บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.1.1 ตัวอย่างพืช

หน่อกะลา (*Alpinia nigra* B.L.Burtt) เก็บตัวอย่างจาก เกาะเกร็ด นนทบุรี

ข่า (*Alpinia galangal* Swartz) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหาร MS

Ammonium nitrate	(NH_4NO_3)
Potassium nitrate	(KNO_3)
Calcium chloride	($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)
Magnesium sulphate heptahydrate	($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
Potassium dihydrogen phosphate	(KH_2PO_4)
Manganese sulfate	($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)
Zinc sulfate	($ZnSO_4 \cdot 5H_2O$)
Boric acid	(H_3BO_3)
Iron(II) sulfate heptahydrate	(FeSO4·7H2O)
Potassium Iodide	(KI)
Sodium molybdate dihydrate	($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)
Copper (II) sulfate pentahydrate	($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)
Cobalt (II) Chloride	($CoCl_2 \cdot H_2O$)
Nicotinic acid	($C_6H_5NO_2$)
Thiamine-HCl	($C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$)
Pyridoxine-HCl	($C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$)
Glycine	($C_2H_5NO_2$)
Ferrous sulfate	($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)

Ethylenediaminetetraacetic Acid, Disodium Salt ($Na_2EDTA \cdot 2H_2O$)

Potassium hydroxide (KOH)

Hydrochloric acid (HCl)

น้ำตาลซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$)

Agar

3.1.2.2 สารประเภทฮอร์โมนพืช

6-Benzylaminopurine (BA)

3.1.2.3 สารเคมีที่ใช้ทั่วไป

Ethanol 70, 95%

Formaldehyde

Potassium permanganat ($KMnO_{4)}$

น้ำกลั่น (RO)

3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

Forceps

Hot Plate

Autoclave : Model HA-300M

pH meter

เครื่องชั่งสาร 4 ตำแหน่ง

เครื่องชั่งสาร 2 ตำแหน่ง

ด้ามจับมีดเบอร์ 3

ใบมีด

ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow)

ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

อาหารแข็งสูตรต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง จะทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ระหว่าง 5.6 - 5.7 ทำการนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C นาน 20 นาที

3.2.2 การเตรียมวัสดุพืชและวิธีฟอกฆ่าเชื้อ (Surface Sterilization) เพื่อนำชิ้นส่วนพืชไปเลี้ยงภายใต้สภาพปลอดเชื้อ

นำเหง้าของข่าและหน่อกะลาที่ได้รับการคัดพันธุ์ มาทำการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาไหลผ่าน ตัดเฉพาะส่วนตาที่อยู่บนเหง้า (Rhizome buds) ขนาดประมาณ 1x1x1 เซนติเมตร^3 มาแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสม Tween® 20 ปริมาตร 1 หยด ต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร เขย่านาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ตัดย้ายเฉพาะส่วนของตาเหง้า วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS, 1962) ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไม่เติมฮอร์โมน เพื่อชักนำให้เกิดการสร้างยอดใหม่ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ยอดใหม่ที่แตกจากตาเหง้าจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.3 การศึกษาผลของฮอร์โมนต่อการชักนำให้เกิดยอด (Shoot induction) จากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงตาเหง้าข่าและหน่อกะลา

3.2.3.1 การทดสอบหาสูตรอาหารที่เหมาะสม

นำชิ้นส่วนต้นข่าและหน่อกะลาที่แตกออกจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงตาเหง้ามาตัดใบและรากออกให้เหลือความยาว ประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ Agargel® 7.2 กรัมต่อลิตร เติมฮอร์โมน BAP (benzyl aminopurine) ที่ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับชิ้นส่วนที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่ไม่ได้เติมฮอร์โมน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 -27 องศาเซลเซียส แสงสว่างจากหลอดไฟเรืองแสงสีขาว (white light fluorescence) ความเข้มแสงประมาณ 37.5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที (μmole $m^{-2}s^{-1}$) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

3.2.3.2 การประเมินผลจากการกระตุ้นการเกิดยอด

หลังจาก 7 วัน ตรวจสอบว่าตัวอย่างมีการปนเปื้อนหรือไม่ บันทึกอัตราการตอบสนองการสร้างจำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย ทุก 4 สัปดาห์

3.2.4 การศึกษาผลของน้ำตาลและแสงต่อการชักนำให้เกิดไมโครไรโซม (microrhizome)

3.2.4.1 การทดลองหาระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส

นำชิ้นส่วนต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตาเหง้า มาตัดใบ และรากออกให้มีความยาวเหลือประมาณ 1 เซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่ทำ

การดัดแปลงโดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลเป็น 30, 60, 90 และ 120 กรัมต่อลิตร นำไปเลี้ยงภายใต้แสงที่ความเข้มแสง 37.5 μmole $m^{-2}s^{-1}$ เป็นเวลา 24, 16, 8 และ 0 (ที่มืด) ชั่วโมงต่อวัน โดยทำการเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

3.2.4.2 การบันทึกผลการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

การบันทึกผลการทดลอง บันทึกจำนวนยอด ความยาวยอด จำนวน ราก ความยาวราก จำนวนไมโครไรโซม และลักษณะทางสัณฐานวิทยา เปรียบเทียบกับต้นควบคุมที่มีอายุเท่ากัน โดยการทดลองในข่า มีจำนวน 5 ซ้ำต่อหน่วยทดลอง ในหน่อกะลา มีจำนวน 10 ซ้ำต่อหน่วยทดลอง ทำการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS

3.2.4.3 การตรวจสอบการชักนำให้เกิดไมโครไรโซม

ยอดที่เกิดใหม่และมีส่วนโคนขยายใหญ่ขึ้นโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 0.5 เซนติเมตร จะนับเป็นส่วน ไมโครไรโซม แต่ถ้ามีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า ให้นับเป็นส่วนยอด นอกจากนี้การตรวจสอบสามารถทำได้โดย anatomical technique

3.2.4.4 การตรวจสอบการเกิดไมโครไรโซมโดย Anatomical technique

การศึกษาการสะสมของแป้งในส่วนไมโครไรโซมที่ถูกชักนำให้เกิดขึ้นโดยวิธีการนี้ ทำโดยการนำชิ้นส่วนไมโครไรโซมมาหั่นเป็นชิ้นบาง ๆ แล้วย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน การสะสมของแป้งสามารถตรวจสอบได้โดยการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Lo-apirukkul S. และคณะ, 2011)