บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1 เมล็ดอัญชันสีน้ำเงินอมม่วงดอกซ้อนที่แก่เต็มที่จากต้นตามธรรมชาติ

1.2 ตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ (laminar air flow)

1.3 ชั้นสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีระบบให้แสงฟลูออเรสเซนส์ ให้ความเข้มแสงประมาณ 1,500 ลักซ์

1.4 กล้องจุลทรรศน์ (dissecting microscope)

1.5 เครื่องชั่งไฟฟ้า ชนิดทศนิยม 3

1.6 เครื่องชั่งชนิดละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.7 ตะแกรงสำหรับวางหลอดทดลองที่เลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 40 หลอด

1.8 เครื่องเขย่า

1.9 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

1.10 หม้อนึ่งความดันไอ

1.11 เตาไมโครเวฟ

1.12 ขวดปรับปริมาตรขนาด 100, 500 และ 1,000 มล

1.13 ขวดรูปชมพู่ (erlenmyer flask) ขนาด 125 และ 250 มล

1.14 บีกเกอร์ขนาด 10, 50, 100, 1,000 และ 2,000 มล

1.15 กระบอกวัดปริมาตรขนาด 10, 50 และ 100 มล

1.16 ปิเปตขนาด 0.5, 1, 2, 5, 10, 25 และ 50 มล

1.17 ขวดใส่สารละลายเข้มข้นขนาด 1,000 มล

1.18 หลอดแก้วขนาด 25x10 มม

1.19 ช้อนตักสาร

1.20 แท่งแก้วสำหรับคนสารละลาย

1.21 วัสดุที่ใช้ในตู้กรองอากาศ ได้แก่

1.21.1 ด้ามมีดผ่าตัดเบอร์ 3

1.21.2 ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 10 และ 11

1.21.3 ใบมีดโกนที่ตัดเป็นใบมีดเล็กขนาด 2x10 มม

1.21.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.21.5 ปากคีบขนาดยาว 140 และ 180 มม

1.21.6 ถุงพลาสติกทนร้อนตัดเป็นแผ่นสี่เหลี่ยมขนาด 70x90 มม

1.21.7 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3

1.21.8 หลอดทดลองขนาด 25x150 มม

1.21.9 จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 95 และ 140 มม

1.21.10 บีกเกอร์ขนาด 50 มล หรือ ขวดสำหรับวางหลอดทดลองที่ใส่แอลกอฮอล์

1.22 วัสดุอื่นๆ เช่น ยางรัด แผ่นป้าย (label) กระดาษซับน้ำ แผ่นอลูมินัม(aluminum foil) กระดาษลอกลาย ผงวุ้นตราเฮลิคอปเตอร์ น้ำตาลซูโครส แผ่นเมนเบรนขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร สำหรับกรอง สารโคลชิซีน

1.23 น้ำกลั่นซึ่งกลั่นจากเครื่องแก้ว

1.24 ถุงพลาสติกดำขนาด 4x8 นิ้ว

1.25 กระถางขนาด 2 นิ้ว และ 8 นิ้ว

1.26 วัสดุสำหรับเพาะเมล็ดใช้ ทรายผสมกับถ่านแกลบ ในอัตราส่วน 1 : 1

1.27 วัสดุสำหรับปลูกต้นกล้าใช้ แกลบ : เปลือกถั่ว : ดินร่วน ในอัตราส่วน 2 : 2 : 1

2 สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับฆ่าเชื้อ

2.1.1 เอทธานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์

2.1.2 น้ำยาคลอร็อกซ์ ของบริษัท The Clorox Co,USA.

2.1.3 สารจับใบ Tween 20 ของบริษัทสากลเคมีภัณฑ์และการค้าจำกัด

2.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหาร

2.2.1 เกลือให้ธาตุอาหารหลักต่างๆตามสูตร MS (1962)

2.2.2 เกลือให้ธาตุอาหารหลักต่างๆตามสูตร White (1963)

2.2.3 เกลือให้ธาตุอาหารรองต่างๆตามสูตร MS (1962)

2.2.4 สารอินทรีย์ต่างๆตามสูตร MS (1962)

2.2.5 น้ำยาเข้มข้นสารละลายเหล็กตามสูตร MS (1962)

2.2.6 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช 6-benzyladenine (BA) ของบริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.

2.2.7 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอล (1N KOH)

2.2.8 กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล (1N HCl)

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

2.3.1 เอทธานอล ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์

2.3.2 Glacial acetic acid

2.3.3 Formalin

2.3.4 TBA (teriary-butyl alcohol)

2.3.5 Absolute alcohol

2.3.6 สี Erythrosin

2.3.7 Paraffin

2.3.8 Liquid paraffin

2.3.9 Xylene

2.3.10 สี Hematoxylin

2.3.11 น้ำยา Canada balsum

2.4 สารเคมีที่ใช้ศึกษาจำนวนโครโมโซม

2.4.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับหยุดการสร้างเส้นใย spindle (pre-treatment solution) ได้แก่ PDB (p-dichlorobenzene)

2.4.2 สารเคมีสำหรับเตรียมน้ำยาหยุดการเจริญเติบโตของเซลล์ และรักษาสภาพเซลล์ (fixative solution) คือ เอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะซิติกเข้มข้นในอัตราส่วน 3 : 1 โดยปริมาตร

2.4.3 สารเคมีสำหรับทำให้เซลล์แยกออกจากกัน (hydrolytic solution) คือกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล (1N HCl)

2.4.4 สารเคมีที่ใช้ย้อมสีโครโมโซม คือ lactopropionic orcein และ carbol fuchsin

2.5 สารเคมีที่ใช้สำหรับกระตุ้นให้กลายพันธุ์ คือ โคลชิซีน

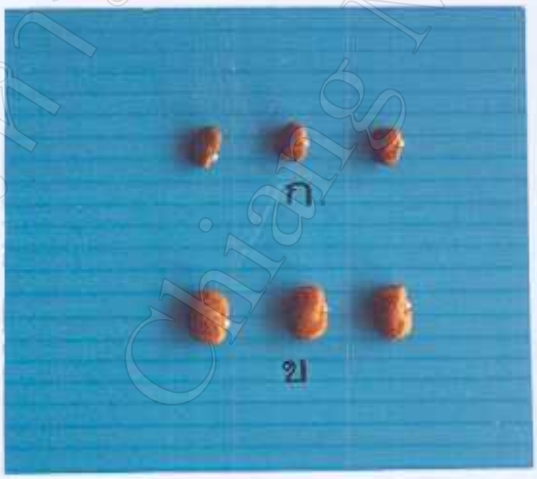
3 การเตรียมพืชทดลอง

3.1 การเตรียมเมล็ดเพื่อใช้ในการทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2.1

เลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ และแก่เต็มที่มีสีน้ำตาลถึงดำ ฆ่าเชื้อโดยเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70% แล้วฆ่าเชื้อด้วย คลอร็อกซ์ (clorox) 20% นาน 20 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ในตู้ปลอดเชื้อ แล้วนำไปแช่น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วนาน 24 ชม บนเครื่องเขย่า เพื่อให้เมล็ดพองตัวเต่งเต็มที่ (ภาพ 2) แล้วเลือกเมล็ดที่เต่งเท่ากันไปทำการทดลองต่อไป ส่วนเมล็ดที่ใช้ในการทดลองที่ 3 ใช้เมล็ดที่แห้งโดยใช้เมล็ดที่แก่เต็มที่คัดเลือกให้มีขนาดใกล้เคียงกัน

3.2 การเตรียมต้นกล้าอัญชันเพื่อใช้ในการทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2.2

นำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว และผ่านการแช่น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว นาน 24 ชม เลือกเมล็ดที่เต่งเต็มที่ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร White (1963) โดยเพาะ 1 เมล็ด ต่อ 1 หลอดทดลอง นำไปเลี้ยงในสภาพที่มีความเข้มแสง 1,500 ลักส์ (lux) ให้แสง 24 ชม/วัน อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน (ภาพ 3) จึงนำต้นไปทำการทดลองต่อไป



ภาพ 2 เมล็ดของอัญชันดอกซ้อนสีน้ำเงินอมม่วง (*Clitoria ternatea* Linn.)

