

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 การคัดเลือกเสาวรสหวานเบอร์ 2 จากแปลงเกษตรกร

จากข้อมูลของงานพัฒนาและส่งเสริมไม้ผลขนาดเล็ก มูลนิธิโครงการหลวง พบว่า มีพื้นที่ที่มีการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเสาวรสหวานเบอร์ 2 ในหลายพื้นที่ของศูนย์พัฒนาโครงการหลวงและสถานีวิจัยของมูลนิธิโครงการหลวง โดยในเบื้องต้น คณะผู้วิจัยได้ลงพื้นที่เพื่อประสานขอเข้าทำการศึกษาและเก็บตัวอย่างยอดเสาวรสจากแปลงของเกษตรกร ซึ่งได้รับความร่วมมือจากเกษตรกรเจ้าของพื้นที่ คณะผู้วิจัยจึงกำหนดพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างยอดเสาวรสจากแปลงเกษตรกรจำนวน 8 พื้นที่ เพื่อเก็บตัวอย่างยอดเสาวรสจากแปลงของเกษตรกร

3.1.1 คัดเลือกยอดเสาวรสหวานจากของแปลงเกษตรกร จำนวน 8 ศูนย์/สถานี ได้แก่

- สถานีเกษตรหลวงปางดะ	อำเภอสะเมิง	จังหวัดเชียงใหม่
- ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่แพะ	อำเภอสะเมิง	จังหวัดเชียงใหม่
- ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงทุ่งหลวง	อำเภอแม่วาง	จังหวัดเชียงใหม่
- สถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด	อำเภอแม่แตง	จังหวัดเชียงใหม่
- ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่โจ้	อำเภอฮอด	จังหวัดเชียงใหม่
- ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหมอกจ๋าม	อำเภอแม่อาว	จังหวัดเชียงใหม่
- ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงสะโง๊ะ	อำเภอเชียงแสน	จังหวัดเชียงราย
- ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่สะเรียง	อำเภอแม่สะเรียง	จังหวัดแม่ฮ่องสอน

3.1.2 คัดเลือกยอดที่มีความสมบูรณ์แข็งแรง และไม่มีอาการของเชื้อไวรัสจากแปลงเกษตรกรจำนวน 8 ศูนย์/สถานี ละ 100 ยอด และทำการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธี ELISA เพื่อยืนยันผลการปลอดไวรัสของยอดเสาวรสที่ผ่านการคัดเลือก โดยการเก็บตัวอย่างใบอ่อนจากยอดที่ทำการคัดเลือก ตรวจสอบการเกิดโรคด้วยวิธี ELISA โดยใช้แอนติซีรัมต่อ potyvirus (CABMV และ TuMV) อ่านค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

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 ต่อบัฟเฟอร์ปริมาตร 2 มล. (1:20 กรัม/มล.)
- (2) ดูดน้ำคั้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมของ ELISA plate บ่มไว้ในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือแช่ที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
- (3) ล้าง plate ด้วย $1 \times$ PBST ($140\text{ mM Na}_2\text{CO}_3$, $2\text{ mM KH}_2\text{HPO}_4$, $8\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ $2\text{H}_2\text{O}$, 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) ใส่ในหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 - 60 นาที หยุดปฏิกิริยา ด้วยสารละลาย 3M NaOH ปริมาตร 50 ไมโครลิตร
- (6) อ่านค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

3.2 การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการผลิตต้นแม่พันธุ์เสาวรสหวานเบอร์ 2 พลดโรคไวรัส

โดยศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเนื้อเยื่อเสาวรสหวานเพื่อการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์เสาวรสหวานในสภาพปลอดเชื้อ

3.2.1 ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมจำนวน 7 วิธีการ วิธีการละ 30 ชั่วโมง

- | | |
|--------------|---|
| วิธีการที่ 1 | สารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10% + เครื่องเขย่า |
| วิธีการที่ 2 | สารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 5% + สารลดแรงตึงผิว Tween 20 + เครื่องเขย่า |
| วิธีการที่ 3 | สารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10% + สารลดแรงตึงผิว Tween 20 + เครื่องเขย่า |
| วิธีการที่ 4 | สารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 15% + สารลดแรงตึงผิว Tween 20 + เครื่องเขย่า |
| วิธีการที่ 5 | สารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 5% + เครื่องเขย่าสารโดยใช้เสียงความถี่สูง |
| วิธีการที่ 6 | สารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 5% + สารลดแรงตึงผิว Tween 20 + เครื่องเขย่าสารโดยใช้เสียงความถี่สูง |
| วิธีการที่ 7 | สารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10% + สารลดแรงตึงผิว Tween 20 + เครื่องเขย่าสารโดยใช้เสียงความถี่สูง |

โดยมีรายละเอียด ดังนี้

วิธีการที่ 1 การฟอกฆ่าเชื้อยอดเสาวรสด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10% โดยปริมาตร มีรายละเอียดขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อ ดังนี้

- (1) นำยอดอ่อนเสาวรสที่มีความสมบูรณ์และไม่มีการปรากฏอาการของโรคจากไวรัส มาล้างน้ำเพื่อขจัดฝุ่นละออง และสิ่งสกปรกที่ติดมากับชิ้นส่วนพืช โดยใช้ น้ำสะอาด
- (2) แยกยอดอ่อนเสาวรสในสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10 % โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที โดยทำการเขย่าบนเครื่องเขย่า (shaker)

- (3) ตั้งแต่ขั้นตอนนี้เป็นต้นไป ดำเนินการในตู้ปลอดเชื้อโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ นำยอดอ่อนเสาวรสมาล้างสารฟอกฆ่าเชื้อออกโดยแช่ในน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที
- (4) ย้ายยอดอ่อนไปวางผึ่งบนจานแก้วให้แห้งพอหมาดๆ แล้วทำการตัดแต่งยอดอ่อนให้มีขนาดของชิ้นส่วนเริ่มต้นสูงประมาณ 0.3 – 0.5 เซนติเมตร
- (5) นำชิ้นส่วนพืชที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารมาตรฐาน Murashige and Skoog (1962) (MS basal medium) ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อทดสอบความปลอดเชื้อ ในการเพาะเลี้ยงใช้ชิ้นส่วนพืช 1 ชิ้นส่วน ต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยง นำชิ้นส่วนพืชไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมให้มีอุณหภูมิระหว่าง 25 ± 2 องศาเซลเซียสและมีอัตราการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์
- (6) ทำการตรวจนับจำนวนชิ้นส่วนพืชที่มีการปนเปื้อน ในช่วง 2 สัปดาห์ และเมื่อครบกำหนด 3 สัปดาห์ ทำการตรวจนับจำนวนชิ้นส่วนพืชที่มีแนวโน้มที่จะสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้
- (7) ทำการเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 6 – 10 สัปดาห์ โดยทำการย้ายเพื่อเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ บันทึกลักษณะของเนื้อเยื่อและความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สังเกตได้ ในกรณีที่ได้นต้นอ่อนที่สมบูรณ์จะทำการอนุบาลพืชเพื่อดูแลให้เจริญเติบโตในโรงเรือนต่อไป

วิธีการที่ 2 การฟอกฆ่าเชื้อยอดเสาวรสดด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 5% โดยปริมาตร และสารลดแรงตึงผิว Tween 20 ความเข้มข้น 0.1% โดยปริมาตร เพื่อช่วยให้สารฟอกฆ่าเชื้อจับกับผิวของตัวอย่างพืชได้ดีขึ้น ร่วมกับการใช้เครื่องเขย่า โดยขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อทำเช่นเดียวกับวิธีการที่ 1 แต่ในขั้นตอนการแช่ยอดเสาวรสดด้วยสารละลายคลอโรกซ์ จะทำการเติมสารลดแรงตึงผิวร่วมด้วย

วิธีการที่ 3 และ 4 การฟอกฆ่าเชื้อยอดเสาวรสดด้วยสารละลายคลอโรกซ์ และ สารลดแรงตึงผิว Tween 20 ความเข้มข้น 0.1% โดยปริมาตร ร่วมกับการใช้เครื่องเขย่า โดยขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อทำเช่นเดียวกับวิธีการที่ 2 แต่ใช้ความเข้มข้นของสารละลายคลอโรกซ์ที่ 10% และ 15 % โดยปริมาตร สำหรับ วิธีการที่ 3 และ 4 ตามลำดับ

วิธีการที่ 5 การฟอกฆ่าเชื้อยอดเสาวรสดด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ร่วมกับการใช้เครื่องเขย่าสาร โดยใช้เสียงความถี่สูง (Ultrasonic Sonicator) รายละเอียดขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อ มีดังนี้

- (1) นำยอดอ่อนเสาวรสดที่มีความสมบูรณ์และไม่มีการปรากฏอาการของโรคจากไวรัส มาล้างน้ำเพื่อขจัดฝุ่นละออง และสิ่งสกปรกที่ติดมากับชิ้นส่วนพืช โดยใช้น้ำสะอาด
- (2) แช่ยอดอ่อนเสาวรสดในสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 5 % โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที โดยทำการเขย่าบนเครื่องเขย่าสารโดยใช้เสียงความถี่สูง
- (3) ตั้งแต่ขั้นตอนนี้เป็นต้นไป ดำเนินการในตู้ปลอดเชื้อโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ นำยอดอ่อนเสาวรสมาล้างสารฟอกฆ่าเชื้อออกโดยแช่ในน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

- (4) ย้ายยอดอ่อนไปวางฝังบนจานแก้วให้แห้งพอหมาดๆ แล้วทำการตัดแต่งยอดอ่อนให้มีขนาดของชิ้นส่วนเริ่มต้นสูงประมาณ 0.3 – 0.5 เซนติเมตร
- (5) นำชิ้นส่วนพืชที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารมาตรฐาน Murashige and Skoog (1962) (MS basal medium) ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อทดสอบความปลอดภัย ในการเพาะเลี้ยงใช้ชิ้นส่วนพืช 1 ชิ้นส่วน ต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยง นำชิ้นส่วนพืชไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมให้มีอุณหภูมิระหว่าง 25 ± 2 องศาเซลเซียสและมีอัตราการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์
- (6) ทำการตรวจนับจำนวนชิ้นส่วนพืชที่มีการปนเปื้อน ในช่วง 2 สัปดาห์ และเมื่อครบกำหนด 3 สัปดาห์ ทำการตรวจนับจำนวนชิ้นส่วนพืชที่มีแนวโน้มที่จะสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้
- (7) ทำการเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 6 – 10 สัปดาห์ โดยทำการย้ายเพื่อเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ บันทึกลักษณะของเนื้อเยื่อและความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สังเกตได้ ในกรณีที่ได้นต้นอ่อนที่สมบูรณ์จะทำการอนุบาลพืช เพื่อดูแลให้เจริญเติบโตในโรงเรือนต่อไป

วิธีการที่ 6 และวิธีการที่ 7 การฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อเสาวรสด้วยสารละลายคลอโรกซ์ และ สารลดแรงตึงผิว ร่วมกับการใช้เครื่องเขย่าสารโดยใช้เสียงความถี่สูง โดยขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อทำเช่นเดียวกับวิธีการที่ 5 แต่ในขั้นตอนการแช่ยอดเสาวรสด้วยสารละลายคลอโรกซ์ จะเติมสารลดแรงตึงผิว ความเข้มข้น 0.1% โดยปริมาตร ร่วมด้วย โดยในวิธีการที่ 6 ใช้ความเข้มข้นของสารละลายคลอโรกซ์ที่ 5% โดยปริมาตร และ ในวิธีการที่ 7 ใช้ความเข้มข้นของสารละลายคลอโรกซ์ที่ 10 % โดยปริมาตร

3.2.2 ในการวิเคราะห์ผลเพื่อใช้ระบุเลือกวิธีการฟอกฆ่าเชื้อยอดอ่อนเสาวรสที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเนื้อเยื่อเสาวรสหวานในการเพาะเลี้ยง และขยายพันธุ์เสาวรสหวานในสภาพปลอดเชื้อ ทำได้โดยเปรียบเทียบค่าร้อยละของชิ้นส่วนพืชที่มีการปนเปื้อน และร้อยละของชิ้นส่วนพืชที่ปลอดการปนเปื้อนและสามารถเจริญเป็นต้นอ่อนของการฟอกฆ่าเชื้อในแต่ละวิธี

3.2.2.1 การหาค่าร้อยละของชิ้นส่วนพืชที่มีการปนเปื้อน ทำได้โดยการนับจำนวนชิ้นส่วนพืชที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียและ/หรือรา ของแต่ละวิธีการฟอก ทำการตรวจนับจำนวนชิ้นส่วนพืชที่มีการปนเปื้อน ในช่วง 2 สัปดาห์ โดย

$$\text{ค่าร้อยละของชิ้นส่วนพืชที่มีการปนเปื้อน} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนพืชที่มีการปนเปื้อน}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนพืชที่ทำการฟอกด้วยวิธีการนั้นๆ}} \times 100$$

3.2.2.2 การหาค่าร้อยละของชิ้นส่วนพืชที่สามารถเจริญเป็นยอดอ่อน ทำได้โดยการนับจำนวนชิ้นส่วนพืชที่ปลอดการปนเปื้อนของแบคทีเรียและ/หรือรา และสามารถเจริญเป็นยอดอ่อนของแต่ละวิธีการฟอก โดยชิ้นส่วนพืชที่สามารถเจริญเป็นยอดอ่อนนั้นจะต้องมีการเกิดใบอย่างน้อย 1 คู่ และมีความสูงของยอดมากกว่า 1 เซนติเมตร โดยทำการตรวจนับเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดย

ค่าร้อยละของชิ้นส่วนพืชที่สามารถเจริญเป็นยอดอ่อน =

$$\frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนพืชที่สามารถเจริญเป็นยอดอ่อน}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนพืชที่ทำการฟอกด้วยวิธีการนั้นๆ}} \times 100$$

3.3 สถานที่ดำเนินการวิจัย

3.3.1 พื้นที่โครงการหลวง จำนวน 8 ศูนย์/สถานีฯ ได้แก่

- สถานีเกษตรหลวงปางดะ	อำเภอสะเมิง	จังหวัดเชียงใหม่
- ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่แพะ	อำเภอสะเมิง	จังหวัดเชียงใหม่
- ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงทุ่งหลวง	อำเภอแม่วาง	จังหวัดเชียงใหม่
- สถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด	อำเภอแม่แตง	จังหวัดเชียงใหม่
- ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่โถ	อำเภอฮอด	จังหวัดเชียงใหม่
- ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหมอกจำ่ม	อำเภอแม่เมาะ	จังหวัดเชียงใหม่
- ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงสะโจ๊ะ	อำเภอเชียงแสน	จังหวัดเชียงราย
- ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่สะเรียง	อำเภอแม่สะเรียง	จังหวัดแม่ฮ่องสอน

3.3.2 ห้องวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและโรงเรือนเพื่อการอนุบาลพืชภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน