บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

เมล็ดมังคุด

1.2 สารเคมี

- สารเคมีที่ใช้เตรียมธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรองของอาหารสูตร MS
- น้ำตาลซูโครส กลูโคส แลคโตส ฟรุกโตส ซอร์บิทอล และแมนนิทอล
- วุ้น Agar-agar, Agarose, Bacto-agar และPhytagel
- polyvinylpyrolidone (PVP)
- สารควบคุมการเจริญเติบโต BA
- อะซีโตน
- โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)
- เอทธานอล
- คลอร็อกซ์

2. อุปกรณ์

- เครื่องแก้วประกอบด้วย ปิเปต กระบอกตวง ขวดปรับปริมาตร บีกเกอร์ จานเพาะเลี้ยง ขวดเพาะเลี้ยง และสไลด์
- อุปกรณ์ในการย้ายเลี้ยง ประกอบด้วย ปากคีบ กระดาษชำระ ด้ามมีด และ ใบมีดผ่าตัด
- อุปกรณ์ในการเตรียมและวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ ประกอบด้วย กรวยกรอง กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 โกร่ง และเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectophotometer)
- อุปกรณ์ในการเตรียมอาหาร ประกอบด้วย หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ตู้อบแห้ง ตู้อบฆ่าเชื้อ ตู้ย้ายเลี้ยง ตู้เย็น เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง และเครื่องวัด pH
- อุปกรณ์ในการบันทึกภาพ ประกอบด้วย กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ กล้องดิจิตอล และกล้องจุลทรรศน์อินเวอร์เต็ด
- อุปกรณ์อื่น ๆ ใบมีดโกน พู่กัน

วิธีการ

1. ผลของชนิดวุ้นและการสร้างแผลต่อการเกิดแคลลัสและยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดมังคุดในหลอดทดลอง

นำผลมังคุดมาผ่าและแกะเอาเนื้อผลออก ล้างส่วนเส้นใยที่เป็นมัดท่อน้ำท่ออาหารออกจนหมด แช่ในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นาน 15 นาที ล้างเส้นใยออกโดยการถูเมล็ดเบา ๆ ด้วยน้ำประปาหลาย ๆ ครั้ง จนสะอาด ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ เติมสารจับใบทวีน 20 1-2 หยดต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร นาน 20 นาที เมื่อครบกำหนดนำเข้าตู้ย้ายเลี้ยงล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3-5 ครั้ง เพาะเลี้ยงทั้งเมล็ดและตัดแบ่งเป็น 3 ชิ้นส่วนต่อเมล็ดบนอาหารสูตร MS เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นชนิดต่าง ๆ คือ Agar-agar (ห้างหุ้นส่วนจำกัด พัฒนาสินเอ็นเตอร์ไพรส์), Agarose (บริษัท sigma ชนิด II-A; Medium EEO), Bacto-agar (Difco) และ Phytagel (บริษัท sigma) ความเข้มข้น 0.75, 0.75, 1.5 และ 0.17 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เพาะเลี้ยงบนอาหารในขวดขนาด 4 ออนซ์ ซึ่งบรรจุอาหารปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงขวดละ 1 ชิ้น ทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ขวด ที่อุณหภูมิ 28$\pm$2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์แคลลัสและยอดรวม จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน และเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดกุดและยอดแก้วเปรียบเทียบกันในวุ้นและการสร้างแผลแต่ละชนิด

1.1 การตรวจสอบอัตราการสร้างยอดรวม โดยการนับจำนวนชิ้นส่วนพืชที่สร้างยอดรวมและจำนวนชิ้นส่วนพืชทั้งหมด แล้วนำมาคำนวนเปอร์เซ็นต์ ดังนี้

$$\text{อัตราการสร้างยอดรวม (\%)} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนพืชที่สร้างยอดรวม}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100$$

1.2 การตรวจสอบจำนวนยอด โดยการนับจำนวนยอดบนชิ้นส่วนพืชและจำนวนชิ้นส่วนพืชที่สร้างยอดรวม แล้วนำมาคำนวนดังนี้

$$\text{จำนวนยอด (ยอด/ชิ้นส่วนพืชที่สร้าง)} = \frac{\text{จำนวนยอดบนชิ้นส่วนพืช}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนพืชที่สร้างยอดรวม}}$$

2. ผลของชนิดวุ้นต่อปริมาณคลอโรฟิลล์

ศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์จากใบมังคุดที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารเติมวุ้นชนิดต่าง ๆ หลังเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน ใช้ใบสดหนัก 1 กรัม มาบดในสารละลายอะซีโตน 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ให้ละเอียด กรองสารที่สกัดได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนตะกอนที่เหลือมาบดอีกครั้งในสารละลายเดียวกันปริมาตร 20 มิลลิลิตร จนเห็นว่าไม่มีสีเขียวในส่วนของใบ จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาล้างโกร่งที่ใช้บดและกรวยกรองปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปกรองและผสมสารละลายที่กรองได้ในแต่ละครั้งเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง นำค่าที่ได้มาคำนวนความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ โดยใช้สูตรของ Withan และคณะ (1996) อ้างโดย ราตรี (2540) ดังนี้

$$\text{คลอโรฟิลล์ a} = [127(D_{663}) - 2.69\,(D_{645})] \times \frac{V}{1000 \times W}$$

$$\text{คลอโรฟิลล์ b} = [22.9(D_{645}) - 4.68\,(D_{663})] \times \frac{V}{1000 \times W}$$

$$\text{คลอโรฟิลล์รวม} = [20.2(D_{645}) + 8.02\,(D_{663})] \times \frac{V}{1000 \times W}$$

(D_{645})และ (D_{663}) เป็นการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร ตามลำดับ
V เป็นปริมาตรสุดท้ายของคลอโรฟิลล์ที่สกัดได้
W เป็นน้ำหนักของใบ

ปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ตรวจสอบได้มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อน้ำหนักใบ 1 กรัม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด วิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างปริมาณคลอโรฟิลล์โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

3. ขนาดและจำนวนเซลล์ปากใบของใบปกติและใบแก้ว

นำใบแก้วและใบปกติที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารเติมวุ้น Phytagel มาเฉือนผิวใบบริเวณท้องใบเป็นแผ่นบาง ๆ วางบนสไลด์ หยดน้ำกลั่นลงบนชิ้นส่วนใบและปิดด้วยกระจกปิดไสลด์ นำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 200 เท่า แต่ละชนิดของใบ ใช้ตัวอย่างใบจำนวน 5 ใบ แต่ละใบตรวจสอบ 3 ตำแหน่ง เปรียบเทียบลักษณะขนาดเซลล์ปากใบและนับจำนวน

เซลล์ปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

4. ลักษณะทางสัณฐานและกายวิภาคของใบ และลำต้นทั้งชนิดปกติและแก้ว

นำชิ้นส่วนใบ และลำต้นทั้งชนิดปกติและแก้วที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารเติมวุ้น Phytagel เป็นเวลานาน 2 เดือน มาส่องด้วยกล้องสเตอริโอ บันทึกความยาว ความกว้าง สี และลักษณะของใบและลำต้น จากนั้นใช้ใบมีดโกนเฉือนตามขวางเป็นแผ่นบาง ๆ วางบนสไลด์หยดน้ำกลั่นลงบนชิ้นส่วนพืชปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อินเวอร์เต็ด โดยใช้ตัวอย่างใบจำนวน 5 ใบ และลำต้นจำนวน 5 ต้น ในแต่ละชิ้นส่วนตรวจสอบ 2 ตำแหน่ง ตรวจสอบลักษณะของเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบภายในชิ้นส่วนพืชเปรียบเทียบกันระหว่างใบ/ลำต้นปกติและใบ/ลำต้นแก้ว

5. ผลของชนิดใบและวุ้นต่อการเจริญของยอดรวม

ในการศึกษานี้ใช้ใบ 2 ชนิดคือใบปกติและใบแก้ว และวุ้น 4 ชนิดคือ Agar–agar, Agarose, Bacto-agar และ Phytagel ในกรณีของใบปกติใช้ใบจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสองชั้น ชั้นล่างเป็นอาหารแข็งสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร PVP 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และวุ้น Agarose 0.75 เปอร์เซ็นต์ ชั้นบนเติมอาหารเหลวสูตร ½ MS เติม NAA 0.06 BA 0.03 และ TDZ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนใบแก้วได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสองชั้นเช่นเดียวกัน แต่อาหารแข็งชั้นล่างเติมวุ้น Phytagel 0.17 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงนาน 1 เดือน นำใบปกติที่มีสีแดงขนาดกว้าง 0.27 เซนติเมตร และยาว 0.85 เซนติเมตรโดยเฉลี่ย สำหรับใบแก้วมีขนาดกว้าง 0.26 เซนติเมตร และยาว 1.53 เซนติเมตรโดยเฉลี่ย เพาะเลี้ยงทั้งใบโดยให้ท้องใบสัมผัสอาหารบนอาหารสูตร MS เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมวุ้นชนิดต่าง ๆ คือ Agar–agar, Agarose, Bacto-agar และ Phytagel เข้มข้น 0.75, 0.75, 1.5 และ 0.17 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 20 หลอด แล้วนำไปเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพการให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 2,860 ลักซ์ อุณหภูมิ 26.5±1.5 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน บันทึกการสร้างแคลลัส ยอด เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดของใบและวุ้น

6. ผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเจริญของยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดมังคุดในหลอดทดลอง

นำผลมังคุดนำมาผ่าและแกะเอาเนื้อผลออก ทำการฟอกฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับวิธีการศึกษาที่ 1 หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงทั้งเมล็ดบนอาหารสูตร MS เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้น Agarose 0.75 เปอร์เซ็นต์ เติมน้ำตาล 6 ชนิดคือ ซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส แลคโตส ซอร์บิทอล และแมนนิทอล แต่ละชนิดใช้ความเข้มข้น 3, 4, 5, 6 และ 7 % เพาะเลี้ยงบนอาหารในขวดขนาด 4 ออนซ์ ซึ่งบรรจุอาหารปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงขวดละ 1 ชิ้น ทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ชิ้นเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26.5±3.8 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสและยอดรวม จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน ความยาวยอด เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดกุด และยอดแก้ว เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาล โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

7. ผลของชนิดน้ำตาลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์

ศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์จากใบมังคุดที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร MS เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมวุ้น Agarose 0.75 เปอร์เซ็นต์ ไม่เติมและเติมน้ำตาล 4 ชนิด คือ ซูโครส, กลูโคส, แลคโตส, และฟรุกโตส ระดับความเข้มข้นที่ให้จำนวนยอด และลักษณะยอดดีที่สุดจากการศึกษาในเรื่องชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลในวิธีการศึกษาที่ 6 หลังเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน นำใบมาสกัดและคำนวนหาความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เช่นเดียวกับวิธีการศึกษาที่ 2 คลอโรฟิลล์ที่ตรวจสอบได้มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อน้ำหนักใบ 1 กรัม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด วิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างปริมาณคลอโรฟิลล์โดยวิธี DMRT