ก) ไม่ผ่านการแช่น้ำ

ข) แช่น้ำกลั่นนาน 24 ชม

ภาพ 3 ต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 10 วัน

4 **การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)**

4.1 การเตรียมธาตุอาหารหลัก

เตรียมธาตุอาหารหลักที่ใช้ในสูตร MS (1962) และสูตร White (1963) ความเข้มข้น 10 เท่า (10X) โดยชั่งสารแต่ละชนิดในตาราง 2 และตาราง 3 ตามลำดับ โดยละลายสารทีละ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ชนิดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มล แล้วเทใส่ขวดเก็บสารละลายเข้มข้นปิดฝาเก็บในตู้เย็น

ตาราง 2 ชนิด และปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 10X (ก/ล)
NH_4NO_3	1,650	16.50
KNO_3	1,900	19.00
$CaCl_2.2H_2O$	44	0.44
$MgSO_4.7H_2O$	370	3.70
KH_2PO_4	170	1.70

ตาราง 3 ชนิด และปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร White (1963)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร White (1963) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 10X (มก/ล)
KCl	65.0	650
$MgSO_4.7H_2O$	720.0	7,200
$NaH_2PO_4.H_2O$	16.5	165
KNO_3	80.0	800
Na_2SO_4	200.0	2,000
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	300.0	3,000

4.2 การเตรียมธาตุอาหารรอง

เตรียมธาตุอาหารรองสูตร MS (1962) โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกันให้ความเข้มข้นของสารเป็น 100X เตรียมน้ำยาให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล โดยใช้น้ำหนักของสารดังแสดงใน ตาราง 4

ตาราง 4 ชนิด และปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) 100X (มก/ล)
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	2.5
KI	0.83	83
$ZnSO_4.7H_2O$	8.60	860
$MnSO_4.4H_2O$	22.30	2,230
H_3BO_4	6.20	620
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	2.5

4.3 การเตรียมสารอินทรีย์

การเตรียมสารอินทรีย์สูตร MS (1962) ทำเป็นสารละลายเข้มข้น รวมไว้ในขวดเดียวกันให้ความเข้มข้นของสารเป็น 100X เตรียมน้ำยาให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล โดยใช้น้ำหนักของสารดังแสดงใน ตาราง 5

ตาราง 5 ชนิด และปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของสารอินทรีย์สูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาความเข้มข้น 100X (มก/ล)
Glycine	2.00	200
Thiamine.HCl	0.25	25
Pryidoxine.HCl	0.25	25
Nicotinic acid	0.25	25
Myo-inositol	100	10,000

4.4 การเตรียมสารละลายเหล็กเข้มข้น

เตรียม FeEDTA สูตร MS (1962) ซึ่งประกอบด้วย $FeSO_4.7H_2O$ และ $Na_2EDTA.2H_2O$ โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นของสารเป็น 100X เตรียมน้ำยาให้มีปริมาตร

สุดท้าย 1,000 มล เตรียมโดยชั่งสารแต่ละชนิดละลายน้ำให้มีปริมาตรสุดท้ายของแต่ละส่วนเป็น 500 มล (ตาราง 6) แล้วจึงนำมาผสมไว้ในขวดเดียวกันโดยเก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง

ตาราง 6 ชนิด และปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของเหล็กสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาเข้มข้น 100X (ก/ล)
FeSO4.7H2O	27.8	2.78
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.3	3.73

4.5 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต

การเตรียม BA (6-benzyladenene) โดยการชั่ง BA 10 มก ละลายด้วยโพแทสเซียมเข้มข้น 1 นอร์มอล ประมาณ 2-3 หยด เพียงพอให้สารละลายจนหมดแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูรายละเอียดในแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลอง

5 การเตรียมอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962)

นำส่วนประกอบของอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962) จากน้ำยาเข้มข้นที่เตรียมไว้ในข้อ 4 มาผสมให้เข้ากัน โดยใช้สารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดดังที่แสดงไว้ในตาราง 7 ขั้นตอนการเตรียมสูตรอาหาร MS (1962) ทำดังนี้

5.1 ใส่น้ำกลั่นลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล ประมาณ 1/3 ของขวดแล้วเติมสารละลาย เข้มข้นของธาตุอาหารหลักลงไปทีละชนิด

5.2 เติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรอง สารอินทรีย์ เหล็ก และสารควบคุมการเจริญเติบโตลงไป ตามลำดับ โดยเขย่าขวดให้น้ำยาผสมกันดีระหว่างแต่ละครั้งที่เติม

5.3 ละลายน้ำตาลใส่ลงไป แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล

5.4 เทสารละลายลงไปในบีกเกอร์ขนาด 2,000 มล จากนั้นนำไปปรับค่าความเป็นกรด- ด่าง ให้ได้ 5.7 โดยใช้ โพแทสเซียมเข้มข้น 1 นอร์มอล หรือ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล

5.5 ใส่วุ้นลงในอาหารแล้วนำไปต้มจนวุ้นละลาย

5.6 เตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 25X150 มม ปริมาตร 10 มล/หลอด แล้วปิดปากหลอดด้วยแผ่นพลาสติก และกระดาษลอกลาย แล้วรัดด้วยยางรัดของ

5.7 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ป (ปอนด์)/ น^2(ตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

ตาราง 7 ส่วนประกอบของสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิด ในอาหารสูตร MS (1962)

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณสารละลายเข้มข้นในอาหาร 1 ลิตร (มล)
สารละลายธาตุอาหารหลักความเข้มข้น 10X	100
สารละลายธาตุอาหารรองความเข้มข้น 100X	10
สารละลายสารอินทรีย์ความเข้มข้น 100X	10
สารละลายเหล็กความเข้มข้น 100X	10
สารควบคุมการเจริญเติบโต	*
น้ำตาลซูโครส (น้ำหนัก/ปริมาตร)	30 ก/ล
ผงวุ้น (น้ำหนัก/ปริมาตร)	8 ก/ล

หมายเหตุ * ปริมาณที่ใช้ขึ้นกับความเข้มข้นในแต่ละกรรมวิธีในการทดลอง

ตาราง 8 ปริมาตรสารละลายเข้มข้นของ BA ที่ใช้ในแต่ละกรรมวิธี

ชนิด และ ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต	ปริมาตรสารละลายเข้มข้นในอาหาร 1 ลิตร (มล)
BA ความเข้มข้น 0.5 มก/ล	5
BA ความเข้มข้น 1.0 มก/ล	10
BA ความเข้มข้น 1.5 มก/ล	15
BA ความเข้มข้น 2.0 มก/ล	20

6 การเตรียมสารละลายโคลชิซีน

การทดลองครั้งนี้ใช้สารละลายโคลชิซีน การเตรียมสารละลายโคลชิซีนความเข้มข้นต่างๆ ตัวอย่างเช่น ถ้าต้องการความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ต้องชั่งสารละลายโคลชิซีนในรูปผงสีขาว 0.2 กรัม มาละลายในน้ำกลั่น 100 มล ลักษณะสารที่ละลายน้ำจะมีสีเหลือง เก็บไว้ในขวดสีชา หรือห่อด้วยแผ่นอลูมินัม (aluminum fiol) เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

7 การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

ใช้วิธีการของ Johansen (1940) ดังแสดงในภาคผนวก

8 การศึกษาจำนวนโครโมโซม

ใช้วิธี Squash ดังแสดงในภาคผนวก

9 วิธีการวิจัย

9.1 การทดลองที่ 1 การขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ ชุดการทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาข้อมูลพื้นฐาน เพื่อเตรียมไว้สำหรับการขยายพันธุ์พืชที่ได้ลักษณะที่ต้องการแล้ว จากกรรมวิธีต่างๆ เช่น การแช่โคลชิซีน และการฉายรังสี แบ่งการทดลองเป็น 2 การทดลองย่อยดังนี้

การทดลองที่ 1.1 ผลของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่ออัญชันเพื่อชักนำให้เกิดยอดและคัพภะเทียมจากส่วนต่างๆในสภาพปลอดเชื้อ

<u>วิธีการทดลอง</u>

ใช้อาหารสูตร MS (วิธีการเตรียมดูข้อ 5) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ BA ความเข้มข้นตามกรรมวิธีต่างๆ โดยเตรียมใส่ในหลอดขนาด 25X150 มม ปริมาตรหลอดละ 10 มล

นำต้นอ่อนของต้นพืชที่มีอายุ 10 วัน โดยผ่านวิธีการที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 3 มาตัดโดยใช้ส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยง ส่วนของใบเลี้ยง และส่วนของราก โดยใช้ขนาด 5 มม

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) รวม 5 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 หลอดทดลอง

กรรมวิธีที่ 1 อาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

กรรมวิธีที่ 2 อาหารเติม BA 0.5 มก/ล

กรรมวิธีที่ 3 อาหารเติม BA 1.0 มก/ล

กรรมวิธีที่ 4 อาหารเติม BA 1.5 มก/ล

กรรมวิธีที่ 5 อาหารเติม BA 2.0 มก/ล

<u>การบันทึกผล</u>

1. จำนวนวันที่เริ่มเกิดยอด และคัพภะเทียม (สังเกตเห็นด้วยตาเปล่า)
2. เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด และคัพภะเทียม
3. จำนวนยอด และจำนวนคัพภะเทียมต่อชิ้นส่วน โดยให้เป็นคะแนน (สังเกตเห็นด้วยตาเปล่า) โดยมีระดับคะแนนดังนี้

0 ไม่เกิดคัพภะเทียมเลย

1 เกิดคัพภะเทียมน้อยมาก

2 เกิดคัพภะเทียมน้อย

3 เกิดคัพภะเทียมปานกลาง

4 เกิดคัพภะเทียมมาก

5 เกิดคัพภะเทียมมากที่สุด

ทำการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาถึงการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเพื่อดูการพัฒนาที่เกิดขึ้น

การทดลองที่ 1.2 ผลของตำแหน่งของชิ้นส่วนพืชต่อการเกิดยอด และคัพภะเทียม

<u>วิธีการทดลอง</u>

ใช้อาหารวุ้นสูตร MS (วิธีการเตรียมดูข้อ 5) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ BA ความเข้มข้นได้จากผลการทดลองที่ 1.1 โดยเตรียมใส่ในหลอดทดลองขนาด 25X150 มม ปริมาตรหลอดละ 10 มล

นำต้นอ่อนของต้นพืชที่มีอายุ 10 วัน โดยผ่านวิธีการที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 3 มาตัดโดยใช้ส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยง ส่วนของใบเลี้ยง และส่วนของราก โดยแบ่งแต่ละส่วนออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนโคน ส่วนกลาง และส่วนปลาย แต่ละส่วนมีขนาด 5 มม

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) รวม 9 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 หลอดทดลอง

กรรมวิธีที่ 1 ส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยง ส่วนโคน
กรรมวิธีที่ 2 ส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยง ส่วนกลาง
กรรมวิธีที่ 3 ส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยง ส่วนปลาย
กรรมวิธีที่ 4 ส่วนของใบเลี้ยง ส่วนโคน
กรรมวิธีที่ 5 ส่วนของใบเลี้ยง ส่วนกลาง
กรรมวิธีที่ 6 ส่วนของใบเลี้ยง ส่วนปลาย
กรรมวิธีที่ 7 ส่วนของราก ส่วนโคน
กรรมวิธีที่ 8 ส่วนของราก ส่วนกลาง
กรรมวิธีที่ 9 ส่วนของราก ส่วนปลาย

<u>การบันทึกผล</u>

1. จำนวนวันที่เริ่มเกิดยอด และคัพภะเทียม (สังเกตเห็นด้วยตาเปล่า)
2. เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด และคัพภะเทียม
3. จำนวนยอด และจำนวนคัพภะเทียมต่อชิ้นส่วน โดยให้เป็นคะแนน (สังเกตเห็นด้วยตาเปล่า) มีระดับคะแนนดังนี้

0	ไม่เกิดคัพภะเทียมเลย
1	เกิดคัพภะเทียมน้อยมาก
2	เกิดคัพภะเทียมน้อย
3	เกิดคัพภะเทียมปานกลาง
4	เกิดคัพภะเทียมมาก
5	เกิดคัพภะเทียมมากที่สุด

9.2 การทดลองที่ 2 การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ด้วยสารละลายโคลชิซีน

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อยดังนี้

การทดลองที่ 2.1 ผลของสารละลายโคลชิซีนต่อการเกิดโพลีพลอยด์ กับต้นอัญชันที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ

วิธีการทดลอง

นำเมล็ดที่ผ่านกรรมวิธีการตามที่อธิบายไว้ในข้อ 3 แช่ในสารละลายโคลชิซีน ความเข้มข้นตามกรรมวิธีต่างๆ และใช้ระยะเวลาตามกรรมวิธีต่างๆ แล้วนำไปเพาะในจานแก้วเลี้ยงเชื้อ ที่มีความชื้นจากกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3 ที่เปียกด้วยน้ำกลั่น เพื่อตัดปลายรากมาตรวจนับจำนวนโครโมโซมก่อนปลูก

ใช้วัสดุปลูกสำหรับอนุบาลต้นกล้าที่เพาะจากจานแก้วเลี้ยงเชื้อ นำเมล็ดที่ตัดรากแล้วย้ายปลูก ในกระถางขนาด 2 นิ้ว โดยมี ทรายผสมกับขี้เถ้าแกลบ ในอัตราส่วน 1:1 ในโรงเรือนที่พรางแสงโดยมีความเข้มแสงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อต้นกล้าแข็งแรงย้ายลงปลูกในกระถางขนาด 8 นิ้ว โดยมี แกลบ เปลือกถั่ว และดินร่วน เป็นวัสดุปลูก โดยผสมในอัตราส่วน 2:2:1 ปลูกกลางแจ้ง

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) มี 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของโคลชิซีน 3 ระดับ คือ 0.1, 0.3 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาในการแช่โคลชิซีน มี 3 ระดับ คือ 2, 4 และ 6 ชม

รวมมี 12 กรรมวิธี ทำกรรมวิธีละ 30 ซ้ำ ซ้ำละ 1 เมล็ด

การบันทึกผล

1. บันทึกจำนวนโครโมโซมจากปลายรากก่อนปลูก และปลายยอดหลังปลูกจากต้นที่รอดตาย
2. บันทึกการเจริญเติบโต
   - 2.1 ความสูงของต้น
   - 2.2 จำนวนใบต่อต้น
   - 2.3 ขนาดต้น
   - 2.4 จำนวนกิ่งข้าง
   - 2.5 จำนวนวันเริ่มออกดอก
3. ขนาดเซลล์ปากใบจากต้นที่มีจำนวนโครโมโซมไม่เปลี่ยน และต้นที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น

4. เปอร์เซ็นต์ของต้นที่รอดตาย

การทดลองที่ 2.2 ผลของสารละลายโคลชิซีนต่อการเกิดโพลีพลอยด์จากการแช่ชิ้นส่วนข้อในสภาพปลอดเชื้อ

<u>วิธีการทดลอง</u>

ใช้อาหารวุ้นสูตร MS (วิธีการเตรียมดูข้อ 5) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ BA 1 มก/ล โดยเตรียมใส่หลอดทดลองขนาด 25X150 มม ปริมาตรหลอดทดลอง 10 มล

ตัดส่วนข้อตำแหน่งใบเลี้ยงจากต้นกล้าอายุ 10 วัน ที่ผ่านวิธีการที่อธิบายไว้ในข้อ 3 นำมาแช่ในสารละลายโคลชิซีนความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร ระยะเวลาในการแช่สารตามกรรมวิธีต่างๆ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) รวม 4 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีละ 10 ข้อ ข้อละ 2 ตายอด รวมเป็น 20 ตายอด

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ได้แช่สารละลายโคลชิซีน

กรรมวิธีที่ 2 แช่สารละลายโคลชิซีนเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที

กรรมวิธีที่ 3 แช่สารละลายโคลชิซีนเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที

กรรมวิธีที่ 4 แช่สารละลายโคลชิซีนเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 นาที

<u>การบันทึกผล</u>

1. จำนวนวันที่เริ่มเกิดยอด
2. จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนที่เลี้ยง
3. จำนวนโครโมโซมจากต้นที่รอดตาย
4. เปอร์เซ็นต์การรอดตาย

นำยอดที่ได้จากการทดลองมาศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาถึงการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเพื่อดูการพัฒนาที่เกิดขึ้น

9.3 การทดลองที่ 3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมา

วิธีการทดลอง

คัดเมล็ดที่สมบูรณ์ และมีขนาดใกล้เคียงกันมาฉายรังสีแกมมา แบบเฉียบพลัน โดยใช้ปริมาณตามกรรมวิธีต่างๆ แล้วนำเมล็ดแช่น้ำ 24 ชม นำเมล็ดเพาะในกระถางขนาด 2 นิ้ว โดยใช้ ทรายผสมกับถ่านแกลบ ในอัตราส่วน 1:1 เป็นวัสดุในการเพาะเมล็ด เก็บไว้ในโรงเรือนที่พรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อต้นกล้าแข็งแรงโดยเกิดใบจริง 3 ใบ ย้ายลงปลูกกลางแจ้งในถุงพลาสติกดำขนาด 4X8 นิ้ว โดยใช้ แกลบ เปลือกถั่ว และดินร่วน ผสมกันในอัตราส่วน 2:2:1 เป็นวัสดุปลูก ให้น้ำทุกเช้าในปริมาณที่เท่ากัน และให้ปุ๋ยน้ำสำหรับไม้กระถางคำนวณโดยวิธี Nutritional Balance (อดิศร, 2540) (ตารางผนวก 1) ในปริมาณที่เท่ากันทุกต้นให้สัปดาห์ละครั้ง จนกว่าการทดลองเสร็จสิ้น

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) รวม 5 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ต้น

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ฉายรังสีแกมมา
กรรมวิธีที่ 2 ใช้ปริมาณรังสีแกมมา 100 เกรย์
กรรมวิธีที่ 3 ใช้ปริมาณรังสีแกมมา 200 เกรย์
กรรมวิธีที่ 4 ใช้ปริมาณรังสีแกมมา 300 เกรย์
กรรมวิธีที่ 5 ใช้ปริมาณรังสีแกมมา 400 เกรย์

การบันทึกผล

1 บันทึกการเจริญเติบโต
   1.1 ความสูงต้น
   1.2 จำนวนใบต่อต้น
   1.3 ขนาดต้น
   1.4 จำนวนกิ่งข้าง
   1.5 ขนาดทรงพุ่ม
2 ลักษณะที่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เช่น สีดอก ลักษณะดอก และใบ เป็นต้น
3 เปอร์เซ็นต์การรอดตาย

สถานที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย และรวบรวมข้อมูล

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ห้องปฏิบัติการเนื้อเยื่อวิทยา และแปลงปลูกภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

เดือนเมษายน 2542 – เดือนเมษายน 2544

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University