บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. เมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1

2. ตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ (air flow cabinet)

3. ชั้นสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขนาด 2.9 x 5.8 ม. ซึ่งติดตั้งหลอดไฟฟลูออเรสเซนส์ ชั้นละ 3 หลอด โดยมีระยะห่างจากขวดเลี้ยงประมาณ 30 ซม.

4. เครื่องชั่งชนิดละเอียด ชนิดทศนิยม 3 ตำแหน่ง

5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

6. เครื่องเขย่า

7. หม้อนึ่งความดันไอ

8. เตาอบไมโครเวฟ

9. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 50, 125 และ 250 มล.

10. ช้อนตักสาร

11. ขวดแก้วฝาเกลียวสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 ซม. สูง 8 ซม.

12. จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.5, 10 และ 15 ซม.

13. เครื่องแก้วอื่นๆ เช่น ปิเปต บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดวัดปริมาตร ขวดใส่สารละลายเข้มข้นหลอดทดลอง แท่งแก้วคนสาร

14. ด้ามมีดผ่าตัดเบอร์ 3

15. ใบมีดผ่าตัด เบอร์ 10 และ 11

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

16. ปากคีบทนไฟ ขนาดความยาว 10 และ 18 ซม.

17. หลอดหยด (dropper) และจุกยาง

18. ตะเกียงแอลกอฮอล์

19. แผ่นพลาสติกใส ขนาด 7 x 9 ซม.

20. กระดาษกรอง whatman เบอร์ 3

21. ผ้ากรองไนล่อนที่มีรูขนาด 0.3 มล.

22. ตะแกรงวางอุปกรณ์

23. กระบอกฉีดน้ำ

24. วัสดุอื่นๆ เช่น แผ่นอลูมิเนียม (aluminium foil) สำลี พาราฟิล์ม ยางรัดของ กระดาษลอกลาย

ถ้วยพลาสติก

3.2 สารเคมี

1. สารเคมีสำหรับฆ่าเชื้อ

-เอทธานอล เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์

-คลอร๊อกซ์

2. สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง

-เกลือให้ธาตุอาหารหลักต่างๆ ตามสูตร LS (Linsmaier and Skoog, 1965)

-เกลือให้ธาตุอาหารรองต่างๆ ตามสูตร LS

-วิตามินและอินทรีย์สารต่างๆ ตามสูตร LS

-Ethylene diamine tetraacetic acid disodium-salt dehydrate

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

-Potasium hydroxide (KOH) 1 N

-Hydrochloric acid (HCl) 1 N

-น้ำกลั่น

-น้ำตาลซูโครส

-น้ำมะพร้าว

-ผงวุ้น

-ผงถ่านกัมมันต์

3. สารที่ใช้ในการทำให้เกิดเจลของเมล็ดสังเคราะห์

-โซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) 100~150cP

-แคลเซียมคลอไรด์ ($Cacl_2.2H_2O$)

3.3 พืชทดลอง

นำเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 มาแกะเปลือกออก ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ขณะฟอกฆ่าเชื้อทำการเขย่าเป็นระยะ แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง ภายในตู้ปลอดเชื้อจากนั้นทำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ขณะฟอกฆ่าเชื้อทำการเขย่าเป็นระยะ แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง ภายในตู้ปลอดเชื้อ หลังจากนั้นแช่ข้าวไว้ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อไม่ให้เมล็ดข้าวแห้ง เพื่อเตรียมนำไปทดสอบการเกิดและการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารสูตรต่างๆ ต่อไป

3.4 การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)

3.4.1 การเตรียมธาตุอาหารหลัก

เตรียมธาตุอาหารหลักสูตร LS ตามรายละเอียดชนิดและปริมาณของสาร ดังแสดงในตารางที่ 3.1 โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน โดยให้ความเข้มข้นของสารมากกว่าที่ใช้จริง 10X เตรียมน้ำยาให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล เก็บสารละลายเข้มข้นทุกชนิดรวมกันในตู้เย็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.1 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร LS

