บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

1. วัสดุ และอุปกรณ์

1. คัพกะอ่อนข้าวโพดหวาน ที่ผ่านการผสมแล้วเป็นเวลา 11 วัน
2. ตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ (Air flow cabinet)
3. ชั้นสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขนาด 2.9x5.8 ม. ที่ติดหลอดไฟฟลูออเรสเซนส์ ชั้นละ 3 หลอด โดยมีระยะห่างจากขวดเลี้ยงประมาณ 30 ซม.
4. เครื่องชั่งละเอียด ชนิดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. เครื่องวัดความเป็นกรด–ด่าง
6. เครื่องเขย่า
7. หม้อนึ่งความดัน
8. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 50, 125 และ 250 มล.
9. ช้อนตักสาร
10. เตาอบไฟฟ้า
11. เตาอบไมโครเวฟ
12. ขวดแก้วฝาเกลียวสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 ซม. สูง 8 ซม.
13. ด้ามมีดผ่าตัด เบอร์ 3
14. ใบมีดผ่าตัด เบอร์ 10 และ 11ปากคีบทนไฟ
15. หลอดหยด (Dropper) และจุกยาง
16. ตะเกียงแอลกอฮอล์
17. หลอดทดลองสำหรับใส่แอลกอฮอล์ ขนาด 25x150 มม.
18. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3
19. จานเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 และ 15 ซม.
20. วัสดุที่ใช้ในตู้กรองอากาศ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

21. วัสดุอื่น ๆ เช่น แผ่นอลูมิเนียม (Aluminium foil) สำลี ถุงพลาสติก เครื่องพ่นฝอย พาราฟิล์ม ยางรัดของ แผ่นป้ายกรรมวิธี

2. สารเคมี

1. สารเคมีสำหรับฆ่าเชื้อ
   - เอทธานอล เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์
   - คลอร็อกซ์
2. สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
   - เกลือที่ให้สารอาหารหลักต่าง ๆ ตามสูตร MS (1962) และN6
   - เกลือที่ให้สารอาหารรองต่าง ๆ ตามสูตร MS (1962) และ N6 (1975)
   - วิตามิน และอินทรีย์สารต่าง ๆ ตามสูตร MS (1962) และ N6 (1975)
   - Ferrous sulfate ของบริษัท J. T. Baker Chemical Co., Philipsberg N.J., USA.
   - Ethylene diamine tetraacetic acid disodium-salt dihydrate ของบริษัท Koch-Light Laboratories Ltd. England
   - Potassium hydroxine (KOH) 1 N
   - Hydrochloric acid (HCl) 1 N
   - Casein hydrolysate
   - L–Proline
   - Silver Nitrate
   - Myo–inositol
   - น้ำกลั่น
   - น้ำตาลซูโครส
   - น้ำมะพร้าว
   - ผงถ่านคาร์บอน
   - ผงวุ้นสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
3. สารที่ใช้ในการทำให้เกิดเจลของเมล็ดพืชเทียม
   - สารโซเดียมอัลจิเนต (Sodium alginate) 100 ~ 150cP ของ Wako Pure Chemical Industries Ltd. Japan
   - แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 . 2H_2O$) ของบริษัท E. Merck Germany

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- สารเบนโนมิล (benomyl)

4. วิธีการดำเนินการวิจัย

4.1 การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)

4.1.1 การเตรียมธาตุอาหารหลัก (macro–elements)

เตรียมธาตุอาหารหลักสูตร MS (1962) และ N6 (1975) โดยเตรียมสารละลายเข้มข้น 10 เท่า โดยชั่งสารแต่ละชนิดตามตารางที่ 1 ละลายสารประกอบแต่ละชนิดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1,000 มล.

ตารางที่ 1 ชนิด และปริมาณของสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร MS (1962) และN6 (1975)

ชนิดของสาร	ปริมาณสารใน สูตร MS (1962) 1 ล. (มก./ล.)	ปริมาณสารใน สูตร N6 (1975) 1 ล. (มก./ล.)
NH_4NO_3	1650.0	463.0
KNO_3	1900.0	2830.0
$CaCl_2 . 2 H_2O$	440.0	166.0
$MgSO_4 . 7H_2O$	370.0	185.0
KH_2PO_4	170.0	400.0

4.1.2 การเตรียมธาตุอาหารรอง (Micro–elements)

เตรียมธาตุอาหารรองสูตร MS (1962) และ N6 (1975) โดยเตรียมสารละลายเข้มข้น 100 เท่า โดยชั่งสารแต่ละชนิดตามตารางที่ 2 ละลายสารประกอบแต่ละชนิดในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1.3 การเตรียมวิตามิน และอินทรีย์สาร (Organic compounds)

เตรียมวิตามิน และอินทรีย์สารสูตร MS (1962) และ N6 (1975) โดยเตรียมสารละลายเข้มข้น 100 เท่า โดยชั่งสารแต่ละชนิดตามตารางที่ 3 ละลายสารประกอบแต่ละชนิดในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มล.

ตารางที่ 2 ชนิด และปริมาณของสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS (1962) และN6 (1975)

ชนิดของสาร	ปริมาณสารใน สูตร MS (1962) 1 ล. (มก./ล.)	ปริมาณสารใน สูตร N6 (1975) 1 ล. (มก./ล.)
Na_2 – EDTA	37.3	37.3
$FeSO_4 . 7 H_2O$	27.8	27.8
H_3BO_3	6.20	1.6
$MnSO_4 . 4H_2O$	22.30	3.3
$ZnSO_4 . 2H_2O$	8.60	1.5
KI	0.85	0.8
$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	0.25	0.25
$CuSO_4 . 5HP_2O$	0.025	0.025
$CoCl_2 . 6H_2O$	0.025	-

ตารางที่ 3 ชนิด และปริมาณของสารในสารละลายเข้มข้นของวิตามิน และอินทรีย์สารของอาหารสังเคราะห์ สูตร MS (1962) และN6 (1975)

ชนิดของสาร	ปริมาณสารใน สูตร MS (1962) 1 ล. (มก./ล.)	ปริมาณสารใน สูตร N6 (1975) 1 ล. (มก./ล.)
Myo – inositol	100	-
Glysine	2.0	40
Nicotinic acid	0.5	0.5
Pyridoxin – HCL	0.5	0.5
Thiamin – HCI	0.5	1
Sucrose	30,000.0	30,000.0
Agar	8,000.0	8,000.0
pH	5.8	5.8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2.3 การเตรียม 2,4-D

ชั่งสาร 2,4-D 30 มก. ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อยเพียงพอให้สารละลายได้ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูได้จากตำรับการทดสอบ

4.2 การเตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนต

เตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยเตรียมใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล. ปริมาตรขวดละ 50 มล. โดยชั่งสารโดยตรงขวดละ 1.5 ก. จากนั้นจึงเติมอาหารเหลวตามตำรับทดสอบเพื่อเป็นตัวทำละลายจำนวน 50 มล. ซึ่งสารโซเดียมอัลจิเนตจะละลายได้ไม่หมด จากนั้นปิดปากขวดและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

4.3 การเตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์

เตรียมสารละลาย $CaCl_2 . 2H_2O$ (น้ำหนักโมเลกุล 147.02) ความเข้มข้น 100 มลม. โดยเตรียมใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล. ขวดละ 100 มล. โดยการชั่งสารโดยตรงขวดละ 14.7 ก. และเติมน้ำกลั่นเพื่อเป็นตัวทำละลาย จำนวน 100 มล. เขย่าจนกระทั่งสารละลายหมดจึงปิดปากขวดและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. วิธีการวิจัย

5.1 การทดลองที่ 1 ศึกษากระบวนการโซมาติคเอมบริโอเจเนซิสของข้าวโพดหวาน

การทดลองที่ 1.1 <u>สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเนื้อเยื่อคัพภะอ่อนของข้าวโพดหวาน เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส</u>

นำเมล็ดข้าวโพดหวานที่อายุ 11 วันหลังการปฏิสนธิ ทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเนื้อเยื่อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ที่มีความเข้มข้น 10 % โดยมีส่วนผสมของ Tween 20 ความเข้มข้น 0.01 % เป็นเวลา 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ทำการผ่าเนื้อเยื่อเพื่อนำคัพภะอ่อน (Immature embyo) ออกจากเมล็ดภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป และนำเนื้อเยื่อคัพภะอ่อนดังกล่าวไปเลี้ยงในอาหารที่มีการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 สูตร คือ อาหารสูตร MS (1962) และ N6(1975)

ปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นของ 2,4- D ในระดับ 2, 3 และ 4 มิลลิลิตรต่อกรัม

ปัจจัยที่ 3 ความเข้มข้นของซูโครส 2 ระดับ คือ 30 และ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร

หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อคัพภะอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารที่มีการควบคุมปัจจัยต่าง ๆดังกล่าวและเพาะเลี้ยงในที่มืด มีการควบคุมอุณหภูมิ 25±2°C เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

บันทึกผลการทดลอง ดังนี้ เปอร์เซ็นต์การเกิด embryogenic callus และ non-embryogenic callus, ขนาดของแคลลัส

การทดลองที่ 1.2 <u>การหาวิธีการเก็บรักษาและการขยายจำนวนของแคลลัส</u>

นำแคลลัสที่ได้มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีปัจจัยต่าง ๆ ตามการทดลองที่1.1 โดยทำการย้ายแคลลัสเพื่อเลี้ยงบนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

บันทึกผลการทดลอง ดังนี้ ขนาดและน้ำหนักสดของแคลลัส และเปอร์เซ็นต์การเกิด embryogenic callus และ non-embryogenic callus

การทดลองที่ 1.3 <u>การหาวิธีการชักนำให้เกิดโซมาติคเอมบริโอ (Somatic embryos) โดยผ่านกระบวนการโซมาติคเอมบริโอเจเนซิสของข้าวโพดหวาน</u>

นำแคลลัสที่ได้จากการขยายจำนวนเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ตัดเนื้อเยื่อให้มีขนาด 0.5 x 0.5 ซม. และนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (1962) แต่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บันทึกผลการทดลอง ดังนี้ เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นราก การพัฒนาเป็น somatic embryos จำนวนการเกิด somatic embryos ต่อชิ้นส่วนแคลลัส

การให้คะแนนแคลลัส

การวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงการเจริญและการพัฒนาของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนของคัพภะอ่อนข้าวโพดหวาน โดยการให้คะแนนแคลลัสตามเกณฑ์มาตรฐานที่วางไว้ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ คะแนนของแคลลัสขึ้นอยู่กับขนาดของแคลลัสที่เกิดขึ้นด้วยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส เกณฑ์การให้คะแนนแคลลัสแสดง ดังนี้

คะแนน	ขนาด	คำอธิบาย
0	-	เนื้อเยื่อคัพภะอ่อนตาย
1	-	เนื้อเยื่อยังมีชีวิตแต่เกิดการพัฒนาเป็นแคลลัส
2	○	เนื้อเยื่อเริ่มมีการพัฒนาเป็นแคลลัสพอมองเห็นได้ แต่มีขนาดโตไม่เกิน 2 มม.
3	◯	เนื้อเยื่อมีแคลลัสเกิดขึ้นและมีการเจริญต่อไป โดยมีขนาดที่เกิดขึ้นมากกว่า 2 มม. แต่ไม่เกิน 5 มม.
4	◯	ขนาดของแคลลัสที่เกิดขึ้นมีขนาดมากกว่า 5 มม. แต่ไม่เกิน 1 ซม.
5	◯	ขนาดของแคลลัสที่เกิดขึ้นมีขนาดมากกว่า 1 ซม. แต่ไม่เกิน 1.5 ซม.
6	◯	ขนาดของแคลลัสที่เกิดขึ้นมีขนาดมากกว่า 1.5 ซม. แต่ไม่เกิน 2 ซม.
7	◯	ขนาดของเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นมีขนาดมากกว่า 2 ซม. แต่ไม่เกิน 2.5 ซม.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 วิเคราะห์ผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นของซูโครสต่อความมีชีวิตของเมล็ดพืชเทียมข้าวโพดหวานที่ผ่านการเก็บรักษา 2 สัปดาห์

วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ (Random Complete Block Design (RCB) : Factorial) โดยมี 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 3 ระดับ คือ 0, 30, 60 กรัมต่อลิตร

ปัจจัยที่ 2 อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา 2 ระดับ คือ 15, 25 °C

โดยการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ตามสภาพแวดล้อมดังกล่าว ทำการทดาอบ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 20 เมล็ดเทียม

บันทึกผลการทดลอง ดังนี้ เปอร์เซ็นต์ความงอก, เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อนที่มีลักษณะปกติ (normal seedling), เปอร์เซ็นต์ต้นอ่อนที่มีลักษณะผิดปกติ (abnormal seedling) และจำนวนวันเริ่มที่เมล็ดพืชเทียมเริ่มงอก

การทดลองที่ 3 ผลของเปอร์เซ็นต์การดึงน้ำออกจากเมล็ดพืชเทียมและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อความมีชีวิตของเมล็ดพืชเทียมข้าวโพดหวาน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ (Random Complete Block Design (RCB) : Factorial)โดยมี 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 อัตราการสูญเสียน้ำออก 3 ระดับคือ 20, 40, 60 เปอร์เซ็นต์

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาในการเก็บรักษา 2 ระดับ คือ 1, 2 สัปดาห์

ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 20 เมล็ดเทียม บันทึกผลการทดลองดังนี้บันทึกผลการทดลอง ดังนี้ เปอร์เซ็นต์ความงอก, เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อนที่มีลักษณะปกติ, เปอร์เซ็นต์ต้นอ่อนที่มีลักษณะผิดปกติ และจำนวนวันเริ่มที่เมล็ดพืชเทียมเริ่มงอก

การทดลองที่ 4 ผลความเข้มข้นของ Benomyl และซูโครสต่อการควบคุมการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ และความมีชีวิตของเมล็ดพืชเทียมข้าวโพดหวานที่ผ่านการเก็บรักษา 2 สัปดาห์

วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ (Random Complete Block Design (RCB) : Factorial)โดยมี 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของ benomyl 3 ระดับ คือ 0, 2, 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นของซูโครส 2 ระดับ คือ 30, 60 สัปดาห์

ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 20 เมล็ดเทียม บันทึกผลการทดลองดังนี้บันทึกผลการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทดลอง ดังนี้ เปอร์เซ็นต์ความงอก, เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อนที่มีลักษณะปกติ, เปอร์เซ็นต์ต้นอ่อนที่มีลักษณะผิดปกติ, จำนวนวันเริ่มที่เมล็ดพืชเทียมเริ่มงอก และเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved