บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชสกุลไพล

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 พืชทดลอง

หน่ออ่อนของพืชในสกุลไพล 3 ชนิด ได้แก่

- ไพลเหลือง (*Zingiber montanum*)
- ไพลดำ (*Zingiber ottensii*)
- ขิง (*Zingiber officinale*)

3.1.2 เครื่องแก้ว

1) ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 8, 12 ออนซ์
2) ปิเปต ขนาด 1, 10 และ 20 มิลลิลิตร
3) แท่งแก้วคนสาร
4) บีกเกอร์ ขนาด 25, 50, 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
5) จานแก้วเพาะเชื้อ
6) กระบอกตวง ขนาด 10, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
7) ขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร
8) หลอดหยด
9) ขวดแก้วสีชา
10) หลอดทดลอง

3.1.3 สารเคมี

1) สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารโดยใช้สูตรของ Murashige and Skoog (MS, 1962)
2) สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ

มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ CHIANG MAI RAJABHAT UNIVERSITY

1. แอลกอฮอล์ 95% และ 70%
2. น้ำยาล้างจาน
3. เมอร์คิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$)
4. ทวีน 20 (Tween-20)

3) สารควบคุมการเจริญเติบโต

1. BA (6-Benzylaminopurine)
2. NAA (α-Napthaleneacetic acid)

4) สารเคมีปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

1. ไฮโดรคลอริก (HCl)
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

5) น้ำตาลทราย (Sucrose)

6) ผงวุ้น (Agar)

3.1.4 เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหารประกอบด้วย

1) เครื่องชั่งหยาบ 2 ตำแหน่ง บริษัท METTLER TOLEDO รุ่น PG 2002-S
2) เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง บริษัท METTLER TOLEDO รุ่น AG 204
3) หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) บริษัท HIRAYAMA รุ่น HVE - 50
4) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) บริษัท METROHM SIAM รุ่น 837
5) เตาไฟฟ้า (Hot plate) บริษัท SCHOTT รุ่น D65319
6) ตู้เย็น

3.1.5 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการตัดเนื้อเยื่อ

1) มีดผ่าตัด เบอร์ 11
2) ด้ามมีด เบอร์ 3
3) ปากคีบ
4) ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ
5) ตะเกียงแอลกอฮอล์
6) กระบอกฉีด

3.1.6 อุปกรณ์เลี้ยงเนื้อเยื่อภายหลังการย้ายเนื้อเยื่อลงขวดอาหาร

1) ชั้นวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่มีหลอดไฟฟลูออเรสเซนส์ ความสว่าง 2500-3000 ลักซ์
2) เครื่องควบคุมเวลา (Timer)
3) เครื่องปรับอากาศ (Air Condition)

3.1.7 เครื่องมือที่ใช้บันทึกและเก็บข้อมูล

1) กล้องถ่ายรูป
2) ไม้บรรทัด
3) เครื่องชั่ง
4) สมุด
5) ปากกา

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมอาหาร

การเตรียมสารละลายเข้มข้นในสูตรอาหารของ Murahige and Skoog (1962) ดังตาราง ภาคผนวก ก

ขั้นตอนการเตรียมอาหาร

การเตรียมอาหาร ครั้งละ 1 ลิตร ใช้อาหารสูตร MS โดยเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ BA ในอัตราส่วนความเข้มข้นที่ต่างกัน

ขั้นที่ 1 เทน้ำกลั่นลงในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร ประมาณ 300 มิลลิลิตร

ขั้นที่ 2 ดูดสารละลายเข้มข้นสูตร MS ลงในบีกเกอร์ตามลำดับ

- สต็อคที่ 1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- สต็อคที่ 2-5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
- ใส่น้ำตาลซูโครส 30 กรัม

ขั้นที่ 3 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ตามความเข้มข้นที่กำหนด

ขั้นที่ 4 ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

ขั้นที่ 5 นำไปปรับความเป็นกรด-เบส (pH) ด้วยกรดเกลือ (HCl) และ

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) โดยให้ค่า pH ที่ได้อยู่ระหว่าง 5.6–5.8

ขั้นที่ 6 เติมผงวุ้น 7 กรัม คนให้วุ้นกระจายตัวดีแล้วยกไปวางบนเตาไฟฟ้าคนเบาๆ ตลอดเวลาจนวุ้นละลาย

ขั้นที่ 7 กรอกอาหารลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เตรียมไว้ ปิดฝาใส่ถุงพลาสติกแล้วรัดด้วยยางรัด

ขั้นที่ 8 นำอาหารที่ใส่ถุงเรียบร้อยแล้ว นำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ขั้นที่ 9 นำขวดเพาะเลี้ยงออกจากหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอที่เย็นแล้วเก็บในตู้ที่สะอาดมิดชิด เพื่อนำไปใช้เพาะเลี้ยงต่อไป

3.2.2. ศึกษาผลของ BA ต่อการเจริญเติบโตของไพลเหลือง ไพลดำ และขิง

โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ส่วนคือ ผลของ BA ต่อการเจริญเติบโตของไพลเหลือง ไพลดำและขิง มีขั้นตอนดังนี้

1. นำเหง้าไพลเหลือง ไพลดำ และขิงมาล้างให้สะอาด นำไปปลูกลงในกระบะทรายเพื่อให้เกิดการงอกเป็นหน่ออ่อนออกมา โดยรดน้ำทุกๆ 5 วัน เนื่องจากถ้าหากว่า รดน้ำบ่อยเกินไปจะ ทำให้เหง้าไพลเหลือง ไพลดำ และโดยเฉพาะขิงเกิดการเน่าได้

2. ตัดแยกหน่ออ่อนซึ่งมีตาอยู่ด้วย ที่มีขนาดยาวประมาณ 5 นิ้ว (ภาพที่ ข.1) ออกจากเหง้า นำมาล้างให้สะอาด แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) นาน 15 นาที

3 ล้างสารละลายฟอกฆ่าเชื้อออกด้วยน้ำกลั่น ที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

4 นำหน่อที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดแต่งบริเวณที่เนื้อเยื่อสัมผัสกับสารเคมีฟอกฆ่าเชื้อรวมทั้งตัดส่วนกาบใบทิ้ง

5 ตัดแบ่งโคนหน่ออ่อนออกเป็น 4 ชิ้น ตามแนวแทยงมุม (ภาพที่ ข.2)

6 นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารกระตุ้นการเจริญเติบโต คือ BA ความเข้มข้น 0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปตั้งไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

(ภาพที่ ข.3) เพื่อทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตโดยทำการย้ายเนื้อเยื่อเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ บันทึกผลการเจริญเติบโตหลังการเพาะเลี้ยง

3.2.3. ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยง

นำขวดที่เพาะเลี้ยง มาตั้งไว้ในที่มีแสง และอุณหภูมิห้องนาน 10 วัน หลังจากนั้น จึงนำต้นอ่อนออกจากขวด ล้างน้ำให้ อาหารวุ้นที่ติดกับรากออกให้หมดนำมาปลูกในโรงเรือนเพาะชำ ในกระบะขนาด 2 x 2 นิ้ว วัสดุปลูก ทราย ดิน ขุยมะพร้าว ในอัตราส่วน 2 : 2 : 1 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วบันทึกข้อมูล อัตราการรอดชีวิต

3.2.4 การบันทึกผลการทดลองและวิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

การบันทึกผลการทดลองได้แก่ ผลการเจริญเติบโตคือ จำนวนยอด และความสูงของยอด และการเปลี่ยนแปลงอื่นของชิ้นส่วนพืช โดยทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยวิธี Complete Randomized Design, CRD

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวาน

3.3 วัสดุอุปกรณ์

3.3.1 พืชทดลอง

1) ชิ้นส่วนของใบของหญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

3.3.2 เครื่องแก้ว ใช้อุปกรณ์ เครื่องแก้ว และเครื่องมือ เหมือนกับในการทดลอง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไพล

3.3.3 สารเคมี ใช้เหมือนกับในการทดลอง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไพล โดยมีการเพิ่มเติม คือ สารเคมีวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส

สารเคมีวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส

1. กลูโคส (glucose, $C_6H_{12}O_6$)
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH)

3. ไดไนโตรซาลิไซลิก แอสิด (dinitrosalicylic acid, $C_7H_4N_2O_7$)

4. น้ำกลั่น

3.3.4 เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหาร ใช้เหมือนกับในการทดลองการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไพล

3.3.5 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส

1) เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer)

2) เครื่องเขย่า (vortex mixer)

3) ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)

3.3.6 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการตัดเนื้อเยื่อ ใช้เหมือนกับในการทดลองการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไพล

3.3.7อุปกรณ์เลี้ยงเนื้อเยื่อภายหลังการย้ายเนื้อเยื่อลงขวดอาหาร

- ชั้นวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีหลอดไฟฟลูออเรสเซนส์
- เครื่องควบคุมเวลาปิด-เปิดไฟ

3.4 วิธีดำเนินงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวาน

3.4.1 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. วางแผนการทดลอง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 7 ชุดการทดลอง (Treatment) และทำการทดลองละ 10 ซ้ำ จำนวน 3 ครั้ง

2. เตรียมอาหารสูตร MS (1962) ซึ่งเติม NAA และ BA ในอัตราส่วนความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงอัตราส่วนความเข้มข้นของ NAA และ BA ในสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยง

สูตรอาหาร	ปริมาณ NAA (มิลลิกรัม ต่อลิตร)	ปริมาณ BA (มิลลิกรัม ต่อลิตร)
T1	0	0
T2	1	0
T3	0	1
T4	1	1
T5	2	1
T6	1	2
T7	2	2

3.4.2 วิธีการทดลอง

ขั้นตอนการเตรียมสารที่ใช้ในการทดลอง

1. **การเตรียมอาหาร**

1.1 การเตรียมสารละลายเข้มข้นในสูตรอาหารของ Murahige and Skoog (1962) ดังตารางภาคผนวก ก

1.2 ขั้นตอนการเตรียมอาหาร เตรียมครั้งละ 1 ลิตร ใช้อาหารสูตร MS ดัดแปลง โดยเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ NAAและ BA ในอัตราส่วนความเข้มข้นที่ต่างกัน

ขั้นที่ 1 เทน้ำกลั่นลงในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร ประมาณ 300 มิลลิลิตร

ขั้นที่ 2 ดูดสารละลายเข้มข้นสูตร MS ลงในบีกเกอร์ตามลำดับ

- สต็อคที่ 1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- สต็อคที่ 2-5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
- ใส่น้ำตาลซูโครส 30 กรัม

ขั้นที่ 3 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ตามสูตร

ขั้นที่ 4 ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

ขั้นที่ 5 นำไปปรับความเป็นกรด-เบส (pH) ด้วยกรดเกลือ (HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) โดยให้ค่าที่ได้ประมาณ 5.6-5.7

ขั้นที่ 6 เติมผงวุ้น 7 กรัมคนให้วุ้นกระจายตัวดีแล้วยกไปวางบนเตาไฟฟ้าคนเบาๆ ตลอดเวลาจนวุ้นละลาย

ขั้นที่ 7 กรอกอาหารลงในขวดเพาะลี้ยงเนื้อเยื่อที่เตรียมไว้ ปิดฝาใส่ถุงพลาสติกแล้ว รัดด้วยยางรัด

ขั้นที่ 8 นำขวดอาหารที่ทำการกรอกอาหารเรียบร้อยแล้ว นำเข้าเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ(Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ขั้นที่ 9 นำขวดเพาะเลี้ยงออกจากหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอที่เย็นแล้วเก็บในตู้ที่สะอาดมิดชิด

2. วิธีการตัดเนื้อเยื่อ

ทำความสะอาดภายในห้องตัดเนื้อเยื่อ และทำการเช็ดตู้ย้ายเนื้อเยื่อ ด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เปิดหลอดรังสีอัลตราไวโอเลตเพื่อฆ่าเชื้อภายในตู้อย่างน้อย 30 นาที

เตรียมต้นหญ้าหวาน ตัดส่วนใบนำส่วนใบที่ได้มาทำความสะอาดโดยการล้างด้วยน้ำยาล้างจานเจือจางแล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด

นำส่วนใบของหญ้าหวนที่ผ่านการล้างนำเข้าตู้ตัดเนื้อเยื่อ นำไปฟอกฆ่าเชื้อ บริเวณผิวด้วยคลอร็อกซ์ (Clorox) 10 เปอร์เซ็นต์ ที่หยด tween-20 จำนวน 1-2 หยด เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที ทำการฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วยคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่หยด tween-20 จำนวน 1-2 หยด เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที ทำการล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที คีบส่วนใบวางบนจานเพาะเชื้อ แล้วทำการตัดเนื้อเยื่อโดยใช้มีดที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว ตัดส่วนที่สัมผัสโดนคลอร็อกซ์ออกทิ้งประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทำการตัดชิ้นส่วนของใบขนาดประมาณ 0.5 × 0.5 เซนติเมตร ไปวางบนอาหารที่เตรียมไว้ ตามสูตร 1-7 นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ตัดเนื้อเยื่อเสร็จแล้วไปวางบนชั้นวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ บันทึกข้อมูลทุกๆ 1 สัปดาห์ ตั้งแต่เริ่มเกิดแคลลัส เป็นเวลา 1 เดือน เมื่อครบ 1 เดือน ทำการตัดแบ่งเนื้อเยื่อแคลลัสไปยังอาหารชุดใหม่ บันทึกข้อมูลทุก ๆ สัปดาห์

3. ขั้นตอนการบันทึกข้อมูล

สังเกตและบันทึกผลการทดลอง นับจากวันที่เริ่มมีการเจริญ โดยสังเกตและบันทึกผลจากขนาดของแคลลัส โดยวัดค่าด้านกว้าง ด้านยาว น้ำหนักของแคลลัส บันทึกภาพถ่ายด้วยกล้องถ่ายรูป

4. วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี การวิเคราะห์ข้อมูลโดยหาค่าเฉลี่ย การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยวิธีของ Least Significant Difference (LSD)

มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่
CHIANG MAI RAJABHAT UNIVERSITY