บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัสดุพันธุ์พืช
    1.1 หัวย่อย (bulbil) ของช่อทับทิม จำนวน 2,400 หัวย่อย
    1.2 เมล็ดต้อยติ่ง จำนวน 100 เมล็ด
    1.3 เมล็ดดอกดาว จำนวน 200 เมล็ด
2. วัสดุอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงหัวย่อยในโรงเรือน
    2.1 ถาดหลุมโฟมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 น ขนาด 72 หลุมต่อถาด จำนวน 34 ถาด
    2.2 ถาดหลุมพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 น ขนาด 24 หลุมต่อถาด จำนวน 100 ถาด
    2.3 วัสดุปลูก โดยเตรียมจากทรายหยาบ 1 ส่วน ผสมขุยมะพร้าวร่อน 1 ส่วน
    2.4 วัสดุปลูกในการปลูกครั้งที่สอง โดยเตรียมจากดินร่วน 1 ส่วน ผสมทรายหยาบ 1 ส่วน
3. วัสดุอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างพืช
    3.1 ขวดแก้วฝาเกลียวปริมาตร 5 และ 10 มล สำหรับใช้เก็บตัวอย่างราก
    3.2 กรรไกร
    3.3 ปากคีบ
4. วัสดุอุปกรณ์สำหรับศึกษาทางเซลล์พันธุศาสตร์
    4.1 เข็มเขี่ย
    4.2 สไลด์ และแผ่นปิดสไลด์
    4.3 กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์การถ่ายภาพ
    4.4 ดินสอที่มีปลายยางลบ สำหรับใช้เคาะแผ่นสไลด์
    4.5 กระดาษซับ
    4.6 Immersion oil
    4.7 ฟิลม์สี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

5. วัสดุอุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

5.1 ตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ (air flow cabinet)

5.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

5.3 เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดละเอียดทศนิยม 3 ตำแหน่ง

5.4 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

5.5 เครื่องเขย่า

5.6 หม้อนึ่งความดันไอ

5.7 เตาไมโครเวฟ

5.8 เครื่องแก้วอื่นๆ เช่น ปิเปต บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดวัดปริมาตร ขวดใส่สารละลายเข้มข้น ขวดปากกว้างสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 75 มม สูง 125 มม และแท่งแก้ว เป็นต้น

5.9 วัสดุที่ใช้ในตู้กรองอากาศ ได้แก่

5.9.1 ด้ามมีดผ่าตัดเบอร์ 3

5.9.2 ใบมีดผ่าตัด เบอร์ 10 และ 11

5.9.3 ปากคีบทนไฟ ขนาดความยาว 100 และ 180 มม

5.9.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์

5.9.5 หลอดทดลองใส่แอลกอฮอล์ขนาด 24x150 มม

5.9.6 บีกเกอร์ขนาด 50 มม สำหรับวางหลอดทดลองที่ใส่แอลกอฮอล์

5.10 วัสดุอื่นๆ เช่น แผ่นพลาสติกใส ขนาด 6x10 มม ยางรัดของ แผ่นป้ายกรรมวิธี ฯลฯ

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการชักนำให้เกิดการเพิ่มโครโมโซม

1.1 โคลชิซีน (Fluka)

2. สารเคมีที่ใช้สำหรับศึกษาทางเซลล์พันธุศาสตร์

2.1 สารละลายอิ่มตัว paradiclorobenzene (PDB) ใช้เป็น pre-treatment solution

2.2 น้ำยาตรึงเซลล์ (fixative solution) เพื่อรักษาสภาพ และหยุดการทำงานของเซลล์ประกอบด้วย absolute ethyl alcohol 3 ส่วน และ glacial acetic acid 1 ส่วน

2.3 ethyl alcohol 70 %

2.4 hydrocloric acid เข้มข้น 1 นอร์มอล (1N HCl)

2.5 carbol fuchsin 5 และ 10 %

2.6 aceto orcein 10 %

3. สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

3.1 ethyl alcohol 70 %

3.2 คลอร็อกซ์ (The Clorox Co.,Ltd)

3.3 น้ำกลั่น

3.4 อาหารเหลวสูตร White (1963) ดัดแปลง (ตารางผนวก 1)

3.5 อาหารวุ้นสูตร MS (1962) ดัดแปลง (ตารางผนวก 2)

วิธีการในการศึกษาครั้งนี้ได้กล่าวถึงรายละเอียดแยกไว้ในแต่ละการทดลอง

การทดลองที่ 1 อิทธิพลของสารละลายโคลชิซีนที่ความเข้มข้น และระยะเวลาที่ต่างกันต่อหัวย่อยของช่อทับทิม (*Globba rosea* Gagnep.)

วิธีการวิจัย

1. วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ที่มีปัจจัยร่วม 2 ปัจจัย ได้แก่

1.1 ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซีน 6 ระดับคือ 0 , 0.015 , 0.03, 0.06, 0.12 และ 0.24 % (น้ำหนัก/ปริมาตร)

1.2 เวลาที่ใช้แช่สารละลาย โคลชิซีน 4 ระดับ คือ 1, 2, 4 และ 6 วัน รวมเป็น 24 กรรมวิธี ๆ ละ 100 หัวย่อย

2. การเตรียมต้นพืช

2.1 เพาะหัวย่อยในถาดหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว โดยใช้ทรายหยาบ 1 ส่วน ผสมขุยมะพร้าวร่อน 1 ส่วน เป็นวัสดุเพาะ

2.2 ย้ายต้นกล้าที่เพาะได้ปลูกเลี้ยงในถาดหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 น เพื่อเก็บตัวอย่างรากพืช โดยสุ่มกรรมวิธีละ 20 ต้น

3. ศึกษาจำนวนโครโมโซมโดยศึกษาจำนวนโครโมโซมปกติของช่อทับทิมจากปลายราก (2n) และ จากละอองเรณู (n) ในอับละอองเรณู จากนั้นศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายรากพืชในชุดทดลอง

3.1 การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายราก (ใช้วิธีดัดแปลงจากสมหมาย , 2536)

3.1.1 เก็บตัวอย่างรากพืชระหว่างเวลา 8.00-11.00 น โดยตัดปลายรากยาว 1 ซม แช่ในสารละลายอิ่มตัวของ PDB ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4-6 ชม

3.1.2 นำตัวอย่างที่ได้ไปตรึงเซลล์ (fixation) ด้วยน้ำยาตรึงเซลล์นาน 10-15 นาที

3.1.3 นำไปสลายผนังเซลล์ด้วย HCl ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

3.1.4 ย้อมสีปลายรากใน carbol fuchsin 5 % นาน 1 คืน ก่อนนำมา squash บนสไลด์เพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซม ในระยะเมตาเฟส ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.2 การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากละอองเรณู

3.2.1 เขี่ยอับละอองเรณูที่อ่อน ขยี้ให้แตกบนกระจกสไลด์ แล้วหยดสี aceto orcein 10 % และ carbol fuchsin 10 % ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์

3.2.2 ตรวจนับจำนวนโครโมโซม ในระยะเมตาเฟส ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

การบันทึกข้อมูล

บันทึกการงอก และการเจริญของต้น ดังนี้

1. อัตราการงอกของหัวย่อย
2. ระยะเวลาที่ใช้ในการงอก
3. อัตราความอยู่รอดของหัวใหม่
4. ระยะเวลาที่ใช้ในการออกดอก
5. ศึกษาจำนวนโครโมโซมจากรากของหัวย่อย และหัวใหม่อย่างน้อย 10 เซลล์ต่อต้น

การทดลองที่ 2 อิทธิพลของสารละลายโคลชิซีนที่ความเข้มข้น และระยะเวลาที่ต่างกันต่อเมล็ดของต้อยติ่ง (*Ruellia tuberosa* Linn.)

วิธีการวิจัย

1. วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ที่มีปัจจัยร่วม 2 ปัจจัยได้แก่
   1.1 ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซีน 5 ระดับคือ 0 , 0.025 , 0.05 , 0.10 และ 0.20 % (น้ำหนัก/ปริมาตร)
   1.2 เวลาที่ใช้แช่สารละลาย โคลชิซีน 2 ระดับคือ 1 และ 2 วัน รวมเป็น 10 กรรมวิธี ๆ ละ 10 เมล็ด