ชนิดของสาร	ปริมาณสารในสูตร LS 1 ล (มก./ล.)	ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (ก.)
NH_4NO_3	1650.0	16.5
KNO_3	1900.0	19.0
$CaCl_2.2H_2O$	440.0	4.4
$MgSO_4.7H_2O$	370.0	3.7
KH_2PO_4	170.0	1.7

3.4.2 การเตรียมธาตุอาหารรอง

เตรียมธาตุอาหารรองสูตร LS ตามรายละเอียดชนิดและปริมาณของสาร ดังแสดงในตารางที่ 3.2 โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน โดยให้ความเข้มข้นของสารมากกว่าที่ใช้จริง 100X เตรียมน้ำยาให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล

ตารางที่ 3.2 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร LS

ชนิดของสาร	ปริมาณสารในสูตร LS 1 ล (มก./ล.)	ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น 100 เท่า ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล (มก.)
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	2.5
KI	0.83	83.0
$ZnSO_4.7H_2O$	8.60	860.0
$MnSO_4.4H_2O$	22.30	2,230.0
H_3BO_4	6.20	620.0
$NaMoO_4.2H_2O$	0.25	25.0
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	2.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.3 การเตรียมสารละลายเหล็กเข้มข้น

เตรียม FeEDTA สูตร LS ซึ่งประกอบด้วย $FeSO_4.7H_2O$ และ $Na_2EDTA.2H_2O$ โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ความเข้มข้นของสารมากกว่าที่ใช้จริง 100X เตรียมน้ำยาให้มีปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล. ทำการเตรียม โดยชั่งสารแต่ละชนิดละลายน้ำให้มีปริมาตรสุดท้ายของแต่ละส่วนเป็น 500 มล. (ตารางที่ 3.3) แล้วจึงนำมาผสมไว้ในขวดเดียวกัน โดยใช้ขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง

ตารางที่ 3.3 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของเหล็กสูตร LS

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร LS 1 ล (มก./ล.)	ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น 100 เท่า ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มล. (มก.)
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	2.78
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.3	3.73

3.4.4 การเตรียมวิตามินและอินทรีย์สาร

การเตรียมวิตามินและอินทรีย์สารในสูตร LS เตรียมแยกแต่ละสาร โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้น

-การเตรียม thiamine.HCl

ชั่ง thiamine 10 มก. ละลายด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อยพอให้ละลายได้ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูได้จากสูตรอาหารแต่ละสูตร

-การเตรียม myo-inositol

ชั่ง myo-inositol 500 มก. ละลายด้วยน้ำกลั่นเล็ดน้อยพอให้ละลายได้ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูได้จากสูตรอาหารแต่ละสูตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.5 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต

-การเตรียม 2,4-D

ชั่ง 2,4-D 30 มก ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อยเพียงพอให้ละลายได้ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น สำหรับความเข้มข้นที่ใช้จริงดูได้จากสูตรอาหารแต่ละสูตร

3.4.6 การเตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนต

เตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักปริมาตร) โดยเตรียมใส่ขวดชมพู่ ขนาด 125 มล ปริมาตรขวดละ 50 มล. โดยชั่งสารลงในขวดรูปชมพู่ที่ใช้โดยตรงขวดละ 1.5 ก. จากนั้นจึงเติมอาหารเหลวสูตร LS ลงไปละลายจำนวน 50 มล. ซึ่งสารโซเดียมอัลจิเนตจะละลายได้ไม่หมด จากนั้นจึงปิดปากขวดในลักษณะเดียวกันกับการเตรียมอาหาร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อต่อไป

3.4.7 การเตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์

เตรียมสารละลาย $CaCl2.2H_2O$ (น้ำหนักโมเลกุล 147.02) ความเข้มข้น 100 มล. โดยเตรียมใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มล. ปริมาตรขวดละ 100 มล. เตรียมโดยชั่งสารลงในขวดรูปชมพู่ที่ใช้ โดยตรง ขวดละ 14.7 ก. แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปละลาย จำนวน 100 มล. เขย่าจนสารละลายหมดแล้วจึงปิดปากขวดและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อต่อไป

3.5 การเตรียมอาหารพื้นฐานสูตร LS (Linsmaier and Skoog, 1965) ดัดแปลงสูตรต่างๆ

อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้ในการวิจัยนี้แบ่งออกเป็น

3.5.1 การเตรียมอาหารสูตรที่ใช้สำหรับชักนำแคลลัส

ใช้สูตรอาหารพื้นฐานของ LS (Linsmaier and Skoog, 1965) โดยนำส่วนประกอบของอาหารพื้นฐานสูตร LS จากน้ำยาเข้มข้นที่เตรียมไว้มาผสมให้เข้ากัน โดยใช้สารละลายเข้มข้นแต่ละชนิด ดังตารางที่ 3.4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนการเตรียมอาหารสูตร LS ดัดแปลง ที่ใช้สำหรับชักนำแคลลัส มีดังนี้

ใส่น้ำกลั่นลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล. ประมาณ 1/3 ของขวด แล้วเติมสารละลายเข้นข้นของธาตุอาหารหลักลงไป หลังจากนั้นจึงเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรอง วิตามิน เหล็กและสารควบคุมการเจริญเติบโตและน้ำมะพร้าวลงไปตามลำดับ โดยเขย่าให้น้ำยาผสมกันดีระหว่างแต่ละครั้งที่เติม จากนั้นละลายน้ำตาลใส่ลงไป แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล. เทสารละลายลงในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มล. จากนั้นนำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ 5.8 โดยใช้ 1 N HCl หรือ 1 N KOH สำหรับเตรียมอาหารวุ้นและใส่วุ้นลงในอาหารแล้ว นำไปต้มจนวุ้นละลายดี สังเกตจากการที่อาหารมีลักษณะใส ต่อจากนั้นตวงอาหารใส่ขวดแก้วฝาเกลียวสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 ซม. สูง 8 ซม. ปริมาณ 25 มล./ขวด ปิดปากขวดด้วยพลาสติกทนร้อนที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 70x70 มม. รัดด้วยยางรัดของและปิดทับด้วยด้วยกระดาษลอกลาย แล้วรัดด้วยยางรัดของอีกครั้ง จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดในอาหารสูตรสำหรับชักนำแคลลัส

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณสารละลายเข้มข้นเพื่อเตรียมอาหาร 1 ลิตร (มล.)
สารละลายธาตุอาหารหลักความเข้มข้น 10X	100
สารละลายธาตุอาหารรองความเข้มข้น 100X	10
สารละลายเหล็กความเข้มข้น 100X	10
วิตามินและอินทรีย์สาร	
thiamine (80 มก ในน้ำยา 100 มล)	5
myo-inositol (400 มก ในน้ำยา 100 มล)	25
สารควบคุมการเจริญเติบโต	
2,4-D (20 มก ในน้ำยา 100 มล)	ดูจากตารางที่ 3.8
น้ำมะพร้าว	150
ซูโครส	30 ก./ล.
วุ้น	8 ก./ล.
ผงถ่านกัมมันต์	ดูจากตารางที่ 3.8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.2 การเตรียมอาหารสูตรที่ใช้สำหรับการกระตุ้นเซลล์แขวนลอย

ใช้สูตรอาหารพื้นฐานของ LS (Linsmaier and Skoog, 1965) โดยนำส่วนประกอบของอาหารพื้นฐานสูตร LS จากน้ำยาเข้มข้นที่เตรียมไว้มาผสมให้เข้ากัน โดยใช้สารละลายเข้มข้นแต่ละชนิด ดังตารางที่ 3.5

ขั้นตอนการเตรียมอาหารสูตร LS ดัดแปลง ที่ใช้สำหรับการกระตุ้นเซลล์แขวนลอย มีดังนี้

ใส่น้ำกลั่นลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล. ประมาณ 1/3 ของขวด แล้วเติมสารละลายเข้นข้นของธาตุอาหารหลักลงไป หลังจากนั้นจึงเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรอง วิตามิน เหล็กและสารควบคุมการเจริญเติบโตและน้ำมะพร้าวลงไปตามลำดับ โดยเขย่าให้น้ำยาผสมกันดีระหว่างแต่ละครั้งที่เติม จากนั้นละลายน้ำตาลใส่ลงไป แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล. เทสารละลายลงในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มล. จากนั้นนำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ 5.8 โดยใช้ 1 N HCl หรือ 1 N KOH จากนั้นตวงอาหารเหลวใส่ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ ปิดปากขวดด้วยพลาสติกทนร้อนที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 70x70 มม. รัดด้วยยางรัดของและปิดทับด้วยด้วยกระดาษลอกลาย แล้วรัดด้วยยางรัดของอีกครั้ง จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ตารางที่ 3.5 ส่วนประกอบของสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดในอาหารสูตรที่ใช้สำหรับการกระตุ้นเซลล์แขวนลอย

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณสารละลายเข้มข้นเพื่อเตรียมอาหาร 1 ลิตร (มล.)
สารละลายธาตุอาหารหลักความเข้มข้น 10X	100
สารละลายธาตุอาหารรองความเข้มข้น 100X	10
สารละลายเหล็กความเข้มข้น 100X	10
วิตามินและอินทรีย์สาร	5
thiamine (80 มก ในน้ำยา 100 มล)	25
myo-inositol (400 มก ในน้ำยา 100 มล)	ดูจากตารางที่ 3.6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.5 (ต่อ) ส่วนประกอบของสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดในอาหารสูตรที่ใช้สำหรับการกระตุ้นเซลล์แขวนลอย

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณสารละลายเข้มข้นเพื่อเตรียมอาหาร 1 ลิตร
สารควบคุมการเจริญเติบโต	250 มล.
2,4-D (20 มก ในน้ำยา 100 มล)	30 ก./ล.
น้ำมะพร้าว	25
ซูโครส	30 ก

ตารางที่ 3.6 ปริมาณ 2,4-D ที่ใช้ในอาหารแต่ละสูตรที่ใช้สำหรับการกระตุ้นเซลล์แขวนลอย

สูตรอาหาร	ปริมาณ 2,4-D ที่ใช้ (มก./ล.)
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 1	0
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 2	4
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 3	8
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 4	12
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 5	16
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 6	20

3.5.3 การเตรียมอาหารสูตรที่ใช้สำหรับเลี้ยงเซลล์แขวนลอยหลังจากทำการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต

ใช้สูตรอาหารพื้นฐานของ LS (Linsmaier and Skoog, 1965) โดยนำส่วนประกอบของอาหารพื้นฐานสูตร LS จากน้ำยาเข้มข้นที่เตรียมไว้มาผสมให้เข้ากัน โดยใช้สารละลายเข้มข้นแต่ละชนิด ดังตารางที่ 3.7

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนการเตรียมอาหารสูตร LS ดัดแปลง ที่ใช้สำหรับเลี้ยงเซลล์แขวนลอย หลังจากทำการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต มีดังนี้

ใส่น้ำกลั่นลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล. ประมาณ 1/3 ของขวด แล้วเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักลงไป หลังจากนั้นจึงเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรอง วิตามิน เหล็กและสารควบคุมการเจริญเติบโตและน้ำมะพร้าวลงไปตามลำดับ โดยเขย่าให้น้ำยาผสมกันดีระหว่างแต่ละครั้งที่เติม จากนั้นละลายน้ำตาลใส่ลงไป แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มล. เทสารละลายลงในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มล. จากนั้นนำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ 5.8 โดยใช้ 1 N HCl หรือ 1 N KOH จากนั้นตวงอาหารเหลวใส่ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ ปิดปากขวดด้วยพลาสติกทนร้อนที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 70x70 มม.รัดด้วยยางรัดของและปิดทับด้วยด้วยกระดาษลอกลาย แล้วรัดด้วยยางรัดของอีกครั้ง จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ตารางที่ 3.7 ส่วนประกอบของสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดในอาหารสูตรที่ใช้สำหรับเลี้ยงเซลล์แขวนลอยหลังจากทำการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณสารละลายเข้มข้นเพื่อเตรียมอาหาร 1 ลิตร (มล.)
สารละลายธาตุอาหารหลักความเข้มข้น 10X	100
สารละลายธาตุอาหารรองความเข้มข้น 100X	10
สารละลายเหล็กความเข้มข้น 100X	10
วิตามินและอินทรีย์สาร	
thiamine (80 มก ในน้ำยา 100 มล)	5
myo-inositol (400 มก ในน้ำยา 100 มล)	25
สารควบคุมการเจริญเติบโต	5
2,4-D (20 มก ในน้ำยา 100 มล)	250
น้ำมะพร้าว	30 ก./ล.
ซูโครส	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6 วิธีการดำเนินการทดลอง

การศึกษาแบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ระดับความเข้มข้มของผงถ่านกัมมันต์ และ 2,4-D ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

นำเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ที่เตรียมตามข้อ 3.3 มาเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ใช้สำหรับชักนำแคลลัส โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD จำนวน 3 ซ้ำ โดยมี 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของผงถ่านกัมมันต์ 5 ระดับ คือ 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 กรัมต่อลิตร

ปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นของ 2,4-D 4 ระดับ คือ 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 3.8 ปริมาณ 2,4-D และผงถ่านกัมมันต์ที่ใช้ในอาหารแต่ละสูตร

สูตรอาหาร	ปริมาณผงถ่านกัมมันต์ที่ใช้ (ก./ล.)	ปริมาณ 2,4-D ที่ใช้ (มก./ล.)
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 1	0	0
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 2	0	1
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 3	0	2
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 4	0	3
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 5	0.05	0
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 6	0.05	1
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 7	0.05	2
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 8	0.05	3
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 9	0.10	0
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 10	0.10	1
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 11	0.10	2
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 12	0.10	3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.8(ต่อ) ปริมาณ 2,4-D และผงถ่านกัมมันต์ที่ใช้ในอาหารแต่ละสูตร

สูตรอาหาร	ปริมาณผงถ่านกัมมันต์ที่ใช้ (ก./ล.)	ปริมาณ 2,4-D ที่ใช้ (มก./ล.)
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 13	0.15	0
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 14	0.15	1
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 15	0.15	2
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 16	0.15	3
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 17	0.20	0
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 18	0.20	1
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 19	0.20	2
สูตร LS ดัดแปลง สูตรที่ 20	0.20	3

ทำการเพาะเลี้ยงคัพภะในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอาหาร 25 มล. โดยวางเมล็ดข้าว 5 เมล็ด ต่ออาหาร 1 ขวด ปิดปากขวดด้วยพลาสติกใสที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 70x70 มม. รัดด้วยยางรัดของ โดยนำไปเพาะเลี้ยงในสภาพควบคุมที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 15 วัน ทำการบันทึกผลการทดลอง ดังนี้

1.) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัส

ทำการเก็บข้อมูลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัสข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 จำนวน 100 เมล็ด โดยการวัดความยาวของเส้นผ่าศูนย์กลางของแคลลัส วัดเป็นหน่วยมิลลิเมตร บันทึกข้อมูลทุก 5 วัน เป็นเวลานาน 15 วัน นำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2.) เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

ทำการเก็บข้อมูลโดยการนับจำนวนแคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 จำนวน 100 เมล็ด ทุก 5 วัน เป็นเวลานาน 15 วัน รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส นำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และนำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแคลลัสของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 มา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเฉลี่ยของแคลลัส (แกน Y) กับ ระยะเวลา (แกน X) เพื่อดูอัตราการเจริญเติบโตของแคลลัส

4.) สีของแคลลัส

การบันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดสีของแคลลัส แบ่งตามสีของชิ้นแคลลัสที่เกิดขึ้น คือ สีขาว (white; W) สีเหลือง (yellow; Y) สีเหลืองปนขาว (yellow white; YW) แคลลัสมีจุดสีเขียว (green spot; GS) สีน้ำตาล (brown;B) และสีดำ (black;BL)

5.) ชนิดของแคลลัส

การบันทึกเปอร์เซ็นต์ชนิดของแคลลัส ชนิดของแคลลัสมี 2 ชนิด คือ compact callus จะมีลักษณะเกาะกันแน่นเป็นก้อนและ friable callus จะมีลักษณะเกาะกันหลวมๆ และฟู การบันทึกชนิดของแคลลัส

การทดลองที่ 2 ระดับ 2,4-D ที่เหมาะสมที่ใช้ในการกระตุ้นแคลลัส เพื่อชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นโซมาติกเอมบริโอ

นำเอมบริโอเจเนิกแคลลัสที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาทำการแยกเป็นชิ้นเล็กๆ และนำมาเลี้ยงในอาหารสูตรที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์และพัฒนาไปเป็นเอมบริโอ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์(Completely Randomnized Design : CRD) จำนวน 3 ซ้ำ โดยมีกรรมวิธี คือ นำเอมบริโอเจนิกแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันหลวมๆ (friable callus) มีสีเหลืองเข้มมาแยกเป็นชิ้นเล็กๆ ย้ายลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยที่มีระดับความเข้มข้นของ 2,4-D 6 ระดับ คือ 0, 4, 8, 12, 16 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.6) โดยนำเอมบริโอเจนิกแคลลัสย้ายลงในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารสูตรที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอย 50 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 รอบ/นาที ในสภาพที่มีแสง อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะ 1 วัน แล้วจึงทำการย้ายเอมบริโอเจนิกแคลลัสกลับมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไม่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ เพื่อชักนำให้ embryogenic callus พัฒนาไปเป็น embryo ทำการย้ายอาหารเลี้ยงทุกๆ 5-7 วัน ทำการบันทึกข้อมูลทุก 7 วัน โดยบันทึกการเจริญ การพัฒนา สีและลักษณะรูปร่างของเซลล์ บันทึกภาพลักษณะของเซลล์ นำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 ผลของเปอร์เซ็นต์การดึงน้ำออกจากเมล็ดสังเคราะห์โดยซิลิกาเจล ต่อความงอกของเมล็ดสังเคราะห์ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1

นำโซมาติกเอมบริโอของข้าวระยะ late torpedo stage ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LS ดัดแปลง สูตรพัฒนาเอมบริโอจากการทดลองที่ 2 มาเติมลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ที่ผสมกับอาหารสูตร LS ใช้หลอดหยดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ดูดสารละลายที่มีโซมาติกเอมบริโออยู่ นำมาหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ทำการคนเป็นระยะ จะเกิดเป็นก้อนเมล็ดสังเคราะห์ที่สมบูรณ์ รินสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ออกให้หมด ล้างเมล็ดสังเคราะห์ด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เลือกเมล็ดสังเคราะห์ที่มีเพียง 1 โซมาติกเอมบริโอไว้สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

การระเหยน้ำออกจากเมล็ดสังเคราะห์

เลือกเมล็ดสังเคราะห์ที่มีเพียง 1 โซมาติกเอมบริโอ ใส่ในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 เซนติเมตร แล้วนำไปชั่งน้ำหนักบันทึกค่าน้ำหนักสด จากนั้นจึงนำจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีเมล็ดสังเคราะห์มาใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18 เซนติเมตรที่บรรจุซิลิกาเจลไว้แล้วในตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ เปิดเครื่องดูดอากาศทิ้งไว้ประมาณ 2-3 ชั่วโมง เพื่อทำการลดความชื้น โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์(Completely Randomnized Design : CRD) โดยมีอัตราการสูญเสียน้ำเป็นปัจจัยที่ใช้ในการศึกษา ซึ่งอัตราการสูญเสียน้ำแบ่งออกเป็น 3 ระดับ คือ 0, 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์

จากนั้นนำมาเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 เดือน จึงนำมาทำการทดสอบความมีชีวิตและความเร็วในการงอกของเมล็ดสังเคราะห์ โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร LS ที่อุณหภูมิ 25±2°C ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ บันทึกผลเปอร์เซ็นต์ความงอก เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อนที่มีลักษณะปกติ เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อนที่มีลักษณะผิดปกติ ลักษณะการงอก จำนวนวันที่เมล็ดพืชเทียมเริ่มงอก ระยะเวลาที่ใช้ในการงอกนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved