโมง

เมื่อครบกำหนดเวลาล้าง EMS ออกจากคัลลัสด้วยอาหารเหลวสูตร MSC ที่ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จึงย้ายคัลลัสสู่อาหารสูตร MSC

6. การขยายปริมาณคัลลัส

เลี้ยงคัลลัสบนอาหารวุ้นสูตร MSC จากข้อ 5 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อให้คัลลัสแบ่งเซลล์ให้ปริมาณมากขึ้น

7. การชักนำให้คัลลัสเจริญและเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นที่สมบูรณ์

นำคัลลัสในข้อ 6 ย้ายมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS เพื่อชักนำให้คัลลัสเจริญและเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ (regenerate) ต่อไป

8. การปลูกอ้อยที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพแวดล้อมภายนอก

เมื่อได้ต้นอ้อยที่สมบูรณ์มีส่วนยอดต้นและรากครบเช่นเดียวกับอ้อยที่เพาะจากเมล็ด นำต้นอ้อยออกจากหลอดทดลองแล้วล้างวุ้นที่ติดอยู่ที่รากอ้อยออก แช่ต้นอ้อยที่ได้ในสารละลายเบนาทริฟินเข้มข้น 10 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตรสักครู่ จึงนำต้นอ้อยปลูกในถ้วยพลาสติกที่เจาะรูที่ฐาน 5 รู โดยใช้เครื่องปลูกในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันไป 3 แบบ เพื่อศึกษาหาวิธีที่ดีที่สุดในการนำกล้าอ้อยออกจากขวด โดยปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก ดังนี้

8.1 ใช้ดินนา : ปุ๋ยคอก : ทรายหยาบ ในอัตราส่วน 2:1:1 ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเครื่องปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก และในกระโจมพลาสติกที่ฉีดพ่นน้ำเป็นละอองฝอย 5 ครั้งต่อวัน

8.2 ใช้แกลบเผาที่ล้างสะอาดเป็นเครื่องปลูก ปลูกในกระบะพ่นหมอก

8.3 ใช้ vermiculite ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นเครื่องปลูก vermiculite นี้ ฟุ่มด้วยสารละลาย Hoagland เข้มข้นเต็มส่วน ปลูกกล้าอ้อยใน vermicultite แล้ววางในถุงพลาสติกขนาด 6 x 12 นิ้ว ฉีดพ่นด้วยน้ำสะอาดเพื่อเพิ่มความชื้นภายในถุง ปิดปากถุงให้สนิท วางบนชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อประมาณ 5 วัน หลังจากนั้น จึงนำมาเปิดปากถุง วางบนชั้นใต้หลังคา เพื่อรับแสงแดดครึ่งวันเช้าเป็นเวลา 3 วัน นำถุงพลาสติกออกทิ้งไว้ ในสภาพเดิม รดด้วยสารละลาย Hoagland เข้มข้น $\frac{1}{2}$ ส่วน วันเว้นวัน

เพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการเตรียมสารละลาย Hogland จึงเตรียมเป็น stock solution เช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงส่วนประกอบของ stock solution และปริมาณที่ใช้ต่อสารละลาย Hoagland 1 ลิตร

Stock solution	ความเข้มข้น	ปริมาณ (มล.) ที่ใช้ต่ออาหาร 1 ลิตร
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	1 M.	5
KNO_3	1 M.	5
$MgSO_4$	1 M.	2
KH_2PO_4	1 M.	1
Fe-EDTA	-	1
Micronutrient	-	1

ปรับ pH = 6 ด้วย HCl และ NaOH เข้มข้น 1 N.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียม stock solution Fe-EDTA

ละลาย Na_2-EDTA.$2H_2O$ 33.13 กรัม ในน้ำร้อน 1 ลิตร ค่อย ๆ เติม $FeSO_4.7H_2O$ 24.86 กรัม คนจนได้สารละลายใส่แล้วพ่นอากาศลงใน stock solution ที่ได้ประมาณ 12 ชั่วโมง จะได้สารละลายสีน้ำตาลเข้มที่มีความเข้มข้นของ Fe^{+3} 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

การเตรียม stock solution ของ micronutrient

ละลายสารต่อไปนี้ในน้ำกรองที่ขจัดไอออนออกแล้ว (deionized water) 1 ลิตร เป็น stock solution ของ micronutrient ดังนี้

H_3BO_3	2.86	กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	1.81	กรัม
$ZnSO_4.6H_2O$	0.22	กรัม
$CuCl_2.2H_2O$	0.05	กรัม
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.025	กรัม

9. การศึกษามิวเตชัน

หลังจากชักนำกล้าอ้อยจากคัลลัสที่แช่ EMS ในความเข้มข้น 25 ppm. เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง, 50 ppm. เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ นำกล้าอ้อยที่แข็งแรงจากข้อ 7 ซึ่งเติมปลูกอยู่ใน vermiculite ย้ายปลูกลงดินในถุงพลาสติกขนาด 6 x 10 นิ้ว ที่เจาะรูรอบถุง โดยปลูกในเรือนเพาะชำ สถานีอ้อยกาญจนบุรี กระทรวงอุตสาหกรรม (ภาพที่ 1) ดินที่ใช้เป็นดินผสมปุ๋ยคอกที่ร่อนแล้วและทรายในอัตราส่วน 2:1:1 ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเมทธิลโบรไมด์ การทดลองนี้วางแผนแบบ randomized complete block design (RCB) แบ่งออกเป็น 5 การทดลอง การทดลองละ 8 บล็อก แต่ละการทดลองในแต่ละบล็อกมี 10 ต้น เมื่อกล้าอ้อยสามารถปรับตัวเข้ากับดินผสมได้แล้ว จึงศึกษาการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่อไป

ภาพที่ 1 เรือนเพาะฆ่าสถานีอ้อยกาญจนบุรี กระทรวงอุตสาหกรรม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9.1 การเจริญ ศึกษาการแปรของการเจริญของต้นอ้อย โดยวัดความสูงและเส้นผ่าศูนย์กลางรอบโคนต้น ความสูงนั้นวัดจากโคนต้นที่สัมผัสหน้าดินถึงคอใบที่ 1 ส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางรอบโคนต้นนั้นวัดที่โคนต้นเหนือผิวดินเล็กน้อย

9.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ศึกษาการแปรของรูปร่างลักษณะที่เห็นจากภายนอก ลักษณะเหล่านี้สามารถใช้จำแนกพันธุ์ได้ ได้แก่

9.2.1 dewlap ศึกษารูปร่างของ dewlap ที่ 3 เป็นมาตรฐาน

9.2.2 การทิ้งตัวของใบ พิจารณาจากใบอ้อยที่อยู่ชั้น

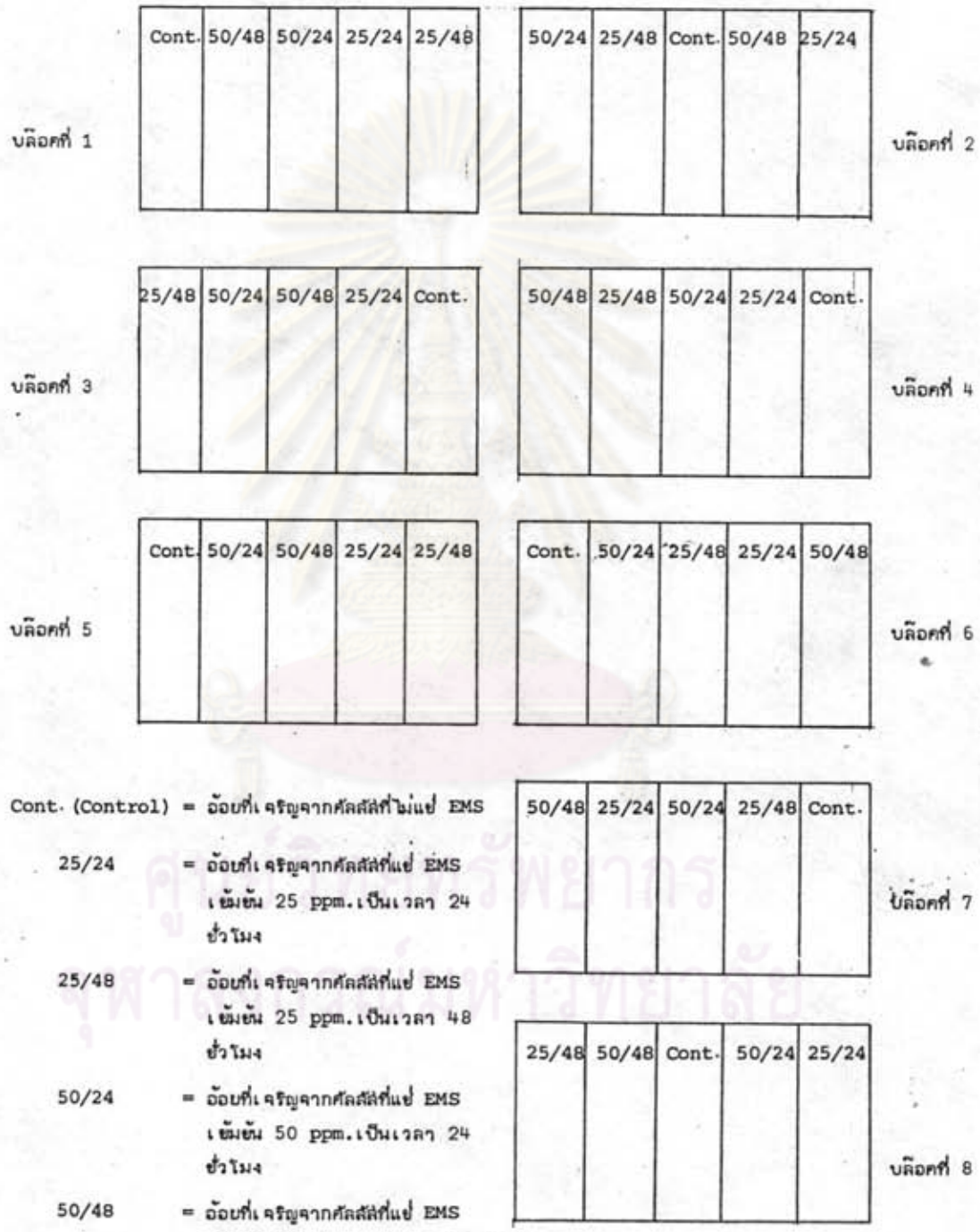
9.2.3 รูปร่างของใบ ศึกษารูปร่างของใบที่แตกต่างกัน โดยวัดความกว้างของส่วนที่กว้างที่สุดและความยาวของส่วนที่ยาวที่สุดจากคอใบถึงปลายใบ

9.2.4 ความหนาของใบ วัดความหนาของใบบริเวณโคน กลางและปลายใบบริเวณละ 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยที่แน่นอน

ในการทดลองทั้งในข้อ 9.1 และ 9.2 นี้ ศึกษาในอ้อยต้นที่ 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 โดยมี control คือ อ้อยที่เจริญจากศัลลัสที่ไม่ได้แช่ EMS

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพที่ 2 แผนผังแสดงการวางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design ซึ่งมี 5 การทดลอง การทดลองละ 8 บล็อค แต่ละการทดลองในแต่ละบล็อคมี 10 ต้น แผนนี้ใช้วัดการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยา



Cont. (Control) = อ้อยที่เจริญจากตัดสลัดที่ไม่แช่ EMS

25/24 = อ้อยที่เจริญจากตัดสลัดที่แช่ EMS เข้มข้น 25 ppm. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

25/48 = อ้อยที่เจริญจากตัดสลัดที่แช่ EMS เข้มข้น 25 ppm. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

50/24 = อ้อยที่เจริญจากตัดสลัดที่แช่ EMS เข้มข้น 50 ppm. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

50/48 = อ้อยที่เจริญจากตัดสลัดที่แช่ EMS เข้มข้น 50 ppm. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

I15964577

9.3 <u>ความสามารถต้านทานโรคแส้ดำ</u> หลังจากที่ศึกษาลักษณะต่าง ๆ ในข้อ 9.1 และ 9.2 แล้ว จึงทดสอบความสามารถต้านทานโรคแส้ดำของกล้าอ้อยตามวิธีของสวนิตย์ แวงวรรณ (2524) โดยเลือกหน่อที่มีความสูง 10-20 ซม. (ซึ่งเป็นหน่อที่มีขนาดพอเหมาะต่อการทดสอบโรค) แยกจากต้นแม่ปลูกลงกระถางขนาด 10 นิ้ว กระถางละ 1 ต้น ทิ้งไว้ 2 สัปดาห์ เพื่อให้อ้อยตั้งตัว จึงทดสอบความสามารถต้านทานโรคแส้ดำ โดยใช้ chlamydospore suspension ของ <u>Ustilago scitaminea</u> Sydow จากแส้อ้อยที่เก็บใหม่ในความเข้มข้น 10 กรัม ต่อน้ำกลั่นแก้วปลอดเชื้อ 1 ลิตร หรือมีความเข้มข้นประมาณ 10^6-10^7 สปอร์ต่อน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร ฉีดด้วยเข็มฉีดยาขนาด 0.33 x 11.3 มิลลิเมตร สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ครั้งละ 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 สัปดาห์ติดต่อกัน ทาแผลที่ถูกเข็มแทงด้วยวาสลีนเพื่อรักษาความชื้นภายในชั้นของกาบใบอ้อย เนื่องจากอ้อยที่ได้จากศัลสัลที่ไม่ได้แช่ด้วย EMS มีความแปรอยู่ในตัวเอง จึงทดสอบความสามารถต้านทานโรคจากอ้อยเหล่านี้ด้วย นับเป็นอีก 1 การทดลอง ส่วน control ยังคงใช้อ้อยที่ได้จากศัลสัลที่ไม่ได้แช่ EMS เช่นเดิมและฉีดด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 มิลลิลิตรแทน สังเกตอาการภายใน 6 เดือน ดังนั้น การทดลองยังคงเป็นแบบ randomized complete block design แบ่งออกเป็น 6 การทดลอง การทดลองละ 8 ซ้ำ แต่ละการทดลองในแต่ละซ้ำมี 10 กระถาง มีอ้อยพันธุ์ NCo 310 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ไวต่อโรคแส้ดำที่สุดเป็นพันธุ์เปรียบเทียบต่างหากอีก 10 กระถาง

10. <u>การคัดเลือกพันธุ์ต้านทาน</u>

คัดเลือกต้นที่ไม่แสดงอาการเป็นโรคส่งให้สำนักงานอ้อยและน้ำตาลทรายเพื่อศึกษาลักษณะและคุณสมบัติทางเกษตรอื่นต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพที่ 3 แผนผังที่แสดงการวางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design แผนนี้ใช้วัดความต้านทานโรคแล้ดำ ซึ่งมี 6 การทดลอง การทดลองละ 8 บล็อค แต่ละการทดลองในแต่ละบล็อคมี 10 ต้น

บล็อคที่ 1	O/O	50/48	50/24	25/24	25/48	Cont.	50/24	25/48	O/O	Cont.	50/48	25/24	บล็อคที่ 2
บล็อคที่ 3	25/48	50/24	50/48	25/24	O/O	Cont.	Cont.	50/48	25/48	50/24	25/24	O/O	บล็อคที่ 4
บล็อคที่ 5	O/O	50/24	50/48	Cont.	25/24	25/48	O/O	50/24	Cont.	25/48	25/24	50/48	บล็อคที่ 6
บล็อคที่ 7	50/48	Cont.	25/24	50/24	25/48	O/O							
บล็อคที่ 8	Cont.	25/48	50/48	O/O	50/24	25/24							

ทิศเหนือของแปลง

Cont.(Control) = อ้อยที่เจริญจากตัดลำที่ไม่แช่ EMS

O/O = อ้อยที่เจริญจากตัดลำที่ไม่แช่ EMS แต่ถือเป็นอีก 1 การทดลอง

25/24 = อ้อยที่เจริญจากตัดลำที่แช่ EMS เข้มข้น 25 ppm. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

25/48 = อ้อยที่เจริญจากตัดลำที่แช่ EMS เข้มข้น 25 ppm. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

50/24 = อ้อยที่เจริญจากตัดลำที่แช่ EMS เข้มข้น 50 ppm. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

50/48 = อ้อยที่เจริญจากตัดลำที่แช่ EMS เข้มข้น 50 ppm. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง