

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดและการเจริญของต้นอ่อนเสาวรสที่ทำการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

3.1.1 ผลของอาหารเพาะเลี้ยงและปริมาณชูโครสที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดและการเจริญของต้นอ่อนเสาวรส

ในการทดลองจะเปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของสูตรอาหารพื้นฐานที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเสาวรสและปริมาณชูโครสในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดยอดและการเจริญของต้นอ่อนเสาวรส โดยในแต่ละวิธีการทำซ้ำ 20 ซ้ำ ให้ 1 ซ้ำ คือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ยอดต่อ 1 ขวดทดลอง (n=20)

- (1) ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของเสาวรสที่ปลอดเชื้อบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS หรือ B5 ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบของสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ได้แก่ ความเข้มข้นขององค์ประกอบเท่ากับ ครึ่งเท่า หนึ่งเท่า และสองเท่า ของสูตรอาหารปกติที่มีการเติมชูโครสที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (15-90 กรัมต่อลิตร) และสารที่ทำให้อาหารแข็งตัว KELCOGEL® 3.0 กรัมต่อลิตร
- (2) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยทำการย้ายเพื่อเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์
- (3) การตรวจวัดผลโดยทำการบันทึกจำนวนยอด ความยาวของยอด และจำนวนยอดที่มีการเกิดราก จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan Multiple's Rang Test (DMRT)

3.1.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอด การเพิ่มปริมาณยอด และการเจริญของต้นอ่อนเสาวรส

ในการทดลองจะเปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน เพื่อหาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดยอด การเพิ่มปริมาณยอด และการเจริญของต้นอ่อนเสาวรส

- (1) ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของเสาวรสที่ปลอดเชื้อบนอาหารกึ่งแข็งสูตรที่เหมาะสม (ผลจากการศึกษาในข้อ 3.1.1) ที่เติมสารที่ทำให้อาหารแข็งตัว KELCOGEL® 3 กรัมต่อลิตร และเติมไซโตไคนินที่แตกต่างชนิด ได้แก่ 6-benzylaminopurine (BAP) และ thaidizuron (TDZ) ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันในช่วงความเข้มข้น 0 - 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยในแต่ละวิธีการทำซ้ำ 20 ซ้ำ ให้ 1 ซ้ำ คือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ยอดต่อ 1 ขวดทดลอง (n=20)
- (2) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยทำการย้ายเพื่อเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์

- (3) การตรวจวัดผลโดยทำการบันทึกจำนวนยอด ความยาวของยอด และจำนวนยอดที่มีการเกิดราก จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan Multiple's Rang Test (DMRT)

3.2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินต่อการชักนำให้เกิดรากของต้นอ่อนเสาวรส

ในการทดลองทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากของต้นอ่อนเสาวรส

- (1) ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของเสาวรสที่ปลอดเชื้อบนอาหารกึ่งแข็งสูตรที่เหมาะสมและเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณยอดและการเจริญของยอด (ผลจากการศึกษาในข้อ 3.1) โดยทำการย้ายเพื่อเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์
- (2) นำยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงซึ่งมีความยาวประมาณ 2.5-3 เซนติเมตร มาทำการย้ายเปลี่ยนอาหารโดย
 - 2.1) ชุดทดลองที่ 1 ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งสูตรเดียวกับข้อ (1) และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ชนิด IBA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในช่วงความเข้มข้น 0.5-3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยในแต่ละวิธีการทำซ้ำ 10 ซ้ำ ให้ 1 ซ้ำ คือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ยอดต่อ 1 ชุดทดลอง (n=10)
 - 2.2) ชุดทดลองที่ 2 ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งสูตรเดียวกับข้อ (1) ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน โดยทำการเติมเฉพาะออกซิน IBA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในช่วงความเข้มข้น 0.5-3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยในแต่ละวิธีการทำซ้ำ 10 ซ้ำ ให้ 1 ซ้ำ คือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ยอดต่อ 1 ชุดทดลอง (n=10)
- (3) การตรวจวัดผลโดยทำการบันทึกจำนวนยอดที่มีการเกิดราก และการเกิดแคลลัส โดยรายงานผลในรูปของเปอร์เซ็นต์ของจำนวนยอดที่เกิดรากและ เปอร์เซ็นต์ของจำนวนยอดที่เกิดแคลลัส

3.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเสาวรสเพื่อจัดเตรียมต้นกล้าแม่พันธุ์เสาวรสหวานเบอร์ 2 ปลอดโรคไวรัส ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- (1) ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของเสาวรสที่ปลอดเชื้อบนอาหารกึ่งแข็งสูตรที่เหมาะสม ที่มีการเติมสารที่ทำให้อาหารแข็งตัว KELCOGEL® 3 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่เหมาะสม (ผลจากการศึกษาในข้อ 3.1) โดยทำการย้ายเพื่อเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์
- (2) นำยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงซึ่งมีความยาว 2.5-3 เซนติเมตร มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมออกซิน IBA ที่เหมาะสม (ผลจากการศึกษาในข้อ 3.2) ทำการเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์
- (3) เมื่อได้ต้นกล้าแม่พันธุ์เสาวรสหวานเบอร์ 2 ปลอดโรคไวรัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำการทดสอบเพื่อยืนยันว่าต้นกล้าที่ได้ปลอดโรคไวรัสโดยการสุ่มต้นกล้ามาทำการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA เพื่อยืนยันผลการปลอดไวรัสของยอดเสาวรส จำนวนอย่างน้อย 60 ต้น

3.4 การตรวจสอบเพื่อยืนยันผลการปลอดไวรัสของยอดเสาวรส ด้วยวิธี ELISA

ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธี ELISA เพื่อยืนยันผลการปลอดไวรัสของเสาวรส จะทำโดยการเก็บตัวอย่างใบอ่อนจากยอดเสาวรสแล้วส่งตัวอย่างของเสาวรสให้แก่ คลินิกสุขภาพพืช ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสนมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เป็นผู้ดำเนินการตรวจสอบการเกิดโรคด้วยวิธี ELISA โดยใช้แอนติซีรั่มต่อ potyvirus (CABMV และ TuMV)

วิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธี ELISA ทำได้โดย

- (1) บดตัวอย่างใบเสาวรส ใน carbonate coating buffer ($0.015\text{ M Na}_2\text{CO}_3$, 0.035 M NaHCO_3 pH 9.6) ที่แช่เย็น ในอัตรา 1 กรัมของตัวอย่างพืช ต่อบัพเฟอร์ปริมาตร 2 มล. (1:20 กรัม/มล.)
- (2) คุดนํ้าคั้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมของ ELISA plate บ่มไว้ในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือแช่ที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
- (3) ล้าง plate ด้วย $1 \times$ PBST ($140\text{ mM Na}_2\text{CO}_3$, $2\text{ mM KH}_2\text{HPO}_4$, $8\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 mM KCl , 0.05% Tween20) 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
- (4) เตรียม anti-rabbit IgG alkaline phosphatase ที่เจือจางในอัตรา 1:30,000 (โดยปริมาตร ใน conjugate buffer) นำไปใส่ในหลุมตัวอย่างที่ล้างแล้วหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องขึ้น ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้าง plate ตามวิธีเดิม
- (5) เตรียม 5% p-nitrophenyl phosphate ใน substrate buffer (diethanolamine 9.7% โดยปริมาตร, pH 9.8) ใส่ในหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 - 60 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 3M NaOH ปริมาตร 50 ไมโครลิตร
- (6) อ่านค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

3.5 สถานที่ดำเนินการวิจัย

3.5.1 พื้นที่ของมูลนิธิโครงการหลวง

3.5.2 ห้องวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและโรงเรือนเพื่อการอนุบาลพืชภาควิชาวิทยาศาสตร์
คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