   แต่ละกรรมวิธีใช้สารละลายโคลชิซีนในอาหารเหลวสูตร White (1963) ดัดแปลง (วิธีการเตรียมสารละลายโคลชิซีนในอาหารเหลว แสดงในตารางผนวก 3)
2. การเตรียมตัวอย่างพืช
   2.1 นำฝักของต้อยติ่งมาทำความสะอาดและฆ่าเชื้อที่ผิว โดยนำไปจุ่มใน ethyl alcohol 70 % นำไปแกะฝักในตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ แล้วจึงนำเมล็ดที่ได้ไปแช่ในสารละลายโคลชิซีนที่เติมลงในอาหารเหลวสูตร White (1963) ดัดแปลงที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ
   2.2 นำเมล็ดที่ผ่านการให้โคลชิซีนที่ความเข้มข้น และเวลาต่างกัน ไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร White (1963) ดัดแปลง
   2.3 ตัดย้ายส่วนเหนือใบเลี้ยง แล้วนำไปเลี้ยงต่อบนอาหารวุ้นสูตร MS (1962) ดัดแปลง นำปลายรากที่เกิดขึ้นไปตรวจหาจำนวนโครโมโซมที่อาจเปลี่ยนแปลงจากการทดลอง
   2.4 ตัดย้ายยอดของต้นที่เก็บรากครั้งที่ 1 แล้วนำไปเลี้ยงต่อบนอาหารวุ้นสูตร MS (1962) ดัดแปลง นำปลายรากที่เกิดขึ้นไปตรวจหาจำนวนโครโมโซมที่อาจเปลี่ยนแปลงจากการเจริญของยอด
3. การศึกษาจำนวนโครโมโซม

   ตามกรรมวิธีของการทดลองที่ 1

การบันทึกข้อมูล

บันทึกการงอก และการเจริญของต้น ดังนี้

1. จำนวนวันเมื่อเริ่มงอกของเมล็ด
2. ระยะเวลาที่ใช้ในการงอกสูงสุด
3. ระยะเวลาที่ใช้ในการแตกยอดใหม่
4. การเจริญของยอดใหม่
5. ระยะเวลาที่ใช้ในการออกรากของยอดใหม่
6. คุณภาพของยอด
7. ศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายราก อย่างน้อย 10 เซลล์ต่อต้น

การทดลองที่ 3 อิทธิพลของสารละลายโคลชิซีนที่ความเข้มข้น และระยะเวลาที่ต่างกันต่อเมล็ดของดอกดาว (*Ipomoea quamoclit* Linn.)

วิธีการวิจัย

1. วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ที่มีปัจจัยร่วม 2 ปัจจัย ได้แก่
   1.1 ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซีน 5 ระดับคือ 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 % (น้ำหนัก/ปริมาตร)
   1.2 เวลาที่ใช้แช่สารละลาย โคลชิซีน 2 ระดับคือ 1 และ 2 วัน รวมเป็น 10 กรรมวิธี ๆ ละ 20 เมล็ด

   แต่ละกรรมวิธีใช้สารละลายโคลชิซีนในอาหารเหลวสูตร White (1963) ดัดแปลง (วิธีการเตรียมสารละลายโคลชิซีนในอาหารเหลว แสดงในตารางผนวก 3)
2. การเตรียมตัวอย่างพืช
   2.1 นำเมล็ดดอกดาวไปฆ่าเชื้อที่ผิว โดยนำไปแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ 15 % (โดยปริมาตร) ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วจึงนำเมล็ดที่ได้ไปแช่ในสารละลายโคลชิซีนในอาหารเหลวสูตร White (1963) ดัดแปลงที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ นำเมล็ดที่ผ่านการให้โคลชิซีนที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ ไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร White (1963) ดัดแปลง

2.2 ตัดย้ายส่วนเหนือใบเลี้ยง แล้วนำไปเลี้ยงต่อบนอาหารวุ้นสูตร MS (1962) ดัดแปลง นำปลายรากที่เกิดขึ้นไปตรวจหาจำนวนโครโมโซมที่อาจเปลี่ยนแปลงจากการทดลอง

2.3 ตัดย้ายยอดของต้นที่เก็บรากครั้งที่ 1 แล้วนำไปเลี้ยงต่อบนอาหารวุ้นสูตร MS (1962) ดัดแปลง นำปลายรากที่เกิดขึ้นไปตรวจหาจำนวนโครโมโซมที่อาจเปลี่ยนแปลงจากการเจริญของยอด

3. การศึกษาจำนวนโครโมโซม

ตามกรรมวิธีของการทดลองที่ 1

การบันทึกข้อมูล

บันทึกการงอก และการเจริญของต้น ดังนี้

1. จำนวนวันเมื่อเริ่มงอกของเมล็ด
2. ระยะเวลาที่ใช้ในการงอกสูงสุด
3. ระยะเวลาที่ใช้ในการแตกยอดใหม่
4. การเจริญของยอดใหม่
5. ระยะเวลาที่ใช้ในการออกรากของยอดใหม่
6. คุณภาพของยอด
7. ศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายราก อย่างน้อย 10 เซลล์ต่อต้น

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

พฤษภาคม 2540 ถึง เมษายน 2543

สถานที่ทำการวิจัย

1. โรงเรือนของห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. แปลงทดลองของศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University