หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

1. อุปกรณ์

1.1 พืชทดลองใช้ส้มโอพันธุ์ขาวพวง

1.1.1 ตายอดและตาข้าง (terminal and axillary bud) ของส้มโอพันธุ์ขาวพวง

1.1.2 เมล็ดของส้มโอพันธุ์ขาวพวง

1.2 petri dish

1.3 หลอดแก้วมีจุกเกลียวขนาด 25 x 95 มิลลิเมตร (8 drams)

1.4 flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

1.5 กระดาษอะลูมินัม (aluminum foil)

1.6 ตู้ถ่ายเชื้อภายในมีหลอด UV ฆ่าเชื้อโรค ชั้นวางหลอดแก้วทดลองได้รับแสงจากหลอดไฟ Gro-lux Sylvania ที่มีความเข้มแสง 3000 ลักซ์ เป็นเวลา 15 ชั่วโมงต่อวัน มืด 9 ชั่วโมงต่อวัน อยู่ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 23-25 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 34.5 เปอร์เซนต์

1.7 เครื่องมือผ่าตัด

1.8 กล้องถ่ายรูป

1.9 เครื่องตัดเนื้อเยื่อ (microtome)

1.10 ultrasonic cleaner

2. อาหารและสารเคมี

2.1 อาหารแข็งสูตร Modified Murashige and Skoog (MMS) ดูภาคผนวก

อาหารแข็ง MMS I ดูภาคผนวก

อาหารแข็ง MMSII ดูภาคผนวก

2.2 growth substance ได้แก่

Indole butyric acid (IBA)

6 - furfurylamino purine (kinetin)

Benzyl adenine (BA)

Naphthalene acetic acid (NAA)

2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำ section แบบฝังพาราฟินตามวิธีของ Johansen (1940)

2.4 สารเคมีที่ใช้ฆ่าเชื้ออื่น ๆ

เอทธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ (95% ethyl alcohol)

คลอรอกซ์ (clorox)

ทีโพล (teepol)

2.5 ดินยบฆ่าเชื้อ

3. วิธีทำการวิจัย

3.1 การเพาะเลี้ยงตายอดและตาข้างของส้มโอ

นำกิ่งอ่อนของส้มโอยาวประมาณ 10 เซนติเมตร ซึ่งจะมีตายอดและตาข้างอยู่ด้วย มาตัดใบออกให้หมด แล้วทำความสะอาดโดยใช้สำลีชุบเอทธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ เช็ดกิ่งอ่อนส้มโอ 2-3 ครั้ง โดยลูบจากโคนไปหายอดทิศทางเดียวโดยตลอด จากนั้นใช้มีดผ่าตัดจุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ เผาไฟทิ้งให้มีดผ่าตัดเย็นแล้วตัดกิ่งส้มโอให้เป็นท่อนยาวประมาณ 5 เซนติเมตร นำไปทำลายเชื้อที่ผิวโดยคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซนต์ และทีโพล 1 หยด ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าเป็นครั้งคราว เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปฟอกอีกครั้งด้วยคลอรอกซ์ 5เปอร์เซนต์ และทีโพล 1 หยด ใช้เวลาฟอกนาน 5 นาที จากนั้นจึงล้างด้วยน้ำกลั่นที่ได้นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง นำไปทำต่อในตู้ถ่ายเชื้อ โดยใช้วิธีการ steriled technique ใช้ปากคีบจับกิ่งส้มโอที่สะอาดวางบนกระดาษอะลูมินัมที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ขนาด 5 x 5

เซนติเมตร โดยวางกระดาษอะลูมินัมบน petri dish ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเช่นกัน ตัดปลายหัวและท้ายของแต่ละท่อนกิ่งส้มโอออก แล้วจึงตัดเป็นท่อนสั้น ๆ ยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร ท่อนล่างจะประกอบไปด้วยตาข้างหนึ่งตาหรือสองตา ท่อนบนจะประกอบไปด้วยตายอดหนึ่งตาและตาข้างหนึ่งตาหรือสองตา นำเอากิ่งทั้งหมดนี้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MMS โดยวางเสียบลงไปในวุ้นซึ่งอยู่ในหลอดแก้วจุกเกลียว ต่อจากนี้จึงนำหลอดแก้วจุกเกลียวไปวางบนชั้นที่ได้รับแสงสว่างจากหลอดไฟ Gro-lux sylvania มีความเข้มแสง 3000 ลักซ์ เป็นเวลา 15 ชั่วโมงต่อวัน มืด 9 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 23-25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 34.5 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

ใช้ตายอดมาเพาะเลี้ยงทั้งหมด	160	ท่อน
ใช้ตาข้างมาเพาะเลี้ยงทั้งหมด	580	ท่อน

3.2 การศึกษาอิทธิพลของ IBA ที่มีต่อการเกิดรากของหน่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตาข้าง

เนื่องจากการเพาะเลี้ยงตายอดที่ได้จากข้อ 3.1 มีจำนวนจำกัดไม่เพียงพอ ส่วนตาข้างมีจำนวนมากพอ จึงนำตาข้างที่เจริญเป็นหน่อมาศึกษา โดยนำหน่อที่เจริญเติบโตมาจากตาข้างอายุ 5 สัปดาห์มาเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MMS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซนต์ และมี IBA ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 15 มก./ล. ตามลำดับ ทำ treatment ละ 8 ซ้ำ ใช้เวลาศึกษา 8 สัปดาห์ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ใช้หน่อของส้มโอที่เจริญจากตาข้างทั้งหมดจำนวน 120 หน่อ

3.3 การเพาะเลี้ยงกล้าส้มโอจากเมล็ด

ใช้ปากคีบจับเมล็ดส้มโอจุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ แล้วผ่านเปลวไฟอย่างเร็ว วางบนกระดาษอะลูมินัม ใน petri dish ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปแกะเอาเปลือกเมล็ดออกแล้วเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MMS ซึ่งอยู่ในหลอดแก้วมีจุกเกลียวใช้เวลา 10-15 วัน เพื่อให้เกิดเป็นต้นกล้าขนาดเล็ก

3.4 การเพาะเลี้ยงอวัยวะส่วนต่าง ๆ ของกล้าส้มโอ

นำเอากล้าส้มโอที่มีอายุ 10 วัน ออกจากอาหารวุ้นสูตร MMS โดยใช้ปากคีบค่อย ๆ ดึงต้นกล้าออกวางบนกระดาษอะลูมินัม ใน petri dish ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้มีดผ่าตัดที่

สะอาด ตัดแบ่งเป็นส่วน ๆ ในตู้ถ่ายเชื้อแล้ว ดังนี้ ตายอด, epicotyl, hypocotyl, ใบ ใบเลี้ยง, ราก แล้วแยกแต่ละส่วนนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MMSI

3.5 การทำให้เกิดแคลลัสจากใบเลี้ยงของส้มโอ

เนื่องจากการเพาะเลี้ยงอวัยวะต่าง ๆตามข้อ 3.4 นั้น ปรากฏว่า ใบเลี้ยง สามารถทำให้เกิดแคลลัสได้ดีและเร็วกว่าอวัยวะส่วนอื่น ๆ จึงใช้ใบเลี้ยงเป็นอุปกรณ์ในการวิจัยต่อไป โดยนำเอาใบเลี้ยงที่ปราศจากเชื้อมาเพาะเลี้ยง ใบเลี้ยงจากกล้าส้มโอหนึ่งต้น ตัดแบ่งครึ่งตามขวางได้ใบเลี้ยงทั้งหมดสี่ส่วน นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MMSI

3.6 การเพิ่มจำนวนแคลลัสจากใบเลี้ยงส้มโอ เพื่อใช้ในการวิจัย

แคลลัสที่ได้จากข้อ 3.5 จะเพิ่มปริมาณให้มากขึ้น โดยการตัดแบ่งและย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารใหม่ทุก ๆ 10 วัน เป็นเวลา 4 เดือน อาหารที่ใช้เป็นอาหารวุ้นสูตร MMSII ทุก ๆ ครั้งที่เปลี่ยนอาหารใหม่จะตัดแบ่งแคลลัสออกเป็นก้อนขนาดประมาณ 5 x 5 x 5 มิลลิเมตร

3.7 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของแคลลัส

แคลลัสจากข้อ 3.6 ที่ได้ทำการย้ายอาหารและเพาะเลี้ยงมาเป็นเวลา 2 เดือน ซึ่งจะทำให้แคลลัสที่อยู่อัดกันแน่นมีการเจริญเติบโตข้ามาก จึงนำมาศึกษาอัตราการเจริญเติบโต โดยตัดแคลลัสออกเป็นก้อนขนาด 5 x 5 x 5 มิลลิเมตร นำไปชั่งน้ำหนักสด แล้วจึงนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MMSII เป็นเวลา 45 วัน จึงนำมาชั่งอีกครั้งหนึ่งและคำนวณหาน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้น ทำการทดลอง 15 ซ้ำ

นำเอาแคลลัสที่ทราบน้ำหนักสดไปอบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน แล้วจึงชั่งน้ำหนักแห้งของแคลลัส

3.8 การศึกษาอิทธิพลของ NAA ที่มีต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงของส้มโอ

ตัดแคลลัสจากใบเลี้ยงให้เป็นก้อนขนาด 7 x 7 x 7 มิลลิเมตร มาเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MMS โดยมี NAA ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.40 มก./ล. ตามลำดับ ทำ 5 treatment ทำ treatment ละ 12 ซ้ำ เพาะเลี้ยงอยู่เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เก็บผลการทดลองโดยการบันทึกภาพไว้ ทำการศึกษาซ้ำกัน 2 ครั้ง

3.9 การศึกษาอิทธิพลของ BA ที่มีต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงของส้มโอ

ตัดแคลลัสของใบเลี้ยงส้มโอให้เป็นก้อนขนาด 7 x 7 x 7 มิลลิเมตร มาเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MMS โดยมี BA ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.40 มก./ล. ตามลำดับ ทำ 5 treatment ทำ treatment ละ 12 ซ้ำ เพาะเลี้ยงอยู่เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เก็บผลการทดลองโดยบันทึกภาพ ทำการศึกษาซ้ำ 2 ครั้ง

2.10 การศึกษาอิทธิพลของ NAA และ BA ที่มีต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงของส้มโอ

ตัดแคลลัสของใบเลี้ยงส้มโอให้เป็นก้อนขนาด 7 x 7 x 7 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MMS ที่มี combination ของ NAA และ BA โดย NAA มีความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.40 มก./ล. ตามลำดับ และ BA มีความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.40 มก./ล. ตามลำดับ มีทั้งหมด 25 treatment (ตารางที่ 4) ทำ treatment ละ 12 ซ้ำ เพาะเลี้ยงอยู่เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เก็บผลการทดลองโดยบันทึกภาพไว้ ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

ตารางที่ 4 combination ของ NAA และ BA

BA (mg/l) / NAA (mg/l)	0	0.05	0.10	0.20	0.40
0	0:0	0:0.05	0:0.10	0:0.20	0:0.40
0.05	0.05:0	0.05:0.05	0.05:0.10	0.05:0.20	0.05:0.40
0.10	0.10:0	0.10:0.05	0.10:0.10	0.10:0.20	0.10:0.40
0.20	0.20:0	0.20:0.05	0.20:0.10	0.20:0.20	0.20:0.40
0.40	0.40:0	0.40:0.05	0.40:0.10	0.40:0.20	0.40:0.40

3.11 การย้ายต้นส้มโอไปปลูกในดิน

นำเอาส้มโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกจากหลอดแก้วจุกเกลียว โดยใช้ปากคีบค่อย ๆ ดึงส้มโอที่มีต้น, ราก รวมทั้งแคลลัสออกจากหลอดแก้ว ทั้งแคลลัสที่มีแต่รากและแคลลัสที่มีแต่ต้นมาปลูกในดินที่อบฆ่าเชื้อแล้ว นำไปไว้ในที่มีแสงรำไร อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส มีการรดน้ำสม่ำเสมอวันละ 2 ครั้ง หลังจากนั้น 6 สัปดาห์ ส้มโอที่ยังมีชีวิตก็นำไปปลูกลงดินต่อไป

3.12 การศึกษา organogenesis ของแคลลัสจากใบเลี้ยงส้มโอ

สุ่มตัวอย่างแคลลัสที่มีต้นและมีราก กับแคลลัสที่ไม่มีต้น ไม่มีราก มาฝังพาราฟินตามวิธีของ Johansen (1940) และตัด section ด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (microtome) ย้อมสี safranin O และ fast green ศึกษารายละเอียดด้วยกล้องจุลทรรศน์และบันทึกภาพประกอบการศึกษา