บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. วัสดุ และอุปกรณ์

1 เมล็ดที่แก่ของพริกหวาน

2 ตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ (air flow cabinet)

3 ชั้นสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขนาด 2.9x5.8 ม. ที่ติดตั้งหลอดไฟฟลูออเรสเซนส์ ความสว่างประมาณ 3,000 ลักซ์ ชั้นละ 4 หลอด มีระยะห่างจากขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อประมาณ 30 ซม.

4 เครื่องชั่งชนิดละเอียด ชนิดทศนิยม 3 ตำแหน่ง

5 เครื่องชั่งชนิดละเอียด ชนิดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

6 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง(pH meter)

7 เครื่องเขย่า (rotary shaker) สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

8 หม้อนึ่งความดันไอ

9 เตาอบไมโครเวฟ

10 เครื่อง Hot Plate และ Magnetic Stirrer

11 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmayer flash) ขนาด 50 125 และ 250 มล.

12 ช้อนตักสาร

13 ขวดแก้วฝาเกลียวสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. สูง 8 ซม.

14 จานเลี้ยงเนื้อเยื่อ (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.5 ซม. และ 16 ซม.

15 เครื่องแก้วอื่นๆ เช่น ปิเปตต์ บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดวัดปริมาตร ขวดใส่สารละลายเข้มข้น แท่งแก้วคนสาร หลอดทดลองขนาด 2.5X15 ซม.

16 ด้ามมีดผ่าตัดเบอร์ 3

17 ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 10 และ 11

18 ปากคีบทนไฟ ขนาดความยาว 10 และ 18 เซนติเมตร

19 หลอดหยด (dropper) ตัดปลายขนาด 3 มม. และจุกยาง

20 ตะเกียงแอลกอฮอล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

21 วัสดุอื่นๆ เช่น แผ่นอลูมิเนียม (aluminium foil) สำลี พาราฟิล์ม ยางรัดของ ถุงพลาสติกร้อนขนาด 5X7 นิ้ว แผ่นป้ายกระดาษวิธี ฯลฯ

22 ตะแกรงกรองสแตนเลส

23. อุปกรณ์ถ่ายภาพ

24. เครื่อง texture analyzer

2. สารเคมี

1 สารเคมีสำหรับฆ่าเชื้อ

- เอทธานอล เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์
- คลอร็อกซ์ ของบริษัท The Clorox Co., Oakland, USA.

2 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดัดแปลงจากสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

- เกลือที่ให้สารอาหารหลักต่างๆ ตามสูตร MS
- เกลือที่ให้ธาตุอาหารรองต่างๆ ตามสูตร MS
- วิตามิน และอินทรีย์สารต่างๆต่างๆ ตามสูตร MS
- Ferrous sulfate ของบริษัท J. T. Baker Chemical Co., Philipsberg N. J., USA
- Ethylene diamine tetraacetic acid disodium-salt dihydrat ของบริษัท Koch-Light Laboratories Ltd. England
- Casein hydrolysate
- Potasium hydroxide (KOH) 1 N
- Hydrochloric acid (HCl) 1 N
- น้ำตาลซูโครส
- น้ำกลั่น
- ผงวุ้น ตราเฮลิคอปเตอร์

3. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulator) ได้แก่

- 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D)
- Abscisic acid (ABA)
- L-proline

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. สารเคมีสำหรับใช้ในการผลิตเมล็ดสังเคราะห์ ได้แก่
   - โซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) 100 ~ 150cP ของ Wako Pure Chemical Industries Ltd. Japan
   - แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ของบริษัท E. Merck. Germany
5. สารเคมีสำหรับทำให้เมล็ดสังเคราะห์แห้ง
   - ซิลิกาเจล (silica gel)

วิธีการเตรียมสารเคมี และอุปกรณ์ในการวิจัย

1. การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

อาหารสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้ในงานวิจัยนี้ แบ่งออกเป็น

1.1 สูตรสำหรับชักนำให้เกิดแคลลัส (callus initiation)

ใช้อาหารพื้นฐานของ Murashige และ Skoog (1962) ดัดแปลงโดย Buyukalaca และ Mavituna (1996) ที่เติม 2,4-D 2 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. และผงวุ้น 8 ก./ล. บรรจุอาหารวุ้นในขวดแก้วฝาเกลียวสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. ขวดละ 25 มล. ปิดปากขวดด้วยพลาสติกรัดด้วยยางรัด

1.2 สูตรสำหรับเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (cell suspension culture)

ใช้อาหารพื้นฐานสูตร Murashige และ Skoog (1962) ดัดแปลงโดย Buyukalaca และ Mavituna (1996) ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ปริมาณขวดละ 50 มล. ปิดปากขวดด้วยพลาสติกรัดด้วยยางรัด

1.3 สูตร pretreatment

ใช้อาหารพื้นฐานสูตร Murashige และ Skoog (1962) ดัดแปลงโดย Buyukalaca และ Mavituna (1996) ที่ไม่มี KNO_3 ที่เติม 2, 4-D 2 มก./ล. และ K-citrate 6 มก./ล. บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ปริมาณขวดละ 50 มล. ปิดปากขวดด้วยพลาสติกรัดด้วยยางรัด

1.4 สูตรชักนำให้เกิดเอมบริโอ (embryo initiation)

ใช้อาหารพื้นฐานสูตร Murashige และ Skoog (1962) ดัดแปลงโดย Buyukalaca และ Mavituna (1996) ซึ่งลดปริมาณของ NH_4NO_3 ลงเหลือ 10 µM และเติม L-proline 6 ก./ล. บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ปริมาณขวดละ 50 มล. ปิดปากขวดด้วยพลาสติกรัดด้วยยางรัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.5 สูตรพัฒนาเอมบริโอให้สุกแก่ (embryo maturation)

ใช้อาหารพื้นฐานสูตร Murashige และ Skoog (1962) ดัดแปลงโดย Buyukalaca และMavituna (1996) แบบ half-strength ที่เพิ่ม AB A ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ปริมาณขวดละ 50 มล. ปิดปากขวดด้วยพลาสติกรัดด้วยยางรัด

อาหารปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ 5.8 โดยใช้ 1N KOH หรือ 1N HCl หลังจากนั้นจึงใส่ผงวุ้นลงไป (ยกเว้นเมื่อเตรียมเป็นอาหารเหลว) ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน และนำไปต้มจนวุ้นละลายเทใส่ขวดปากกว้างและขวดแก้วรูปชมพู่ตามปริมาตรที่กล่าวไว้ข้างต้น ปิดทับด้วยพลาสติกรัดยางรัด นำอาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้งหมดนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ที่ความดันไอ 15 ปอนด์/ตร.น. อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. การเตรียมชิ้นส่วนพืชและการชักนำให้เกิดแคลลัส (callogenesis)

นำเมล็ดพันธุ์พริกหวานที่แก่เต็มที่ (mature seed) มาทำความสะอาดเบื้องต้นโดยการแช่ในเอทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นจึงทำการแช่เมล็ดพันธุ์พริกหวานในสารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ในตู้ปลอดเชื้อ แช่เมล็ดพันธุ์พริกหวานในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แกะเอาส่วนของไซโกติกเอมบริโอออกจากเปลือกหุ้มเมล็ด

นำไซโกติกเอมบริโอที่ได้ไปเลี้ยงในขวดปากกว้างฝาเกลียวขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. สูง 8 ซม. ที่บรรจุอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส

3. การเตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนต

เตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยเตรียมใส่ขวด Erlenmayer flash ขนาด 125 มล. ปริมาตรขวดละ 50 มล. โดยชั่งสารลงในขวดรูปชมพู่ที่ใช้โดยตรง ขวดละ 1.5 ก. จากนั้นจึงเติมอาหารเหลวสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)ลงไปละลายจำนวน 50 มล. ซึ่งสารโซเดียมอัลจิเนตจะละลายได้ไม่หมด จากนั้นจึงปิดปากขวดในลักษณะเดียวกันกับการเตรียมอาหาร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อต่อไป

4. การเตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์

เตรียมสารละลาย $CaCl_2.2H_2O$ (น้ำหนักโมเลกุล 147.02) ความเข้มข้น 100 มล. โดยเตรียมใส่ขวด Erlenmayer flash ขนาด 125 มล. ปริมาตรขวดละ 100 มล. เตรียมโดยชั่งสารลงในขวดรูปชมพู่ที่ใช้โดยตรง ขวดละ 14.7 ก. แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปละลาย จำนวน 100 มล. เขย่าจนสารละลายหมดแล้วจึงปิดปากขวด และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การผลิตโซมาติกเอมบริโอของพริกหวาน (somatic embryo induction)

จากกรรมวิธีของ Buyakalaca and Mavituna (1993) แกะส่วนของไซโกติกเอมบริโอที่อยู่ข้างในเมล็ดพริกในสภาพปลอดเชื้อ นำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อฝาเกลียวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 ซม. เป็นเวลา 1-2 เดือน แล้วจึงย้ายส่วนของ embryogenic callus ปริมาณ 1-1.2 ก. เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2, 4-D 1 มก./ล. ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ที่มีอาหาร 50 มล. เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที เพื่อเพิ่มปริมาณ embryogenic callus ทำการย้ายอาหารเลี้ยงทุกๆ 2 อาทิตย์ เป็นเวลา 2 เดือนจากนั้นทำการ Pretreatment โดยเปลี่ยนอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์แขวนลอยเป็นอาหารเหลวสูตร MS ที่ไม่มี KNO_3 และเติม 2,4-D 2 มก./ล. และ K-citrate 6 มก./ล. เป็นเวลา 1 เดือน หลังจากนั้นทำการเปลี่ยนสูตรอาหารเป็นอาหารเหลวสูตร MS สูตรชักนำให้เกิดเอมบริโอซึ่งลดปริมาณของ NH_4NO_3 ลงเหลือ 10 mM และเติม L-proline 6 ก./ล. เพื่อชักนำให้ embryogenic callus พัฒนาไปเป็น embryo เป็นเวลา 1 เดือน หลังจาก embryogenic callus พัฒนาเข้าสู่ระยะ late torpedo จึงย้าย embryoไปเลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรพัฒนาเอมบริโอ แบบ half-strength ที่มี ABA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์

6. การผลิตเมล็ดสังเคราะห์ของพริกหวาน

นำโซมาติกเอมบริโอของพริกหวานระยะ late torpedo stage ที่เลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรพัฒนาเอมบริโอ ผสมลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ ใช้หลอดหยดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม. ดูดสารละลายที่มีโซมาติกเอมบริโอบรรจุอยู่ นำมาหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ทำการคนเป็นระยะ จะเกิดเป็นก้อนเมล็ดสังเคราะห์ที่สมบูรณ์ รินสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ออกให้หมด ล้างเมล็ดสังเคราะห์ด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู่ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เลือกเมล็ดสังเคราะห์ที่มีเพียง 1 โซมาติกเอมบริโอไว้สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

7. การระเหยน้ำออกจากเมล็ดสังเคราะห์

นำเมล็ดสังเคราะห์ใส่ในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 ซม. แล้วนำไปชั่งน้ำหนักบันทึกค่าน้ำหนักสด จากนั้นจึงนำจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีเมล็ดสังเคราะห์มาใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18 ซม.ที่บรรจุซิลิกาเจลไว้แล้วในตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ เปิดเครื่องดูดอากาศทิ้งไว้ประมาณ 2-3 ชั่วโมง แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก จนมีน้ำหนักลดลง 80 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักที่ชั่งในตอนแรก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการวิจัย

การศึกษาแบ่งออกเป็น 4 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 : ผลของความเข้มข้นของ sodium alginate และ calcium chloride ที่มีต่อความงอกของเมล็ดสังเคราะห์พริกหวาน ความแข็งแรง และความอยู่ตัวของเจลที่ใช้เคลือบเมล็ดสังเคราะห์พริกหวานหลังจากนำเมล็ดสังเคราะห์ไประเหยน้ำออกด้วยซิลิกาเจล จนมีระดับการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์

วิเคราะห์แบบ ANCOVA test โดยปัจจัยดังนี้

ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของ sodium alginate 5 ระดับ คือ 2, 3, 4, 5 และ 6 %w/v

ปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นของ calcium chloride 4 ระดับ คือ 25, 50, 75 และ 100 mM

ทวนซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละซ้ำมี 10 เมล็ดสังเคราะห์

วิธีการทดลอง

นำโซมาติกเอมบริโอที่ได้จากการกรองด้วยตะแกรงสแตนเลสใส่ลงในอาหารเหลวสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ดัดแปลงโดย Buyukalaca และ Mavituna (1996) ที่เติม sodium alginate ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2 ถึง 6 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตรน้ำตาลซูโครส 2 มก./ล. IAA 1 มก./ล. และ KIN 1 มก./ล. ใช้หลอดแก้วดูดอาหารที่มีโซมาติกเอมบริโอของพริกหวานผสมอยู่ นำมาหยดลงในสารละลายของ calcium chloride ที่มีความเข้มข้น 25, 50, 75 และ100 mM ในขวด Erlenmayer flash ขนาด 125 มล. นำไปคนด้วยเครื่อง magnetic stirrer เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลาย calcium chloride ออก ล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำมาระเหยน้ำออกโดยใช้ซิลิกาเจล จนมีระดับการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์ เลือกเมล็ดสังเคราะห์ที่มีเพียง 1 โซมาติกเอมบริโอ มาใช้ในการทดสอบการงอกและความเร็วในการงอกของเมล็ดสังเคราะห์ โดยทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2°C สภาพแสง 16 ชั่วโมง ต่อวัน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ บันทึกผลเปอร์เซ็นต์ความงอก ระยะเวลาที่ใช้ในการงอก วัดความแข็งแรง และความอยู่ตัวของเจลด้วยเครื่อง texture analyzer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 : ระยะการเจริญที่เหมาะสมของโซมาติกเอมบริโอของพริกหวานในการชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำ (desiccation tolerance) โดยใช้ ABA ก่อนนำมาผลิตเมล็ดสังเคราะห์ และนำไประเหยน้ำออกด้วยซิลิกาเจล จนมีระดับการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์

วิเคราะห์แบบ ANCOVA test รวมทั้งสิ้น 9 กรรมวิธี ทวนซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละซ้ำมี 10 เมล็ด สังเคราะห์

กำหนดกรรมวิธีต่างๆดังนี้ กรรมวิธีที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ทำการเพาะเลี้ยงโซมาติกเอมบริโอในอาหารเหลว MSสูตรชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอ 3, 6, 9, 12 , 15, 18, 21, 24 และ 25 วัน ตามลำดับ

วิธีการทดลอง

นำโซมาติกเอมบริโอของพริกหวานที่เจริญในระยะต่างๆ ได้แก่ 3, 6, 9, 12 , 15, 18, 21, 24 และ25 วัน หลังจากเลี้ยงในอาหารเหลวMS สูตรพัฒนาเอมบริโอให้สุกแก่ (maturated medium) ที่เติม ABA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. (Buyukalaca, 1993) บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25±2°C ในที่มืด จากนั้นนำโซมาติกเอมบริโอมาผลิตเป็นเมล็ดสังเคราะห์แล้ว ทำการระเหยน้ำออกด้วยซิลิกาเจลจนมีระดับการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงนำมาใช้ใน การทดสอบการงอก และความเร็วในการงอกของเมล็ดสังเคราะห์ โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารMS ที่อุณหภูมิ 25±2°C ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ บันทึกผลเปอร์เซ็นต์ความงอก ลักษณะการงอก ระยะเวลาที่ใช้ในการงอก

การทดลองที่ 3 : วิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของ ABA (abscisic acid) ในการชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำ (desiccation tolerance) ก่อนนำมาผลิตเมล็ดสังเคราะห์ และนำไประเหยน้ำออกด้วยซิลิกาเจล จนมีระดับการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์

วิเคราะห์แบบ ANCOVA test รวมทั้งสิ้น 8 กรรมวิธี ทวนซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละซ้ำมี 10 เมล็ด สังเคราะห์

กำหนดกรรมวิธีต่างๆดังนี้ กรรมวิธีที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ8 เลี้ยงเมล็ดสังเคราะห์ในอาหารเหลวMS (Murashige and Skoog, 1962) สูตรพัฒนาเอมบริโอ ที่เติม ABA 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 1.0 มก./ล. ตามลำดับ

วิธีการทดลอง

นำโซมาติกเอมบริโอของพริกหวานในระยะ late torpedo ที่เลี้ยงในอาหารสูตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอ ย้ายลงในขวด Erlenmayer flash ขนาด 250 มล. ที่บรรจุอาหารเหลว MS สูตรพัฒนาเอมบริโอแก่ (maturated medium) ปริมาณ 50 มล. ที่เติม ABA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 1.0 มก./ล. ตามลำดับ เป็นเวลา 21 วัน ในที่มืด บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 ±2°C และนำโซมาติกเอมบริโอที่ได้มาผลิตเป็นเมล็ดสังเคราะห์ และนำไปทำให้แห้งโดยการระเหยน้ำออกด้วยซิลิกาเจล จนมีระดับการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารMSที่อุณหภูมิ 25±2°C ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ บันทึกผลเปอร์เซ็นต์ความงอก ลักษณะการงอก และระยะเวลาที่ใช้ในการงอก

การทดลองที่ 4 : การทดสอบความงอกภายหลังการเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ของพริกหวานที่ผ่านการชักนำให้เกิดการทนทานต่อการสูญเสียน้ำด้วย ABA หลังจากนำเมล็ดสังเคราะห์ไประเหยน้ำออกด้วยซิลิกาเจลจนมีระดับการสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์

วิเคราะห์แบบ ANCOVA test รวมทั้งสิ้น 7 กรรมวิธี ทวนซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละซ้ำมี 10 เมล็ดสังเคราะห์

กำหนดกรรมวิธีต่างๆดังนี้ กรรมวิธีที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ทำการเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 6 และ 8 สัปดาห์

วิธีการทดลอง

นำโซมาติกเอมบริโอของพริกหวานที่เลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรพัฒนาเอมบริโอที่เติม ABA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มก./ล. บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25± 2°C เป็นระยะเวลา 21 วัน ในที่มืด มาผลิตเมล็ดสังเคราะห์ และทำให้แห้งโดยการระเหยน้ำออกด้วยซิลิกาเจล จนมีระดับสูญเสียน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์ มาทำการเก็บรักษาในขวด Erlenmayer flash ขนาด 250 มล. ขวดละ 5 เมล็ดสังเคราะห์ ปิดด้วยพลาสติก รัดด้วยยางรัด นำไปเก็บที่มีแสง 16 ชั่วโมง ต่อวันอุณหภูมิ 25±2 °C เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 6 และ8 สัปดาห์ ตามลำดับ หลังจากนั้น นำเมล็ดสังเคราะห์ที่ผ่านการเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ มาทำการให้ความชื้นอีกครั้งและเพาะเพื่อทดสอบความงอก โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารMSที่อุณหภูมิ 25±2°C ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ บันทึกผลเปอร์เซ็นต์ความงอก ลักษณะการงอก และระยะเวลาที่ใช้ในการงอกภายหลังการเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved