บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาลักษณะ การเจริญเติบโต และการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อของแผ่นดินเย็นพันธุ์ HKRC01 และ HKRC02 ที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ **การทดลองที่ 1** การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา กายวิภาควิทยา เซลล์วิทยา และรูปแบบไอโซไซม์ **การทดลองที่ 2** การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโต **การทดลองที่ 3** การศึกษาการผสมเกสร การเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากตาใบ

อุปกรณ์และวิธีการทดลองมีดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาลักษณะ

การศึกษาลักษณะของพืชทดลองแบ่งออกเป็น 3 การทดลองย่อย โดยมีอุปกรณ์และวิธีการดังนี้

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะของแผ่นดินเย็นพันธุ์ HKRC01 และ HKRC02 โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของต้นพืช

1.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1 พืชทดลอง ได้แก่ แผ่นดินเย็นพันธุ์ HKRC01 และ HKRC02 โดยคัดจากต้นที่ปลูกเลี้ยงไว้ในแปลงรวบรวมพันธุ์ พันธุ์ละ 5 ต้น

1.1.2 อุปกรณ์ ได้แก่ กระดาษสำหรับวาดภาพ กล้องถ่ายภาพ สมุด ไม้บรรทัด ยางลบ ดินสอ ปากกาหมึกซึมสีดำ แว่นขยาย มีดผ่าตัด และปากคีบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.2 วิธีการ

1.1.2.1 บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของต้นพืชทดลองแต่ละพันธุ์ ได้แก่ส่วนของราก หัว ใบ ดอก ช่อดอก และฝัก โดยบันทึกข้อมูลดังกล่าวจากต้นพืชทดลองพันธุ์ละ 5 ต้น ในระยะที่ส่วนต่าง ๆ ของต้นพืชเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว พร้อมทั้งวาดภาพทางพฤกษศาสตร์แสดงรายละเอียดของส่วนประกอบเหล่านั้น

1.1.2.2 บันทึกจำนวนและขนาดของส่วนประกอบของต้นดังนี้

หัว นับจำนวนหัวต่อต้น จำนวนปล้องต่อหัว วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางหัว โดยวัดจากส่วนที่กว้างที่สุดของหัว

ต้น วัดความสูงของต้นโดยวัดจากโคนต้นส่วนที่ติดกับหัวจนถึงปลายใบ

ใบ วัดขนาดความกว้างและความยาวของใบ

ช่อดอก วัดความยาวและความกว้างของก้านช่อดอก โดยความกว้างวัดที่จุดที่อยู่สูงจากโคนก้านช่อดอกประมาณ 10 ซม และนับจำนวนดอกต่อช่อ

ดอก วัดความกว้างของดอกจากตำแหน่งที่กว้างที่สุดของดอกโดยวัดจากปลายสุดของกลีบเลี้ยงด้านซ้ายไปยังปลายสุดของปลายกลีบเลี้ยงด้านขวา และความยาวของดอกจากตำแหน่งของกลีบเลี้ยงด้านบนถึงปลายกลีบปากด้านล่าง วัดความกว้างและความยาวขององค์ประกอบต่าง ๆ ของดอก เช่น กลีบเลี้ยง กลีบดอก และกลีบปาก

ฝัก วัดความกว้างและความยาวของฝัก โดยวัดจากฝักที่เจริญเต็มที่แล้ว พันธุ์ละ 5 ฝัก

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยา

ศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาของเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ ของแผ่นดินเย็นพันธุ์ HKRC01 และ HKRC02 โดยการตัดเนื้อเยื่อตามขวางและตามยาว ใช้เทคนิคของ Johansen (1940) และ Sass (1966) แล้วศึกษาและบันทึกภาพของเนื้อเยื่อดังกล่าวใต้กล้องจุลทรรศน์

1.2.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1.2.1.1.1 เนื้อเยื่อของส่วนต่าง ๆ ของต้นพืชทดลอง ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ ดอก และฝัก

1.2.1.1.2 แท่งไม้ที่ใช้ยึดเนื้อเยื่อที่ฝังพาราฟิน

1.2.1.1.3 ขวดแก้วสำหรับเก็บตัวอย่างพืช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.1.1.4 ขวดแก้วสำหรับย้อมสี

1.2.1.1.5 แผ่นกระจกสไลด์ (slide) และ แผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover slip)

1.2.1.1.6 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.2.1.1.7 เข็มเขี่ย

1.2.1.1.8 ปากคีบ

1.2.1.1.9 พู่กันขนอ่อน

1.2.1.1.10 มีดผ่าตัด

1.2.1.1.11 ป้ายกระดาษติดกาว

1.2.1.1.12 เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome)

1.2.1.1.13 แผ่นให้ความร้อน (hot plate) สำหรับอุ่นแผ่นกระจก

1.2.1.1.14 กล้องจุลทรรศน์แบบ dissecting microscope และ stereo microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

1.2.1.1.15 ตู้ควบคุมอุณหภูมิระดับ 56 - 60°ซ

1. 2.1.2 สารเคมี

1.2.1.2.1 สารที่ใช้เตรียมน้ำยารักษาสภาพเซลล์(fixtative) ได้แก่ 95% ethyl alcohol, glacial acetic acid, formalin และ น้ำกลั่น

1.2.1.2.2 สารที่ใช้ในการเตรียมน้ำยาในการดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) คือ 95% ethyl alcohol, 100% ethyl alcohol, tertiary butyl alcohol (TBA) และ น้ำกลั่น

1.2.1.2.3 สารที่ใช้สำหรับฝังเนื้อเยื่อ คือ Paraplast

1.2.1.2.4 สารที่ใช้ในการยึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive) เตรียมจากไข่ขาว และ น้ำกลั่น

1.2.1.2.5 สารที่ใช้ในการย้อมสีและทำความสะอาด คือ aluminium sulfate [$Al_2(SO_4)_3.16H_2O$], hematoxylin ($C_{16}H_{14}O_6$), 95% ethyl alcohol, 100% ethy alcohol, methyl alcohol, glycerol และ xylene

1.2.1.2.6 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นกระจกสไลด์ (mounting media) คือ Canada balsam

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.2 วิธีการ

1.2.2.1 การเตรียมน้ำยา

1.2.2.1.1 การเตรียมน้ำยารักษาสภาพเซลล์ (formalin-acetic acid- alcohol : FAA) เตรียมจากส่วนผสมของสารเคมีดังต่อไปนี้

95% ethyl alcohol	50	มิลลิลิตร (มล)
glacial acetic acid	5	มล
formalin	10	มล
น้ำกลั่น	35	มล

ตวงสารเคมีทั้งหมดมาผสมรวมกันในกระบอกตวงขนาด 100 มล ผสมสารให้รวมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปเก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อรอนำไปใช้แช่เนื้อเยื่อ

1.2.2.1.2 การเตรียมน้ำยาสำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) เตรียมจากส่วนผสมของสารเพื่อให้ได้น้ำยาที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์แตกต่างกันในแต่ละขั้นตอนของการดึงน้ำออกจากเซลล์ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดและปริมาณของแอลกอฮอล์ในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ในแต่ละขั้นตอน

ขั้นตอน	ปริมาณรวมของแอลกอฮอล์ในน้ำยา (%)	95 % ethyl alcohol (มล)	100 % ethyl alcohol (มล)	tertiary butyl alcohol (TBA) (มล)	น้ำกลั่น (มล)
1	50	40	-	10	50
2	70	50	-	20	30
3	85	50	-	35	15
4	95	45	-	55	5
5	100	-	25	75	-

ผสมแอลกอฮอล์ในแต่ละระดับของน้ำยาตามชนิดและปริมาณที่แสดงไว้ในตารางที่ 1 จากนั้นนำน้ำยาที่ผสมเสร็จแล้วในแต่ละระดับเก็บใส่ขวดแก้วที่มีฝาปิดมิดชิด ส่วนน้ำยาระดับ 100 %นั้นผสมสี erythrosin ลงไปด้วย เพื่อให้เนื้อเยื่อของชิ้นส่วนพืชติดสีซึ่งจะช่วยให้การฝังเนื้อเยื่อในพาราฟินง่ายต่อการจัดระนาบของเนื้อเยื่อ และสามารถจัดตำแหน่งของชิ้นส่วนให้ได้ระนาบบนเครื่องตัดเนื้อเยื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.2.1.3 การเตรียมสีย้อมเนื้อเยื่อเตรียมจากส่วนผสมของสาร ดังต่อไปนี้

aluminium sulfate [$Al_2(SO_4)_3.16H_2O$]	400	มล
hematoxylin ($C_{16}H_{14}O_6$)	4	กรัม
95% ethyl alcohol	25	มล
methyl alcohol	100	มล
glycerol	100	มล

1.2.2.1.4 การเตรียมน้ำยายึดเนื้อเยื่อพืช ทำโดยนำไข่ไก่มาแยกเอาเฉพาะไข่ขาว ตีจนเหลวและข้น จากนั้นตักเอาส่วนที่เป็นฟองทิ้งไปแล้วนำส่วนที่เป็นของเหลวไปกรอง เทใส่ขวดนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15°ซ เพื่อใช้เป็นสารละลายเข้มข้น ถ้าไข่ขาวที่ตีไว้นั้นข้นมากเกินไปจนไม่สามารถกรองผ่านกระดาษกรองได้ให้ผสมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อยแล้วจึงกรอง เมื่อจะใช้จึงนำสารละลายเข้มข้นของไข่ขาวดังกล่าวไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ไข่ขาว 1 มล เจือจางด้วยน้ำกลั่น 49 มล แล้วกรองผ่านกระดาษกรองอีกครั้งก่อนนำไปใช้

1.2.2.2 การเตรียมสไลด์ถาวรของชิ้นส่วนพืช

1.2.2.2.1 เก็บตัวอย่างของราก ลำต้น ใบ ดอก และฝักมาแช่ในน้ำยา FAA ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้ว แล้วนำขวดดังกล่าวไปดูดอากาศเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากเนื้อเยื่อ การแช่เนื้อเยื่อใน FAA ควรแช่ไว้นาน 18 - 24 ชั่วโมง สำหรับเนื้อเยื่อที่มีความอ่อนนุ่ม ส่วนเนื้อเยื่อที่มีความแข็งควรแช่นาน 1 - 2 สัปดาห์ หรือนานกว่านี้ ก่อนนำไปผ่านขั้นตอนต่อไป

1.2.2.2.2 นำเนื้อเยื่อมาผ่านขั้นตอนของการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยเริ่มจากขั้นตอนที่มีแอลกอฮอล์ในน้ำยา 50% แล้วผ่านไปที่ 70%, 85% และ 95% ตามลำดับ โดยให้เวลาในการดึงน้ำออกขั้นตอนละ 12-24 ชั่วโมง สำหรับขั้นตอนของ 100% และ TBA นั้นใช้เวลา 24 ชั่วโมง เป็นอย่างต่ำ ส่วนขั้นตอนสุดท้ายคือ TBA + พาราฟินเหลว 1:1 นั้นใช้เวลา 24 ชั่วโมงขึ้นไป แต่ไม่ควรนานเกิน 48 ชั่วโมง

1.2.2.2.3 เมื่อผ่านขั้นตอนของการดึงน้ำออกแล้วแล้วนำเนื้อเยื่อไปผ่านขั้นตอนของการแทรกพาราฟินเข้าไปในเนื้อเยื่อ (infiltration) โดยนำขวดแก้วที่บรรจุเนื้อเยื่อในน้ำยาขั้นตอนสุดท้ายของข้อ 1.2.2.2.2 ไปใส่ตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิระดับ 56 – 60°ซ ไว้จนกระทั่ง TBA ระเหยออกไปจนหมดแล้วจึงนำขวดนั้นออกมา เทพาราฟินทิ้งไป แล้วใส่พาราฟินเหลวที่หลอมเตรียมไว้แล้วลงไปแทน นำขวดไปเก็บไว้ในตู้อบตามเดิมจนกระทั่งพาราฟินแทรก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เข้าไปในเนื้อเยื่ออย่างเต็มที่ ซึ่งระยะเวลาที่ใช้นั้นจะนานเท่าใดขึ้นอยู่กับสภาพความแข็งของเนื้อเยื่อ สำหรับพืชทดลองใช้เวลา 2 สัปดาห์ เป็นอย่างต่ำ

1.2.2.2.4 นำชิ้นส่วนพืชที่พาราฟินแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่ออย่างเต็มที่แล้วมาฝังลงในพาราฟินที่หลอมเอาไว้ก่อนหน้านี้แล้วและเทบรรจุอยู่ในแม่พิมพ์ที่พับด้วยกระดาษเป็นรูปสี่เหลี่ยม จัดวางชิ้นส่วนพืชให้อยู่ในตำแหน่งที่ต้องการก่อนจะทำให้พาราฟินแข็งตัวและนำไปตัด

1.2.2.2.5 นำแท่งพาราฟินที่ฝังชิ้นส่วนพืชเรียบร้อยแล้วไปตัดแต่งให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมโดยให้มีชิ้นส่วนพืชอยู่บริเวณกลางของแท่งพาราฟินนำแท่งพาราฟินมาติดกับแท่งไม้แล้วนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน ให้มีความหนาของเนื้อเยื่อ 13-15 ไมครอน

1.2.2.2.6 นำแถบเนื้อเยื่อพืช (paraffin ribbon) ที่ตัดได้มาติดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ด้วยน้ำยายึดเนื้อเยื่อพืช จากนั้นนำแผ่นสไลด์ไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์จนแถบเนื้อเยื่อแห้งและติดแน่นกับแผ่นสไลด์

1.2.2.2.7 นำแผ่นกระจกสไลด์ที่ติดแถบเนื้อเยื่อแล้วมาละลายพาราฟินออกใน xylene แล้วนำไปย้อมสี

1.2.2.2.8 เมื่อย้อมสีเสร็จ ผ่านแผ่นกระจกสไลด์ลงในขวดแก้วบรรจุ xylene เพื่อให้เนื้อเยื่อใสสะอาด จากนั้นปิดแผ่นกระจกสไลด์ด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์โดยใช้ Canada balsam เป็นตัวยึด ทิ้งเอาไว้จนน้ำยาแห้ง จากนั้นนำแผ่นกระจกสไลด์ดังกล่าวไปศึกษาเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ

การทดลองที่ 1.3 การศึกษาเซลล์วิทยา

ศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อปลายรากของพืชทดลองทั้ง 2 พันธุ์ ด้วยวิธี Feulgen's squash ที่ดัดแปลงตามวิธีการของจารุภัทร (2549)

1.3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1.1 ปลายรากของแผ่นดินเย็นพันธุ์ HKRC01 และ HKRC02

3.1.1.2 ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับเก็บตัวอย่างปลายราก

3.1.1.3 แผ่นกระจกสไลด์ และแผ่นกระจกปิดสไลด์

3.1.1.4 ปรอทวัดความร้อน

3.1.1.5 อ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ

3.1.1.6 ปากคีบ

3.1.1.7 เข็มเขี่ย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.1.8 น้ำยาเคลือบเล็บ

3.1.1.9 กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และ photomicroscope

3.1.1.10 สารเคมี

3.1.1.10.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับหยุดวงชีพเซลล์ (pre-treatment) คือ PDB

3.1.1.10.2 สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาในการรักษาสภาพเซลล์ (fixtative) คือ 100% ethyl alcohol และ glacial acetic acid

3.1.1.10.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับย่อยแยกเซลล์ (hydrolytic solution) คือ1N HCl

3.1.1.10.4 สีที่ใช้ย้อมโครโมโซม คือ carbol fuchsin

1.3.2 วิธีการ

1.3.2.1 การเตรียมน้ำยา

1.3.2.1.1 การเตรียมน้ำยาสำหรับหยุดวงชีพเซลล์ เตรียมได้จากการชั่ง PDB 10 กรัม แล้วนำมาละลายในน้ำกลั่น 500 มล เพื่อให้ได้สารละลายอิ่มตัวในน้ำ และเพื่อให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จึงนำไปตั้งบนแผ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 60°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.3.2.1.2 การเตรียมน้ำยารักษาสภาพเซลล์ ทำโดยการผสม 100% ethyl alcohol 3 ส่วน กับ glacial acetic acid 1 ส่วน เตรียมน้ำยาก่อนใช้ทุกครั้ง เนื่องจากน้ำยาที่ทิ้งไว้นานจะสลายตัวเป็น ester หมดคุณสมบัติเดิมไป

1.3.2.2 การเตรียมสไลด์สำหรับศึกษาโครโมโซม

1.3.2.2.1 เก็บปลายรากโดยเลือกรากที่กำลังเจริญเติบโต คือ ปลายรากที่เริ่มงอกออกมาจากหัว และมีความยาว 0.3-0.5 ซม เก็บตัวอย่างรากในช่วง 7.00-11.00 น. โดยเก็บทุกชั่วโมงระหว่างเวลาดังกล่าว

1.3.2.2.2 หยุดวงชีพเซลล์โดยการแช่ปลายรากในสารละลาย PDB เป็นเวลา 30 นาที, 1 และ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 10°ซ

1.3.2.2.3 นำปลายรากมาล้างเอาสารละลาย PDB ออกด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด แล้วนำไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ นาน 5 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง

1.3.2.2.4 ย่อยแยกเซลล์ โดยนำปลายรากมาแช่ใน 1 NHCl นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 60°ซ แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3.2.2.5 ย้อมเนื้อเยื่อปลายรากใน carbol fuchsin แช่ไว้นาน 30 นาที และ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นคีบเนื้อเยื่อวางบนแผ่นกระจกสไลด์แล้วใช้มีดผ่าตัดตัดเฉพาะส่วนปลายรากให้ยาวประมาณ 1 มม คีบส่วนเกินทิ้งไป หยดสีลงไปเล็กน้อยบนเนื้อเยื่อ จากนั้นใช้ปลายเข็มเขี่ยเคาะหรือบดเนื้อเยื่อเบา ๆ เพื่อให้เซลล์กระจายตัว ไม่เกาะรวมกันเป็นก้อน คีบเอาเศษเนื้อเยื่อส่วนเกินทิ้งไปแล้วปิดแผ่นกระจกปิดสไลด์บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ ถ้าเกิดฟองอากาศให้ไล่ฟองอากาศออกก่อน วางกระดาษซับบนแผ่นกระจกปิดสไลด์ ใช้นิ้วหัวแม่มือกดลงไปเพื่อให้เซลล์กระจายตัวและซับเอาสีส่วนเกินออก ใช้น้ำยาเคลือบเล็บทาบริเวณขอบแผ่นกระจกปิดสไลด์เพื่อป้องกันไม่ให้อากาศเข้าไป

1.3.2.2.6 นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกเซลล์ที่มีการกระจายตัวของโครโมโซมดี และสามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ ถ้าโครโมโซมไม่อยู่ในระนาบเดียวกัน ใช้นิ้วกดลงบนแผ่นกระจกปิดสไลด์เบา ๆ เพื่อให้เซลล์แบนและอยู่ในระนาบเดียวกัน ก่อนนำแผ่นกระจกสไลด์ไปตรวจนับจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วบันทึกภาพ

การทดลองที่ 1.4 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์

ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของพืชทดลองทั้ง 2 พันธุ์ โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อของใบและใช้เอนไซม์ 10 ชนิด คือ ACP, DIA, EST, GDH, GOT, LAP, MDH, POX, SKD และ SOD ตามวิธีการของพสุ (2546) และสุทธินันท์ (2548)

1.4.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.4.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1.4.1.1.1 เนื้อเยื่อใบของพืชทดลอง

1.4.1.1.2 โกร่งบดตัวอย่างพืชพร้อมที่บด

1.4.1.1.3 เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.4.1.1.4 เครื่องวัดความเป็นกรด/ด่างของสารละลาย

1.4.1.1.5 เครื่องหมุนเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็นได้

1.4.1.1.6 ชุดอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบ slab gel

1.4.1.1.7 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า Model 1,000/500

1.4.1.1.8 ตู้บ่ม (incubator)

1.4.1.1.9 ตู้แช่แข็งที่ปรับอุณหภูมิเป็น -20 ° ซ และ ตู้เย็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4.1.1.10 ไมโครปิเปตปรับปริมาตรได้ ขนาด20 - 200, 10 - 100 และ 1,000 ไมโครลิตร

1.4.1.1.11 หลอดใส่สาร (Eppendrof tube) ขนาด 1.5 มล

1.4.1.1.12 ชุดอ่านเจล (visible light transillumінator)

1.4.1.1.13 เครื่องแก้วแบบต่างๆ

1.4.1.1.14 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น กล่องโฟม แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ ถุงมือ กระดาษชั่งสาร ปากคีบ ช้อนตักสาร พลาสติกใส ถาดพลาสติก กระดาษติดป้าย กล้องถ่ายรูปพร้อมฟิล์ม

1.4.1.2 สารเคมี

1.4.1.2.1 สารที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ extraction buffer คือ

1.4.1.2.1.1 1.0 M tris-HCl pH 7

1.4.1.2.1.2 0.5 M ethylene diamine tetraacetate (EDTA)

1.4.1.2.1.3 polyvinylpyrrolidone (PVP-10)

1.4.1.2.1.4 0.5 M dithiothreitol (DTT)

1.4.1.2.1.5 14.3 M β-mercaptoethanol (MSH)

1.4.1.2.2 สารที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ gel

1.4.1.2.2.1 30 % acrylamide stock solution (acrylation 29.2 กรัม และ bis-acrylamide 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มล เก็บไว้ในขวดสีชาที่ 4 ° ซ)

1.4.1.2.2.2 1.5 M tris-HCl pH 8.8

1.4.1.2.2.3 10 % ammonium persulfate (APS) เตรียมทันทีก่อนใช้

1.4.1.2.2.4 TEMED (N,N,N’,N’-tetramethyl ethylene-diamine)

1.4.1.2.2.5 น้ำกลั่น

1.4.1.2.3 สารที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ loading dye

1.4.1.2.3.1 10 % glycerol

1.4.1.2.3.2 0.5 % bromophenol blue

1.4.1.2.4 สารที่ใช้เป็น running buffer

1.4.1.2.4.1 tris

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4.1.2.4.2 glycine pH 8.3 ต่อน้ำกลั่น 500 มล

1.4.1.2.5 สารที่ใช้ย้อมเอนไซม์

1.4.1.2.5.1 0.05 M acetate buffer pH 4.8

1.4.1.2.5.2 fast ganet GBC diasonium salt

1.4.1.2.5.3 disodium α-naphthyl phosphate

1.4.1.2.5.4 $MgCl_2$

1.4.1.2.5.5 0.1 M tris-HCl pH 8.0

1.4.1.2.5.6 nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form (NADH)

1.4.1.2.5.6 2, 6-dichloroindophenol sodium (DCIP)

1.4.1.2.5.7 3[4, 5-dimethyphiazol]2, 5-diphenyltetrazelium bromide (MTT)

1.4.1.2.5.8 0.2 M phosphate buffer pH 6.0

1.4.1.2.5.9 fast blue B-salt

1.4.1.2.5.10 α-naphthyl acetate

1.4.1.2.5.11 0.1 M tris-HCl pH 7.5

1.4.1.2.5.12 α-D glucose

1.4.1.2.5.13 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)

1.4.1.2.5.14 nitro blue tetrazolium (NBT)

1.4.1.2.5.15 phenazine methosulfate (PMS)

1.4.1.2.5.16 0.1 M tris-HCl pH 7.4

1.4.1.2.5.17 α-ketoglutaric acid

1.4.1.2.5.18 aspartic acid

1.4.1.2.5.19 pyridoxal-5’-phosphate

1.4.1.2.5.20 fast blue BB salt

1.4.1.2.5.21 0.1 M sodium phosphate buffer pH 6

1.4.1.2.5.22 L-leucine β–naphyl acid

1.4.1.2.5.23 O-dianisidine salt

1.4.1.2.5.24 L-malic acid

1.4.1.2.5.25 shikimic acid

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4.1.2.5.26 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)

1.4.1.2.5.27 0.1 M tris-HCl pH 4.0

1.4.1.2.5.28 3-amino-9-ethylcarbazole

1.4.1.2.5.29 β-naphthol

1.4.1.2.5.30 3 % H_2O_2

1.4.1.2.5.31 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.5

1.4.1.2.5.32 TEMED

1.4.1.2.5.33 riboflavin

1.4.2 วิธีการ

1.4.2.1 การเตรียมน้ำยา

1.4.2.1.1 การเตรียมน้ำยาสกัด (extraction buffer) เตรียมน้ำยาสกัดโดยผสมสารตามชนิดและปริมาณที่แสดงในตารางที่ 2 เข้าด้วยกัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 30 มิลลิลิตร

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมน้ำยาสกัด

ชนิด	ปริมาณ
0.2 M tris – buffer pH 8.4	5 มล
0.5 M EDTA	0.06 มล
PVPP - 10	0.5 กรัม
0.5 M DTT	0.12 มล
14.3 M β-mercaptoethanol (MSH)	21 ไมโครลิตร

1.4.2.1.2 เตรียมสารที่ใช้เป็น running buffer โดยมีส่วนผสมของสารเคมี คือ tris 3 กรัม(ก) และ glycine 14.4 ก โดยการละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน โดยใส่น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายแล้วปรับปริมาตรให้ปริมาณสุดท้ายเป็น 500 มล เพื่อใช้สำหรับเป็นสารละลายเข้มข้น เมื่อจะใช้จึงนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:4

1.4.2.2 การสกัดเอนไซม์

นำใบของพืชทดลองมาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น และเช็ดให้แห้ง ชั่งใบให้ได้น้ำหนัก 1.0 ก หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในโกร่งที่แช่เย็นจัดใช้น้ำแข็งหล่อรอบโกร่งเพื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ป้องกันการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ เมื่อบดตัวอย่างจนละเอียดแล้ว เติม extraction buffer ตามสูตรดัดแปลงของ พสุ (2546) ลงไป 3 มล บดจนตัวอย่างละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทของเหลวที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 2°ซ เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใสใส่หลอดทดลองอันใหม่ ส่วนที่เป็นตะกอนทิ้งไป แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ เพื่อนำไปทำโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสต่อไป

1.4.2.3 การทำโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ประกอบชุดแผ่นกระจกเข้าด้วยกัน จากนั้นเตรียมสารละลายของเจล 7.5 % สำหรับ separating gel โดยผสมสารจากส่วนผสมที่แสดงไว้ในตารางที่ 3 ซึ่งจะต้องเตรียมแล้วใช้ทันทีโดยที่ส่วนผสมดังกล่าวเพียงพอสำหรับทำเจล 2 แผ่น

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณของสารเคมีที่เป็นส่วนผสมที่ใช้ในการเตรียม separating gel 7.5% (Kuntapanomand Smitamana, 1997)

ชนิด	ปริมาณ
น้ำกลั่น	4.85 มล
1.5 M tris pH 8.8	2.5 มล
30% acrylamide	2.5 มล
10% APS	100.00 ไมโครลิตร
TEMED	5.00 ไมโครลิตร

เมื่อเตรียมสารละลายเจลเสร็จ รีบนำสารละลายดังกล่าวมาเทลงระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้พร้อมกับเสียบหวี (comb) ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว ดึงหวีออก จากนั้นต่อชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมน้ำยา running buffer ลงใน chamber ให้อยู่ในระดับครึ่งหนึ่งของแผ่นกระจก ส่วนในช่องว่างของแผ่นกระจกทั้ง 2 ชุด เติมน้ำยาจนล้นหรือให้พอดีกับขอบกระจกด้านบน จากนั้นหยอดตัวอย่างที่ผสมกับ bromophenol blue ในอัตราส่วน 9:1 ลงในช่องของ stacking gel ปริมาณ 20 ไมโครลิตรต่อช่อง ปิดฝาครอบแล้วต่อขั้วไฟเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เปิดสวิทช์ ตั้งค่ากระแสไฟคงที่ที่ 20 มิลลิแอมแปร์ ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟ เมื่อสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่มาถึงปลายล่างของเจล จึงนำแผ่นกระจกออกจาก chamber แล้วแกะเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นกระจกออก ตัดมุมของเจลในจุดเริ่มต้นที่หยอดตัวอย่างเพื่อทำเป็นเครื่องหมาย แล้วนำมาวางในกล่องพลาสติกเพื่อรอย้อมสีเอนไซม์ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4.2.4 การย้อมสีเอนไซม์ในเจล

นำเจลที่ได้มาย้อมด้วย staining solution ของไอโซไซม์ตามระบบเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ รอจนเกิดแถบสี ล้างสีส่วนเกินออก แล้วนำไปแช่ใน 7% acetic acid (การเตรียมสีย้อมอยู่ในภาคผนวก)

1.4.2.5 การบันทึกข้อมูล

นำเจลที่ย้อมสีแล้วมาบันทึกค่าระยะทางของ bromophenol blue และบันทึกตำแหน่ง ขนาด จำนวนของแถบสี และรูปแบบการเกิดแถบของเอนไซม์แต่ละชนิด แล้วนำค่าระยะทางการเคลื่อนที่มาคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) ตามสมการข้างล่าง จากนั้นวาดไซโมแกรม

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของแถบสี}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของ marker}}$$

แสดงผลในรูปแบบของเดนโดรแกรม โดยวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างหาค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยค่าที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้จากการเกิดแถบสีหรือไม่เกิดแถบสีของแต่ละตัวอย่าง แล้วแปลงค่าที่มีแถบสีเป็น 1 และค่าที่ไม่มีแถบสีเป็น 0 นำค่าที่ได้นี้มาวิเคราะห์ผลด้วย UPGMA cluster analysis ตามวิธีการของ Jaccard's similarity coefficient โดยใช้โปรแกรม SPSS

การทดลองที่ 2 การศึกษาการเจริญเติบโต

การศึกษาการเจริญเติบโตของพืชทดลองเป็นการบันทึกการเจริญเติบโตของพืชทดลองในระยะเวลา 1 วงจรปี โดยศึกษาจากพืชทดลองที่ปลูกเลี้ยงไว้ภายใต้โรงเรือนในบริเวณแปลงรวบรวมพันธุ์ การบันทึกการเจริญเติบโตของต้นพืชครอบคลุมช่วงการเจริญเติบโตของดอก ใบ และ หัว จนกระทั่งต้นพืชพักตัวและเจริญเติบโตใหม่ในวงจรปีถัดไป วัสดุอุปกรณ์ และ วิธีการทดลองมีดังต่อไปนี้

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 พืชทดลอง คือ แผ่นดินเย็นพันธุ์ HKRC01 และ HKRC02 พันธุ์ละ 5 ต้น

2.1.2 วัสดุปลูกได้แก่ ดิน ทราย และขี้เถ้าแกลบ ในอัตราส่วน 1:1:1

2.1.3 ภาชนะปลูก ได้แก่ กระถางพลาสติกสีดำ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.5 นิ้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.4 อุปกรณ์ในการบันทึกการเจริญเติบโตของต้นพืชทดลอง คือ สมุดบันทึก เวอร์เนียแคลลิเปอร์ ไม้บรรทัด กล้องถ่ายภาพพร้อมฟิล์ม และป้ายชื่อ

2.2 วิธีการ

2.2.1 ปลูกต้นพืชในกระถางพลาสติกที่บรรจุวัสดุปลูกดังระบุส่วนผสมไว้ในข้อ 2.1.2 จากนั้นนำไปเลี้ยงไว้ภายในโรงเรือนที่มีตาข่ายพรางแสงประมาณ 50 %

2.2.2 ติดตามการเจริญเติบโตของพืชทดลองโดยการบันทึกการเจริญเติบโตของต้นพืชตั้งแต่ระยะที่มีการเจริญเติบโตหลังจากที่หัวแม่ผ่านระยะพักตัวแล้ว ตลอดไปจนถึงช่วงการเจริญเติบโตของใบ ช่วงแทงช่อดอก และ ช่วงดอกบาน ไปจนถึงช่วงที่หัวใหม่เข้าสู่ระยะพักตัว แล้วแสดงวงจรการเจริญเติบโตใน 1 วงจรปีของต้นพืชแต่ละพันธุ์ในลักษณะของภาพวาด

2.2.3 บันทึกการเจริญเติบโตทางใบและบันทึกขนาดใบ

2.2.4 บันทึกการเจริญเติบโตของดอกโดยสังเกตการเริ่มเกิดช่อดอก การเจริญเติบโตของช่อดอก ความยาวของช่อดอก จำนวนดอกต่อช่อ และขนาดของดอกย่อย

2.2.5 บันทึกการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของหัวตั้งแต่เริ่มต้นการเจริญเติบโตจนถึงช่วงพักตัว

การทดลองที่ 3 การศึกษาการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

การศึกษาการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อของพืชทดลองแบ่งออกเป็น 3 การทดลองย่อย โดยมีอุปกรณ์และวิธีการดังนี้

การทดลองที่ 3.1 การผสมเกสร

ศึกษาความเป็นไปได้ของการผสมเกสรของพืชทดลอง โดยการถ่ายละอองเกสรด้วยมือเพื่อให้เกิดการผสมเกสรในดอกเดียวกันของพืชทดลองทั้ง 2 พันธุ์ วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการทดลองมีดังนี้

3.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1.1 พืชทดลอง คือ ต้นแผ่นดินเย็น 2 พันธุ์ ซึ่งมีการเจริญเติบโตของต้นพืชในระยะที่มีช่อดอก และอยู่ในช่วงที่ดอกกำลังบาน

3.1.1.2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ ได้แก่ ไม้ปลายแหลม ดินสอ แผ่นป้ายพลาสติก ด้าย และสมุดบันทึก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.2 วิธีการ

3.1.2.1 การผสมเกสร

ผสมเกสรของพืชทดลองในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน 4 ช่วง คือ 7.00-8.00 น. 8.00-9.00 น. 9.00-10.00 น. และ 10.00-11.00 น. วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ดอก ผสมเกสรโดยใช้ไม้ปลายแหลมที่สะอาดเขี่ยเกสรเพศผู้ออกมา แล้วนำไปใส่ในยอดเกสรเพศเมียซึ่งเป็นแอ่งที่มีน้ำเมือกเหนียวใส ติดป้ายบันทึกข้อมูลการผสม

3.1.2.2 การบันทึกผล

บันทึกจำนวนดอกที่ผสม จำนวนดอกที่ผสมติด และติดตามการเจริญเติบโตของฝักตั้งแต่ระยะติดฝักจนถึงระยะฝักแก่

การทดลองที่ 3.2 การเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ

ศึกษาการเพาะเมล็ดของพืชทดลอง 2 พันธุ์ ในสภาพปลอดเชื้อ วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการมีดังนี้

3.2.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1.1.1 วัสดุทดลอง ได้แก่ ฝักของพืชทดลองที่มีอายุ 3, 5, 10, และ 15 วันหลังผสมเกสร

3.2.1.1.2 กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ส่องกลับ (inverted microscope)

3.2.1.1.3 หม้อนึ่งความดันไอ

3.2.1.1.4 เครื่องวัดความเป็นกรด/ด่าง

3.2.1.1.5 เครื่องชั่งชนิดละเอียด

3.2.1.1.6 เครื่องชั่งไฟฟ้า

3.2.1.1.7 ตู้กรองอากาศ

3.2.1.1.8 ชั้นสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.2.1.1.9 เครื่องเขย่า

3.2.1.1.10 ตู้อบไมโครเวฟ

3.2.1.1.11 ไมโครปิเปต

3.2.1.1.12 ขวดรูปชมพู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.1.1.13 หลอดทดลอง

3.2.1.1.14 เครื่องแก้วอื่น ๆ เช่น บีกเกอร์ กระบอกวัดปริมาตร ปิเปต ขวดวัดปริมาตร ขวดใส่สารละลายเข้มข้น แท่งแก้วคนสาร จานเลี้ยงเชื้อ แผ่นกระจกสไลด์ และแผ่นกระจกปิดสไลด์

3.2.1.1.15 วัสดุที่ใช้ในตู้กรองอากาศ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ แอลกอฮอล์ 70 % พร้อมกระบอกฉีด ไม้ขีดไฟ ปากคีบขนาดยาว 140 และ 180 มม ด้ามมีดเบอร์ 3 ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 11 หลอดทดลองขนาด 25x150 มม สำหรับใส่แอลกอฮอล์ฆ่าเชื้อ กระดาษกรอง แผ่นพลาสติกใสที่ฆ่าเชื้อแล้ว และ จานเลี้ยงเชื้อ

3.2.1.1.16 วัสดุอื่น ๆ เช่น ช้อนตักสาร แผ่นพลาสติกใส ยางรัด แผ่นป้ายขาว สติกเกอร์สำหรับเขียนกรรมวิธีและวันที่ทดลองติดหลอดทดลอง กระดาษลอกลายที่ใช้ปิดปากขวด และกระดาษอลูมินั่มฟอยล์

3.2.1.1.17 กล้องจุลทรรศน์ พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

3.2.1.1.18 วัสดุ เครื่องมือ และ อุปกรณ์ในการศึกษาเนื้อเยื่อดังระบุใน 1.2.1

3.2.1.2 สารเคมี

3.2.1.2.1 สารสำหรับฆ่าเชื้อ ได้แก่ น้ำยาล้างจาน สารลดแรงตึงผิว น้ำยา clorox เข้มข้น 15 % และ ethyl alcohol เข้มข้น 70 %

3.2.1.2.2 สารที่ใช้สำหรับเตรียมอาหาร

3.2.1.2.2.1 ธาตุอาหารหลักตามสูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลง (CMU1) ซึ่งในที่นี้เรียกว่าสูตร VW (CMU1) ดังแสดงในตารางที่ 4

3.2.1.2.2.2 ธาตุอาหารรองต่าง ๆ ตามสูตร Murashige and Skoog (1962) หรือในที่นี้เรียกสูตร MS ดังแสดงในตารางที่ 5

3.2.1.2.2.3 $FeSO_4.7H_2O$ และ Na_2EDTA

3.2.1.2.2.4 สารอินทรีย์ต่าง ๆ ได้แก่ glycine, myo–inosital, thiamine.HCl, pyridoxin.HCl และ nicotinic acid

3.2.1.2.2.5 potassium hydroxide 1 N (1 N KOH)

3.2.1.2.2.6 hydrochloric acid 1 N (1 N HCl)

3.2.1.2.2.7 น้ำกลั่น

3.2.1.2.2.8 น้ำตาลซูโครส

3.2.1.2.2.9 น้ำมะพร้าว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.1.2.2.10 ผงวุ้นตราเฮลิคอปเตอร์

3.2.1.2.3 สารที่ใช้สำหรับการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยา ดังระบุในข้อ 1.2.1.2

ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณของสารที่ให้ธาตุอาหารหลักของสูตร VW (CMU1)

ชนิด	ปริมาณตามสูตรมาตรฐาน (มก/ล)	ปริมาณที่ใช้ในการเตรียมสารละลายเข้มข้น 20 เท่า(ก/ล)
KNO_3	525	10.50
$(NH_4)_2SO_4$	500	10.00
KH_2PO_4	250	5.00
$MgSO_4.7H_2O$	250	5.00
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	151	3.02

3.2.2 วิธีการ

3.2.2.1 การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)

3.2.2.1.1 การเตรียมธาตุอาหารหลัก เตรียมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร VW (CMU1) โดยเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นรวมมากกว่าสูตรมาตรฐาน 20 เท่า โดยชั่งสารแต่ละชนิดตามปริมาณที่แสดงในตารางที่ 4 ละลายสารด้วยน้ำอุ่น จากนั้นเทสารทุกชนิดรวมกันในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล แล้วใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1,000 มล เทใส่ขวดแก้วปิดฝาแล้วนำไปเก็บในที่เย็น

3.2.2.1.2 การเตรียมธาตุอาหารรอง เตรียมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS โดยเตรียมเป็นสารละลายให้มีความเข้มข้นรวมมากกว่าสูตรมาตรฐาน 100 เท่า โดยชั่งสารแต่ละชนิดตามปริมาณที่แสดงในตารางที่ 5 จากนั้นนำสารแต่ละชนิดมาละลายในน้ำอุ่น เมื่อละลายดีแล้วเทรวมกันในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1,000 มล ด้วยน้ำกลั่น เทใส่ขวดแก้วที่มีฝาปิดแล้วนำไปเก็บไว้ในที่เย็น

3.2.2.1.3 การเตรียมสารละลายเหล็กในรูป FeEDTA ในสูตรอาหาร MS เตรียมโดยชั่ง $FeSO_4.7H_2O$ และ Na_2EDTA ตามปริมาณที่แสดงไว้ในตารางที่ 6 จากนั้นนำมาละลายในน้ำอุ่น เมื่อละลายหมดแล้วเทรวมกันในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1,000 มล ด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง และนำไปไว้ในที่เย็น สารละลายที่เตรียมได้นี้เป็นสารละลายเข้มข้นรวมที่มีความเข้มข้นมากกว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สูตรมาตรฐาน 100 เท่า ทุกขั้นตอนของการเตรียมสารละลายเหล็กจะต้องเตรียมในที่มืด เพื่อกันการเกิดปฏิกิริยากับแสง

ตารางที่ 5 ชนิดและปริมาณของสารที่ให้ธาตุอาหารรองสูตร MS

ชนิด	ปริมาณตามสูตรมาตรฐาน (มก/ล)	ปริมาณที่ใช้ในการเตรียมสารละลายเข้มข้น 100 เท่า(มก/ล)
$MnSO_4.4H_2O$	22.330	2230.0
$ZnSO_4.7H_2O$	8.600	860.0
H_3B_3O	6.200	620.0
KI	0.830	83.0
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.250	25.0
$CoCl_4.6H_2O$	0.025	2.5
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	2.5

ตารางที่ 6 ชนิดและสารเคมีในสารละลายเหล็กเข้มข้นของสูตร MS

ชนิด	ปริมาณตามสูตรมาตรฐาน (มก/ล)	ปริมาณที่ใช้ในการเตรียมสารละลายเข้มข้น 100 เท่า(ก/ล)
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	2.78
Na_2EDTA	37.8	3.73

3.2.2.1.4 การเตรียมอินทรีย์สาร

เตรียมอินทรีย์สารให้เป็นสารละลายเข้มข้นรวม โดยมีความเข้มข้นของสารเป็น 100 เท่าของสูตรมาตรฐาน โดยการละลายสารชนิดต่าง ๆ ในปริมาณที่ระบุไว้ในตารางที่ 7 แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1,000 มล ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเทใส่ขวดแก้วแล้วนำไปเก็บในที่เย็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 7 ชนิดและสารเคมีในสารละลายเข้มข้นของอินทรีย์สารสูตร MS

ชนิด	ปริมาณตามสูตรมาตรฐาน (มก/ล)	ปริมาณที่ใช้ในการเตรียมสารละลายเข้มข้น 100 เท่า(มก/ล)
myo-inosital	100.00	10,000
glycine	2.00	200
thiamine.HCl	0.25	25
pyridoxin.HCl	0.25	25
nicotinic acid	0.25	25

3.2.2.2 วิธีการเตรียมสิ่งทดลองในกรรมวิธีต่าง ๆ มีขั้นตอน คือ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยมีกรรมวิธีการทดลอง 4 กรรมวิธี คือ เพาะเลี้ยงฝักที่มีอายุ 3, 5, 10, และ 15 วันหลังผสมเกสร แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ

สำหรับการเตรียมอาหารเพื่อกรรมวิธีทั้ง 4 กรรมวิธีนั้น เตรียมอาหารในปริมาณ 50 มล ต่อ 1 กรรมวิธี จึงต้องเตรียมอาหารทั้งหมด 200 มล โดยทำตามขั้นตอนดังนี้ เติมน้ำกลั่นเล็กน้อยลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มล เติมสารละลายของธาตุอาหารหลักในสูตร VW (CMU1) ที่มีความเข้มข้น 20 เท่าลงไป 12.5 มล เขย่าสารให้เข้ากันแล้วเติมสารละลายของธาตุอาหารรองสูตร MS ที่มีความเข้มข้น 100 เท่าลงไป 2.5 มล เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลาย FeEDTA ที่มีความเข้มข้น 100 เท่าลงไป 2.5 มล เขย่าให้เข้ากัน ต่อมาเติมสารละลายอินทรีย์สารที่มีความเข้มข้น 100 เท่าลงไป 2.5 มล เขย่าให้เข้ากัน เติมน้ำมะพร้าว 37.5 มล เขย่าให้เข้ากัน สำหรับน้ำตาลซูโครสนั้นชั่งมา 5 ก ละลายด้วยน้ำกลั่น คนจนละลายทั่วกันแล้วเทลงในขวดวัดปริมาตรรวมกับธาตุอาหารที่เตรียมไว้ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 มล แล้วเทลงในบีกเกอร์ ปรับความเป็นกรด/ด่างให้เป็น 5.7 เติมผงวุ้นลงไป 2 ก ต้มจนวุ้นละลายนำมาบรรจุลงในหลอดทดลองหลอดละ 10 มล ปิดด้วยพลาสติก รัดด้วยยาง แล้วหุ้มด้วยกระดาษอีกชั้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้จนอาหารวุ้นเย็นและแข็งตัวจึงนำไปทดลองต่อไป

เมื่อเตรียมอาหารเสร็จแล้ว นำฝักของพืชทดลองที่มีอายุครบตามที่กำหนดไว้ มาเตรียมการภายในตู้กรองอากาศ โดยเริ่มจากการตัดส่วนที่แห้งบริเวณปลายฝักออกทำความสะอาดเบื้องต้นโดยการล้างด้วยน้ำยาล้างจาน ใช้แปรงขัดตามซอกของฝักแล้วล้างด้วยน้ำให้สะอาด จากนั้นเช็ดด้วย 70% ethyl alcohol เข้มข้น แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยน้ำยา 15% clorox เข้มข้น นาน 20 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นวางฝักลงบนจานเพาะเชื้อที่มีแผ่นพลาสติกที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นึ่งฆ่าเชื้อแล้วรองอยู่ ใช้มีดกรีดฝักตามขวาง ต่อมาใช้ปลายมีดเขี่ยเมล็ดลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเหลวอยู่ 10 มล โดยใส่ 1 ขวดต่อ 1 กรรมวิธี ใช้หลอดหยดดูดเอาเมล็ดในขวดรูปชมพู่ดังกล่าวหยดลงบนผิวหน้าของอาหารแข็งที่เตรียมใส่หลอดทดลองเอาไว้แล้วนั้น จำนวน 1 หยดต่อ 1 หลอดในแต่ละกรรมวิธี ทำกรรมวิธีละ 5 ซ้ำ คือ 5 หลอด จากนั้นนำไปเก็บไว้ในที่มืด

3.2.2.3 บันทึกระยะเวลาที่ใช้ในการงอกและเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดในแต่ละกรรมวิธี

การทดลองที่ 3.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากตาใบ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้เนื้อเยื่อจากตาใบของพืชทดลอง เป็นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดังกล่าวในอาหารสูตร VW (CMU1) ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ 2,4-D และ TDZ เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อนั้น วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการทดลองมีดังนี้

3.3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.3.1.1 วัสดุทดลอง ได้แก่ ชิ้นส่วนตาใบของพืชทดลองซึ่งตัดมาจากต้นอ่อนที่เจริญเติบโตในขวดอาหารในสภาพปลอดเชื้อ ขนาดของชิ้นส่วนตาใบ คือ 0.5 ซม โดยประมาณ

3.3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง ใช้เช่นเดียวกับที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.1.1.3 - 3.2.1.1.18

3.3.1.3 สารที่ใช้สำหรับเตรียมอาหารใช้เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.2..2.

3.3.1.4 สารที่ใช้สำหรับการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาใช้เช่นเดียวกับข้อ 1.2.1.2

3.3.2 วิธีการทดลอง

3.3.2.1 การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเตรียมเช่นเดียวกับในข้อ 3.2.2.1

3.3.2.2 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งได้แก่ 2,4-D และ TDZ นั้นเตรียมสารละลาย 2, 4-D โดยชั่ง 2, 4-D 1 มก ละลายด้วย 100% ethyl alcohol เล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มลด้วยน้ำกลั่น ส่วนการเตรียมสารละลาย TDZ ทำโดยชั่ง TDZ 1 มก ละลายด้วย1N KOH เล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มล

3.3.2.3 วิธีการเตรียมกรรมวิธีทดลอง วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) โดยมี 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของ 2,4-D 4 ระดับ ได้แก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

0, 0.5, 1 และ 2 มก/ล และความเข้มข้นของ TDZ 3 ระดับ ได้แก่ 0, 1 และ 2 มก/ล รวม 12 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ โดยเลี้ยงเนื้อเยื่อตาใบลงในอาหารวุ้นสูตร VW (CMU1) ซึ่งมี 2,4-D และ TDZ ผสมลงไปตามกรรมวิธีต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 2, 4-D 0 มล/ล + TDZ 0 มล/ล

กรรมวิธีที่ 2 2, 4-D 0 มล/ล + TDZ 1 มล/ล

กรรมวิธีที่ 3 2, 4-D 0 มล/ล + TDZ 2 มล/ล

กรรมวิธีที่ 4 2, 4-D 0.5 มล/ล + TDZ 0 มล/ล

กรรมวิธีที่ 5 2, 4-D 0.5 มล/ล + TDZ 1 มล/ล

กรรมวิธีที่ 6 2, 4-D 0.5 มล/ล + TDZ 2 มล/ล

กรรมวิธีที่ 7 2, 4-D 1 มล/ล + TDZ 0 มล/ล

กรรมวิธีที่ 8 2, 4-D 1 มล/ล + TDZ 1 มล/ล

กรรมวิธีที่ 9 2, 4-D 1 มล/ล + TDZ 2 มล/ล

กรรมวิธีที่ 10 2, 4-D 2 มล/ล + TDZ 0 มล/ล

กรรมวิธีที่ 11 2, 4-D 2 มล/ล + TDZ 1 มล/ล

กรรมวิธีที่ 12 2, 4-D 2 มล/ล + TDZ 2 มล/ล

ปริมาณอาหารเพื่อใช้ในกรรมวิธีทั้งหมด ใช้ 600 มล จึงเตรียมอาหารพื้นฐานให้มีความเข้มข้น 2 เท่า รวมปริมาณเป็น 300 มล โดยทำตามขั้นตอนดังนี้ เติมน้ำกลั่นเล็กน้อยลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มล เติมสารละลายของธาตุอาหารหลักในสูตร VW (CMU1) ที่มีความเข้มข้น 20 เท่าลงไป 30 มล เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลายของธาตุอาหารรองสูตร MS ที่มีความเข้มข้น 100 เท่าลงไป 6 มล เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย FeEDTA ที่มีความเข้มข้น 100 เท่าลงไป 6 มล เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลายอินทรีย์สารที่มีความเข้มข้น 100 เท่าลงไป 6 มล เขย่าให้เข้ากัน เติมน้ำมะพร้าวลงไป 90 มล เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นชั่งน้ำตาลซูโครสมา 12 ก ละลายด้วยน้ำกลั่นคนจนน้ำตาลละลายหมด เทลงในขวดวัดปริมาตรรวมกับธาตุอาหารต่าง ๆ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 มล แล้วเทลงในบีกเกอร์เติมน้ำกลั่นลงไปอีก 50 มล เพื่อให้ได้ปริมาตรของอาหารพื้นฐานเป็น 300 มล ตามที่ต้องการ จากนั้นนำอาหารพื้นฐานที่เตรียมได้แบ่งใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มล จำนวน 12 ขวดตามจำนวนของกรรมวิธี โดยแบ่งอาหารพื้นฐานใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขวดละ 25 มล จากนั้นใช้ปิเปตดูดเอา 2,4-D และ TDZ ตามปริมาตรที่คำนวณเอาไว้ในตารางที่ 8 ของแต่ละกรรมวิธี ใส่ลงไปในขวดวัดปริมาตร เมื่อใส่สารจนครบทุกกรรมวิธีแล้ว ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 50 มล ด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปรับค่าความเป็นกรด/ด่างให้เป็น 5.7 ในทุกกรรมวิธี เติมผงวุ้นกรรมวิธีละ 0.4 กรัม ต้มจนวุ้นละลายนำมาบรรจุลงใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลอดทดลองหลอดละ 10 มล ปิดด้วยพลาสติก รัดด้วยยาง แล้วหุ้มด้วยกระดาษอีกชั้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้จนอาหารวุ้นเย็นและแข็งจึงนำไปทำการทดลองต่อไป

ตารางที่ 8 ปริมาตรของอาหาร ความเข้มข้นของ 2,4-D และ TDZ ในแต่ละกรรมวิธี

TDZ (มก/ล)	2,4-D (มก/ล) 0	0.5	1	2
0	อาหารพื้นฐาน 25 มล 2,4-D 0 มล TDZ 0 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล 2,4-D 2.5 มล TDZ 0 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล 2,4-D 5 มล TDZ 0 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล 2,4-D 10 มล TDZ 0 มล
1	อาหารพื้นฐาน 25 มล 2,4-D 0 มล TDZ 5 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล 2,4-D 2.5 มล TDZ 5 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล 2,4-D 5 มล TDZ 5 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล 2,4-D 10 มล TDZ 5 มล
2	อาหารพื้นฐาน 25 มล 2,4-D 0 มล TDZ 10 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล 2,4-D 2.5 มล TDZ 10 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล 2,4-D 5 มล TDZ 10 มล	อาหารพื้นฐาน 25 มล 2,4-D 10 มล TDZ 10 มล

การเตรียมชิ้นส่วนของตาใบทำโดยการตัดเอาชิ้นส่วนของตาใบที่เกิดอยู่บนไหลของต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อให้มีขนาดยาวประมาณ 0.5 ซม เมื่อได้ชิ้นส่วนดังกล่าวแล้วใช้ปากคีบหยิบชิ้นส่วนปักลงบนอาหารแข็งที่เตรียมเอาไว้ โดยใช้ชิ้นส่วนของตาใบ 1 ชิ้นต่อ 1 หลอด จากนั้นนำหลอดทดลองทั้งหมดไปเก็บไว้ในห้องเพาะเลี้ยง อนึ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของตาใบนั้น ทุกขั้นตอนจะต้องทำภายในตู้กรองอากาศที่ฆ่าเชื้อแล้ว

บันทึกผลการทดลองโดยการบันทึกและสังเกตลักษณะและจำนวนชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส จำนวนต้นต่อชิ้นส่วน ความสูงต้น จำนวนราก และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นอ่อน

ในขั้นตอนของการสังเกตและบันทึกผลการทดลองหากมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาเนื้อเยื่อของชิ้นส่วนที่มีการเจริญเติบโตในลักษณะต่าง ๆ จึงดำเนินการศึกษาเนื้อเยื่อของชิ้นส่วนเหล่านั้นโดยวิธีการที่ระบุไว้ในข้อ 1.2.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved