รายงานวิจัย

เรื่อง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวเหนียวพันธุ์ต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

(Tissue Culture of Glutinous Rice in North-East of Thailand)

โดย

นางสาวพรรณณี รอดแรงบุญ

นางสาวนารีรัตน์ มูลใจ

พ.ศ.2540

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(6)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	5
ผลการทดลอง	12
วิจารณ์	38
สรุป	40
เอกสารอ้างอิง	42
ภาคผนวก	44

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	อาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2, 4-D และ kinetin ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อใช้เพาะเลี้ยงเมล็ดให้เกิดแคลลัส	7
2	อาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ GA_3 ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อใช้เพาะเลี้ยงเมล็ดให้เกิดยอดหลาย ๆ ยอด	10
3	ผลการเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ก้านตาล ให้เจริญเป็นแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2, 4-D และ kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์	14
4	ผลการเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ข้าวดอ ให้เจริญเป็นแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2, 4-D และ kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์	15
5	ผลการเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ตีนเต่า ให้เจริญเป็นแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2, 4-D และ kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์	16
6	ผลการเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์นางดำ ให้เจริญเป็นแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2, 4-D และ kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์	17
7	ผลการเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์อีเตี้ย ให้เจริญเป็นแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2, 4-D และ kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์	18

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

8 ผลการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ก้านตาล อายุ 3 สัปดาห์ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 20

9 ผลการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ข้าวดอ อายุ 3 สัปดาห์ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 21

10 ผลการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ดีนเต่า อายุ 3 สัปดาห์ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 22

11 ผลการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์นางดำ อายุ 3 สัปดาห์ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 23

12 ผลการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์อีเตี้ย อายุ 3 สัปดาห์ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 24

13 ผลการเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ก้านตาล ให้เจริญเป็นยอดหลาย ๆ ยอด ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ GA_3 ในระดับความเข้มข้มต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 26

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

14 ผลการเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ข้าวดอ ให้เจริญเป็นยอดหลาย ๆ ยอด ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ GA_3 ในระดับความเข้มข้มต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 27

15 ผลการเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ตีนเต่า ให้เจริญเป็นยอดหลาย ๆ ยอด ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ GA_3 ในระดับความเข้มข้มต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 28

16 ผลการเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์นางดำ ให้เจริญเป็นยอดหลาย ๆ ยอด ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ GA_3 ในระดับความเข้มข้มต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 29

17 ผลการเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์อีเตี้ย ให้เจริญเป็นยอดหลาย ๆ ยอด ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ GA_3 ในระดับความเข้มข้มต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 30

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
1	องค์ประกอบสูตรอาหารของ Murashige และ Skoog (MS) (1962)	45

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของแคลลัสที่เซลล์เกาะกันหลวม ๆ (friable callus)	32
2	ลักษณะของแคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์ที่เกาะกันแน่น (Compact callus) และเซลล์ที่เกาะกันหลวม ๆ (friable callus)	33
3	ลักษณะบริเวณสีเขียว (green spot) ที่เกิดบนแคลลัส	34
4	ลักษณะยอดอ่อนที่พัฒนามาจากแคลลัส	35
5	ลักษณะการเกิดยอดจำนวนหลาย ๆ ยอด (multiple shoot)	36
6	ลักษณะต้นอ่อนที่นำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ	37

คำนำ

ข้าว *(Oryza sativa)* เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่อประเทศไทย ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นับเป็นแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญแห่งหนึ่งของประเทศ แต่ในปัจจุบันพบว่า ข้าวบางพันธุ์ที่เกษตรกรปลูกเพื่อบริโภคและส่งขาย มีผลผลิตต่อไร่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งสาเหตุมาจากต้นข้าวไม่สามารถปรับตัวได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น สภาพความแห้งแล้ง สภาพดินเค็ม อีกทั้งไม่ต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรู ทรงต้นสูงหักล้มง่าย

ปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้เข้ามามีบทบาทต่อโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวมากขึ้น เช่น สร้างสายพันธุ์กลายที่มีลักษณะพึงประสงค์ ได้แก่ สายพันธุ์ที่ทนเค็ม สายพันธ์ที่ต้านทานต่อความแห้งแล้ง สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคหรือแมลงบางชนิด เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม การที่จะใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้เกิดผลดังกล่าว จำเป็นที่จะต้องศึกษาข้อมูลพื้นฐานเสียก่อน เพราะฉะนั้นในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงจำเป็นที่จะต้องศึกษาข้อมูลพื้นฐานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว เพื่อที่จะนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยใช้เทคนิคชั้นสูง เช่น เทคนิคการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ เทคนิคพันธุวิศวกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ต่าง ๆ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส (callus) และหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัส เพื่อชักนำให้เกิดต้นอ่อน

2. เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ต่าง ๆ เพื่อชักนำให้เกิดยอดหลาย ๆ ยอด (multiple shoot)

3. เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการย้ายต้นอ่อนออกปลูกในสภาพธรรมชาติ เพื่อให้เกิดอัตราการรอดตายสูงสุด

การตรวจเอกสาร

ข้าวเป็นธัญพืชที่จัดอยู่ใน Family Gramineae Genus Oryza Sub-Tribe Oryzineae เป็นพืช diploid มีจำนวนโครโมโซม 2n = 24 (นพพร, 2526) เป็นพืชผสมตัวเอง (self fertilized crop) เกือบ 100 เปอร์เซนต์ จึงมีความเป็น homozygous สูง มียีนที่ควบคุมลักษณะต่าง ๆ มากกว่า 300 ยีน (วาสนา, 2523) ประกอบด้วย 23 species โดยเป็นข้าวป่า 21 species ข้าวปลูก 2 species ได้แก่ *Oryza sativa* มีปลูกกันทั่วไป และ *Oryza glaberrima* มีปลูกเฉพาะในแอฟริกาเท่านั้น

สำหรับข้าวพวก *O. sativa* ซึ่งมีปลูกกันอย่างแพร่หลายในประเทศต่าง ๆ นั้น ได้ยึดถือเอาลักษณะภายนอกของต้น เมล็ด และเปอร์เซนต์เมล็ดลีบของข้าวลูกผสม (hybrid sterility) เป็นหลักในการแบ่งออกเป็น 3 พวก ได้แก่

1. Japonica เป็นข้าวที่ปลูกในเขตอบอุ่น ได้แก่ จีน ญี่ปุ่น เกาหลี เป็นต้น
2. Indica เป็นข้าวที่ปลูกในเขตร้อน ได้แก่ ไทย อินเดีย ฟิลิปปินส์ เป็นต้น
3. Javanica เป็นข้าวที่ปลูกในอินโดนีเซียเท่านั้น

ปัจจุบันมีผู้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาใช้ร่วมในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าว โดยมีจุดประสงค์แตกต่างกันไป เช่น ผลิตสายพันธุ์แท้ ผลิตพันธุ์ต้านทานโรคหรือแมลง ผลิตพันธุ์ข้าวทนเค็มทนต่อสภาพความเป็นกรดหรือด่าง ทนต่อความแห้งแล้ง อย่างไรก็ตาม การที่จะบรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าวจำเป็นจะต้องศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวพื้นฐานเสียก่อน ซึ่งมีผู้ประสบผลสำเร็จในการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก เช่น ในข้าวพันธุ์ Kyoto Asahi (Nishi ed al., 1968) พันธุ์ Taichung No.65 (Wu and Li, 1970) พันธุ์ Aichiasahi และ Kinmaze (Meada, 1980) พันธุ์บาสมาติ 370 (Raina ey al., 1978 เผดิมและคณะ 2532) ข้าวป่าพันธุ์แพริกัน *(Oryza langistaminate)* (Boissot, 1990) พันธุ์ Lemont, Rico I, Rexmont, Taipe 309, IR 64 และ IR 36 (Peterson and Roberta, 1991)

การที่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวได้รับการพัฒนาอย่างรวดเร็ว เนื่องมาจากชิ้นส่วนของต้นเกือบทุกส่วน สามารถนำมาเพาะเลี้ยงให้สร้างแคลลัสได้ เมื่อย้ายแคลลัสที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมาะสม สามารถพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ (Henke และคณะ, 1978 : Vajrabaya และคณะ, 1986 : Wang และคณะ, 1987)

Nabors และคณะ (1983) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในธัญญพืชต่าง ๆ กลุ่มเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ได้ต้องเป็นแคลลัสชนิด E (embryogenic callus) สำหรับแคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวมีสีขาวหรือสีนวล ผิวแห้งมีปุ่มปมเล็ก ๆ และแคลลัสชนิดที่มีสีเหลืองค่อนข้างนิ่ม โดยทั่วไปพบว่ามีแคลลัสมากกว่า 1 ชนิดอยู่ร่วมกัน ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นพืชต้นใหม่ของแคลลัสทั้ง 2 ชนิดต่างกัน (Ling และคณะ, 1930) อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงทั่วไปมักส่งเสริมการเจริญของแคลลัสชนิด NE (non embryogenic callus) แต่ยับยั้งการเจริญของแคลลัสชนิด E (embryogenic callus) (รัชนี และคณะ, 2529) แคลลัสที่ชักนำได้จากเมล็ดหรือส่วนของคัพภะของข้าวส่วนใหญ่จะเกิดจากบริเวณ scutellum และ mesocotyl bud แคลลัสที่เกิดจากบริเวณ scutellum นั้นเนื่องจากการขยายตัวของเซลล์ pacenchyma และการแบ่งตัวของเซลล์ epithelium (Wu และ Li, 1970 : Maeda, 1980)

Ketchum และคณะ (1987) รายงานว่า เมล็ดข้าวที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วเหมาะสมมากต่อการนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพราะจะให้การเกิดแคลลัสที่เป็น embryogenic callus ที่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ดี ข้าวพันธุ์ต่าง ๆ มีการตอบสนองต่ออาหารเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน ทั้งการชักนำแคลลัสและชักนำให้เกิดต้น (Kamiya และคณะ, 1988) ความสามารถที่จะพัฒนาไปเป็นต้นจะมีความแตกต่างกันมากยิ่งกว่าอัตราการเกิดแคลลัส กับความสามารถที่จะพัฒนาไปเป็นต้นนั้นไม่เกี่ยวข้องกันเช่นเดียวกับที่ควบคุมการเกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ที่นำมาเพาะเลี้ยง (Davoyan, 1987)

อุปกรณ์

1. เมล็ดข้าว 5 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ก้านตาล พันธุ์ข้าวดอ พันธุ์ตีนเต่า พันธุ์นางดำ และพันธุ์อีเตี้ย

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร MS (Murashige และ Skoog, 1962)

2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid), kinetin (6-furfurylaminopurine), BA (Benzyl amino purine), GA_3 (Gibberellic acid) และ casine hydrolysate

2.3 กรดอะมิโน ได้แก่ proline, cysteine และ glutamine

2.4 สารเคมีสำหรับฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ คลอรอกซ์ (clorox) หรือ haiter, สารเปียกใบ (ทวีน 20)

2.5 แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซนต์

2.6 ยาสำหรับป้องกันเชื้อรา

2.7 น้ำกลั่น

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับเตรียมอาหาร ได้แก่ หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ขวดบรรจุอาหารพร้อมฝาปิด เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบหยาบ เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง เตาไฟฟ้า เตาแก๊ส บีกเกอร์ กระบอกตวง แท่งแก้วคน และช้อนตักสาร

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับฟอกฆ่าเชื้อ และถ่ายเนื้อเยื่อ ได้แก่ ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ (laminar air flow cabinet) ฟลาสก์ ตะเกียงแอลกอฮอล์ จานแก้ว ปากคีบ มีดผ่าตัด

4. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4.1 อุปกรณ์ภายในห้องประกอบด้วยชั้นวางที่ติดตั้งหลอดไฟเรืองแสงสีขาว (cool white) พร้อมเครื่องควบคุมเวลา (time switch) และเครื่องปรับอากาศ

4.2 สภาพแวดล้อมภายในห้องมีอุณหภูมิประมาณ 25±2 องศาเซลเซียส ช่วงแสง 16/8 คือ มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมง มืด 8 ชั่วโมง

5. วัสดุและภาชนะที่ใช้สำหรับปลูกต้นอ่อน ได้แก่ ดินนา ใส่ลงในกระถางขนาดกว้าง 3 นิ้ว

6. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับถ่ายภาพ

วิธีการ

การทดลองแบ่งออกเป็น 4 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เมล็ดข้าวพันธุ์ต่าง ๆ เจริญเป็นแคลลัส (callus)

นำเมล็ดข้าวเปลือกพันธุ์ก้านตาล พันธุ์ข้าวดอ พันธุ์ดีนเด่า พันธุ์นางดำ และพันธุ์อีเตี้ย มาแกะเอาเปลือกออก จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) โดยแช่เมล็ดข้าวในสารละลายแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที แล้วย้ายลงในสารละลายคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารเปียกใบ (ทวีน 20) จำนวน 3-4 หยด เขย่าเป็นครั้งคราวนาน 30 นาที และล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลง ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ kinetin ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ได้อาหารทั้งหมด 6 สูตร (ตารางที่ 1) โดยอาหารทุกสูตรจะเสริมด้วย casein hydrolysate 1 กรัมต่อลิตร และกรดอะมิโนบางชนิด ปรับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.6 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 1 อาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D และ kinetin ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อใช้เพาะเลี้ยงเมล็ดให้เกิดแคลลัส

สูตรอาหาร	สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)	
	2,4-D	kinelin
1	-	-
2	0.5	1.0
3	1.0	1.0
4	2.0	1.0
5	3.0	1.0
6	4.0	1.0

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสและลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น โดยใช้สัญลักษณ์แทนดังนี้

C หมายถึง แคลลัสที่เซลล์เกาะกันแน่น (compact callus)

F หมายถึง แคลลัสที่เซลล์เกาะกันหลวม ๆ (friable callus)

T หมายถึง แคลลัสที่เซลล์อยู่ระหว่างแบบ C และ F

ดังตัวอย่างแสดงในภาพที่ 1

การทดลองที่ 2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้น

นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ในอาหารสูตรที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 อายุ 3 สัปดาห์ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลง ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0,1,2,3,4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้อาหารทั้งหมด 6 สูตร โดยอาหารทุกสูตรจะเสริมด้วย casein hydrolysate 1 กรัมต่อลิตร และกรดอะมิโนบางชนิด ปรับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.6 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพแวดล้อมเดิมเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อนของแคลลัส โดยใช้สัญลักษณ์แทนดังนี้

G หมายถึง แคลลัสมีพื้นที่สีเขียวเกิดขึ้น

S หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอด

R หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นราก

P หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอด และราก

N หมายถึง แคลลัสไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอด และราก

การทดลองที่ 3 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เมล็ดข้าวพันธุ์ต่าง ๆ เจริญเป็นยอดหลาย ๆ ยอด (multiple shoot)

นำเมล็ดข้าวเปลือกพันธุ์ก้านตาล พันธุ์ข้าวดอ พันธุ์ตืนเต่า พันธุ์นางดำ และพันธุ์อีเตี้ย มาแกะเอาเปลือกออก จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) โดยแช่เมล็ดข้าวในสารละลายแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ นาน 3 นาที แล้วย้ายลงในสารละลายคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ที่เติมสารเปียกใบ (ทวีน 20) จำนวน 3-4 หยด เขย่าเบ็นครั้งคราว นาน 30 นาที และล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ GA_3 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ได้อาหารทั้งหมด 6 สูตร (ตารางที่ 2) โดยอาหารทุกสูตรจะเสริมด้วย casein hydrolysate 1 กรัมต่อลิตร และกรดอะมิโนบางชนิด ปรับความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.6 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 2 อาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D และ kinetin ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อใช้เพาะเลี้ยงเมล็ดให้เกิดยอดหลาย ๆ ยอด

สูตรอาหาร	สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)	
	BA	GA_3
1	-	-
2	1	1
3	5	1
4	10	1
5	15	1
6	20	1

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกการเกิดจำนวนยอด โดยใช้สัญลักษณ์แทนดังนี้

\+ หมายถึง จำนวนยอด 1-5 ยอด

\++ หมายถึง จำนวนยอด 6-10 ยอด

\+++ หมายถึง จำนวนยอด 11-15 ยอด

\++++ หมายถึง จำนวนยอด 16-20 ยอด

การทดลองที่ 4 ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการย้ายต้นอ่อนออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

เมื่อให้ต้นข้าวที่สมบูรณ์ ย้ายลงปลูกในกระถาง โดยแบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

1. นำต้นอ่อนที่มีระบบยอดและรากดีมีความสูง 8-10 เซนติเมตร ออกจากขวดเพาะเลี้ยง นำไปล้างเอาวุ้นออกให้หมด จากนั้นนำไปแช่ในน้ำยาป้องกันเชื้อราความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร นาน 3 นาที

2. นำต้นอ่อนที่ผ่านการแช่น้ำยาป้องกันเชื้อราแล้ว ไปปลูกในกระถางขนาดกว้าง 3 นิ้ว ซึ่งบรรจุดินนา โดยแยกปลูกต้นอ่อน 1 ต้น ต่อ 1 กระถาง จากนั้นนำกระถางไปวางไว้ในสภาพแวดล้อมเดิม คือ มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์

3. ย้ายกระถางออกมาวางในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติเป็นเวลา 2 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลองเดือน ตุลาคม 2539 สิ้นสุดการทดลองเดือน กันยายน 2540

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เมล็ดข้าวพันธุ์ต่าง ๆ เจริญเป็นแคลลัส

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (ตารางที่ 1) พบว่า อาหารทุกสูตรที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำเมล็ดให้เจริญเป็นแคลลัสได้ โดยพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวได้ประมาณ 2 วัน จะมีการงอกของต้นกล้าบริเวณส่วนของคัพภะ และภายในสัปดาห์แรกจะสังเกตเห็นแคลลัสเกิดขึ้น ในบริเวณส่วนฐานซึ่งเป็นบริเวณเดียวกับการงอกของของต้นกล้า โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นในระยะแรกจะมีสีเหลืองอ่อน ประกอบด้วยเซลล์ที่มีขนาดเล็ก มีทั้งแบบที่เซลล์เกาะกันแน่น (compact callus) และแบบที่เซลล์เกาะกันหลวม ๆ (friable callus) ซึ่งจะพบว่าเกิดแยกกันในแต่ละก้อน แต่ก็พบว่า มีแคลลัสบางก้อนที่ประกอบด้วยเซลล์ 2 ชนิดรวมกัน ในสัปดาห์ต่อมาแคลลัสจะมีขนาดใหญ่ขึ้น แคลลัสบางส่วนจะมีสีเข้มขึ้น เซลล์ค่อนข้างร่วน เกาะกันอย่างหลวม ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 3 สัปดาห์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของข้าวแต่ละพันธุ์ในอาหารแต่ละสูตรจะมีค่าอยู่ระหว่าง 20-83 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3-7) โดยสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเมล็ดให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดในข้าวแต่ละพันธุ์มีดังนี้ คือ

1. **พันธุ์ก้านตาล** ได้แก่ สูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสเฉลี่ย 60 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)

2. **พันธุ์ข้าวดอ** ได้แก่ สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสเฉลี่ย 51 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4)

3. **พันธุ์ตีนเต่า** ได้แก่ สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสเฉลี่ย 83 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5)

4. **พันธุ์นางดำ** ได้แก่ สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสเฉลี่ย 78 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6)

5. **พันธุ์อีเตี้ย** ได้แก่ สูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสเฉลี่ย 59 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 3 ผลการเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ก้านตาล ให้เจริญเป็นแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D และ kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนเมล็ดที่เพาะเลี้ยง	ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น			จำนวนเมล็ดที่เกิดแคลลัส	% การเกิดแคลลัส
		C	F	T		
1	100	-	-	-	-	-
2	100	4	7	9	20	20
3	100	4	5	14	23	23
4	100	10	19	25	54	54
5	100	11	16	33	60	60
6	100	7	15	29	51	51

สัญลักษณ์แทนลักษณะแคลลัส

C หมายถึง แคลลัสที่เซลล์เกาะกันแน่น (compact callus)

F หมายถึง แคลลัสที่เซลล์เกาะกันหลวม ๆ (friable callus)

T หมายถึง แคลลัสที่เซลล์อยู่ระหว่างแบบ C และ F

ตารางที่ 4 ผลการเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ข้าวดอ ให้เจริญเป็นแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D และ kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนเมล็ดที่เพาะเลี้ยง	ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น			จำนวนเมล็ดที่เกิดแคลลัส	% การเกิดแคลลัส
		C	F	T		
1	100	-	-	-	-	-
2	100	9	9	17	35	35
3	100	-	8	17	32	32
4	100	5	13	32	50	50
5	100	5	25	10	40	40
6	100	15	16	20	51	51

สัญลักษณ์แทนลักษณะแคลลัส

C หมายถึง แคลลัสที่เซลล์เกาะกันแน่น (compact callus)

F หมายถึง แคลลัสที่เซลล์เกาะกันหลวม ๆ (friable callus)

T หมายถึง แคลลัสที่เซลล์อยู่ระหว่างแบบ C และ F

ตารางที่ 5 ผลการเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ตีนเต่า ให้เจริญเป็นแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D และ kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนเมล็ดที่เพาะเลี้ยง	ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น			จำนวนเมล็ดที่เกิดแคลลัส	% การเกิดแคลลัส
		C	F	T		
1	100	-	-	-	-	-
2	100	11	16	33	60	60
3	100	17	20	35	72	72
4	100	13	16	54	83	83
5	100	9	10	31	50	50
6	100	11	18	34	63	63

สัญลักษณ์แทนลักษณะแคลลัส

C หมายถึง แคลลัสที่เซลล์เกาะกันแน่น (compact callus)

F หมายถึง แคลลัสที่เซลล์เกาะกันหลวม ๆ (friable callus)

T หมายถึง แคลลัสที่เซลล์อยู่ระหว่างแบบ C และ F

ตารางที่ 6 ผลการเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์นางดำ ให้เจริญเป็นแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D และ kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนเมล็ดที่เพาะเลี้ยง	ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น			จำนวนเมล็ดที่เกิดแคลลัส	% การเกิดแคลลัส
		C	F	T		
1	100	-	-	-	-	-
2	100	15	18	18	51	51
3	100	10	19	30	59	59
4	100	11	26	41	78	78
5	100	16	12	38	66	66
6	100	14	18	39	71	71

สัญลักษณ์แทนลักษณะแคลลัส

C หมายถึง แคลลัสที่เซลล์เกาะกันแน่น (compact callus)

F หมายถึง แคลลัสที่เซลล์เกาะกันหลวม ๆ (friable callus)

T หมายถึง แคลลัสที่เซลล์อยู่ระหว่างแบบ C และ F

ตารางที่ 7 ผลการเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์อีเตี้ย ให้เจริญเป็นแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D และ kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนเมล็ดที่เพาะเลี้ยง	ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น			จำนวนเมล็ดที่เกิดแคลลัส	% การเกิดแคลลัส
		C	F	T		
1	100	-	-	-	-	-
2	100	5	8	9	22	22
3	100	11	21	27	59	59
4	100	15	17	18	50	50
5	100	5	10	12	27	27
6	100	7	11	14	32	32

สัญลักษณ์แทนลักษณะแคลลัส

C หมายถึง แคลลัสที่เซลล์เกาะกันแน่น (compact callus)

F หมายถึง แคลลัสที่เซลล์เกาะกันหลวม ๆ (friable callus)

T หมายถึง แคลลัสที่เซลล์อยู่ระหว่างแบบ C และ F

การทดลองที่ 2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้น

เมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ kinetin ความเข้มข้นที่เหมาะสมของข้าวแต่ละพันธุ์อายุ 3 สัปดาห์ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0 1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารทุกสูตรสามารถชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ โดยสังเกตเห็นว่าในสัปดาห์แรกจะเกิดบริเวณพื้นที่สีเขียว (green spot) บนผิวแคลลัส จากนั้นบริเวณพื้นที่สีเขียวจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอดอ่อน โดยแคลลัสแต่ละก้อนจะเกิดยอดอ่อนจำนวนไม่เท่ากัน ซึ่งพบว่า เกิดยอดอ่อนตั้งแต่ 1-6 ยอดต่อแคลลัส 1 ก้อน และพบว่าจะมีการเจริญของรากเกิดขึ้นในเวลาต่อมา ทำให้ได้ต้นที่สมบูรณ์โดยไม่ต้องนำยอดไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่จะชักนำให้เกิดราก นอกจากนั้นยังพบแคลลัสบางส่วนที่มีการเจริญของรากขึ้นมาก่อน แต่ไม่พบว่ามีการเจริญของยอดตามมา และแคลลัสบางส่วนจะมีแต่การขยายขนาดเท่านั้น ไม่พบการเจริญของทั้งยอดและราก หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นของอาหารแต่ละสูตรจะมีค่าอยู่ระหว่าง 20-75 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8-12) โดยอาหารสูตรที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุดในข้าวแต่ละพันธุ์มีดังนี้ คือ

1. **พันธุ์ก้านตาล** ได้แก่ สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8)

2. **พันธุ์ข้าวดอ** ได้แก่ สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 60 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9)

3. **พันธุ์ตีนเต่า** ได้แก่ สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 75 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10)

4. **พันธุ์นางดำ** ได้แก่ สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 35 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11)

5. **พันธุ์อีเตี้ย** ได้แก่ สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 45 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 8 ผลการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ก้านตาล อายุ 3 สัปดาห์ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ kinetin (มก./ล.)	จำนวนแคลลัสที่เพาะเลี้ยง	การเปลี่ยนแปลงของแคลลัส					% การเกิดต้น
		G	S	R	P	N	
0	20	10	1	2	6	11	30
1	20	11	1	1	8	10	40
2	20	15	-	2	10	8	50
3	20	12	1	-	5	14	25
4	20	12	1	-	6	13	30
5	20	8	2	-	4	12	20

สัญลักษณ์แทนลักษณะแคลลัส

G หมายถึง แคลลัสมีพื้นที่สีเขียวเกิดขึ้น

S หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอด

R หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นราก

P หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดและราก

N หมายถึง แคลลัสไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอดและราก

ตารางที่ 9 ผลการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ข้าวดอ อายุ 3 สัปดาห์ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ kinetin (มก./ล.)	จำนวนแคลลัสที่เพาะเลี้ยง	การเปลี่ยนแปลงของแคลลัส					% การเกิดต้น
		G	S	R	P	N	
0	20	12	-	-	7	13	35
1	20	9	-	1	5	14	25
2	20	15	1	1	10	8	50
3	20	14	-	-	12	8	60
4	20	10	-	1	7	12	35
5	20	8	-	-	6	14	30

สัญลักษณ์แทนลักษณะแคลลัส

G หมายถึง แคลลัสมีพื้นที่สีเขียวเกิดขึ้น

S หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอด

R หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นราก

P หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดและราก

N หมายถึง แคลลัสไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอดและราก

ตารางที่ 10 ผลการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ดีนเต่า อายุ 3 สัปดาห์ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ kinetin (มก./ล.)	จำนวนแคลลัสที่เพาะเลี้ยง	การเปลี่ยนแปลงของแคลลัส					% การเกิดต้น
		G	S	R	P	N	
0	20	12	1	-	10	9	50
1	20	16	1	-	15	14	75
2	20	12	-	-	9	9	45
3	20	10	-	2	9	6	45
4	20	14	-	1	12	11	60
5	20	16	1	-	13	12	65

สัญลักษณ์แทนลักษณะแคลลัส

G หมายถึง แคลลัสมีพื้นที่สีเขียวเกิดขึ้น

S หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอด

R หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นราก

P หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดและราก

N หมายถึง แคลลัสไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอดและราก

ตารางที่ 11 ผลการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์นางดำ อายุ 3 สัปดาห์ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ kinetin (มก./ล.)	จำนวนแคลลัสที่เพาะเลี้ยง	การเปลี่ยนแปลงของแคลลัส					% การเกิดต้น
		G	S	R	P	N	
0	20	10	-	-	6	6	30
1	20	12	-	-	7	7	35
2	20	6	1	-	5	4	25
3	20	8	1	1	6	4	30
4	20	5	-	-	4	4	20
5	20	8	1	-	4	3	20

สัญลักษณ์แทนลักษณะแคลลัส

G หมายถึง แคลลัสมีพื้นที่สีเขียวเกิดขึ้น

S หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอด

R หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นราก

P หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดและราก

N หมายถึง แคลลัสไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอดและราก

ตารางที่ 12 ผลการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์อีเตี้ย อายุ 3 สัปดาห์ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ kinetin (มก./ล.)	จำนวนแคลลัสที่เพาะเลี้ยง	การเปลี่ยนแปลงของแคลลัส					% การเกิดต้น
		G	S	R	P	N	
0	20	8	-	2	5	3	25
1	20	9	-	-	5	5	25
2	20	10	1	-	7	6	35
3	20	10	1	-	9	8	45
4	20	12	-	-	10	10	50
5	20	11	-	-	8	8	40

สัญลักษณ์แทนลักษณะแคลลัส

G หมายถึง แคลลัสมีพื้นที่สีเขียวเกิดขึ้น

S หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอด

R หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นราก

P หมายถึง แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดและราก

N หมายถึง แคลลัสไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอดและราก

การทดลองที่ 3 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เมล็ดข้าวพันธุ์ต่าง ๆ เจริญเป็นยอดหลาย ๆ ยอด

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ GA_3 ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (ตารางที่ 2) พบว่า อาหารทุกสูตรที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำให้เมล็ดเกิดยอดหลาย ๆ ยอดได้ โดยพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวได้ประมาณ 2 วัน จะมีการงอกของต้นกล้าบริเวณส่วนของคัพภะ และภายใน 2 สัปดาห์จะมียอดจำนวนหลาย ๆ ยอดเกิดขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์ พบว่า การเกิดยอดของข้าวแต่ละพันธุ์ในอาหารแต่ละสูตรจะมีค่าอยู่ระหว่าง 1-20 ยอด โดยอาหารสูตรที่เหมาะสมในการชักนำเมล็ดให้เกิดยอดหลาย ๆ ยอดได้ดีที่สุด ในข้าวแต่ละพันธุ์มีดังนี้ คือ

1. **พันธุ์ก้านตาล** ได้แก่ สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดอยู่ระหว่าง 16-20 ยอด (ตารางที่ 13)

2. **พันธุ์ข้าวดอ** ได้แก่ สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดอยู่ระหว่าง 16-20 ยอด (ตารางที่ 14)

3. **พันธุ์ตีนเต่า** ได้แก่ สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 15 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดอยู่ระหว่าง 16-20 ยอด (ตารางที่ 15)

4. **พันธุ์นางดำ** ได้แก่ สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดอยู่ระหว่าง 16-20 ยอด (ตารางที่ 16)

5. **พันธุ์อีเตี้ย** ได้แก่ สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดอยู่ระหว่าง 16-20 ยอด (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 13 ผลการเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ก้านตาล ให้เจริญเป็นยอดหลาย ๆ ยอดในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ GA_3 ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนเมล็ดที่เพาะเลี้ยง	ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดที่เกิดขึ้นต่อ 1 เมล็ด
1	30	+
2	30	++
3	30	++++
4	30	+++
5	30	++
6	30	++

สัญลักษณ์แทนจำนวนยอด

+ หมายถึง จำนวนยอด 1-5 ยอด

++ หมายถึง จำนวนยอด 6-10 ยอด

+++ หมายถึง จำนวนยอด 11-15 ยอด

++++ หมายถึง จำนวนยอด 16-20 ยอด

ตารางที่ 14 ผลการเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ข้าวดอ ให้เจริญเป็นยอดหลาย ๆ ยอดในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ GA_3 ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนเมล็ดที่เพาะเลี้ยง	ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดที่เกิดขึ้นต่อ 1 เมล็ด
1	30	+
2	30	++
3	30	+++
4	30	++++
5	30	++
6	30	++

สัญลักษณ์แทนจำนวนยอด

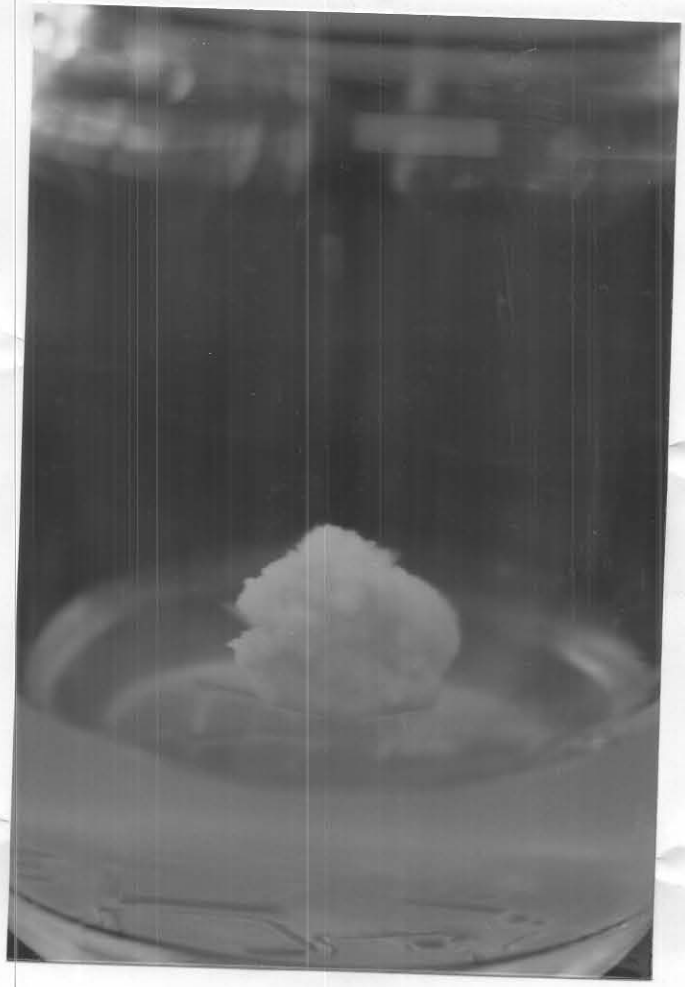
+	หมายถึง	จำนวนยอด	1-5	ยอด
++	หมายถึง	จำนวนยอด	6-10	ยอด
+++	หมายถึง	จำนวนยอด	11-15	ยอด
++++	หมายถึง	จำนวนยอด	16-20	ยอด

ตารางที่ 15 ผลการเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ตีนเต่า ให้เจริญเป็นยอดหลาย ๆ ยอดในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA และ GA_3 ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนเมล็ดที่เพาะเลี้ยง	ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดที่เกิดขึ้นต่อ 1 เมล็ด
1	30	+
2	30	++
3	30	+++
4	30	++++
5	30	+++
6	30	++

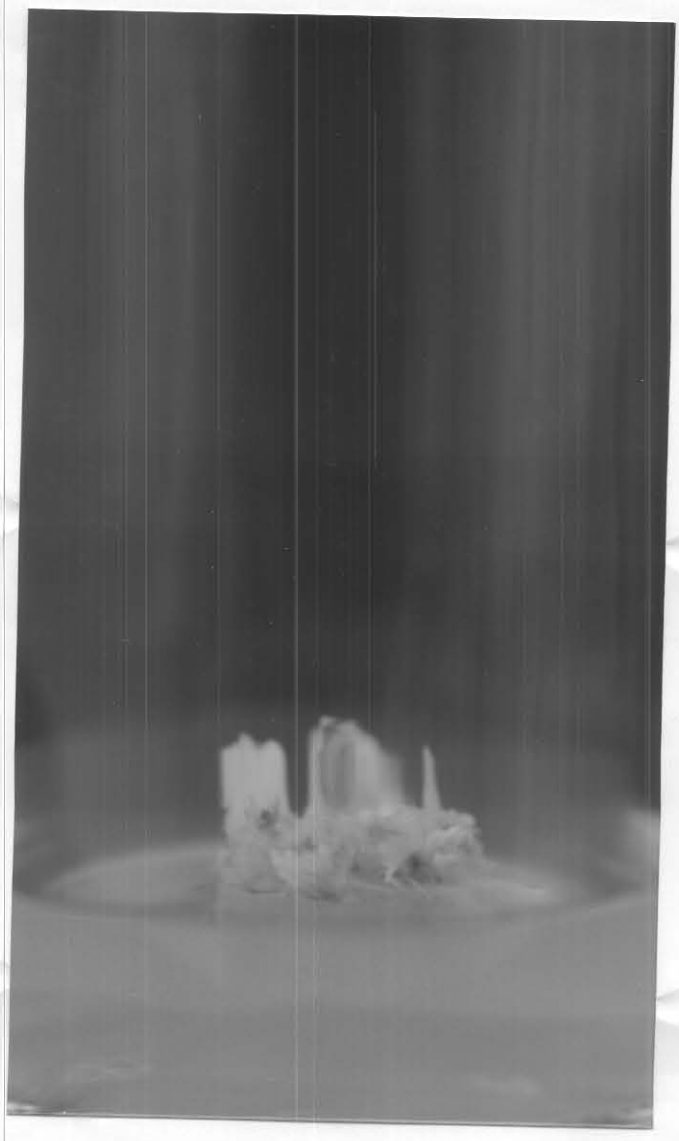
สัญลักษณ์แทนจำนวนยอด

+	หมายถึง	จำนวนยอด	1-5	ยอด
++	หมายถึง	จำนวนยอด	6-10	ยอด
+++	หมายถึง	จำนวนยอด	11-15	ยอด
++++	หมายถึง	จำนวนยอด	16-20	ยอด



ภาพที่ 1 ลักษณะของแคลลัสที่เซลล์เกาะกันหลวม ๆ (friable callus)

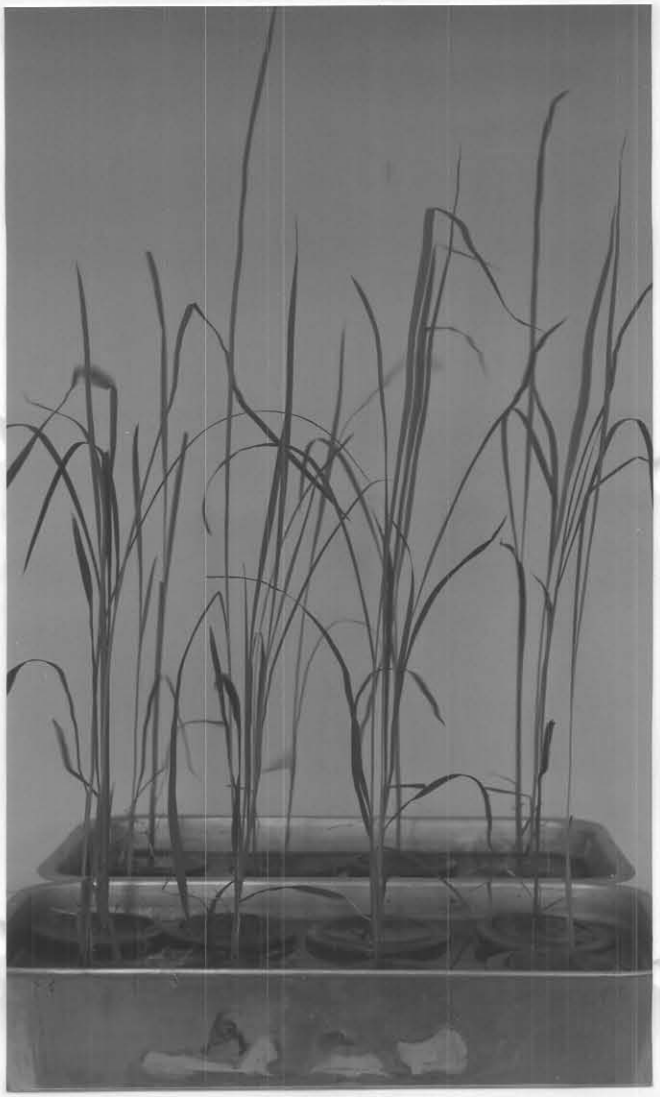
ภาพที่ 2 ลักษณะของแคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์ที่เกาะกันแน่น (compact callus) และเซลล์ที่เกาะกันหลวม ๆ (friable callus)



ภาพที่ 3 ลักษณะบริเวณสีเขียว (green spot) ที่เกิดบนแคลลัส

ภาพที่ 4 ลักษณะยอดอ่อนที่พัฒนามาจากแคลลัส

ภาพที่ 5 ลักษณะการเกิดยอดอ่อนจำนวนหลาย ๆ ยอด (multiple shoot)



ภาพที่ 6 ลักษณะต้นอ่อนที่นำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

วิจารณ์

ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ต่าง ๆ 5 พันธุ์ ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 6 สูตร เมื่อชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่า อาหารแต่ละสูตรมีผลต่อการเกิดแคลลัสในข้าวแต่ละพันธุ์แตกต่างกันไป โดยพบว่า อาหารที่สามารถชักนำเมล็ดให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดในข้าวแต่ละพันธุ์ คือ อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 1-4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 51-83 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Raina และคณะ (1993) ที่ได้ใช้ 2,4-D และ kinetin ในการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยพบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวได้ 1 สัปดาห์ จะสังเกตเห็นแคลลัสเจริญมาจากเนื้อเยื่อ ในส่วนของ scutellum ซึ่งในบริเวณนี้จะเป็นบริเวณที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว (Siriwardana และ Nabors, 1983; Gosal และคณะ, 1993) และลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ แคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์ขนาดเล็ก สีขาวหรือสีเหลือง ผิวแห้ง เซลล์เกาะกันแน่น ค่อนข้างแข็ง ซึ่งเป็นลักษณะของ embryogenic callus มีความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นได้ (Nabors และคณะ, 1983; Ketchum และคณะ, 1987; Vajrabhaya และคณะ, 1989) และแคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์ขนาดเล็กสีเหลือง ผิวค่อนข้างนิ่ม เซลล์เกาะกันอย่างหลวม ๆ ซึ่งเป็นลักษณะของ non-embryogenic callus ไม่มีความสามารถพัฒนาไปเป็นต้น จากจำนวนแคลลัสที่เกิดจะมีแคลลัสทั้ง 2 ชนิด เกิดขึ้นในจำนวนที่ใกล้เคียงกัน นั่นแสดงว่าอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสามารถส่งเสริมการเจริญของแคลลัสทั้ง 2 ชนิด

ในการทดลองชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นนั้น ได้ใช้แคลลัสที่มาจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในอาหารสูตรที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 ของข้าวแต่ละพันธุ์ อายุ 3 สัปดาห์ มาทำการทดลอง โดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 6 สูตร ซึ่งพบว่า อาหารแต่ละสูตรมีผลต่อการเกิดต้นในข้าวแต่ละพันธุ์แตกต่างกันไป โดยพบว่า อาหารที่สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดต้นได้ดีที่สุดในข้าวแต่ละพันธุ์ คือ อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin 1-3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 35-75 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดลองพบว่า kinetin นอกจากชักนำให้เกิดยอดแล้วยังมีผลกเกิด

เกิดขึ้นด้วย ทำให้ได้ต้นที่สมบูรณ์ ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะว่าในขั้นตอนที่ชักนำเมล็ดให้เจริญเป็นแคลลัสนั้นได้ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดในอาหารสูตรที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ในกลุ่มออกซิน คือ 2,4-D ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดรากได้ ทำให้แคลลัสมีการสะสมของสารควบคุมการเจริญกลุ่มนี้อยู่ เมื่อนำมาชักนำให้พัฒนาเป็นต้น จึงมีรากเกิดขึ้นด้วย

สรุป

จากการเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่า

1. **พันธุ์ก้านตาล** สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 60 เปอร์เซ็นต์ ชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และชักนำเมล็ดให้เกิดยอดหลาย ๆ ยอดได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 16-20 ยอด

2. **พันธุ์ข้าวคอ** สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 51 เปอร์เซ็นต์ ชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุด ในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 60 เปอร์เซ็นต์ และชักนำเมล็ดให้เกิดยอดหลาย ๆ ยอดได้ดีที่สุด ในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 16-20 ยอด

3. **พันธุ์ตีนเต่า** สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 83 เปอร์เซ็นต์ ชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุด ในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 75 เปอร์เซ็นต์ และชักนำเมล็ดให้เกิดยอดหลาย ๆ ยอดได้ดีที่สุด ในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 15 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 16-20 ยอด

4. **พันธุ์นางดำ** สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 78 เปอร์เซ็นต์ ชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุด ในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 35 เปอร์เซ็นต์ และชักนำเมล็ดให้เกิดยอดหลาย ๆ

ยอดได้ดีที่สุด ในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 16-20 ยอด

5. **พันธุ์อีเตี้ย** สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 59 เปอร์เซ็นต์ ชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุด ในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และชักนำเมล็ดให้เกิดยอดหลาย ๆ ยอดได้ดีที่สุด ในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 16-20 ยอด

6. **อัตรากการอยู่รอดของต้นอ่อน** เมื่อนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติของข้าวทุกพันธุ์เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

เอกสารอ้างอิง

นพพร สายัมพล. 2536. **เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 123 น.

เผดิม ระติสุนทร ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา และสุพรรณี แก่นสาร. 2532. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวพันธุ์บาสมาติ 237**. ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 23(3) : 205-210.

รัชนี จำปาเทศ ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และอธิ เจริญทรัพย์. 2529. **อิทธิพลของน้ำมะพร้าวระยะต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของยอด ราก และแคลลัสในข้าว**. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 11(6) : 379-387.

วาสนา พลารักษ์. 2523. **ข้าว**. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. 76 น.

Boissot, N., M. Valdez and E. Guiderdoni. 1990. Plant regeneration from leaf and seed-derived calli and suspension culture of the African perennial wild rice (Oryza longgistaminate). Plant cell Rep. 9 : 447-450.

Davoyan, E.I. 1987. Genetic determination of the processes of callus formation and induction of regenerates in the tissue culture of rice. Rice Abstr. 10 : 238.

Evans, D.A. and W.R. Sharp. 1983. Single gene mutations in tomato Plants regenerated from tissue culture. Science 221 : 949-951.

Henke, R.R., M.A. Mansure and M.J. Constantin. 1978. Organogenesis and plantlet formation from organ and seedling-derived calli of rice (Oryza sativa) Physio. Plant. 44 : 11-14.

Kayima. M., H. Yamanaka and K. Oono. 1988. Intervarietai variations of somatic embryogenesis in rice (Oryza sativa L.). Publ. Natt. Inst. Agrobiol. Resour. 4 : 127-151.

Ling, D.H., W.Y. Ghen, M.F. Chen and Z.R.Ma. 1963. Somatic embryogenesis and plant regeneration in an interspecific hybrid of Oryza. Plant Cell Rep. 2 : 169-171.

Maeda,. E. 1980. Organogenesis and cell culture in rice plants under sterile condition (Part I). JARQ 14 : 4-8.

Nabors, M.W., Heyser, T.A. Dydes and L.J.De Mott.. 1983. Loang duration, night frequency plant regeneration form cereal tissue cultures. Planta 157 : 385-391.

Nishi. T.,Y. Yamada and E. Takahashi. 1968. Organ redifferentiation and plant restoration in rice callus. Nature 219 : 508-509.

Peterson, G. and S. Raina. S.K.. P. Sathish and K.S. Sarma. 1987. Plant regeneration from in vitro cultures of anthers and mature seeds of rice (Oryza sativa L.) Basmati-370. Plant Cell Rep. 6 : 43-45.

Vajrabhaya, M., O Tunvachkul and T. Vajrabhaya. 1986. Effects of auxin and cytokinin on plant regeneration from rice callus. J. Sci. Res. Chula. Univ. 11(2) : 112-115.

Wang, M.S., F.J. Zapata and D.C. De Castro. 1987. Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature seed and young inflorescence of wild rice (Oryza Perennis Maench). Plant cell Rep. 6 : 249-296.

Wu, L. and H.W. Li. 1970. Induction of callus tissues initiation from different somatic organs of rice plant of various concentration of 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid. Cytologia 36 : 411-416.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบสูตรอาหารของ Murashige และ Skoog (MS)

องค์ประกอบ	มก./ล.
ธาตุอาหารหลัก	
$CaCl_2.2H_2O$	440.0
KH_2PO_4	170.0
KNO_3	1,900.0
$MgSo_4.7H_2O$	370.0
NH_4NO_3	1,650.0
ธาตุอาหารรอง	
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
H_3BO_3	6.2
KI	0.83
$MnSO_4.4H_2O$	22.3
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$ZnSO_4.4H_2O$	8.6
Na_2-EDTA	37.3
$FeSO_4.7H_2O$	27.8
สารประกอบอินทรีย์	
Glycine	2.0
Myo-inositol	100.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxin. HCl	0.5
Thiamin. HCl	0.1
Sucrose	30,000.0
pH	5.6