

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

ส่วนที่ 1 การประเมินความต้านทานโรคราน้ำค้างของแตงกวาพันธุ์ต่าง ๆ

1.1 ประชากรแตงกวาที่ใช้ศึกษา

ทำการปลูกแตงกวาพันธุ์การค้าและพันธุ์ปรับปรุง จำนวน 23 พันธุ์ (ประกอบด้วยพันธุ์ไฉไล, อมตะ 2 และอมตะ 765 จากบริษัท เจียไต่ จำกัด พันธุ์หยกขาว, CU 075, CU 4302, CU 4303, CU 4304, CU 4305, CU 4306, CU 4307 และ CU 4308 จากห้างหุ้นส่วนจำกัด พีชพันธุ์ตราสิงห์ พันธุ์บิ๊กโบนัส จากบริษัท ที ทรอปีโด จำกัด พันธุ์บิ๊กซี, มินิ-ซี และไมโคร-ซี จากบริษัท อีสท์ เวสต์ ซีด จำกัด พันธุ์สุวรรณภูมิ และสุรียา จากบริษัท ฉั่วยงเซ่งพันธุ์พืช จำกัด พันธุ์สายฟ้า 185 จากบริษัท เมโทรซีดการเกษตร จำกัด พันธุ์ Natali No. 5 จากบริษัท ซีตส์เทค มาร์เก็ตติ้ง จำกัด พันธุ์สีมา จากบริษัท รีลซีด จำกัด พันธุ์ขุนศรี จากบริษัท โปร อินเตอร์ ซีตส์ จำกัด และพันธุ์มีชัย จากบริษัท แอ็ดวานซ์ซีตส์ จำกัด) ในกระถางพลาสติกสีดำ ขนาด 10 นิ้ว ซึ่งใส่ดินปลูกผสมใบก้ามปู ทรายละเอียด 2-3 เมล็ด โรยปุ๋ย-ราดาน 3 จี และปุ๋ยเคมี สูตร 15-15-15 ขนาด 1 กรัมต่อกระถาง บริเวณข้างโรงเรือนเพาะชำ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา

1.2 การเตรียมเชื้อสาเหตุโรคราน้ำค้าง

ใช้เชื้อ *Pseudoperonospora cubensis* สาเหตุโรคราน้ำค้างแตงกวาในการทดสอบ โดยเก็บเชื้อจากใบแตงกวาพันธุ์มีชัยที่เป็นโรคจากแปลงเกษตรกร บริเวณวัดโกรกเดือนห้า จ.นครราชสีมา ในช่วงเวลา 9.00 น. ระวังอย่าให้ใบเข้า ล้างใบด้วยน้ำสะอาด จำนวน 1 ครั้ง จากนั้นใช้สำลีจุ่มเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 70% (v/v) เช็ดให้ทั่วใบทั้งบนใบและใต้ใบ แล้วเช็ดด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้ออีก 1 ครั้ง นำใบมาใส่ในกล่องพลาสติกที่มีก้อนสำลีชุ่มน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อวางอยู่เพื่อรักษาความชื้น บ่มที่อุณหภูมิ 22°C ในสภาพมืดนาน 1-2 วัน เพื่อให้เชื้อสร้างสปอร์ใหม่ จากนั้น ใช้ฟู่กันสะอาดปิด และใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อล้างสปอร์จากใบใส่ในบีกเกอร์ และนำสารแขวนลอยสปอร์ไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน จำนวน 3 ครั้ง ที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน 5-10 นาที โดยละลายตะกอนในสารละลายสเตรปโตมัยซิน (streptomycin) 0.05% (w/v) ปริมาตร 0.5 มล. จำนวน 2 ครั้ง และละลายในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 1 ครั้ง และตรวจนับจำนวนสปอร์โดยใช้สไลด์นับเม็ดเลือด (haemocytometer) ปรับให้มีความเข้มข้น 1×10^3 สปอร์/มล. ในสารละลายสเตรปโตมัยซิน 0.05% เพื่อใช้ในการปลูกเชื้อ

