# บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 1. วัสดุและอุปกรณ์

1. เมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105
2. ตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ (air flow cabinet)
3. ชั้นสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขนาด 2.9x5.8 ม. ที่ติดหลอดไฟฟลูออเรสเซนส์ ชั้นละ4 หลอด มีระยะห่างจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประมาณ 30 ซม.
4. เครื่องชั่ง (balance) ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง pH / conductivity (CyberScan PC 510 Meter, MYS)
6. เครื่องทดสอบลักษณะเนื้อสัมผัส TA.XT.plus texture analyzer (stable micro systems, UK)
7. เครื่องเขย่า (shaker)
8. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
9. เตาอบไมโครเวฟ (microwave oven)
10. ขวดแก้วฝาเกลียวสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. สูง 8 ซม.
11. ขวดชมพู่ (flask) ขนาด 125 และ 250 มล.
12. จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ขนาเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.5 ซม.
13. ช้อนตักสาร (spatula)
14. ด้ามมีดผ่าตัดเบอร์ 3
15. ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 11
16. ปากคีบ (forceps) ขนาดความยาว 10 และ 18 ซม.
17. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (turnel)
18. หลอดทดลอง (test tube) ใส่แอลกอฮอล์ ขนาด 2.5 × 15 ซม.
19. หลอดหยด (dropper) และจุกยาง
20. วัสดุอื่นๆ เช่น ถุงพลาสติก ขนาด 5x7 นิ้ว และ 16x26 นิ้ว ยางรัดของ และแผ่นป้ายกรรมวิธี
21. เครื่องแก้วอื่นๆ เช่น
    - ปิเปต (pipette) ขนาด 5 แ ละ 10 มล.

- บีเกอร์ (beaker) ขนาด 250 300 และ 1,000 มล.
- กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 25 50 และ 100 มล.
- ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 250 500 และ 1,000 มล.
- ขวดใส่สารละลายเข้มข้น
- กรวยแก้ว (funnel)
- แท่งแก้ว (stirring rod)

**2. สารเคมี**

1. สารเคมีสำหรับฆ่าเชื้อ
   - เอทธานอล เข้มข้น 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์
   - คลอร๊อกซ์
2. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
   - เกลือให้ธาตุอาหารหลักต่างๆ ตามสูตร LS (1965)
   - เกลือให้ธาตุอาหารรองต่างๆ ตามสูตร LS (1965)
   - Thiamine-HCL
   - Myo-inositol
   - น้ำตาลซูโครส
   - น้ำกล่ัน
   - น้ำมะพร้าว
   - ผงถ่านคาร์บอน
   - ผงวุ้นสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
   - Potasium hydroxide (KOH) 1 N
   - Hydrochloric acid (HCL) 1 N
3. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulator) ได้แก่
   - 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)
   - Napthalene acetic acid (NAA)

**3. วิธีการดำเนินการวิจัย**

3.1 การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)

3.1.1 การเตรียมธาตุอาหารหลัก (macro-elements)

เตรียมธาตุอาหารหลักสูตร LS (1965) โดยเตรียมสารละลายเข้มข้น 50 เท่า โดยชั่งสารแต่ละชนิดตามตารางที่ 3.1 ละลายสารประกอบแต่ละชนิดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1,000 มล.

ตารางที่ 3.1 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร LS (1965)

| ชนิดของสาร | ปริมาณสารในสูตร LS (1965) 1 ล (มก/ล) | ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น 50 เท่า ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (ก) |
|---|---|---|
| $NH_4NO_3$ | 1690.0 | 84.5 |
| $KNO_3$ | 1900.0 | 95.0 |

3.1.2 การเตรียมธาตุอาหารรอง (Micro-elements)

เตรียมธาตุอาหารรองสูตร LS (1965) โดยเตรียมสารละลายเข้มข้น 200 เท่า โดยชั่งสารละลายแต่ละชนิดตามตารางที่ 3.2 ละลายสารประกอบแต่ละชนิดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มล.

ตารางที่ 3.2 ชนิดและปริมาณของสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร LS (1965)

| ชนิดของสาร | ปริมาณสารในสูตร LS (1965) 1 ล (มก/ล) | ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น200 เท่า ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (ก) |
|---|---|---|
| $CaCl_2.2H_20$ | 440.0 | 88.0 |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 370.0 | 74.0 |
| $KH_2PO_4$ | 170.0 | 34.0 |
| $Na_2$-EDTA | 37.3 | 7.46 |
| $FeSO_4.7H_2O$ | 27.8 | 5.56 |
| $H_3BO_3$ | 6.20 | 1.24 |
| $MnSO_4.4H_2O$ | 22.30 | 4.46 |
| $ZnSO_4.2H_2O$ | 8.60 | 1.72 |
| KI | 0.83 | 0.166 |
| $Na_2MoO_4.2H_2O$ | 0.25 | 0.05 |
| $CuSO_4.5HP_2O$ | 0.025 | 0.005 |
| $CoCl_2.6H_2O$ | 0.025 | 0.005 |

3.1.3 การเตรียมวิตามินและอินทรีย์สาร (Organic compounds)

เตรียมวิตามินและอินทรีย์สารสูตร LS (1965) โดยเตรียมสารละลายเข้มข้น 200 เท่า โดยชั่งสารแต่ละชนิดตามตารางที่ 3.3 ละลายสารประกอบแต่ละชนิดในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มล.

ตารางที่ 3.3 ชนิดและปริมาณของสารละลายเข้มข้นของวิตามินและอินทรีย์สาร

| ชนิดของสาร | ปริมาณสารในสูตร LS (1965) 1 ล (มก/ล) | ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น 200 เท่า ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (ก) |
|---|---|---|
| Myo-inositol | 100 | 20 |
| Thiamine-HCl | 0.4 | 0.08 |

3.1.4 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต

1. การเตรียม 2,4-D

ชั่ง 2,4-D 20 มก. ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อยเพียงพอให้ละลายได้ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูได้จากสูตรอาหารแต่ละสูตร

2. การเตรียม NAA

ชั่ง NAA 20 มก. ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อยเพียงพอให้ละลายได้ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูได้จากสูตรอาหารแต่ละสูตร

**4. วิธีการวิจัย**

การทดลองที่ 1 ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าว พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

การทดลองที่ 1.1 <u>ระดับ pH ของอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงคัพภะของเมล็ดข้าวเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส</u>

วางแผนทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) มีทั้งหมด 9 กรรมวิธี ทวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัวอย่างย่อย

กรรมวิธีการทดลอง อาหารสูตร LS (1965) ที่ปรับ pH แตกต่างกัน 9 ระดับ คือ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 5.8 (control), 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5

ก่อนการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวได้แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกแล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70% เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยย้ายลงฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำเมล็ดข้าวดังกล่าวไปเลี้ยงในอาหาร วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทวนซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละซ้ำมี 100 เมล็ด

หลังจากนั้นนำเมล็ดข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพควบคุมที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นบันทึกผลการทดลอง โดยนับจำนวนการเกิดแคลลัสแล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ และนำแคลลัสดังกล่าวชั่งหาน้ำหนักสด บันทึกสีของแคลลัสและวัดความยาวของเส้นผ่าศูนย์กลาง

การทดลองที่ 1.2 ทดสอบลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหารและค่าการนำไฟฟ้าของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

วางแผนทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) มีทั้งหมด 9 กรรมวิธี ทวน 2 ซ้ำ ซ้ำละ 8 ตัวอย่างย่อย

กรรมวิธีการทดลอง อาหารสูตร LS (1965) ที่ปรับ pH แตกต่างกัน 9 ระดับ คือ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 5.8 (control), 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5

เตรียมอาหารสูตร LS ดัดแปลง ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.05 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร และวุ้น 0.8 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำอาหารดังกล่าวปรับให้มีค่า pH แตกต่างกัน 9 ระดับ คือ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 5.8 (control), 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำขวดอาหารดังกล่าวไปทดสอบลักษณะเนื้อสัมผัสเพื่อหาความแข็งของอาหาร

**การทดสอบลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหาร**

การทดสอบลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหารเกี่ยวข้องกับแรงต้านทาน โดยใช้ทดสอบแรงกด (compression) หรือแรงเจาะ (penetration) เพื่อหาความแข็ง (hardness) ของอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส โดยใช้เครื่อง TA.XT.plus texture analyzer (stable micro systems, UK) ด้วยหัววัดลักษณะเนื้อสัมผัสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร (P25 cylinder aluminum probe) โดยใช้สภาวะในการวัดดังนี้ ความเร็วก่อนวัด 1 มิลลิเมตรต่อวินาที ความเร็วขณะวัด 0.5 มิลลิเมตรต่อวินาที ความเร็วหลังวัด 10 มิลลิเมตรต่อนาที และระยะในการกดตัวอย่าง 5 มิลลิเมตร เพื่อหาค่าความแข็งของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีหน่วยเป็น นิวตัน (N)

อาหารสำหรับการทดสอบค่าการนำไฟฟ้านั้น เตรียมอาหารสูตร LS ดัดแปลง ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ผงถ่าน 0.05 กรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร จากนั้นนำอาหารดังกล่าวปรับให้มีค่า pH แตกต่างกัน 9 ระดับ คือ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 5.8 (control), 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำขวดอาหารดังกล่าวไปทดสอบค่าการนำไฟฟ้าของอาหาร

**การทดสอบค่าการนำไฟฟ้า**

เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการละลายของธาตุอาหารในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อแสดงถึงความเข้มข้นของเกลือทั้งหมดที่ละลายอยู่ในอาหาร ซึ่งเป็นค่าวัดโดยรวมไม่สามารถแยก

บอกความเข้มข้นของเกลือแต่ละตัวได้ โดยใช้เครื่องวัด pH / conductivity (CyberScan PC 510 Meter, MYS) โดยจุ่มหัวอ่าน (electrode) ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มี pH แตกต่างกัน 9 ระดับ หลอดละ 30 มิลลิลิตร เพื่อหาค่าการนำไฟฟ้า มีหน่วยเป็น มิลลิซีเมนต์ต่อเซนติเมตร (mS/cm)

**การบันทึกสีของแคลลัส**

แบ่งตามสีของชิ้นแคลลัสที่เกิดขึ้น คือ สีขาว (white) สีเหลือง (yellow) สีเหลืองปนขาว (yellow white) แคลลัสมีจุดสีเขียว (green spot) สีน้ำตาล (brown) และ สีดำ (black) จากนั้นคำนวณเปอณ์เซ็นต์การเกิดสีของแคลลัส

**คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากสูตร**

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส (\%)} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดข้าวที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนเมล็ดข้าวที่เลี้ยง}} \times 100$$

การทดลองที่ 2 การชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นโซมาติกเอมบริโอโดยวิธีการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน

มีทั้งหมด 8 กรรมวิธี ทวน 2 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ตัวอย่างย่อย

กรรมวิธีการทดลอง อาหารสูตร LS (1965) ที่มี 2,4-D และ NAA ความเข้มข้น 2, 4, 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร

นำส่วนของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ปริมาณ 1-1.2 กรัม มาเพเลี้ยงเป็นเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวสูตร LS ที่มี น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 250 มิลลิลิตรต่อลิตร และเติม 2,4-D 2, 4, 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับ NAA 2, 4, 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที ทำการย้ายอาหารเลี้ยงทุกๆ 1สัปดาห์ เป็นเวลา 1 เดือน และหลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์

บันทึกผลการทดลอง ดังนี้ การพัฒนาเป็นราก การพัฒนาเป็น somatic embryos ในระยะต่างๆ (proembryo stage, globular stage, scutellar stage และ coleoptilar stage (Hartmann *et al.*, 1997)) และจำนวนวันในการเพาะเลี้ยง

**5. การวิเคราะห์ข้อมูล**

ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ Statistix 8 (Analytical Software, USA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

**6. สถานที่ทำการทดลอง**

1. ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)
2. สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่