บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

1. วัสดุ และอุปกรณ์
    1. ใบอ่อนที่ยังม้วนงออยู่ของอ้อยพันธุ์อู่ทอง 3
    2. ตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ (air flow cabinet)
    3. ชั้นสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขนาด 2.9 x 5.8 ม ซึ่งติดตั้งหลอดไฟฟลูออเรสเซนส์ ชั้นละ 3 หลอด โดยมีระยะห่างจากขวดเลี้ยงประมาณ 30 ซม
    4. เครื่องชั่งชนิดละเอียด ชนิดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
    5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
    6. เครื่องเขย่า
    7. หม้อนึ่งความดันไอ
    8. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 125 และ 250 มล
    9. ช้อนตักสาร
    10. ขวดแก้วฝาเกลียวสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 ซม สูง 8 ซม
    11. จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.5 ซม
    12. เครื่องแก้วอื่นๆ เช่น ปิเปต บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดวัดปริมาตร ขวดใส่สารละลายเข้มข้น
    13. ด้ามมีดผ่าตัดเบอร์3
    14. ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 10 และ 11
    15. ปากคีบทนไฟ ขนาดความยาว 10 และ 18 ซม
    16. หลอดหยด (dropper) และจุกยาง
    17. ตะเกียงแอลกอฮอล์
    18. หลอดทดลองใส่แอลกอฮอล์ ขนาด 2.5 x 15 ซม
    19. แผ่นพลาสติกใส ขนาด 7 x 9 ซม
    20. กระดาษกรอง whatman เบอร์ 3
    21. ผ้ากรองไนล่อนที่มีรูขนาด 0.3 มล

22. จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 และ 15 ซม
23. วัสดุอื่นๆ เช่น แผ่นอลูมิเนียม (aluminium foil) สำลี พาราฟิลม์ ยางรัดของ แผ่นป้าย กรรมวิธี ฯลฯ

2. สารเคมี

1. สารเคมีสำหรับฆ่าเชื้อ
   - เอทธานอล เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์
   - คลอร๊อกซ์ ของบริษัท The Clorox Co., Oakland, USA.
2. สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง
3. เกลือให้ธาตุอาหารหลักต่างๆ ตามสูตร MS (1962)
4. เกลือให้ธาตุอาหารรองต่างๆ ตามสูตร MS (1962)
5. วิตามิน และอินทรีย์สารต่างๆ ตามสูตร MS (1962)
6. Ferrous sulfate ของบริษัท J.T. Baker Chemical Co., Philipsberg N.J., USA.
7. Ethylene diamine tetraacetic acid disodium-salt dihydrate ของบริษัท Koch-Light Laboratories Ltd., England
8. Casein hydrolysate
9. 2,4-dicholorophenoxyacetic acid (2,4-D)
10. Abscisic acid (ABA)
11. Potasium hydroxide (KOH) 1 N
12. Hydrochloric acid (HCl) 1 N
13. น้ำกลั่น ชนิดกลั่นจากเครื่องแก้ว
14. น้ำตาลซูโครส
15. น้ำมะพร้าว
16. ผงวุ้น ตราเฮลิคอปเตอร์
17. สารที่ใช้ในการทำให้เกิดเจลของเมล็ดสังเคราะห์
18. โซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) 100~150cP ของบริษัท Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japan
19. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ของบริษัท E. Merck, Germany

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การ เตรียมสารละลายเข้มข้น(stock solution)

1.1 การเตรียมธาตุอาหารหลัก

เตรียมธาตุอาหารหลักสูตร MS (1962) โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้น 10 เท่า โดยชั่งสารแต่ละชนิดตามตารางที่ 1 ละลายสารแต่ละชนิดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1,000 มล แล้วเทใส่ขวดเก็บสารละลายเข้มข้นทุกชนิดรวมกัน ปิดฝา เก็บในตู้เย็น

ตารางที่ 1 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร MS (1962)

ชนิดของสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) 1 ล (มก/ล)	ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (ก)
NH_4NO_3	1650.0	16.5
KNO_3	1900.0	19.0
$CaCl_2 . 2H_2O$	440.0	4.4
$MgSO_4 . 7H_2O$	370.0	3.7
KH_2PO_4	170.0	1.7

1.2 การเตรียมธาตุอาหารรอง

เตรียมธาตุอาหารรองสูตร MS (1962) โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกันโดยให้ความเข้มข้นของสารมากกว่าที่ใช้จริง 100X เตรียมน้ำยาให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS (1962)

ชนิดของสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) 1 ล (มก/ล)	ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น 100 เท่า ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (มก)
$CuSo_4.5H_2O$	0.025	2.5
KI	0.83	83.0
$ZnSO_4.7H_2O$	8.60	860.0
$MnSO_4.4H_2O$	22.30	2,230.0
H_3BO_4	6.20	620.0
$NaMoO_4.2H_2O$	0.25	25.0
$CaCl_2.6H_2O$	0.025	2.5

1.3 การเตรียมสารละลายเหล็กเข้มข้น

เตรียม FeEDTA สูตร MS ซึ่งประกอบด้วย $FeSO_4.7H_2O$ และ $Na_2EDTA.2H_2O$ โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ความเข้มข้นของสารมากกว่าที่ใช้จริง 100X เตรียมน้ำยาให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล ทำการเตรียมโดยชั่งสารแต่ละชนิดละลายน้ำให้มีปริมาตรสุดท้ายของแต่ละส่วนเป็น 500 มล (ตารางที่3) แล้วจึงนำมาผสมไว้ในขวดเดียวกัน โดยใช้ขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของเหล็กสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) 1 ล (มก/ล)	ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น 100 เท่า ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (มก)
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	2.78
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.3	3.73

1.4 การเตรียมวิตามินและอินทรีย์สาร

การเตรียมวิตามินและ อินทรีย์สาร ในสูตรMS (1962) เตรียมแยกแต่ละสาร โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้น

1.4.1 การเตรียม thiamine.HCl

ชั่ง thiamine 10 มก ละลายด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อยพอให้ละลายได้ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูได้จากสูตรอาหารแต่ละสูตร

1.4.2 การเตรียม pyridoxin .HCl

ชั่ง pyridoxin 10 มก ละลายด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อยพอให้ละลายได้ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูได้จากสูตรอาหารแต่ละสูตร

1.4.3 การเตรียม nicotinic acid

ชั่ง nicotinic acid 5 มก ละลายด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อยพอให้ละลายได้ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูได้จากสูตรอาหารแต่ละสูตร

1.4.4 การตรียม glycine

ชั่ง glycine 20 มก ละลายด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อยพอให้ละลายได้ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูได้จากสูตรอาหารแต่ละสูตร

1.4.5 การเตรียม myo-inositol

ชั่ง myo-inositol 500 มก ละลายด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อยพอให้ละลายได้ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูได้จากสูตรอาหารแต่ละสูตร

1.5 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต

1.5.1 การเตรียม2,4-D

ชั่ง 2,4-D 30 มก ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อยเพียงพอให้ละลายได้ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูได้จากสูตรอาหารแต่ละสูตร

1.6 การเตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนต

เตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยเตรียมใส่ขวดชมพู่ ขนาด 125 มล ปริมาตรขวดละ 50 มล. โดยชั่งสารลงในขวดรูปชมพู่ที่ใช้โดยตรง ขวดละ 1.5 ก จากนั้นจึงเติมอาหารเหลวสูตร MS (1962) ลงไปละลายจำนวน 50 มล ซึ่งสารโซเดียมอัลจิเนตจะละลายได้ไม่หมด จากนั้นจึงปิดปากขวดในลักษณะเดียวกันกับการเตรียมอาหาร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อต่อไป

1.7 การเตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์

เตรียมสารละลาย $CaCl2.2H_2O$ (น้ำหนักโมเลกุล 147.02) ความเข้มข้น 100 มลม โดยเตรียมใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มล ปริมาตรขวดละ 100 มล เตรียมโดยชั่งสารลงในขวดรูปชมพู่ที่ใช้โดยตรง ขวดละ 14.7 ก แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปละลาย จำนวน 100 มล เขย่าจนสารละลายหมดแล้วจึงปิดปากขวด และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อต่อไป

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ

อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้ในการวิจัยนี้แบ่งออกเป็น

2.1.1 สูตรอาหารสำหรับชักนำแคลลัส

ใช้สูตรอาหารพื้นฐานของ Murashige and Skoong (1962) ดัดแปลงโดย Oropeza *et al.* (2000) โดยนำส่วนประกอบของอาหารพื้นฐานสูตร MS จากน้ำยาเข้มข้นที่เตรียมไว้มาผสมให้เข้ากัน โดยใช้สารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดดังตาราง

ขั้นตอนการทำอาหารสูตร MS ดัดแปลง สำหรับชักนำแคลลัส มีดังนี้

ใส่น้ำกลั่นลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล ประมาณ 1/3 ของขวดแล้วเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักลงไป หลังจากนั้นจึงเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรอง วิตามิน เหล็ก และสารควบคุมการเจริญเติบโต และน้ำมะพร้าวลงไปตามลำดับ โดยเขย่าให้น้ำยาผสมกันดีระหว่างแต่ละครั้งที่เติม จากนั้นละลายน้ำตาลใส่ลงไป แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล เทสารละลายลงในบีกเกอร์ขนาด 2,000 มล จากนั้นนำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ 5.8 โดยใช้ 1 N HCl หรือ 1 N KOH สำหรับเตรียมอาหารวุ้นและใส่วุ้นลงในอาหารแล้วนำไปต้มจนวุ้นละลายดี สังเกตจากการที่อาหารมีลักษณะใส ต่อจากนั้นตวงอาหารใส่ขวดแก้วฝาเกลียวสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 ซม สูง 8 ซม ปริมาณ 25 มล/หลอด ปิดด้วยฝาขวดพลาสติกและหุ้มด้วยกระดาษลอกลาย แล้วรัดด้วยยางรัดของ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดในอาหารสูตรชักนำแคลลัส

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณสารละลายเข้มข้นเพื่อเตรียมอาหาร 1 ลิตร (มล)
สารละลายธาตุอาหารหลักความเข้มข้น 10X	100
สารละลายธาตุอาหารรองความเข้มข้น 100X	10
สารละลายเหล็กความเข้มข้น 100X	10
วิตามินและอินทรีย์สาร	
thiamine (10 มก ในน้ำยา 100 มล)	10
myo-inositol (500 มกในน้ำยา 100 มล)	20
cysteine (500 มก ในน้ำยา 100 มล)	10
สารควบคุมการเจริญเติบโต	
2,4-D (30 มก ในน้ำยา 100 มล)	10
น้ำมะพร้าว	50
ซูโครส	20 ก/ล
วุ้น	8 ก/ล

2.1.2 สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

ใช้สูตรอาหารพื้นฐานของ Murashige and Skoong (1962) ดัดแปลงโดย Oropeza *et al.* (2000) โดยนำส่วนประกอบของอาหารพื้นฐานสูตร MS จากน้ำยาเข้มข้นที่เตรียมไว้มาผสมให้เข้ากัน โดยใช้สารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดดังตาราง

ขั้นตอนการทำอาหารสูตร MS ดัดแปลง สำหรับเลี้ยงเซลล์แขวนลอย มีดังนี้

ใส่น้ำกลั่นลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล ประมาณ 1/3 ของขวดแล้วเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักลงไป หลังจากนั้นจึงเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรอง วิตามิน เหล็ก และสารควบคุมการเจริญเติบโต และน้ำมะพร้าว ลงไปตามลำดับ โดยเขย่าให้น้ำยาผสมกันดีระหว่างแต่ละครั้งที่เติม จากนั้นละลายน้ำตาลใส่ลงไป แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล เทสารละลายลงในบีกเกอร์ขนาด 2,000 มล จากนั้นนำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ 5.8 โดยใช้ 1 N HCl หรือ 1 N KOH จากนั้นตวงอาหารเหลวใส่ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ ปิดปากขวดด้วยพลาสติกทนร้อนที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 70 x 70 มม รัดด้วยยางรัดของ และปิดทับด้วยกระดาษลอกลาย รัดด้วยยางรัดของอีกครั้ง จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2.1.3 สูตรสำหรับชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอ

ใช้สูตรอาหารพื้นฐานของ Murashige and Skoong (1962) โดยนำส่วนประกอบของอาหารพื้นฐานสูตร MS จากน้ำยาเข้มข้นที่เตรียมไว้มาผสมให้เข้ากัน โดยใช้สารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดดังตาราง

ขั้นตอนการทำอาหารสูตร MS ดัดแปลง สำหรับชักนำโซมาติกเอมบริโอมีดังนี้

ใส่น้ำกลั่นลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล ประมาณ 1/3 ของขวดแล้วเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักลงไป หลังจากนั้นจึงเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรอง วิตามิน เหล็ก ลงไปตามลำดับ โดยเขย่าให้น้ำยาผสมกันดีระหว่างแต่ละครั้งที่เติม จากนั้นละลายน้ำตาลใส่ลงไป แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล เทสารละลายลงในบีกเกอร์ขนาด 2,000 มล จากนั้นนำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ 5.8 โดยใช้ 1 N HCl หรือ 1 N KOH จากนั้นตวงอาหารเหลวใส่ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มล ปิดปากขวดด้วยพลาสติกทนร้อนที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 70 x 70

มม รัดด้วยยางรัดของ และปิดทับด้วยกระดาษลอกลาย รัดด้วยยางรัดของอีกครั้ง จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดในอาหารสูตรเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณสารละลายเข้มข้นเพื่อเตรียมอาหาร 1 ลิตร (มล)
สารละลายธาตุอาหารหลักความเข้มข้น 10X	100
สารละลายธาตุอาหารรองความเข้มข้น 100X	10
สารละลายเหล็กความเข้มข้น 100X	10
วิตามินและอินทรีย์สาร	
thiamine (10 มก ในน้ำยา 100 มล)	5
pyridoxin (10 มก ในน้ำยา 100 มล)	5
nicotinic acid (5 มก ในน้ำ 100 มล)	10
myo-inositol (500 มกในน้ำยา 100 มล)	20
casein hydrolysate (400 มก ในน้ำยา 100 มล)	100
สารควบคุมการเจริญเติบโต	
2,4-D (3 มก ในน้ำยา 100 มล)	10
น้ำมะพร้าว	100
ซูโครส	20 ก/ล

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบของสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิด ในอาหารสูตรชักนำโซมาติกเอมบริโอ

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณสารละลายเข้มข้นเพื่อเตรียมอาหาร 1 ลิตร (มล)
สารละลายธาตุอาหารหลักความเข้มข้น 10X	100
สารละลายธาตุอาหารรองความเข้มข้น 100X	10
สารละลายเหล็กความเข้มข้น 100X	10
วิตามินและอินทรีย์สาร	
Glycine (20 มก ในน้ำยา 100 มล)	10
thiamine (10 มก ในน้ำยา 100 มล)	1
pyridoxin (10 มก ในน้ำยา 100 มล)	5
nicotinic acid (5 มก ในน้ำ 100 มล)	10
myo-inositol (500 มกในน้ำยา 100 มล)	20
น้ำตาลซูโครส	30 ก/ล

2.2 การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การผลิตโซมาติกเอมบริโอของอ้อยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนของใบอ่อนที่ยังม้วนงออยู่ของอ้อยพันธุ์อู่ทอง 3 มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.2.1 การชักนำให้เกิดแคลลัส (callus induction)

นำยอดอ้อยพันธุ์อู่ทอง 3 ในแปลงปลูกที่มีอายุ 6 เดือน มาตัดแต่งทำความสะอาด ทำการลอกกาบใบชั้นนอกออก นำมาล้างด้วยสบู่เหลวและล้างด้วยน้ำจนสะอาด แล้วลอกกาบใบออกอีก ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ขณะฟอกฆ่าเชื้อทำการเขย่าเป็นระยะ แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ภายในตู้ปลอดเชื้อ นำมาลอกใบออกจนเหลือใบชั้นในสุดประมาณ 2-3 ชั้น ใช้ชิ้นส่วนใบอ่อนตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ให้มีขนาดขนาด 2 มม แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส ในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอาหาร 25 มล โดยวางชิ้นส่วนใบอ่อนในแนวตั้ง ปิดฝาพันทับด้วยพาราฟิล์ม นำไปเลี้ยงในสภาพไม่มีแสง ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เพื่อทำการชักนำให้เกิดแคลลัส ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 3 สัปดาห์ สังเกต

การเจริญการพัฒนาและลักษณะของเนื้อเยื่อแคลลัส บันทึกภาพของลักษณะของแคลลัสที่ได้

2.2.2 การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (suspension culture)

นำเอมบริโอเจนิกแคลลัสที่มีอายุ 8 สัปดาห์ ที่ได้จากการการเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนที่ม้วนงอของอ้อยพันธุ์อู่ทอง 3 บนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัส โดยเอมบริโอเจนิกแคลลัสที่นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเป็นแคลลัสที่มีลักษณะแน่น (compact callus) มีสีขาว มีผิวเป็นปุมกลม นำเอมบริโอเจนิกแคลลัสมาแยกเป็นชิ้นเล็กๆ ย้ายลงอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเซลล์แขวนลอยตามวิธีของ Taylor *et al.* (1992) โดยนำเอมบริโอเจนิกแคลลัสหนัก 0.5 กรัม (น้ำหนักสด) ย้ายลงในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 50 มล ที่มีอาหารสูตรเลี้ยงเซลล์แขวนลอย 10 มล บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ในสภาพไม่มีแสงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำการเปลี่ยนอาหารตามการพัฒนาของเซลล์แขวนลอยตามวิธีต่อไปนี้

ในระยะแรกทำการเปลี่ยนอาหารด้วยอาหารใหม่ทุก 3-4 วันเพื่อลดการสะสมของสารประกอบฟีนอลลิก (phenolic compound) เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ ทำการย้ายแคลลัสและเซลล์แขวนลอยทั้งหมด ไปยังขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร และเพิ่มปริมาณอาหารเป็น 20 มิลลิลิตร ทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ปริมาณ 10 มิลลิลิตรทุก 3-4 วัน เป็นเวลา 3-5 สัปดาห์ เมื่อถึงระยะนี้จะได้เซลล์แขวนลอยที่มีทั้งเซลล์เดี่ยว กลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก กลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ และก้อนแคลลัส เซลล์ที่มีแวคคิวโอขนาดใหญ่ และเซลล์ที่มีรูปร่างยาว ปะปนกันอยู่ในอาหารเหลว เรียกว่าheterogeneous cell suspension culture

ทำการเปลี่ยนอาหารโดยการเขย่าเซลล์แขวนลอยเป็นเวลาประมาณ 5 วินาที ก้อนแคลลัสและกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่จะตกตะกอนอยู่บริเวณก้นขวดแก้วรูปชมพู่ ใช้ปิเปตปากกว้างดูดเซลล์บริเวณตอนกลางของเซลล์แขวนลอย ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วปริมาณ 10 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารใหม่ 25 มิลลิลิตร ทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 3-4 วัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เมื่อถึงระยะนี้จะได้เซลล์แขวนลอยชนิด homogeneous cell suspension culture ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 7 วัน โดยการเขย่าเซลล์แขวนลอยแล้วทิ้งไว้ประมาณ 5 วินาทีเพื่อให้กลุ่มเซลล์ตกตะกอน ใช้ปิเปตดูดเอาอาหารเก่าออกแล้วแทนด้วยอาหารใหม่สูตรเดิมในปริมาณที่เท่ากัน ทุก 7 วัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์

2.2.3 การชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอ (somatic embryo induction)

ทำการกรองเซลล์แขวนลอยในระยะ proembryonic mass (PEM) ด้วยผ้ากรองไนล่อนที่มีรูขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 300 ไมโครเมตร ล้างเซลล์ด้วยอาหารสูตร MS (1962) สำหรับชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอ เพื่อชะล้างสารที่ไม่ต้องการ และให้เซลล์ขนาดเล็กลอดผ่านผ้ากรองได้ดีขึ้น นำกลุ่มเซลล์ของอ้อยที่ติดบนผ้ากรองไนล่อนลงเลี้ยงในอาหารเหลวพื้นฐานสูตร MS (1962) สำหรับชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอ ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มล ที่บรรจุอาหาร 50 มล โดยใช้ปริมาณเซลล์ 2 กรัม (น้ำหนักสด) ปิดปากขวดด้วยพลาสติกรัดด้วยยางรัดของและพันทับด้วยพาราฟิล์ม นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อวินาที ในสภาพแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25+2 องศาเซลเซียส เป็นเวลาเป็นเวลา 6 สัปดาห์ จะได้ somatic embryo ที่พร้อมสำหรับนำมาใช้ในการทดลอง

2.2.4 การผลิตเมล็ดสังเคราะห์

นำโซมาติกเอมบริโอของอ้อยที่ผลิตได้ขนาด 3 มม ที่ได้จากการอาหารชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอสูตร MS (1962) ผสมลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ ใช้หลอดหยดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม ดูดสารละลายที่มีโซมาติกเอมบริโอบรรจุอยู่ นำมาหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ทำการเขย่าเป็นระยะ จะเกิดเป็นก้อนเมล็ดสังเคราะห์ที่สมบูรณ์ รินสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ออกให้หมด ล้างเมล็ดสังเคราะห์ด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เลือกเมล็ดสังเคราะห์ที่มีเพียง 1 โซมาติกเอมบริโอไว้สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

3 วิธีการวิจัย

การศึกษาแบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ

3.1 การทดลองที่ 1 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ของอ้อย

วางแผนการทดลองสุ่มสมบูรณ์ (CRD) รวมทั้งสิ้น 3 กรรมวิธี ทวนซ้ำ4 ครั้ง แต่ละซ้ำใช้15 เมล็ดสังเคราะห์

กำหนดกรรมวิธีต่างๆ ดังนี้ กรรมวิธีที่ 1, 2 และ 3 ทำการเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 4±1, 15±2 และ 25±2 องศาเซลซียส ตามลำดับ

วิธีการทดลอง

นำเมล็ดสังเคราะห์ของอ้อยที่ผลิตได้ มาทำการเก็บรักษาในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มล ขวดละ 15 เมล็ด ปิดปากขวดด้วยพลาสติก รัดด้วยยางรัดของ พันทับด้วยพาราฟิลม์ นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±1, 15±2 และ 25±2 องศาเซลเซียส สภาพแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นทำการเพาะทดสอบความงอกในสภาพปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส สภาพแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลเปอร์เซ็นต์ความงอกการตายในระหว่างการเก็บรักษา และเปอร์เซ็นต์ความงอกรวม (ระหว่างและหลังการเก็บรักษา)

3.2 การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของระดับการดึงน้ำออกโดยซิลิกาเจล ต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดสังเคราะห์แบบแห้งของอ้อย

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) รวมทั้งสิ้น 5 กรรมวิธี ทวนซ้ำ4 ครั้ง แต่ละซ้ำมี15 เมล็ดสังเคราะห์

กำหนดกรรมวิธีต่างๆ ดังนี้ กรรมวิธีที่ 1, 2, 3, 4, และ 5 ทำการระเหยน้ำออกจากเมล็ดสังเคราะห์จนมีระดับการสูญเสียน้ำ 0, 20, 40, 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

วิธีการทดลอง

นำเมล็ดสังเคราะห์ที่ผลิตได้มาทำการดึงน้ำออกโดยใช้ซิลิกาเจล จนกระทั่งเมล็ดสังเคราะห์มีระดับการสูญเสียน้ำ 0, 20, 40, 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากนั้นนำเมล็ดสังเคราะห์มาเก็บไว้ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มล ปิดด้วยพลาสติกใส รัดยางรัด และพันทับด้วยพาราฟิล์ม ทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในสภาพแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25+2 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำเมล็ดสังเคราะห์มาให้ความชื้น (rehydration) อีกครั้งและเพาะทดสอบความงอกในสภาพปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส สภาพแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

บันทึกผลเปอร์เซ็นต์ความงอกและตายของเมล็ดสังเคราะห์ในระหว่างการเก็บรักษา เปอร์เซ็นต์ความงอกรวม (ระหว่างและหลังการเก็บรักษา)

3.3 การทดลองที่ 3 หาผลของ ABA (abscisic acid) ในการชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำ (desiccation tolerance) ของเมล็ดสังเคราะห์ของอ้อยที่ผ่านการดึงน้ำออก

3.3.1 หาระดับความเข้มข้นของ ABA ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) รวมทั้งสิ้น 7 กรรมวิธี ทวนซ้ำ 4 ครั้ง แต่ละซ้ำมี 15 เมล็ดสังเคราะห์

กำหนดกรรมวิธีต่างๆ ดังนี้ กรรมวิธีที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 เลี้ยงเมล็ดสังเคราะห์ในอาหารเหลวสูตร MS (1962) สำหรับชักนำโซมาติกเอมบริโอ ที่เติม ABA 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.6 มก/ล ตามลำดับ

วิธีการทดลอง

นำโซมาติกเอมบริโอที่เลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ย้ายลงในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มล ที่บรรจุอาหารเหลวสูตร MS (1962) สำหรับชักนำโซมาติกเอมบริโอ 50 มล ที่มีความเข้มข้นของ ABA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.6 มก/ล ตามลำดับ เป็นเวลา 10 วัน บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25±2

องศาเซลเซียส สภาพแสง 16 ชมต่อวัน และนำโซมาติกเอมบริโอที่ได้มาเคลือบด้วยสารอัลจิเนตสำหรับผลิตเป็นเมล็ดสังเคราะห์ และนำไปทำให้แห้งโดยการดึงน้ำออกด้วยซิลิกาเจลในจานแก้ว จนมีระดับการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์ นำเมล็ดสังเคราะห์ที่ได้มาทำการให้ความชื้นและทดสอบความงอกของเมล็ดสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส สภาพแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลเปอร์เซ็นต์ความงอก ของเมล็ดสังเคราะห์ภายหลังการดึงน้ำออก

3.3.2 การทดสอบความงอกภายหลังการเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ของอ้อยที่ผ่านการชักนำให้เกิดการทนทานต่อการสูญเสียน้ำด้วย ABA

วางแผนการทดลองแบบ สุ่มสมบูรณ์ (CRD) รวมทั้งสิ้น 4 กรรมวิธี ทวนซ้ำ 4 ครั้ง แต่ละซ้ำมี 15 เมล็ดสังเคราะห์

กำหนดกรรมวิธีต่างๆ ดังนี้ กรรมวิธีที่ 1, 2, 3 และ 4 ทำการเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ที่ระยะเวลา 0, 1, 2 และ 3 สัปดาห์

วิธีการทดลอง

นำเมล็ดสังเคราะห์ของอ้อยที่ผ่านการชักนำให้เกิดการทนทานต่อการดึงน้ำออกด้วย ABA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มก/ล และทำให้แห้งโดยการดึงน้ำออกด้วยซิลิกาเจลจนมีระดับการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์ มาทำการเก็บรักษาในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 125 มล ขวดละ 10 เมล็ด ปิดด้วยพลาสติกรัดด้วยยางรัด นำไปเก็บในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 1, 2 และ 3 สัปดาห์ ตามลำดับ หลังจากนั้นนำเมล็ดสังเคราะห์ที่ผ่านการเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ มาทำการให้ความชื้นอีกครั้งและเพาะเพื่อทดสอบความงอกในสภาพปลอดเชื้อ อุณหภูมิ 25+2 องศาเซลเซียส สภาพแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

บันทึกผลเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดสังเคราะห์ ภายหลังจากเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