1.3 การปลูกเชื้อ

ทำการปลูกเชื้อ *P. cubensis* ลงบนต้นกล้าแตงกวา อายุ 2 สัปดาห์ โดยฉีดพ่นสารละลายสปอร์เชื้อโรคความเข้มข้น 1×10^3 สปอร์/มล. ให้ทั่วทั้งต้น จากนั้นย้ายกระถางไปไว้ในที่ร่มและชื้น นาน 1 สัปดาห์ และย้ายมาวางข้างโรงเรือนเพาะชำ สังเกตการเกิดโรคของต้นแตงกวา

1.4 การบันทึกผล

บันทึกข้อมูลการเกิดโรคหลังการปลูกเชื้อที่ 46 วัน โดยประเมินจากภาพรวมทั้งต้น และที่ 65 วันโดยประเมินจากภาพรวมทั้งต้น และใบข้อที่ 12 (นับใบข้อที่ 1 จากยอด) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1.4.1 ระดับความรุนแรงในการเกิดโรคราน้ำค้าง

1.4.1.1 ระดับการเกิดโรคราน้ำค้าง โดยให้คะแนน 0-4 คะแนน

0 = ไม่เป็นโรค

1 = เป็นโรค 25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ

2 = เป็นโรค 50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ

3 = เป็นโรค 75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ

4 = เป็นโรค 100 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ

(ประยุกต์จาก Reuveni and Raviv, 1997)

1.4.1.2 สีของแผล (color of infected area) โดยให้คะแนน 0-3 คะแนน

0 = ไม่ปรากฏอาการ (no symptoms)

1 = แผลสีเขียวอมเหลือง (yellowish)

2 = แผลสีเหลือง (yellow)

3 = แผลสีน้ำตาล (total necrosis)

(Reuveni and Raviv, 1997)

หมายเหตุ : ระดับความรุนแรงในการเกิดโรคราน้ำค้าง = คะแนนระดับการเกิดโรคราน้ำค้าง × คะแนนสีของแผล

ระดับความรุนแรงในการเกิดโรคราน้ำค้าง

0.0-3.0 = ต่ำมาก

3.1-6.0 = ต่ำปานกลาง

≥ 6.1 = อ่อนแอ

1.4.2 ลักษณะโดยรวมของต้นพืช (Plant aspect) รวมถึงการเข้าทำลายของโรคชนิดอื่นและแมลง โดยให้คะแนน 1-5 คะแนน

1 = ดีมาก

2 = ดี

3 = ปานกลาง

4 = พอใช้

5 = ไม่ดี

(Menkir and Maziya-Dixon, 2004)

1.5 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความแปรปรวนแปรทางสถิติของระดับความรุนแรงในการเกิดโรค และลักษณะโดยรวมของต้นพืช ซึ่งแปลงข้อมูลโดยใช้ $X' = (X+1)^{1/2}$ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006)

ส่วนที่ 2 การเปรียบเทียบสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงรังไข่แดงวาเพื่อผลิตสายพันธุ์แท้

2.1 การทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 1

2.1.1 ประชากรแดงวาที่ใช้ศึกษา

ทำการปลูกแดงวาพันธุ์การค้า จำนวน 5 พันธุ์ ประกอบด้วยพันธุ์ไฉไล จากบริษัท เจียไต๋ จำกัด พันธุ์บึกซี จากบริษัท อีสท์ เวสต์ ซีด จำกัด พันธุ์สายฟ้า 185 จากบริษัท เมโทรซีดการเกษตร จำกัด พันธุ์มีชัย จากบริษัท แอ็ดวานซ์ซีดส์ จำกัด และพันธุ์มินิคิงซ์ จากบริษัท ซินเจนทา ซีดส์ จำกัด ในกระถางพลาสติกสีดำ ขนาด 10 นิ้ว ซึ่งใส่ดินปลูกผสมใบก้ามปู ทรายละเอียด 2-3 เมล็ด โรยปุ๋ยมูลสัตว์ 3 จี และปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ปริมาณ 1 กรัมต่อกระถาง หลังเมล็ดงอก 1 สัปดาห์ ใส่ยาฆ่าหอยทากเมทลดีไฮด์บริเวณรอบโคนต้น เมื่อพืชอายุ 2 สัปดาห์ ฉีดพ่นยาฆ่าแมลงพอสซ์ (2-3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl (dibutylaminothio) methylcarbamate) อัตราส่วน 2.5 มล./ล เมื่อพืชอายุครบ 1 เดือน ใส่ปุ๋ยสูตร 12-24-12 ปริมาณ 1 กรัมต่อกระถาง และฉีดพ่นปุ๋ยเคมีทางใบบีพลัส อัตราส่วน 1 มล./ล หลังจากนั้นฉีดพ่นสารเคมีแมนโคเซบ (dithiocarbamate) ความเข้มข้น 2 ก./ล ทุกเดือน เพื่อป้องกันโรคราน้ำค้าง

2.1.2 การเตรียมดอกตัวเมีย (ovary) ของแดงวา ในสภาพปลอดเชื้อ

2.1.2.1 ฟอกดอกแดงวาด้วยน้ำสบู่ แล้วนำไปแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 70% (v/v) นาน 1 นาที

2.1.2.2 ย้ายดอกแดงวาลงในสารละลาย streptomycin sulfate ความเข้มข้น 25 มก./ล (w/v) นาน 30 นาที

2.1.2.3 ฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วย clorox 20 และ 10% (v/v) นาน 20 และ 10 นาที ตามลำดับ และนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

2.1.3 การตัดเนื้อเยื่อ

2.1.3.1 ปอกเปลือกดอกแดงวา แล้วนำไปแช่ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide; H_2O_2) ความเข้มข้น 3% (v/v) นาน 30 วินาที

2.1.3.2 ฝาดรังไข่แดงวาตามแนวยาว แล้ววางในอาหารระยะที่ 1 จำนวน 5 สูตร

2.1.3.3 นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 และ 35°C

2.1.4 การชักนำให้เกิด embryo-like structure (ELS) และแคลลัส

2.1.4.1 วางแผนการทดลองแบบ factorial ใน completely randomized design (CRD) จำนวน 6 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ (1) สูตรอาหารระยะที่ 1 จำนวน 5 สูตร และ (2) สูตรอาหาร

ระยะที่ 2 จำนวน 3 สูตร โดยเฉพาะเลี้ยงแดงกวางอาหารระยะที่ 1 สูตร Murashige and Skoog (1962) (MS) ที่เติมฮอร์โมนและสารเคมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 5 สูตร ดังนี้

I1 : MS + thidiazuron (TDZ) 0.02 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + sucrose 4% (w/v)

I2 : MS + TDZ 1 มก./ล + 6-benzylaminopurine (BA) 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + sucrose 3% (w/v)

I3 : ½ MS + BA 0.18 มก./ล + kinetin (KIN) 0.1 มก./ล + 2, 4-D 0.2 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + sucrose 3% (w/v)

I4 : MS + KIN 0.5 มก./ล + 4-chlorophenoxy acetic acid (CPA) 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + sucrose 3% (w/v)

I5 : MS + BA 2 มก./ล + indole-3-acetic acid (IAA) 0.5 มก./ล + gibberellic acid (GA₃) 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + putrescine 32 มก./ล + sucrose 3% (w/v)

2.1.4.2 หลังจากนั้นย้ายเนื้อเยื่อเลี้ยงแดงกวางจากอาหารระยะที่ 1 แต่ละสูตร ลงในอาหารระยะที่ 2 ทุกสูตร เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ โดยอาหารระยะที่ 2 คืออาหาร MS ที่เติมฮอร์โมนและสารเคมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ sucrose 3% (w/v) จำนวน 3 สูตร ดังนี้

D1 : MS + naphthalene acetic acid (NAA) 2 มก./ล + BA 3 มก./ล + ascorbic acid 20 มก./ล + proline 100 มก./ล

D2 : MS + NAA 0.05 มก./ล + BA 0.2 มก./ล + ascorbic acid 20 มก./ล + proline 100 มก./ล

D3 : MS + IAA 0.1 มก./ล + KIN 0.1 มก./ล + ascorbic acid 20 มก./ล + proline 100 มก./ล + ซิลเวอร์ไนเตรต (silver nitrate; AgNO₃) 2 มก./ล

2.1.5 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกการเกิด ELS และแคลลัสบนอาหารระยะที่ 1 และ 2 สูตรต่าง ๆ ทุก 4 สัปดาห์

2.1.6 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส จำนวน 6 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยรังไข่ 1,500-2,264 ชิ้น (ค่าเฉลี่ย 1,829 ชิ้น) ซึ่งแปลงข้อมูลโดยใช้ Arcsine และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อประเมินศักยภาพของอาหารสูตรต่าง ๆ ต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อเลี้ยงแดงกวาง ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006)

2.2 การทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 2

2.2.1 ประชากรแดงกวางที่ใช้ศึกษา

ทำการปลูกแดงกวางพันธุ์การค้า จำนวน 9 พันธุ์ ประกอบด้วยพันธุ์ไฉไล จากบริษัท เจีย-ไต่ จำกัด พันธุ์เบอร์ 3, 4, 5, 6, 7, 9 และ 11 (ลูกผสมจีน) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. มล.อโณทัย ชุมสาย บริษัท Green World Genetics Co. Ltd. (ติดต่อส่วนตัว) และพันธุ์ปักซี จากบริษัท อีสท์ เวสต์ ซีด

จำกัด ในดินปลูกผสมใบก้ามปูภายในบล็อกปูน ขนาดกว้าง 0.5 เมตร ยาว 5.5 เมตร หลังคาพลาสติกสูง 2 เมตร โรยปุ๋ยมูลสัตว์ 3 จี และปุ๋ยเคมี สูตร 15-15-15 ปริมาณ 1 กรัมต่อหลุม ระยะปลูกระหว่างหลุม 30 ซม. หลุมละ 2-3 เมล็ด หลังเมล็ดงอก 1 สัปดาห์ ใส่ยาฆ่าหอยทากเมทัล- ดีไฮด์บริเวณรอบโคนต้น เมื่อพืชอายุ 2 สัปดาห์ ฉีดพ่นยาฆ่าแมลงพอสซ์ อัตราส่วน 2.5 มล./ล เมื่อพืชอายุครบ 1 เดือน ใส่ปุ๋ยสูตร 12-24-12 ปริมาณ 1 กรัมต่อหลุม และฉีดพ่นปุ๋ยเคมีทางใบบีบีพลัส อัตราส่วน 1 มล./ล หลังจากนั้นฉีดพ่นสารเคมีแมนโคเซบความเข้มข้น 2 ก./ล ทุกเดือน เพื่อป้องกันโรคราน้ำค้าง

2.2.2 การเตรียมดอกตัวเมียของแตงกวาในสภาพปลอดเชื้อ

2.2.2.1 ฟอกดอกแตงกวาด้วยน้ำสบู่ แล้วนำไปแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70% (v/v) นาน 1 นาที

2.2.2.2 ย้ายดอกแตงกวาลงแช่ในสารละลาย streptomycin sulfate ความเข้มข้น 25 มก./ล (w/v) นาน 30 นาที

2.2.2.3 ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวดอกในสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ (mercuric chloride; $HgCl_2$) ความเข้มข้น 0.1% (w/v) นาน 15 นาที

2.2.2.4 นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

2.2.3 การตัดเนื้อเยื่อ

2.2.3.1 ปอกเปลือกดอกแตงกวา แล้วนำไปแช่ในสารละลาย H_2O_2 ความเข้มข้น 3% (v/v) นาน 30 วินาที

2.2.3.2 ฝาดครึ่งดอกแตงกวาตามแนวยาว แล้ววางในอาหารระยะที่ 1 จำนวน 6 สูตร

2.2.3.3 นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°C ในที่มืดเป็นเวลา 1 สัปดาห์

2.2.4 การชักนำให้เกิด ELS และแคลลัส

2.2.4.1 วางแผนการทดลองแบบ factorial ใน CRD จำนวน 4 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ (1) สูตรอาหารระยะที่ 1 จำนวน 6 สูตร และ (2) สูตรอาหารระยะที่ 2 จำนวน 3 สูตรโดยเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาบนอาหารระยะที่ 1 ในที่มืด นาน 1 สัปดาห์ ซึ่งอาหารระยะที่ 1 คืออาหาร MS ที่เติมฮอร์โมนและสารเคมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ sucrose 3% (w/v) จำนวน 6 สูตร ดังนี้

I2 : MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล

I2A : MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + melissyl alcohol (MA) 2 มก./ล + glutamine 800 มก./ล

I2B : MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + MA 2 มก./ล + 2, 3, 5 triiodobenzoic acid (TIBA) 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล

I2C : MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + MA 2 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + น้ำมะพร้าว 100 มล./ล

I2D : Miller I 100 มล./ล + Miller II 10 มล./ล + MB^+ 10 มล./ล + NaFeEDTA 1 มล./ล + thiamine hydrochloride (vitamin B1) 9 มก./ล + BA 0.8 มก./ล + MA 2 มก./ล

I2E : MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + chitosan 50 มก./ล

2.2.4.2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารระยะที่ 1 ครบกำหนด ย้ายเนื้อเยื่อแต่งกวางลงในอาหารระยะที่ 2 ทุกสูตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยอาหารระยะที่ 2 คืออาหาร MS ที่เติมฮอร์โมนและสารเคมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ sucrose 3% (w/v) จำนวน 3 สูตร ดังนี้

D2 : MS + NAA 0.05 มก./ล + BA 0.2 มก./ล + ascorbic acid 20 มก./ล + proline 100 มก./ล

D2+ : MS + NAA 0.05 มก./ล + BA 0.2 มก./ล + MA 2 มก./ล + ascorbic acid 20 มก./ล + proline 100 มก./ล

D2++ : MS + NAA 0.05 มก./ล + BA 0.2 มก./ล + MA 2 มก./ล + ascorbic acid 20 มก./ล + proline 100 มก./ล + AgNO₃ 2 มก./ล

2.2.5 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกการเกิด ELS และแคลลัสบนอาหารสูตรต่าง ๆ ของอาหารระยะที่ 1 และ 2 ทุก 3 สัปดาห์

2.2.6 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส จำนวน 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยรังไข่ 332-661 ชิ้น (ค่าเฉลี่ย 498 ชิ้น) ซึ่งแปลงข้อมูลโดยใช้ Arcsine และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อประเมินศักยภาพของอาหารสูตรต่าง ๆ ต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อรังไข่แต่งกวาง ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006)

2.3 การทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 3

2.3.1 ประชากรแต่งกวางที่ใช้ศึกษา

ทำการปลูกแต่งกวางพันธุ์การค้า จำนวน 2 พันธุ์ ประกอบด้วยพันธุ์ไฉไล จากบริษัท เจียไต๋ จำกัด และพันธุ์บ๊ิกซี จากบริษัท อีสท์ เวสต์ ซีด จำกัด ในดินปลูกผสมใบก้ามปูภายในบล็อกปูน ขนาดกว้าง 0.5 เมตร ยาว 5.5 เมตร หลังคาพลาสติกสูง 2 เมตร โรยปุ๋ยมูลสัตว์ 3 จี และปุ๋ยเคมี สูตร 15-15-15 ปริมาณ 1 กรัมต่อหลุม ระยะปลูกระหว่างหลุม 30 ซม. หลุมละ 2-3 เมล็ด หลังเมล็ดงอก 1 สัปดาห์ ใส่ยาฆ่าหอยทาก เมทลดีไฮด์บริเวณรอบโคนต้น เมื่อพืชอายุ 2 สัปดาห์ ฉีดพ่นยาฆ่าแมลงพอสซ์ อัตราส่วน 2.5 มล./ล เมื่อพืชอายุครบ 1 เดือน ใส่ปุ๋ยสูตร 12-24-12 ขนาด 1 กรัมต่อหลุม และฉีดพ่นปุ๋ยเคมีทางใบปีพลัส อัตราส่วน 1 มล./ล หลังจากนั้นฉีดพ่นสารเคมีแมนโคเซบ ความเข้มข้น 2 ก./ล ทุกเดือน เพื่อป้องกันโรคราน้ำค้าง

2.3.2 การเตรียมดอกตัวเมียของแต่งกวางในสภาพปลอดเชื้อ

ใช้วิธีการเดียวกับการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 2

2.3.3 การตัดเนื้อเยื่อ

ใช้วิธีการเดียวกับการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 2

2.3.4 การชักนำให้เกิด ELS และแคลลัส

2.3.4.1 วางแผนการทดลองแบบ factorial ใน CRD จำนวน 5 ซ้ำ ประกอบด้วย 3 ปัจจัย คือ (1) สูตรอาหารระยะที่ 1 จำนวน 4 สูตร (2) สูตรอาหารระยะที่ 2 จำนวน 1 สูตร และการไม่ใช้



อาหารระยะที่ 2 (3) สูตรอาหารระยะที่ 3 จำนวน 2 สูตร โดยเฉพาะเลี้ยงแต่งกวางบนอาหารระยะที่ 1 ในที่มืด นาน 1 สัปดาห์ สูตรอาหารระยะที่ 1 คืออาหาร MS ที่เติมฮอริโมนและสารเคมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ sucrose 3% (w/v) จำนวน 4 สูตร ดังนี้

I2 : MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล

I2B+ : MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + MA 0.02 มก./ล + TIBA 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล

I2C+ : MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + MA 0.02 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + น้ำมะพร้าว 100 มล./ล

I2F : MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + MA 0.02 มก./ล + TIBA 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + น้ำมะพร้าว 100 มล./ล + มะเขือเทศ 50 ก./ล

2.3.4.2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารระยะที่ 1 ในที่มืดครบ 1 สัปดาห์ ย้ายเนื้อเยื่อแต่งกวางลงในอาหารระยะที่ 2 หรือไม่ใช้อาหารระยะที่ 2 แต่ย้ายเนื้อเยื่อแต่งกวางลงในอาหารระยะที่ 3 จำนวน 2 สูตร โดยไม่ผ่านอาหารระยะที่ 2 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยอาหารระยะที่ 2 คืออาหาร MS ที่เติมฮอริโมนและสารเคมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ sucrose 3% (w/v) จำนวน 1 สูตร ดังนี้

D2+++ : MS + NAA 0.05 มก./ล + BA 0.2 มก./ล + ascorbic acid 20 มก./ล + MA 0.02 มก./ล + proline 100 มก./ล + AgNO₃ 2 มก./ล

ส่วนอาหารระยะที่ 3 คืออาหาร MS ที่เติมฮอริโมนและสารเคมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ sucrose 3% (w/v) ดังนี้

MST3+ : MS + TDZ 1 มก./ล + GA₃ 0.5 มก./ล + MA 0.02 มก./ล + indole-3-butyric acid (IBA) 0.05 มก./ล + proline 1.38 ก./ล + glutathione 30.7 มก./ล + น้ำมะพร้าว 100 มล./ล + มะเขือเทศ 50 ก./ล + AgNO₃ 2 มก./ล

MST3++ : MS + TDZ 1 มก./ล + GA₃ 0.5 มก./ล + MA 0.02 มก./ล + IBA 0.05 มก./ล + abscisic acid (ABA) 0.1 มก./ล + proline 1.38 ก./ล + glutathione 30.7 มก./ล + polyvinylpyrrolidone (PVP) 1% (w/v) + น้ำมะพร้าว 100 มล./ล + มะเขือเทศ 50 ก./ล + กลัวย 50 ก./ล + AgNO₃ 2 มก./ล

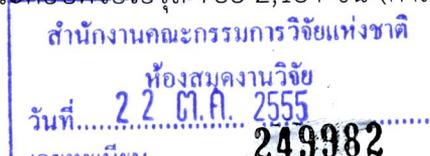
2.3.4.3 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารระยะที่ 2 หรือ 3 ครบกำหนด ย้ายเนื้อเยื่อแต่งกวางลงในอาหารระยะที่ 3 สองสูตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยอาหารระยะที่ 3 คืออาหาร MST3+ และ MST3++ ดังระบุด้านบน

2.3.5 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกการเกิด ELS และแคลลัสบนอาหารสูตรต่าง ๆ ของอาหารระยะที่ 1, 2 และ 3 ทุก 3 สัปดาห์

2.3.6 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความแปรปรวนแปรทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส จำนวน 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยโวลูม 788-2,184 ซัน (ค่าเฉลี่ย 1,346 ซัน) ซึ่งแปลงข้อมูลโดยใช้ Arcsine และ



เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อประเมินศักยภาพของอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ ต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อรังไข่ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006)

2.4 การทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 4

2.4.1 ประชากรแตงกวาที่ใช้ศึกษา

ทำการปลูกแตงกวาพันธุ์การค้า จำนวน 2 พันธุ์ ประกอบด้วยพันธุ์ไฉไล จากบริษัท เจียไต๋ จำกัด และพันธุ์บ๊ิกซี จากบริษัท อีสท์ เวสต์ ซีด จำกัด ในดินปลูกผสมใบก้ามปูภายในบล็อกปูน ขนาดกว้าง 0.5 เมตร ยาว 5.5 เมตร หลังคาพลาสติกสูง 2 เมตร โรยปุ๋ยมูลสัตว์ 3 จี และปุ๋ยเคมี สูตร 15-15-15 ปริมาณ 1 กรัมต่อหลุม ระยะปลูกระหว่างหลุม 30 ซม. หลุมละ 2-3 เมล็ด หลังเมล็ดงอก 1 สัปดาห์ ใส่ยาฆ่าหอยทาก เมทิลดีไฮด์บริเวณรอบโคนต้น เมื่อพืชอายุ 2 สัปดาห์ ฉีดพ่นยาฆ่าแมลงพอสซ์ อัตราส่วน 2.5 มล./ล เมื่อพืชอายุครบ 1 เดือน ใส่ปุ๋ยสูตร 12-24-12 ปริมาณ 1 กรัมต่อหลุม และฉีดพ่นปุ๋ยเคมีทางใบปีพลัส อัตราส่วน 1 มล./ล หลังจากนั้นฉีดพ่นสารเคมีแมนโคเซบ ความเข้มข้น 2 ก./ล ทุกเดือน เพื่อป้องกันโรคราน้ำค้าง

2.4.2 การเตรียมดอกตัวเมียของแตงกวาในสภาพปลอดเชื้อ

ใช้วิธีการเดียวกับการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 2

2.4.3 การตัดเนื้อเยื่อ

ใช้วิธีการเดียวกับการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 2

2.4.4 การชักนำให้เกิด ELS แคลลัส และยอดกลุ่ม

2.4.4.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแตงกวาบนอาหารระยะที่ 1 ในที่มีด นาน 1 สัปดาห์ สูตรอาหารระยะที่ 1 คืออาหาร MS ที่เติมฮอร์โมนและสารเคมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ sucrose 3% (w/v) จำนวน 5 สูตร ดังนี้

I2G : MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + casein hydrolysate 500 มก./ล

I2G_{MA} : MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + casein hydrolysate 500 มก./ล + MA 0.02 มก./ล

I3 : ½ MS + BA 0.18 มก./ล + KIN 0.1 มก./ล + 2,4-D 0.2 มก./ล + glutamine 800 มก./ล

I7 : MS + TDZ 0.04 มก./ล (Diao et al., 2009)

I8 : MS + TDZ 0.04 มก./ล + MA 0.02 มก./ล + casein hydrolyzate 500 มก./ล

2.4.4.2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารระยะที่ 1 ในที่มีดครบ 1 สัปดาห์ ย้ายเนื้อเยื่อแตงกวาลงในอาหารระยะที่ 2 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยอาหารระยะที่ 2 คืออาหาร MS ที่เติมฮอร์โมนและสารเคมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ sucrose 3% (w/v) จำนวน 1 สูตร ดังนี้

D2+++ : MS + NAA 0.05 มก./ล + BA 0.2 มก./ล + MA 0.02 มก./ล + ascorbic acid 20 มก./ล + proline 100 มก./ล + AgNO₃ 2 มก./ล

2.4.4.3 ย้ายเนื้อเยื่อแตงกวาจากอาหารระยะที่ 2 ลงในอาหารระยะที่ 3 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ซึ่งอาหารระยะนี้ คืออาหาร MS ที่เติมฮอร์โมนและสารเคมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ sucrose 3% (w/v) จำนวน 1 สูตร ดังนี้

MST3++ : MS + TDZ 1 มก./ล + GA₃ 0.5 มก./ล + MA 0.02 มก./ล + IBA 0.05 มก./ล + ABA 0.1 มก./ล + proline 1.38 ก./ล + glutathione 30.7 มก./ล + PVP 1% (w/v) + น้ำมะพร้าว 100 มล./ล + มะเขือเทศ 50 ก./ล + กลัวย 50 ก./ล + AgNO₃ 2 มก./ล

2.4.5 การชักนำให้เกิดต้น

หลังจากเพาะเลี้ยงรังไข่ในอาหารระยะที่ 3 นาน 1-3 เดือน ย้ายลงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน (MS0) เพื่อชักนำการเกิดต้นและรากที่สมบูรณ์

2.4.6 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกการเกิด ELS แคลลัส และยอดกลุ่มบนอาหารสูตรต่าง ๆ ของอาหารระยะที่ 1, 2 และ 3 ทุก 3 สัปดาห์

2.4.7 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS แคลลัส และยอดกลุ่มจำนวน 11 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยรังไข่ 107-381 ชิ้น (ค่าเฉลี่ย 238 ชิ้น) ซึ่งแปลงข้อมูลโดยใช้ Arcsine และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อประเมินศักยภาพของอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ ต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อรังไข่แตงกวา ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006)

ส่วนที่ 3 การตรวจสอบแตงกวาสายพันธุ์แท้

การทดลองในส่วนที่ 3 นี้ใช้ต้นแตงกวาที่เพาะเลี้ยงชักนำจนได้ต้นแตงกวาสมบูรณ์จากการทดลอง ส่วนที่ 2 นำมาตรวจสอบการเป็นสายพันธุ์แท้ โดยการนับจำนวนโครโมโซม และการใช้เครื่องหมาย ISSR

3.1 การตรวจสอบต้นสายพันธุ์แท้ (ดับเบิลแฮพลอยด์) โดยการนับจำนวนโครโมโซม

3.1.1 นับจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยการตัดปลายรากมาย้อมด้วยสารละลาย acetocarmine

3.1.2 คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นดับเบิลแฮพลอยด์และแฮพลอยด์

3.2 การตรวจสอบต้นสายพันธุ์แท้โดยใช้เครื่องหมาย ISSR

3.2.1 ใช้ไพรเมอร์ ISSR ที่มีรายงานการใช้กับพืชตระกูลแตง (Levi et al., 2005; Parvathaneni et al., 2011) จำนวน 4 ไพรเมอร์ คือ ISSR 808 ((AG)₈C), ISSR 809 ((AG)₈G), ISSR 811 ((GA)₈C) และ ISSR 834 ((AG)₈CTT)

3.2.2 สกัดดีเอ็นเอแตงกวามาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ในข้อ 3.2.1 และใช้ส่วนผสมอุณหภูมิ และระยะเวลาดังแสดงใน Wang et al. (2006)

3.2.3 นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ในข้อ 3.2.2 มาแยกขนาดบน polyacrylamide gel ด้วยวิธี electrophoresis

3.2.4 ย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรต เพื่อตรวจสอบขนาดและจำนวนของท่อนดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่าง

3.2.5 บันทึกผลการทดลอง และเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของรูปแบบแถบ ดีเอ็นเอระหว่างต้นสายพันธุ์แท้ (ดับเบิลแฮพลอยด์) และต้นลูกผสม (donor plants)