บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. การเตรียมต้นพืชทดลอง

เตรียมดินโดยใช้อัตราส่วนระหว่างดิน : ปุ๋ยคอก : ขี้เถ้าแกลบ อัตรา 3:1:1 อบฆ่าเชื้อที่ติดมากับดินด้วยเมทธิลโบรไมด์ บรรจุดินลงในกล่องฟิล์มทรงกระบอกเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 ซม. สูง 5 ซม. ประมาณครึ่งหนึ่ง แล้วใส่ออสโมโค้ทสูตร 13-13-13 กล่องละ 3 เม็ด บรรจุดินจนกระทั่งเต็มกล่องฟิล์ม

เมล็ดพันธุ์ผักกาดขาวปลีพันธุ์ #23 กับ #161 และผักกาดหัวพันธุ์ #9 กับ #100 เป็นพันธุ์ผสมเปิดที่ได้จากโครงการวิจัยผัก ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพาะเมล็ดพันธุ์ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาด 2 x 10 ซม. วางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2-3 วัน เมล็ดจะเริ่มงอก เมื่อใบเลี้ยงเริ่มคลี่ออกนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 °ซ. ในที่มืดเป็นเวลา 20 วัน ย้ายต้นกล้าปลูกในกล่องฟิล์มที่เตรียมไว้กล่องละ 1 ต้น วางกล่องฟิล์มบนแผ่นโฟมที่บุด้วยผ้าวีลาเน่ และวางในถาดอลูมิเนียมขนาด 13" x 19" ถาดละ 40 ต้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 22 $\pm$ 3 °ซ. ให้แสงตลอดเวลาด้วยหลอดไฟ fluorescent ความเข้มแสง 9000 lux ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 80 % ให้น้ำทุกวันและให้ Hoagland's solution (วิธีการเตรียมดูในภาคผนวกหน้า 107) อาทิตย์ละ 1 ครั้ง ผักกาดขาวปลีและผักกาดหัวจะเริ่มแทงช่อดอก (ภาพที่ 4 และ 5) ประมาณ 20-30 วันหลังการปลูกโดยไม่ผ่านระยะเข้าปลีหรือลงหัว หลังจากดอกแรกของช่อดอกหลักเริ่มบาน เก็บดอกผักกาดขาวปลีที่มีขนาดความยาวจากฐานดอกถึงปลายดอก 1.6-2.5 มม. และดอกผักกาดหัวขนาด 1.6-3.5 มม. มาทดลองโดยล้างดอกด้วยน้ำผสมไลปอนเอฟเล็กน้อยประมาณ 1 นาที ล้างไลปอนเอฟออกแล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วย clorox 10 % โดยปฏิบัติภายใต้สภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 10 นาที ล้าง clorox ออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แกะอับละอองเกสรออกจากดอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo โดยใช้ปากคีบ (forceps) ช่วยจับดอก แกะกลีบเลี้ยงออกทีละกลีบจนกระทั่งหมดทั้ง 4 กลีบ ใช้ปากคีบหักเอาอับละอองเกสรออกจากก้านชูเกสรตัวผู้จนครบ 6 อัน โดยไม่มีส่วนของก้านชูเกสรตัวผู้เหลือติดอยู่ เลี้ยงอับละอองเกสรบนอาหารตามกรรมวิธีต่าง ๆ และเลี้ยงอับละอองเกสรในที่มืด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 4 แสดงการออกดอกของผักกาดขาวปลี

ภาพที่ 5 แสดงการออกดอกของผักกาดหัว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

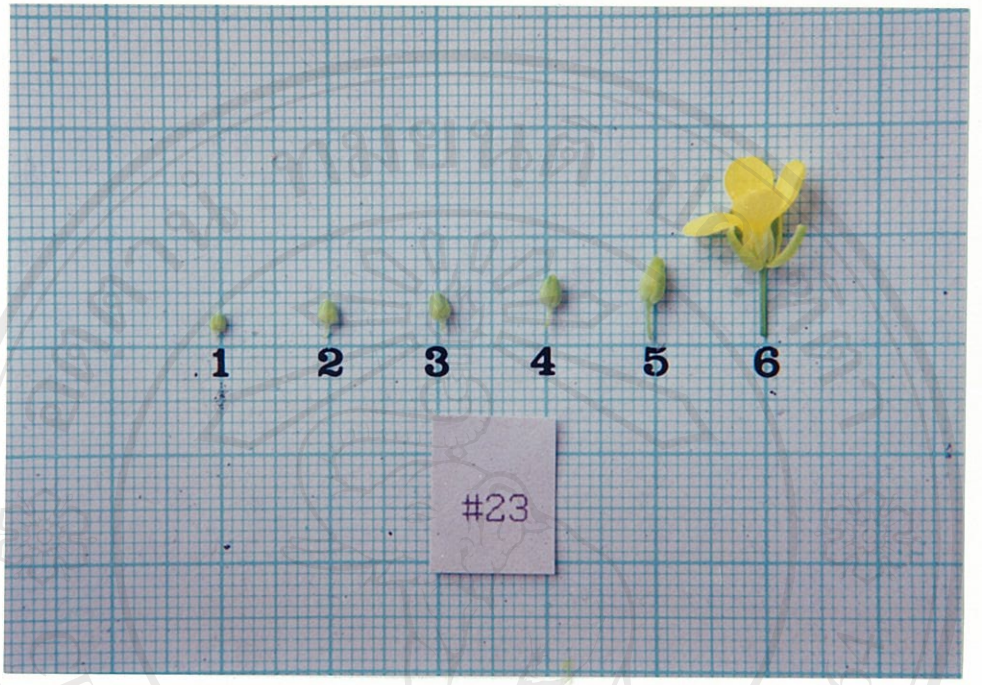
2. วิธีการวิจัย

2.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดดอก และระยะการพัฒนาของละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #23 กับ #161 และผักกาดหัวพันธุ์ #9 กับ #100 โดยแบ่งลำดับการทดลองดังนี้

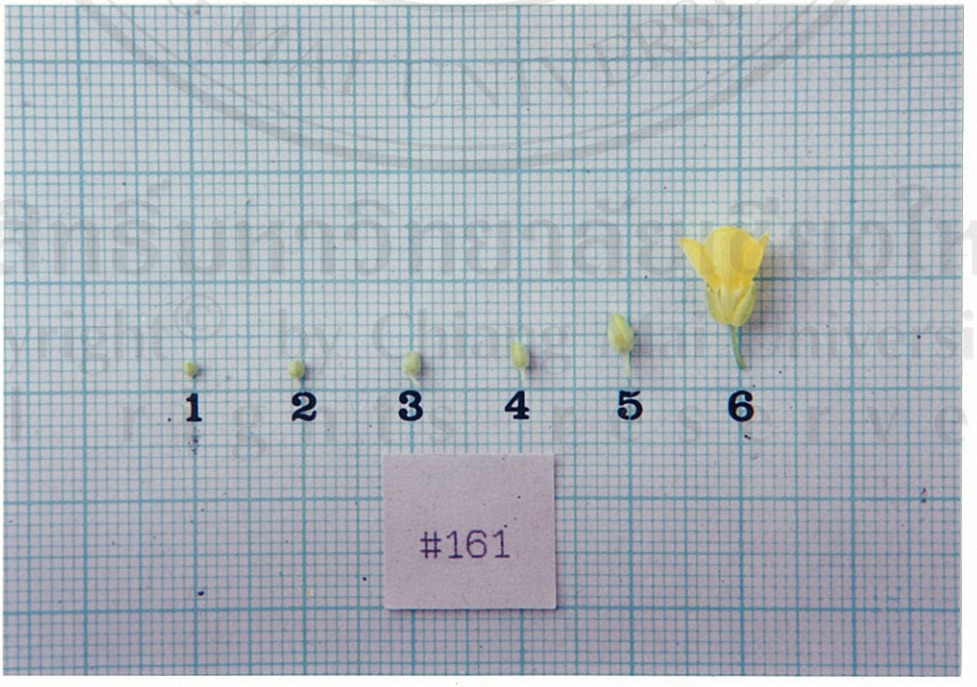
แบ่งขนาดดอกผักกาดขาวปลีเป็นขนาดต่าง ๆ โดยวัดจากฐานดอกถึงปลายดอกดังนี้ 1.1-1.5 1.6-2.5 2.6-3.5 3.6-4.5 4.6-5 มม. และดอกบาน (ภาพที่ 6 และ 7) ส่วนผักกาดหัวแบ่งเป็นขนาดต่าง ๆ ดังนี้ 1.1-1.5 1.6-2.5 2.6-3.5 3.6-4.5 4.6-5.5 5.6-6.5 6.6-7.5 7.6-8.5 8.6-9.5 9.6-10.5 10.6-11.5 มม. และดอกบาน (ภาพที่ 8 และ 9) แต่ละขนาดที่นำมาศึกษาจำนวน 20 ดอก และคิดเป็นร้อยละ นำดอกไปรักษาสภาพเซลล์ด้วยน้ำยาคงสภาพประกอบด้วย glacial acetic acid : แอลกอฮอล์ 95 % อัตรา 1 : 3 เก็บที่อุณหภูมิ 5 °ซ. เป็นเวลา 24 ชม. ล้างเอาน้ำยาคงสภาพออกด้วยแอลกอฮอล์ 70 % และเก็บที่แอลกอฮอล์ 70 % วางดอกแต่ละขนาดบนสไลด์ ใช้ด้ามเข็มเขี่ยบดดอกเพื่อให้ละอองเกสรหลุดออกจากอับละอองเกสร ใช้เข็มเขี่ยเกลี่ยละอองเกสรให้กระจาย ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาทีเพื่อให้แห้ง หยดสี quinacrine HCl ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/น้ำกลั่น 1 มล. (วิธีการเตรียมดูในภาคผนวกหน้า 108) ลงบนตัวอย่าง ปิด cover glass ใช้กระดาษซับวางบน cover glass และใช้นิ้วหัวแม่มือกด ปิดขอบ cover glass ด้วยน้ำยาทาเล็บ ทิ้งไว้ 15 นาที นำสไลด์ไปตรวจสอบการพัฒนาของละอองเกสรภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ fluorescent โดยใช้ Dichroic mirrors B Exciter filter EY 455 Barrier filter O530 หรือ B460 บันทึกภาพโดยใช้ฟิล์มสีโกดัก 400 และบันทึกระยะการพัฒนาของละอองเกสรในดอกแต่ละขนาดโดยแบ่งเป็นระยะต่าง ๆ ดังนี้

- microspore mother cell
- microspore tetrad
- uninucleate
- starch grain

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

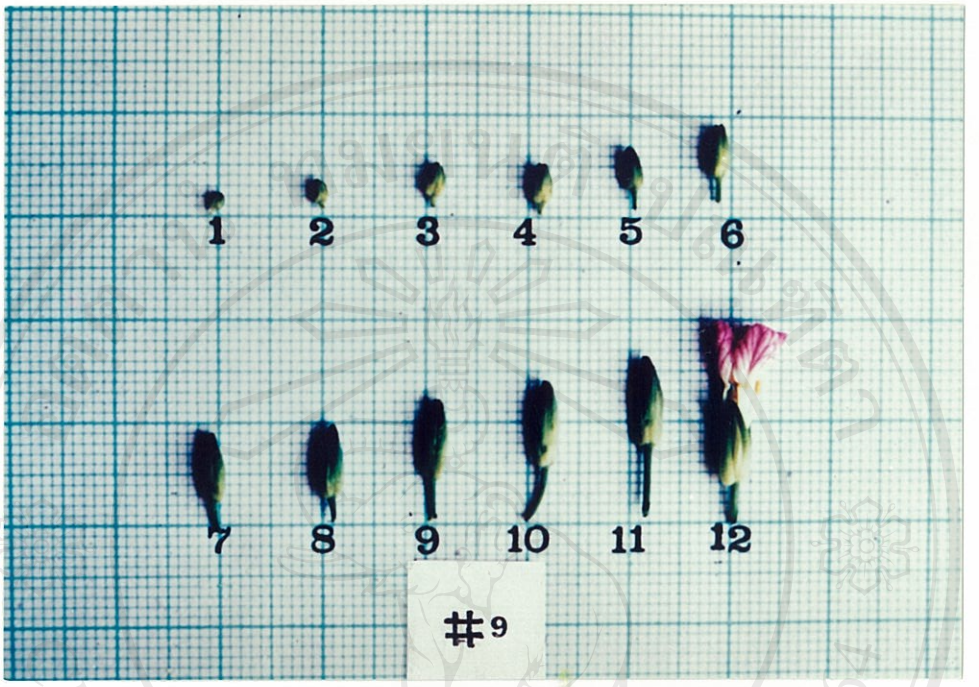


ภาพที่ 6 แสดงการเรียงขนาดของดอกผักกาดขาวปลีพันธุ์ # 23

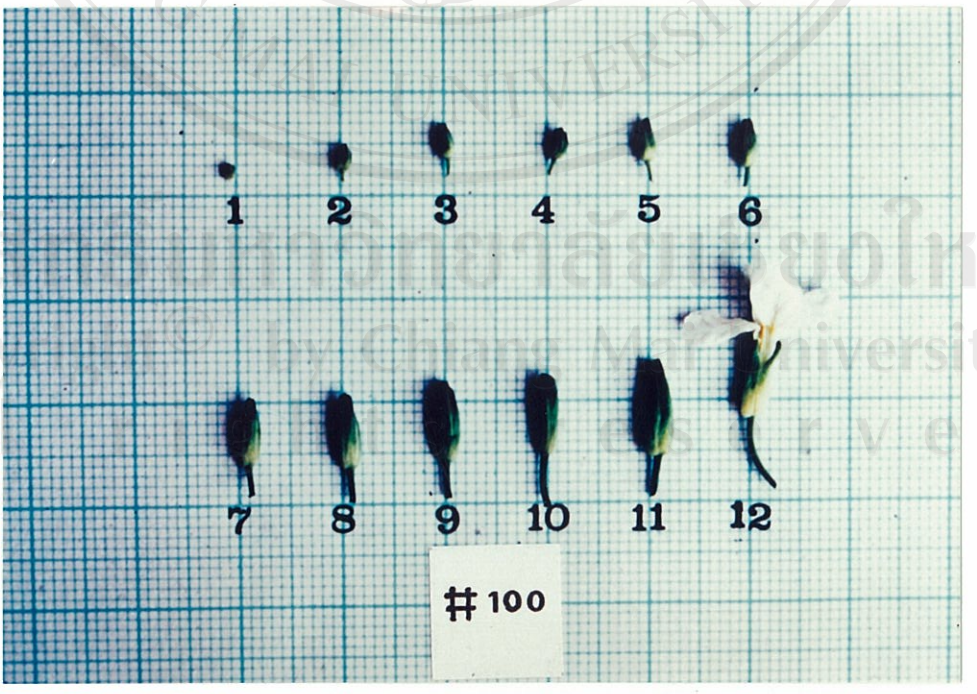


ภาพที่ 7 แสดงการเรียงขนาดของดอกผักกาดขาวปลีพันธุ์ # 161

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 8 แสดงการเรียงขนาดของดอกผักกาดหัวพันธุ์ # 9



ภาพที่ 9 แสดงการเรียงขนาดของดอกผักกาดหัวพันธุ์ # 100

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 การทดลองที่ 2 การศึกษาความมีชีวิต และ ความสามารถในการงอก pollen tube ของละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #23 กับ #161 และผักกาดหัวพันธุ์ #9 กับ #100 โดยแบ่งลำดับการทดลองดังนี้

การศึกษาความมีชีวิตและไม่มีชีวิต หยดอาหารตามสูตร Roberts et al. (1983)(วิธีการเตรียมดูในภาคผนวกหน้า 108) ลงบนสไลด์ 1 หยด เคาะละอองเกสรจากดอกที่บานแล้วพันธุ์ละ 10 ดอก โดยใช้ 1 ดอกต่ออาหาร 1 หยด หยด fluorescein diacetate ความเข้มข้น 2 มก./acetone 1 มล. (วิธีการเตรียมดูในภาคผนวกหน้า 108) สังเกตจนกระทั่งมีสีขาวขุ่น วางสไลด์ใน petridish ที่รองด้วยกระดาษซับที่อิ่มน้ำ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำตัวอย่างไปตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ fluorescent โดยใช้ Dichroic mirrors B Exciter filter EY 455 Barrier filter O530 หรือ B460 บันทึกจำนวนละอองเกสรที่เรืองแสงหมายถึงละอองเกสรที่มีชีวิตและละอองเกสรที่ไม่เรืองแสงหมายถึงละอองเกสรที่ไม่มีชีวิต แต่ละสไลด์จะใช้วิธีการนับเพียงจุดเดียวโดยการสุ่ม

การศึกษาความสามารถในการงอก pollen tube ของละอองเกสรทำเช่นเดียวกัน แต่ไม่หยด fluorescein diacetate เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา บันทึกจำนวนละอองเกสรที่งอก pollen tube และไม่งอก pollen tube วิธีการนับทำเช่นเดียวกับการศึกษาความมีชีวิต

2.3 การทดลองที่ 3 การเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #23 กับ #161 และผักกาดหัวพันธุ์ #9 กับ #100 บนอาหาร 4 สูตร ดังนี้

สูตรอาหารตาม Quazi (1978)

สูตรอาหารตาม Lichter (1981)

สูตรอาหารตาม Keller (1984)

สูตรอาหารตาม ประสาทพร

เลี้ยงอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #23 กับ #161 และผักกาดหัวพันธุ์ #9 กับ #100 บนอาหารทั้ง 4 สูตร (ส่วนประกอบของอาหารแต่ละสูตร และวิธีการเตรียมดูในภาคผนวกหน้า 109) โดยเลี้ยงอับละอองเกสร 18 อับต่อ petridish ขนาด 1.5 x 6 ซม.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มีอาหารเหลวบรรจุอยู่ 4 มล. วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Random Design) สูตรละ 4 ซ้ำ หลังจากเลี้ยงได้ 5 วัน สุ่มอับละอองเกสรออกมาตรวจการพัฒนาของละอองเกสรตามวิธีการของการทดลองที่ 1 หลังจากได้ 45 วัน บันทึกจำนวนอับละอองเกสรที่พัฒนาเป็น callus

2.4 การทดลองที่ 4 ระดับของ NAA และ 2,4,5-T ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #23 กับ #161 และผักกาดหัวพันธุ์ #9 กับ #100 โดยแบ่งลำดับการทดลองดังนี้

เลี้ยงอับละอองเกสรของผักกาดขาวปลีพันธุ์ #23 กับ #161 และผักกาดหัวพันธุ์#9 กับ #100 บนอาหารตามสูตร Keller (1984) แต่ดัดแปลงเติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 4 NAA และ 2,4,5-T ในระดับที่ต่างกันตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงการเติม NAA ร่วมกับ 2,4,5-T ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน

NAA (มก./ล.) / 2,4,5-T (มก./ล.)	0.0	0.5	1.0	2.0
0.0	A	B	C	D
0.5	E	F	G	H
1.0	I	J	K	L
2.0	M	N	O	P

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วางแผนการทดลองแบบแฟคตอเรียล โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (factorial in completely random design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 12 อับ บันทึกจำนวนอับละอองเกสรที่พัฒนาเป็น callus บนอาหารแต่ละตำรับหลังจากเลี้ยงได้ 45 วัน

2.5 การทดลองที่ 5 ระดับของ NAA และ BAP ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #23 กับ #161 และผักกาดหัวพันธุ์ #9 กับ #100 โดยแบ่งลำดับการทดลองดังนี้

เลี้ยงอับละอองเกสรของผักกาดขาวปลีพันธุ์ #23 กับ #161 และผักกาดหัวพันธุ์ #9 กับ #100 บนอาหารตามสูตร Keller (1984) แต่ดัดแปลงเติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 4 NAA และ BAP ในระดับที่ต่างกันตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการเติม NAA ร่วมกับ BAP ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน

NAA (มก./ล.) / BAP (มก./ล.)	0.0	0.5	1.0	2.0
0.0	A	B	C	D
0.5	E	F	G	H
1.0	I	J	K	L
2.0	M	N	O	P

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วางแผนการทดลองแบบแฟคตอเรียล โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 12 อับ บันทึกจำนวนอับละอองเกสรที่พัฒนาเป็น callus บนอาหารแต่ละตำรับหลังจากเลี้ยงได้ 45 วัน

2.6 การทดลองที่ 6 ระยะเวลา pretreatment ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #161

นำดอกที่มีขนาด 1.6-2.5 มม. บรรจุในกล่องฟิล์ม เก็บไว้ในที่มืดอุณหภูมิ 5 °ซ. ตามระยะเวลาดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1	ไม่ผ่านอุณภูมิ 5 °ซ.
กรรมวิธีที่ 2	2 วัน
กรรมวิธีที่ 3	4 วัน
กรรมวิธีที่ 4	6 วัน

ต่อจากนั้น แกะเอาอับละอองเกสรออกมาเลี้ยง บนอาหารตามสูตร Quazi (1978) วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด ทำการทดลองกรรมวิธีละ 5 ซ้ำ บันทึกจำนวนอับละอองเกสรที่พัฒนาเป็น callus หลังจากเลี้ยงได้ 45 วัน

2.7 การทดลองที่ 7 ระดับน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #161

เลี้ยงอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #161 บนอาหารตามสูตร Quazi (1978) แต่ดัดแปลงเติมน้ำตาลซูโครสในระดับต่าง ๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1	ร้อยละ 2
กรรมวิธีที่ 2	ร้อยละ 4
กรรมวิธีที่ 3	ร้อยละ 6
กรรมวิธีที่ 4	ร้อยละ 8
กรรมวิธีที่ 5	ร้อยละ 10

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด ทำการทดลองกรรมวิธีละ 5 ซ้ำ บันทึกจำนวนอับละอองเกสรที่พัฒนาเป็น callus หลังจากเลี้ยงได้ 45 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.8 การทดลองที่ 8 ตำรับอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้นจาก callus ของผักกาดขาวปลีพันธุ์ #161

เลี้ยงอับละอองเกสรผักกาดขาวปลีพันธุ์ #161 บนอาหารตามสูตร Quazi (1978) เพื่อชักนำให้เกิด callus จากอับละอองเกสร หลังจากได้ 45 วัน นำ callus ที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมแต่ดัดแปลงเป็นตำรับต่าง ๆ โดยแบ่งเป็นการทดลองดังนี้

5.8.1 การทดลองชุดที่ 1 เลี้ยง callus บนอาหารตามตำรับดังนี้

ตำรับที่ 1 2,4-D 0.44 มก./ล. ร่วมกับ BAP 0.45 มก./ล.

ตำรับที่ 2 NAA 1.0 มก./ล.

ตำรับที่ 3 NAA 2.0 มก./ล.

ตำรับที่ 4 NAA 1.0 มก./ล. ร่วมกับ GA_3 0.5 มก./ล.

ตำรับที่ 5 NAA 2.0 มก./ล. ร่วมกับ GA_3 0.5 มก./ล.

ตำรับที่ 6 GA_3 4.0 มก./ล. ร่วมกับ BAP 5.0 มก./ล.

ตำรับที่ 7 IBA 2.0 มก./ล. ร่วมกับ GA_3 4.0 มก./ล.

เลี้ยง callus ในที่มีแสงตลอดเวลาและมีความเข้มของแสง 3000 lux วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด ตำรับละ 3 ซ้ำ บันทึกการเปลี่ยนแปลงของ callus

5.8.2 การทดลองชุดที่ 2 เลี้ยง callus บนอาหารตามตำรับดังนี้

ตำรับที่ 1 IAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 0.5 มก./ล.

ตำรับที่ 2 NAA 1.0 มก./ล. ร่วมกับ BAP 1.0 มก./ล.

ตำรับที่ 3 GA_3 3.5 มก./ล. ร่วมกับ BAP 11.0 มก./ล.
และน้ำมะพร้าวร้อยละ 10

ตำรับที่ 4 IBA 10.0 มก./ล. ร่วมกับ GA_3 3.5 มก./ล.
และน้ำมะพร้าวร้อยละ 10

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด ตำรับละ 5 ซ้ำ และบันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับชุดที่ 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved