บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาการชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้และการเพิ่มชุดโครโมโซมของกล้วยไม้ *Phalaenopsis amabilis* และ *P. parishii* จากใบอ่อน แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 การชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้โดยสูตรอาหารที่เหมาะสม

การทดลองที่ 2 การกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลายโคลชิซิน

การทดลองที่ 3 การศึกษาวิธีการหาจำนวนโครโมโซมปลายรากของต้น *Phalaenopsis*

อุปกรณ์และวิธีการทดลองมีดังนี้

การทดลองที่ 1 การชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้โดยสูตรอาหารที่เหมาะสม

การชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้โดยสูตรอาหารที่เหมาะสมของพืชทดลองแบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย โดยมีอุปกรณ์และวิธีการทดลองดังนี้ คือ

การทดลองที่ 1.1 สูตรอาหารพื้นฐานและระดับน้ำตาลที่เหมาะสมต่อชิ้นส่วนใบอ่อนของกล้วยไม้ *P. amabilis* และ *P. parishii*

1.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1.1 ต้นกล้วยไม้ *P. amabilis* และ *P. parishii* จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ อายุ 6 เดือนที่มีใบอ่อน

1.1.1.2 เครื่องแก้ว

หลอดทดลองสำหรับเพาะเลี้ยง

แท่งแก้วคนสาร

กระบอกตวง

บีกเกอร์

ปิเปต

ขวดปรับปริมาตร ขนาด 100, 200 และ 500มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขวดใส่สารละลายเข้มข้น

จานแก้ว

กรวยแก้ว

1.1.1.3 อุปกรณ์ฆ่าเชื้อ

หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.1.1.4 อุปกรณ์สำหรับตัดเลี้ยง

ตู้กรองอากาศ (laminar air flow)

มีดผ่าตัดเบอร์ 3

ใบมีดเบอร์ 11 และ 15

ปากคีบ

ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.1.1.5 อุปกรณ์ในการเตรียมสารเคมี

เครื่องชั่งสารชนิดละเอียด (analytical balance)

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง

ช้อนตักสาร (spatula)

1.1.2 สารเคมี

1.1.2.1 สารที่ใช้ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ

เอทธานอล 70 เปอร์เซนต์

1.1.2.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหาร

สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายธาตุอาหารหลักตามสูตร Vacin and Went (VW) (1949) ดัดแปลง (CMU1 :Phornsawatchai and Apavatjrut, 2008) สูตร Murashige and Skoog (1962) (MS) และ สูตร Schenk and Hildebrandt (1972) (SH) ดังนี้

- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
- $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$
- KH_2PO_4
- KNO_3
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- $(NH_4)_2SO_4$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- $(NH_4)_2H_2PO_4$
- NH_4NO_3

สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายธาตุอาหารรองตามสูตร MS

- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
- KI
- $ZnSO_4 \cdot 7H2O$
- $MnSO_4 \cdot 4H_2O$
- H_3BO_3
- $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$
- $CoCl_2.6H_2O$

สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายสารอินทรีย์เข้มข้นตามสูตร MS

- Glycine
- Thiamine.HCl
- Pyridoxin.HCl
- Nicotinic acid
- Myo-inositol

สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายเหล็กเข้มข้นตามสูตร MS

- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
- $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$

NaOH

HCl

ส่วนประกอบอื่นๆ

- น้ำตาลซูโครส
- น้ำมะพร้าว
- ผงวุ้น
- น้ำกลั่น

1.1.3 วัสดุอื่นๆ เช่น

เวอร์เนีย

ไม้บรรทัด

ปากกาเคมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ยางรัด

ป้าย

กระดาษทิชชู

กระดาษลอกลายสำหรับห่อปากหลอด

ไม้ขีดไฟ

ปากกาเคมี

1.1.4 เตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)

1.1.4.1 เตรียมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร CMU1 MS และ SH โดยเตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้น 2 0 เท่าของสูตรอาหารมาตรฐาน และเตรียมให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล.โดยใช้สารเคมีแต่ละชนิด ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

1.1.4.2 เตรียมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS โดยเตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้น 100 เท่าของสูตรอาหารมาตรฐาน และเตรียมให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล.โดยใช้สารเคมีแต่ละชนิด ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 4

1.1.4.3 เตรียมสารละลายอินทรีย์ที่ประกอบด้วยวิตามิน glycine และ myo-inositol ในสูตร MSโดยเตรียมให้มีความเข้มข้น 100 เท่าของสูตรอาหารมาตรฐาน และเตรียมให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล.โดยใช้สารเคมีแต่ละชนิด ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 5

1.1.4.4 เตรียมสารละลายเหล็กในรูป $FeNa_2EDTA$ ตามสูตร MS ซึ่งประกอบด้วย $FeSO_4.7H_2O$ และ $Na_2EDTA.2H_2O$ โดยเตรียมโดยสารละลายความเข้มข้น 100 เท่าของสูตรอาหารมาตรฐาน และเตรียมให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล. โดยใช้สารเคมีแต่ละชนิด ดังแสดงใน ตารางภาคผนวกที่ 6

1.1.4.5 เตรียมสารละลายน้ำตาลเข้มข้น โดยชั่งน้ำตาลซูโครส 50 กรัม มาละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.5 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง

1.1.5.1 ดูดสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ซึ่งมีความเข้มข้น 20 เท่าสูตร CMU1 MS และ SH ปริมาตรสูตรละ30 มล.ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 200 มล. (ความเข้มข้นเป็น 3 เท่าของปริมาตรสุดท้ายที่จะเตรียม) สูตรละ 1 ขวด เติมสารละลายธาตุอาหารรอง น้ำยาสารประกอบอินทรีย์ สารละลายธาตุอาหาร

เหล็ก อย่างละ 6 มล.และน้ำมะพร้าว 90 มล.ลงในทุกขวด แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 200 มล.

1.2.5.2 เทลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มล. แล้วเติมน้ำกลั่น 100 มล. จะได้สารละลายอาหารแต่ละสูตรที่มีความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตร 300 มล.

1.1.5.3 ดูดสารละลายธาตุอาหารแต่ละสูตรและน้ำตาลเข้มข้นลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มล. (ตารางที่ 1) แล้วเติมน้ำให้ครบ 100 มล.นำไปวัดความเป็นกรดด่างและปรับให้ได้ 5.7

1.1.5.4 เติมวุ้น 0.8 กรัม สำหรับแต่ละกรรมวิธี แล้วนำไปต้มให้วุ้นละลายจนหมด

1.1.5.5 นำอาหารแต่ละกรรมวิธีใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 10 มล. ปิดหลอดด้วยแผ่นพลาสติกแล้วรัดด้วยยางรัดของ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปใช้

1.1.6 การวางแผนทดลอง

1.1.6.1 การเตรียมพืชทดลอง

ต้นกล้วยไม้ *P. amabilis* และ *P. parishii* อายุ 6 เดือนที่มีใบอ่อน กว้างมากกว่า 1 ซม.

1.1.6.2 กรรมวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) รวมทั้งหมด 24 กรรมวิธีๆ ละ10 ซ้ำ (ตารางที่ 1) โดยปรับธาตุอาหารหลักและความเข้มข้นของน้ำตาลดังนี้

ธาตุอาหารหลัก จำนวน 6 ระดับ คือ สูตร 1/2 MS, MS, 1/2 CMU1, CMU1, 1/2 SH และ SH

น้ำตาลซูโครส 4 ระดับ คือ 0, 1, 2 และ3 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1)

1.1.6.3 การเตรียมชิ้นส่วนพืชและการเลี้ยง

ตัดใบอ่อนจากต้นที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยตัด ให้ติดเส้นกลางใบและมีพื้นที่ 25 ตารางมิลลิเมตร (มม^2) แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่เตรียมไว้ ใช้พลาสติกปิดปากหลอด มัดด้วยยางรัดแล้วพันทับด้วยแผ่น พาราฟิล์ม แล้วเขียนวันที่ทำการทดลอง ชื่อพืช กรรมวิธีและซ้ำไว้ที่ข้างหลอด นำไปวางบนชั้นที่มีแสงฟลูออเรสเซนส์ ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.6.4 การบันทึกผล

บันทึกการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนใบในหลอดทดลอง ทุกสัปดาห์เป็นเวลา 24 สัปดาห์ ดังนี้

- ขนาด
- รูปร่าง
- สี โดยใช้ RHS Colour Chart ของ The Royal Horticultural Society เป็นตัวเทียบสี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 ปริมา ตรของสารละลายธาตุอาหาร (มล.) และน้ำตาล (มล.) ในแต่ละกรรมวิธี เมื่อเตรียมอาหาร 100 มล.

กรรมวิธี	MS (มล.)	CMU1 (มล.)	SH (มล.)	น้ำตาล 50 ก./100มล (มล.)
1	25	0	0	0
2	25	0	0	2
3	25	0	0	4
4	25	0	0	6
5	50	0	0	0
6	50	0	0	2
7	50	0	0	4
8	50	0	0	6
9	0	25	0	0
10	0	25	0	2
11	0	25	0	4
12	0	25	0	6
13	0	50	0	0
14	0	50	0	2
15	0	50	0	4
16	0	50	0	6
17	0	0	25	0
18	0	0	25	2
19	0	0	25	4
20	0	0	25	6
21	0	0	50	0
22	0	0	50	2
23	0	0	50	4
24	0	0	50	6

[1] ทุกกรรมวิธีเติม ธาตุอาหารรอง วิตามิน เหล็ก และน้ำมะพร้าว เหมือนกับข้อ 1.1.5.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 1.2 การชักนำการเกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้

1.2.1 วัสดุและอุปกรณ์

เหมือนการทดลองที่ 1.1 ข้อ 1.1.1

1.2.2 สารเคมี

1.2.2.1 สารที่ใช้ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ

เอทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์

1. 2.2.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหาร

สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายธาตุอาหารหลัก ตามสูตร CMU1 ดังนี้

- $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$
- KH_2PO_4
- KNO_3
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- $(NH_4)_2SO_4$

สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายธาตุอาหารรองตามสูตร MS ดังนี้

- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
- KI
- $ZnSO_4 \cdot 7H2O$
- $MnSO_4 \cdot H_2O$
- H_3BO_3
- $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$
- $CoCl_2.6H_2O$

สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายสารอินทรีย์ ตามสูตร MS ดังนี้

- Glycine
- Thiamine.HCl
- Pyridoxin.HCl
- Nicotinic acid
- Myo-inositol

สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายเหล็ก เข้มข้นตามสูตร MS ดังนี้

- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- $Na_2EDTA{\cdot}2H_2O$

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ดังนี้

- BAP
- TDZ
- NAA
- 2,4-D

NaOH

HCl

ส่วนประกอบอื่น

- น้ำตาลซูโครส
- น้ำมะพร้าว
- ผงวุ้น
- น้ำกลั่น

1.2.3 วัสดุอื่นๆ

เหมือนข้อ 1.1.3

1.2.4 เตรียมสารละลายเข้มข้น

1.2.4.1 เตรียมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร CMU1 โดยเตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้น 2 0 เท่าของสูตรอาหารมาตรฐาน และเตรียมให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล. โดยใช้สารเคมีแต่ละชนิด ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 1

1.2.4.2 เหมือนข้อ 1.1.4.2

1.2.4.3 เหมือนข้อ 1.1.4.3

1.1.4.4 เหมือนข้อ 1.1.4.4

1.2.5 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต

1.2.5.1 เตรียม BA โดยชั่ง BA 10 มก. ละลายด้วย KOH เล็กน้อยแล้วปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

1.2.5.2 เตรียม TDZ โดยชั่ง TDZ 10 มก. ละลายด้วย KOH เล็กน้อยแล้วปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

1.2.5.3 เตรียม NAA โดยชั่ง NAA 10 มก. ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อยแล้วปรับ ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.5.4 เตรียม 2,4-D โดยชั่ง 2,4-D 10 มก. ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อยแล้วปรับ ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

1.2.6 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง

1.2.6.1 ดูดสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร CMU1 300 มล. ธาตุอาหารรองสูตร MS 60 มล. สารอินทรีย์สูตร MS 60 มล. และสารละลายเหล็กสูตร MS 60 มล. ผสมกันในขวดปรับปริมาตรขนาด 500 มล. แล้วปรับปริมาตรให้ เป็น 500 มล.

1.2.6.2 ละลายน้ำตาลซูโครส 120 กรัมด้วยน้ำกลั่น แล้ว เทลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 500 มล. เติมน้ำมะพร้าว 900 มล. แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มล.

1.2.6.3 เท สารละลายข้อ 1.2.6.1 และ1.2.6.2 ลงในบีกเกอร์ขนาด 2000 มล. จะได้สารละลายอาหารสูตร CMU1 ที่มีความเข้มข้น 4 เท่า ปริมาตร 1,500 มล.

1.2.6.4 ดูดสารละลายอาหารสูตร CMU1 ที่มีความเข้มข้น 4 เท่า ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มล.จำนวน 25 มล ในกรรมวิธีที่มีสูตรอาหารหลักคือ CMU1 และ 12.5 มล.ในกรรมวิธีที่มีสูตรอาหารหลักคือ 1/2 CMU1 แล้วเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตตามกรรมวิธีของการทดลอง แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. นำไปวัดความเป็นกรดด่างและปรับให้ได้ 5.7

1.2.6.5 เติมวุ้น 0.8 กรัม ในแต่ละกรรมวิธี แล้วนำไปต้มให้วุ้นละลายจนหมด

1.2.6.6 นำอาหารแต่ละกรรมวิธีใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 10 มล. ปิดหลอดด้วยแผ่นพลาสติกแล้วรัดด้วยยางรัดของ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.7 วิธีการทดลอง

1.2.7.1 การเตรียมพืชทดลอง

ต้นอ่อนของกล้วยไม้ *P. amabilis* และ *P. parishii* ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้ออายุ 6 เดือน

1.2.7.2 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in Completely Randomized Design)

โดยมีการแบ่งการทดลองออกเป็น 4 การทดลองย่อยคือ

การทดลองที่ 1.2.1 แบบวางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมสุ่มสมบูรณ์ (Factorial (2x4x3) in Completely Randomized Design)
สูตรอาหารหลัก 2 สูตรคือ 1/2 CMU1, CMU1
TDZ 4 ระดับคือ 0, 0.1,1.0 และ 2.0 มก./ล.
NAA 3 ระดับคือ 0, 0.1 และ 1.0 มก./ล.
รวม 24 กรรมวิธีๆ ละ10 ซ้ำ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณสูตรอาหาร NAA และ TDZ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารของการทดลองที่ 1.2.1

สูตรอาหารหลัก	NAA (มก./ล.)	TDZ (มก./ล.) 0	0.1	1.0	2.0
1/2 CMU1	0	กรรมวิธี 1	กรรมวิธี 2	กรรมวิธี 3	กรรมวิธี 4
	0.1	กรรมวิธี 5	กรรมวิธี 6	กรรมวิธี 7	กรรมวิธี 8
	1.0	กรรมวิธี 9	กรรมวิธี 10	กรรมวิธี 11	กรรมวิธี 12
CMU1	0	กรรมวิธี 13	กรรมวิธี 14	กรรมวิธี 15	กรรมวิธี 16
	0.1	กรรมวิธี 17	กรรมวิธี 18	กรรมวิธี 19	กรรมวิธี 20
	1.0	กรรมวิธี 21	กรรมวิธี 22	กรรมวิธี 23	กรรมวิธี 24

การทดลองที่ 1.2.2 วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมสุ่มสมบูรณ์ (Factorial (2x4x2) in Completely Randomized Design)
สูตรอาหารหลัก 2 สูตรคือ 1/2 CMU1, CMU1
TDZ 4 ระดับคือ 0, 0.1,1.0 และ 2.0 มก./ล.
2,4-D 2 ระดับคือ 0.1 และ 1.0 มก./ล.
รวม 16 กรรมวิธีๆ ละ10 ซ้ำ (ตารางที่ 3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 ปริมาณสูตรอาหาร 2,4-D และ TDZ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารของการทดลองที่ 1.2.2

สูตรอาหารหลัก	2,4-D (มก./ล.)	TDZ (มก./ล.)			
		0	0.1	1.0	2.0
1/2 CMU1	0.1	กรรมวิธี 1	กรรมวิธี 2	กรรมวิธี 3	กรรมวิธี 4
	1.0	กรรมวิธี 5	กรรมวิธี 6	กรรมวิธี 7	กรรมวิธี 8
CMU1	0.1	กรรมวิธี 9	กรรมวิธี 10	กรรมวิธี 11	กรรมวิธี 12
	1.0	กรรมวิธี 13	กรรมวิธี 14	กรรมวิธี 15	กรรมวิธี 16

การทดลองที่ 1.2.3 วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมสุ่มสมบูรณ์ (Factorial (2x4x3) in Completely Randomized Design)

สูตรอาหารหลัก 2 สูตรคือ 1/2 CMU1, CMU1

BA 4 ระดับ คือ 0.1, 1.0, 5.0 และ 10.0 มก./ล.

NAA 3 ระดับคือ 0, 0.1 และ 1.0 มก./ล.

รวม 24 กรรมวิธีๆ ละ10 ซ้ำ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ปริมาณสูตรอาหาร NAA และ BA ที่ใช้ในการเตรียมอาหารของการทดลองที่ 1.2.3

สูตรอาหารหลัก	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)			
		0.1	1.0	5.0	10.0
1/2 CMU1	0	กรรมวิธี 1	กรรมวิธี 2	กรรมวิธี 3	กรรมวิธี 4
	0.1	กรรมวิธี 5	กรรมวิธี 6	กรรมวิธี 7	กรรมวิธี 8
	1.0	กรรมวิธี 9	กรรมวิธี 10	กรรมวิธี 11	กรรมวิธี 12
CMU1	0	กรรมวิธี 13	กรรมวิธี 14	กรรมวิธี 15	กรรมวิธี 16
	0.1	กรรมวิธี 17	กรรมวิธี 18	กรรมวิธี 19	กรรมวิธี 20
	1.0	กรรมวิธี 21	กรรมวิธี 22	กรรมวิธี 23	กรรมวิธี 24

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 1.2.4 วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมสุ่มสมบูรณ์ (Factorial (2x4x2) in Completely Randomized Design)

สูตรอาหารหลัก 2 สูตรคือ 1/2 CMU1, CMU1

BA 4 ระดับ คือ 0.1, 1.0, 5.0 และ 10.0 มก./ล.

2,4-D 2 ระดับคือ 0.1 และ 1 มก./ล.

รวม 16 กรรมวิธีๆ ละ10 ซ้ำ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ปริมาณสูตรอาหาร 2,4-D และ BA ที่ใช้ในการเตรียมอาหารของการทดลองที่ 1.2.4

สูตรอาหารหลัก	2,4-D (มก./ล.)	BA (มก./ล.)			
		0.1	1.0	5.0	10.0
1/2 CMU1	0.1	กรรมวิธี 1	กรรมวิธี 2	กรรมวิธี 3	กรรมวิธี 4
	1.0	กรรมวิธี 5	กรรมวิธี 6	กรรมวิธี 7	กรรมวิธี 8
CMU1	0.1	กรรมวิธี 9	กรรมวิธี 10	กรรมวิธี 11	กรรมวิธี 12
	1.0	กรรมวิธี 13	กรรมวิธี 14	กรรมวิธี 15	กรรมวิธี 16

1.2.7.3 การเตรียมชิ้นส่วนพืชและการเลี้ยงโดยตัดใบอ่อนให้ติดเส้นกลางใบและมีพื้นที่ 25 มม^2 แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่เตรียมไว้ ใช้พลาสติกปิดปากหลอด มัดด้วยยางรัดแล้วพันทับด้วยแผ่น พาราฟิล์มแล้วเขียนวันที่ทำการทดลอง ชื่อพืช กรรมวิธีและซ้ำไว้ที่ข้างหลอด นำไปวางบนชั้นที่มีแสงฟลูออเรสเซนส์ ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมง/ วัน อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส

1.2.7.4 การบันทึกผล

บันทึกการเจริญเติบโตและการเกิดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ของชิ้นส่วนใบในหลอดทดลอง ทุกสัปดาห์เป็นเวลา 24 สัปดาห์ ดังนี้

- ขนาด
- รูปร่าง
- สี โดยใช้ RHS Colour Chart ของ The Royal Horticultural Society เป็นตัวเทียบสี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 การกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารละลายโคลชิซิน

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 พืชทดลองคือ โปรโตคอร์มของ *P. amabilis* และ *P. parishii* อายุ 120 วัน ที่ได้จากการ ผสมตัวเอง ขนาด 2-3 มิลลิเมตร

2.1.2 ขวดรูปชมพู่ขนาด 25 50 100 และ 250 มล.

2.1.3 กระบอกตวงขนาด 10 50 และ 100 มล.

2.1.4 แผ่นกระดาษปิดขวดแก้ว แผ่นพลาสติกใส ยางรัด

2.1.5 เครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที

2.1.6 น้ำกลั่น น้ำตาล น้ำมะพร้าว

2.1.7 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ตะเกียงแอลกอฮอล์

2.1.8 ผ้าขา วบางที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2.1.9 แผ่นกรอง(milipore filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

2.1.10 อุปกรณ์ที่ใช้ในตู้ตัดเลี้ยงช้อนตักสาร (spatula) ตู้ตัดเลี้ยง (laminar air flow) ปากคีบ (forceps)จานแก้ว ด้ามมีดผ่าตัด ใบมีดผ่าตัด แผ่นป้าย

2.2 สารเคมี

2.2.1 สาร โคลชิซิน 0.25 กรัม ละลายในน้ำ 25 มล.เพื่อเตรียมสารละลายเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

2.2.2 สารเคมีธาตุอาหารหลักสูตร CMU1

- $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$
- KH_2PO_4
- KNO_3
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- $(NH_4)_2SO_4$

สารเคมีธาตุอาหารรองสูตร MS

- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
- KI
- $ZnSO_4 \cdot 7H2O$
- $MnSO_4 \cdot H_2O$
- H_3BO_3
- $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- $CoCl_2.6H_2O$

สารเคมีอินทรีย์สูตร MS

- Glycine
- Thiamine.HCl
- Pyridoxin.HCl
- Nicotinic acid
- Myo-inositol

สารเคมีสารละลายเหล็กสูตร MS

- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
- $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$

2.2.3 15 เปอร์เซ็นต์ ของคลอร็อกซ์

2.2.4 ทวีน 20

2.3 การเตรียมการทดลอง

2.3.1 เตรียมอาหารแข็งสูตร CMU1 ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์และน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 75 ขวดๆละ 50 มล. และ อาหารเหลวสูตร CMU1 ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 75 ขวดๆ 5 มล. (เตรียมในทำนองเดียวกับการทดลองที่1)

2.3.2 การเตรียมโปรโตคอร์ม โดยนำฝักกล้วยไม้ *P. amabilis* และ *P. parishii* ที่ได้จากการผสมตัวเองมาเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้นตามข้อ 2.1.4 แล้วเก็บไว้ในห้องมืดเป็นเวลา 3 เดือน เมื่ออายุได้ 4 เดือนนำมาคัดเลือกโปรโตคอร์มสีเขียวที่มีขนาด 2 - 3 มม. มาทำการทดลอง ทั้งหมดมี 15 กรรมวิธีๆ ละ 5 ซ้ำ ใน 1 ซ้ำมี 20 โปรโตคอร์ม ใช้โปรโตคอร์มทั้งหมด 1500 โปรโตคอร์ม

2.3.3 เตรียมอาหารเหลว ปิดด้วยแผ่นพลาสติกแล้วรัดด้วยยางรัดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปใช้

2.3.4 นำสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มากรองฆ่าเชื้อโดยใช้ แผ่นกรองขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร ในตู้ตัดเลี้ยง แล้วเติมลงในอาหารเหลวที่นึ่งแล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4 วิธีการทดลอง

2.4.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมสุ่มสมบูรณ์ (Factorial (5x3)in Completely Randomized Design)รวมทั้งหมด 15 กรรมวิธีๆ ละ10 ซ้ำ (ตารางที่ 6) มีการศึกษา 2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องคือ

ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 5 ระดับ คือ 0, 0.01, 0.025, 0.05 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาที่แช่โปรโตคอร์มเป็นเวลา 1, 5 และ 10 วัน

2.4.2 ใช้ช้อนด้ามยาวตักโปรโตคอร์มที่ได้จากข้อ 2.3.1 ออกจากขวดในตู้ปลอดเชื้อ และซับด้วยผ้าขาวบางที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นย้ายโปรโตคอร์มลงอาหารเหลวที่เติมสารละลายโคลชิซิน 5 ระดับคือ 0, 0.01, 0.025, 0.05 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ปิดหลอดรัดยางให้แน่นแล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่า ตามกรรมวิธีในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินและระยะเวลาที่ใช้ เพื่อการชักนำให้โปรโต-คอร์มของ *P. amabilis* และ *P. parishii* มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้น

ระยะเวลา	ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน				
	0 %	0.01 %	0.025 %	0.05 %	0.1 %
1 วัน	กรรมวิธี 1	กรรมวิธี 2	กรรมวิธี 3	กรรมวิธี 4	กรรมวิธี 5
5 วัน	กรรมวิธี 6	กรรมวิธี 7	กรรมวิธี 8	กรรมวิธี 9	กรรมวิธี 10
10 วัน	กรรมวิธี 11	กรรมวิธี 12	กรรมวิธี13	กรรมวิธี 14	กรรมวิธี 15

2.4.2 เมื่อครบเวลาที่กำหนด ย้ายโปรโตคอร์มลงในอาหาร แข็งใหม่ที่ไม่เติมโคลชิซิน โดยล้างโปรโตคอร์มในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 3 ครั้ง ซับด้วยผ้าขาวบางที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นย้ายลงอาหารแข็งที่เตรียมไว้ใช้พลาสติกปิดปาก ขวดแล้วเขียนวันที่ทำการทดลอง ชื่อพืช กรรมวิธีและซ้ำไว้ที่ข้างหลอด นำไปวางบนชั้นที่มีแสงฟลูออเรสเซนส์ ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมง/ วัน อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส

2.4.3 บันทึกอัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์ม และการเปลี่ยนแปลงขนาด รูปร่างทุก 2 สัปดาห์ และเปลี่ยนอาหารทุกเดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.4 ย้ายโปรโตคอร์มที่เจริญเป็นลักษณะต้นอ่อนที่มีสีเขียวลงในอาหาร แข็งสูตรชักนำให้เกิดยอดและราก ที่เติม NAA 0.1 มก./ล. BA 0.1 มก./ล. และผงถ่าน 0.2 %

2.4.5 เมื่อต้นมีใบคลี่แล้วนำมาดูและวัดขนาดของปากใบเปรียบเทียบกับต้นปกติ

การทดลองที่ 3 การศึกษาจำนวนโครโมโซม

ศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อปลายรากของกล้วยไม้ *Phalaenopsis* ด้วยวิธี Feulgen's squash ที่ดัดแปลงโดยดวงทิพย์ (2539) และ ประภัสสร (2543)

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 ปลายรากของ *Phalaenopsis* ยาว 3-5 มิลลิเมตร

3.1.2 ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับเก็บตัวอย่างปลายราก

3.1.3 แผ่นกระจกสไลด์และแผ่นกระจกปิดสไลด์

3.1.4 ปรอทวัดความร้อน

3.1.5 อ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ

3.1.6 อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ เข็มเขี่ย กระบอกตวงสารเคมี น้ำยาเคลือบเล็บ กระดาษซับสี นาฬิกาจับเวลา

2.3.1.7 กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และ photomicroscope

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับหยุดวงชีพเซลล์ (pre-treatment) ได้แก่ paradichlorobenzene (PDB)

3.2.2 สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาในการรักษาสภาพเซลล์ (fixative) คือ เอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะซีติกเข้มข้นในอัตราส่วน 3:1

3.2.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับย่อยแยกเซลล์ (hydrolytic solution) คือ กรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 1 นอร์มอล

3.2.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับการเก็บปลายรากที่ผ่านขั้นตอนการหยุดวงชีพเซลล์แต่ยังไม่ผ่านกรรมวิธีการย่อยแยกเซลล์ คือ เอทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์

3.2.5 สีที่ใช้ย้อมโครโมโซม คือ carbol fuchsin ที่เตรียมเป็นสารละลายแล้วบรรจุในขวดสีชาและเก็บไว้ในตู้เย็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 เตรียมปลายราก โดยเลือกรากที่กำลังเจริญเติบโตซึ่งบริเวณปลายมีสี เขียว ใช้ปลายรากที่งอกใหม่ จากต้นที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อแล้วนำไปเก็บไว้ภายใต้สภาพโรงเรือน และมีความยาว 0.5 เซนติเมตร ตัดเฉพาะส่วนปลาย 1 - 2 มิลลิเมตร เก็บตัวอย่างปลายรากในเวลา 7.00 8.00 และ9.00 รวมเป็น 3 กรรมวิธี

3.3.2 นำปลายรากมาหยุดวงชีพเซลล์ โดยแช่ปลายรากในสารละลาย PDB เป็นเวลานาน 4 8 และ 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส รวมเป็น 3 กรรมวิธี

3.3.3 นำปลายรากออกมาจากสารละลาย PDB ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง

3.3.4 ย่อยเซลล์ให้แยกจากกันโดยการแช่รากในกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 1 นอร์มอล นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น

3.3.5 ย้อมเนื้อเยื่อปลายรากในสีย้อม carbol fucshin แช่ไว้นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นคีบเนื้อเยื่อวางลงบนแผ่นกระจกสไลด์แล้วใช้มีดผ่าตัดตัดเอาเฉพาะส่วนปลายรากให้ยาว 1 มิลลิเมตร เขี่ยส่วนเกินทิ้งไป หยดสี 1 หยดตรงบริเวณปลายราก ใช้เข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อเบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจาย คีบเนื้อเยื่อส่วนเกินทิ้งไปแล้วปิดกระจกปิดสไลด์บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ วางกระดาษซับบนแผ่นกระจกสไลด์และกดนิ้วหัวแม่มือลงเพื่อให้เซลล์กระจายซับสีส่วนเกินออก และเคาะด้วยปลายด้ามดินสอเบาๆเพื่อไล่ฟองอากาศออกจนหมด

3.3.6 นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟสและมีการกระจายตัวของโครโมโซมดี มีมากกว่า 10 เซลล์ สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้แม่นยำ เมื่อได้เซลล์ที่ต้องการแล้วกดแผ่นกระจกปิดสไลด์เบาๆ เพื่อให้เซลล์แบนราบ และอยู่ในระนาบเดียวกัน ผึ่งลมทิ้งไว้ระวังอย่าให้อากาศเข้า ใช้น้ำยาเคลือบเล็บทาบนแผ่นกระจกปิดสไลด์เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์แห้ง นำแผ่นกระจกสไลด์ไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อนับจำนวนโครโมโซมและบันทึกภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved