บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุ

1. พืชทดลอง: แครอท *Daucus carota* Linn. พันธุ์คูโรดาโกซัน (Kurodagosun) ซึ่งเป็นพันธุ์ปลูกและใช้กันโดยทั่วไป

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.1.1 อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งประกอบด้วย ธาตุอาหารหลัก (macronutrient) ธาตุอาหารรอง (micronutrient) น้ำตาลซูโครส วิตะมิน และ กรดอะมิโน ตามสูตรในตารางที่ 3

2.1.2 สารควบคุมการเจริญ ได้แก่

2,4 - D (2,4 - dichlorophenoxyacetic acid)

ABA (abscisic acid)

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำให้ปลอดเชื้อ และ สารลดความตึงผิว ได้แก่

คลอรอกซ์ (sodium hypochlorite 5.25%)

เอธิลแอลกอฮอล์ 95% และ 70%

Tween 20

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการผลิตเมล็ดพืชเทียม ได้แก่

sodium alginate

calcium nitrate

2.4 สารเคมีที่ในการทำเมล็ดพืชเทียมแห้ง

silica gel

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดแก้วฝาเกลียวสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร สูง 8 เซนติเมตร ขวดแก้วรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 200, 250 มิลลิลิตร จานเลี้ยงเชื้อ (petri-dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.5 และ 9.5 เซนติเมตร หลอดหยดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 6 มิลลิเมตร

2. อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ผ้ากรองที่มีรูขนาด 0.1, 0.5 และ 4 มิลลิเมตร กล่องพลาสติกใส กระดาษอลูมีเนียม พาราฟิล์ม กระดาษกรอง มีด เครื่องเขย่า (shaker) 100 รอบต่อนาที และอุปกรณ์อื่นๆ ตามวิธีมาตรฐานสำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อทั่วไป

3. ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ชั้นสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ชั้นสว่างใช้หลอดฟลูออเรสเซนซ์ Phillips TL 40 W/33 (cool white) ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ

อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เตรียมตามสูตรดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 แบ่งออกเป็น

1.1 สูตรอาหารสำหรับชักนำแคลลัส

ใช้สูตรอาหารพื้นฐานของ Murashige และ Skoog (1962) ดัดแปลงโดย Halperin และ Wetherell (1964) บรรจุอาหารวุ้นลงในขวดแก้วพร้อมฝาเกลียวสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อขวดละประมาณ 15 มิลลิลิตร

1.2 สูตรอาหารชักนำให้เกิด somatic embryo

ใช้สูตรอาหารพื้นฐานของ Murashige และ Skoog (1962) โดยเตรียมเป็นอาหารเหลวบรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 50 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยแผ่นอลูมีเนียม

อาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้งหมดนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดัน 1.1 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

2. การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.1 การผลิต somatic embryo

ขั้นตอนแรกของการวิจัย คือ การผลิต somatic embryo จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดย somatic embryo ต้องมีขนาดสม่ำเสมอ แข็งแรง และผลิตได้ครั้งละมากๆ วิธีการผลิต somatic embryo นี้เลือกใช้วิธีของ ชัยวัฒน์ น่าชม (2535) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

2.1.1 การชักนำให้เกิดแคลลัส (callus induction)

การชักนำแคลลัสของแครอทจากเนื้อเยื่อส่วนแคมเบียมโดยตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร นำไปเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส (ตารางที่ 3) ในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 สัปดาห์

2.1.2 การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (suspension culture)

เมื่อต้องการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย จะนำแคลลัสจากขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อในข้อ 2.1.1 แยกเป็นชิ้นเล็กๆ ย้ายลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสบนเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที ในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อเขย่าให้กลุ่มของเซลล์ที่ประกอบกันเป็นแคลลัสแยกออกจากกันเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ และเพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณเซลล์

2.1.3 การกรองเซลล์แขวนลอย (filtration of suspension cell)

เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลวครบ 2 สัปดาห์แล้ว นำเซลล์แขวนลอยมากรองด้วยผ้ากรองที่มีรูขนาด 0.1 และ 0.5 มิลลิเมตร เทน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วลงบนผ้ากรองเพื่อช่วยให้เซลล์ลอดผ่านตะแกรงได้ดีขึ้น และล้างชะสารที่ไม่ต้องการออก จะได้กลุ่มเซลล์ที่มีขนาด 0.1-0.5 มิลลิเมตร

2.1.4 การชักนำให้เกิด somatic embryo (somatic embryo induction)

นำกลุ่มเซลล์ที่มีขนาด 0.1-0.5 มิลลิเมตร แยกลงไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิด somatic embryo (ตารางที่ 3) บนเครื่องเขย่า อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลาประมาณ 14 วันจะได้ somatic embryo รูป torpedo

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

องค์ประกอบ	สูตรอาหาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	สูตรชักนำแคลลัส Halperin and Wetherell (1964)	สูตรชักนำ somatic embryo Murashige and Skoog (1962)
ธาตุอาหารหลัก		
NH_4NO_3	1650.00	1650.00
KNO_3	1900.00	1900.00
$CaCl_2 . 2H_2O$	440.00	440.00
$MgSO_4 . 7H_2O$	370.00	370.00
KH_2PO_4	170.00	170.00
ธาตุอาหารรอง		
H_3BO_3	6.20	6.20
$MnSO_4 . 4H_2O$	6.90	6.90
$ZnSO_4 . 7H_2O$	6.14	6.14
KI	0.83	0.83
$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	0.25	0.25
$CuSO_4 . 5H_2O$	0.025	0.025
$CoCl_2 . 6H_2O$	0.025	0.025
$Na_2EDTA . 2H_2O$	37.25	37.25
$FeSO_4 . 7H_2O$	27.85	27.85
วิตะมิน		
Nicotinic acid	0.50	0.50
Pyridoxine HCl	0.50	0.50
Thiamine HCl	0.10	0.10
กรดอะมิโน		
Glycine	2.00	2.00
สารควบคุมการเจริญ		
2,4- D	1.00	-
อื่นๆ		
Sucrose(กรัมต่อลิตร)	30.00	30.00
Agar (กรัมต่อลิตร)	8.00	8.00
Myo-inositol	100.00	-

pH = 5.6 (ปรับด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 การผลิตเมล็ดพืชเทียม

เมื่อกลุ่มเซลล์พัฒนาเป็น somatic embryo ในระยะ torpedo แล้วนำมากรองบนตะแกรงเพื่อแยก somatic embryo ระยะ torpedo ที่มีขนาด 4 มิลลิเมตร เพื่อนำมาผลิตเมล็ดพืชเทียมภายใต้สภาวะที่ปลอดเชื้อ โดยวิธีการดังต่อไปนี้

1. ผสม somatic embryo ระยะ torpedo ขนาด 4 มิลลิเมตร ที่ได้จากการกรองลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Murashige และ Skoog (1962) ที่เติม sodium alginate 2 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

2. ใช้หลอดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 6 มิลลิเมตรดูดอาหารที่มี somatic embryo ผสมอยู่ นำมาหยดลงในสารละลายของ calcium nitrate 100 mM ทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 30 นาที จะได้เมล็ดพืชเทียมที่สมบูรณ์

3. ล้างเมล็ดพืชเทียมด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง หลังจากนั้นเลือกเมล็ดพืชเทียมที่มีเพียง 1 somatic embryo ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิและแสงที่มีต่อการเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียม

นำเมล็ดพืชเทียมแครอทที่ผลิตได้มาศึกษาผลของอุณหภูมิและแสงที่มีต่อการเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียม เพื่อเปรียบเทียบผลของแสง และอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บเมล็ดพืชเทียม โดยนำเมล็ดพืชเทียมใส่ใน flask ขนาด 200 มิลลิลิตรขวดละ 15 เมล็ด ปิดด้วยแผ่นอลูมีเนียม นำไปเก็บในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และที่มืด ซึ่งมีอุณหภูมิ 4, 15 และ 25 องศาเซลเซียส ศึกษาการงอกและการตายเมื่ออยู่ในระหว่างการเก็บรักษา หลังจากนั้นนำเมล็ดพืชเทียมที่ผ่านการเก็บที่อุณหภูมิและสภาพของแสงต่างๆกันมาเพาะทดสอบการงอกในสภาพปลอดเชื้อ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากเก็บเป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ โดยนับจำนวนเมล็ดพืชเทียมที่มีการงอกของ somatic embryo ออกมาพ้นเมล็ดพืชเทียมเป็น 1 เมล็ด และการตายนับจากจำนวนเมล็ดพืชเทียมที่ somatic embryo เปลี่ยนเป็นสีดำ แล้วหาเปอร์เซนต์การงอกและการตายระหว่างการเก็บรักษา และเปอร์เซนต์การงอกรวม (ระหว่างและหลังการเก็บรักษา) ของเมล็ดพืชเทียมในแต่ละชุดการทดลองทุกๆ 1 สัปดาห์เป็นเวลา 3 สัปดาห์ แต่ละชุดการทดลองมี 5 ซ้ำ

2.4 การศึกษาผลของวิธีการทำแห้งและเปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำที่มีต่อการงอกหลังการ rehydrate ของเมล็ดพืชเทียม

ศึกษาการงอกของเมล็ดพืชเทียมที่ทำให้แห้ง โดยใช้ silica gel เปรียบเทียบกับการใช้ลมเป่าใน laminar flow

2.4.1 ผลิตเมล็ดพืชเทียมแห้งโดยใช้ silica gel

นำเมล็ดพืชเทียมที่ผลิตได้จำนวน 15 เมล็ด วางบน petri-dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร แล้วจึงไปวางบน silica gel ที่บรรจุอยู่ใน prtri-dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.5 เซนติเมตร (ใช้ silica gel 15 กรัมต่อ 1 petri-dish และเปลี่ยน silica gel ทุก 6 ชั่วโมง)

2.4.2 ผลิตเมล็ดพืชเทียมแห้งโดยใช้ลมเป่าใน laminar flow

นำเมล็ดพืชเทียมที่ผลิตได้จำนวน 15 เมล็ด วางบน petri-dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร แล้วนำไปวางในตู้ laminar flow ซึ่งมีความเร็วลม 80 ft/min

จนกระทั่งเมล็ดพืชเทียมที่ทำให้แห้งทั้ง 2 วิธี มีการสูญเสียน้ำ 0, 20, 40, 60, 70 และ 80 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ศึกษาเวลาที่ใช้ในการทำแห้ง และศึกษาการงอกหลังการ rehydrate ในสภาพปลอดเชื้อ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อหาเปอร์เซนต์การงอกของเมล็ดพืชเทียม โดยแต่ละชุดการทดลองมี 5 ซ้ำ

2.5 การศึกษาผลของการทำแห้งที่มีต่อการเก็บรักษา และการงอกของเมล็ดพืชเทียม

นำเมล็ดพืชเทียมที่ผลิตได้ทำให้แห้งโดยใช้ silica gel จนกระทั่งมีการสูญเสียน้ำ 0, 20, 40, 60, 70 และ 80 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ หลังจากนั้นนำมาเก็บใน flask ขนาด 200 มิลลิลิตร ปิดด้วยแผ่นอลูมีเนียม เก็บไว้เป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 สัปดาห์ ในที่มืด อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ศึกษาการงอกและการตายเมื่ออยู่ในระหว่างการเก็บรักษา และศึกษาการงอกหลังการ rehydrate ในสภาพปลอดเชื้อ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อหาเปอร์เซนต์การงอกและการตายระหว่างการเก็บรักษา และเปอร์เซนต์การงอกรวม (ระหว่างและหลังการเก็บรักษา) หลังการ rehydrate ของเมล็ดพืชเทียมในแต่ละชุดการทดลองทุกๆ 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยแต่ละชุดการทดลองมี 5 ซ้ำ ซ้ำละ 15 เมล็ด

2.6 การศึกษาระยะที่เหมาะสมของ somatic embryo ในการชักนำให้เกิด desiccation tolerance โดยใช้ ABA (abscisic acid)

2.6.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของขนาด และ ระยะการเจริญของ somatic embryo ในระหว่าง ABA treatment โดยนำ somatic embryo ที่ระยะต่างๆ ของการเจริญ (4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 และ 20 วันหลังจากเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิด somatic embryo ตามลำดับ) มาเลี้ยงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิด somatic embryo 50 มิลลิลิตร ที่เติม ABA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตั้งบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ช่วงแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7 วัน ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอายุของเอมบริโอ ความยาวและระยะการเจริญของ somatic embryo ก่อนและหลังการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติม ABA โดยแต่ละการทดลองมี 5 ซ้ำๆ ละ 15 somatic embryo

2.6.2 นำ somatic embryo ระยะต่างๆ ที่ได้จาก 2.6.1 ซึ่งผ่าน ABA treatment เป็นเวลา 7 วัน มาผลิตเมล็ดพืชเทียม และทำให้แห้งโดยใช้ silica gel จนมีการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซนต์หลังจากนั้นนำมาศึกษาการงอกหลังการ rehydrate ในสภาพปลอดเชื้อ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อหาเปอร์เซนต์การงอกของเมล็ดพืชเทียม โดยแต่ละชุดการทดลองมี 5 ซ้ำ ซ้ำละ 15 เมล็ด

2.7 การศึกษาความเข้มข้นของ ABA ที่มีต่อการงอกหลังการ rehydrate ของเมล็ดพืชเทียมแห้ง

นำ somatic embryo ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรชักนำให้เกิด somatic embryo เป็นเวลา 14 วัน ย้ายลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเหลวสูตร MS 50 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของ ABA ระดับต่างๆ ได้แก่ 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ เป็นเวลา 7 วัน บนเครื่องเขย่า อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน จากนั้นนำ somatic embryo ที่ได้มาผลิตเมล็ดพืชเทียม แล้วทำให้แห้งโดยใช้ silica gel จนมีการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซนต์ นำเมล็ดพืชเทียมที่ได้มา rehydrate และทดสอบการงอกในสภาพปลอดเชื้อ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อหาเปอร์เซนต์การงอกของเมล็ดพืชเทียม โดยแต่ละชุดการทดลองมี 5 ซ้ำ ซ้ำละ 15 เมล็ด

2.8 การศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาที่มีต่อการงอกหลังการ rehydrate ของเมล็ดพืชเทียมแห้งซึ่งผ่านการชักนำให้เกิด desiccation tolerance โดย ABA

นำ somatic embryo ระยะ torpedo shape ที่มีอายุ 14 วันเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรชักนำให้เกิด somatic embryo ที่เติม ABA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 วันบนเครื่องเขย่า อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน จากนั้นนำ somatic embryo ที่ได้มาผลิตเมล็ดพืชเทียม แล้วทำให้แห้งโดยใช้ silica gel จนมีการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซนต์ หลังจากนั้นนำมาเก็บใน flask ขนาด 200 มิลลิลิตร ปิดด้วยแผ่นอลูมีเนียม เก็บไว้เป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 สัปดาห์ โดยเก็บในที่มืด อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส นำเมล็ดพืชเทียมที่ได้มา rehydrate และทดสอบการงอกในสภาพปลอดเชื้อ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อหาเปอร์เซนต์การงอกของเมล็ดพืชเทียม โดยแต่ละชุดการทดลองมี 5 ซ้ำ ซ้ำละ 15 เมล็ด

3. การหาค่าทางสถิติ

การวางแผนการทดลองตลอดงานวิจัย ใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Complete Randomized Design) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SAS (Statistical Analysis System) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง treatment ด้วยวิธีการเปรียบเทียบแบบ DMRT (Duncan's Multiple Range Test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย