บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 ครุภัณฑ์

เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave)บริษัท Hirayama manufacturing Corporation model HA-30

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) บริษัท Radiometer model PHM 83 Autocal

ตู้ย้ายเนื้อเยื่อที่มีบรรยากาศปลอดเชื้อ (Laminar Flow) บริษัท ISSCO model 25

เครื่องกรองจุลินทรีย์ (Swinnex) พร้อมกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

เครื่องอบไมโครเวฟ (Microwave oven) บริษัท NEC model MC-300 TE

กล้องจุลทรรศน์ Stereoscopic model SMZ-10 บริษัท Nikon, Japan

กล้องจุลทรรศน์ Episcopic-Fluorescence บริษัท Nikon, Japan

เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง Type 1507 บริษัท Sartorius, Germany

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง Type 1702 บริษัท Sartorius, Germany

ตู้อบ บริษัท Memmert, Germany

เครื่องเซนตริฟิวจ์ Top bench centrifuge Minor 35 บริษัท MSE Ltd., England

2.2 วัสดุและเคมีภัณฑ์

2.2.1 เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดลอง

เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 จาก กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และไร่แม่กรณ์ บริษัท บุญรอดบริวเวอลี่ จำกัด จังหวัดเชียงราย

2.2.2 สารเคมี (Chemical Reagent)

คลอรอกซ์ (clorox)มีสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaoCl) 0.525% เป็นองค์ประกอบ บริษัทลีเวอร์บราเธอร์ประเทศไทย

เอธานอล 70% และ 95% องค์การเภสัชกรรม

2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) บริษัท Fluka

BA (Benzyladenine) บริษัท Sigma Chemical CO.,

NAA (Napthalene acetic acid) บริษัท Fluka

IAA (Indoleacetic acid) บริษัท Fluka

IBA (Indolebutyric acid) บริษัท Sigma Chemical Co.,

zeatin บริษัท Sigma Chemical Co.

MES (2-(N-morpholino) ethanesulphonic acid) บริษัท Sigma Chemical Co,

Cellulase "Onozuka" R10 บริษัท Yakult Honsha Co. Ltd.

Macerozyme "Onozuka" R10 บริษัท Yakult Hansha Co. Ltd.

Triton X-100 บริษัท Pacckard

ผงวุ้น (Agar Powder) ห้างหุ้นส่วนจำกัด วอร์ค เมติก

mannitol บริษัท Sigma Chemical Co.,

2.3 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและโปรโตพลาสต์

อาหารสูตร MS ของ Murashige and Skoog (1962) (ภาคผนวกที่ 1)

อาหารสูตร B5 ของ Gamborg O.L. (1970)(ภาคผนวกที่ 2)

อาหารสูตร RV-5 ของ Freytag และคณะ (1989)(ภาคผนวกที่ 3)

อาหารสูตร K8P ของ Kao (1970)(ภาคผนวกที่ 4)

2.4 สภาวะมาตรฐานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue culture condition)

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 20-25 °C ให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนท์ ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และสลับความมืด 8 ชั่วโมงต่อวัน

2.5 การเตรียมอาหารแข็งและอาหารเหลว

ดูดสารอาหารจาก stock ที่เตรียมไว้ (ภาคผนวกที่ 5,6)ใส่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นประมาณ 500 มล. จากนั้นเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร คนให้ละลายนำไปปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดพีเอช ปรับให้ได้ pH 5.8 ด้วยกรดเกลือ (HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ถ่ายใส่ภาชนะที่ทนความร้อน ถ้าเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น 7 กรัมต่อลิตร นำไปต้มจนวุ้นละลายทั่วกัน เทใส่ขวดหรือ flask ที่เตรียมไว้ นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (autoclave) ที่ความดัน 25 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.6 การชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นจากเนื้อเยื่อส่วนใบคู่แรก (Primary leaves)

2.6.1 การเตรียมและฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อพืช

เตรียมอาหารวุ้น water agar 0.7% ใส่ในหลอดทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 ซม. ยาว 19 ซม. ความจุ 150 มล. หลอดละ 10 มล. ปิดด้วยจุกสำลีนำไปนึ่งฆ่าเชื้อนาน 15 นาที

นำเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 มาแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ 15% นาน 20 นาที จากนั้นจึงนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วอีก 2 ครั้ง

นำเมล็ดถั่วเหลืองที่ฆ่าเชื้อแล้ว ไปเพาะในหลอดอาหารวุ้นที่เตรียมไว้ โดยบรรจุ หลอดละ 3-4 เมล็ด (ขั้นตอนนี้ทำในสภาพปลอดเชื้อ) จากนั้นจึงนำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยง นานประมาณ 7 วัน ให้เมล็ดถั่วเหลืองงอก (รูปที่ 2)

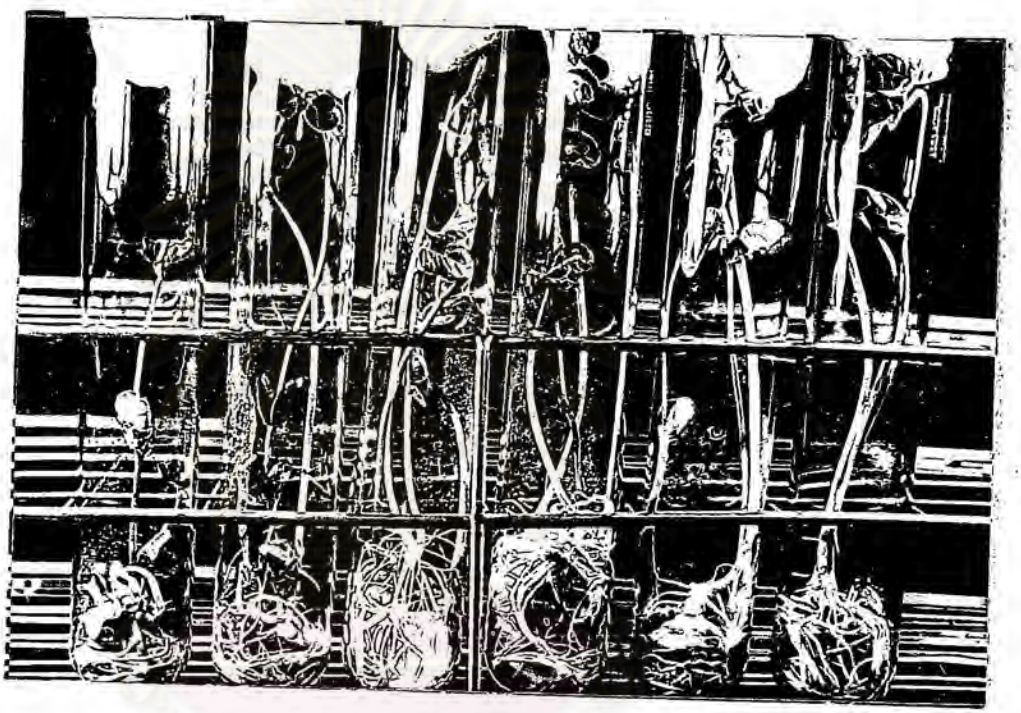
หลังจากทำการเพาะได้ 7 วัน นำต้นถั่วเหลืองที่ได้มาตัดแยกเอาเฉพาะส่วนใบคู่แรก ซึ่งจะมีขนาดประมาณ 0.3-1 ซม. นำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 15% ประมาณ 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ แล้วอีก 2 ครั้ง นำไปตัดให้ได้ชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 0.3 X 0.3 ซม.

2.6.2 การชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นจากอาหารที่ทำให้เกิดเอมบริโอเจเนซิสและออร์แกโนเจเนซิส

สำหรับสูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองมีดังต่อไปนี้

สูตร 1	MS	เสริมด้วย	BA	0.1	มก./ล.	และ NAA	1.0 มก./ล.
สูตร 2	MS	เสริมด้วย	BA	0.05	มก./ล.	และ NAA	10 มก./ล.
สูตร 3	MS	เสริมด้วย	BA	1	มก./ล.	และ NAA	0.125 มก./ล.
สูตร 4	B5	เสริมด้วย	2,4-D	2	มก./ล.	และ kinetin	0.5 มก./ล.
สูตร 5	B5	เสริมด้วย	BA	0.5	มก./ล.	และ 2,4-D	1 มก./ล.
สูตร 6	B5	เสริมด้วย	BA	1	มก./ล.	และ NAA	0.15 มก./ล.

นำใบที่เตรียมไว้ มาเลี้ยงในอาหารแต่ละสูตร สูตรละ 100 ชิ้น นำไป



รูปที่ 2 การเพาะเมล็ดถั่วเหลืองในหลอดทดลอง โดยเพาะใน water agar ที่อายุประมาณ 10 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยง เมื่ออายุครบ 30 วัน สังเกตลักษณะทั่ว ๆ ไปของแคลลัส หาเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสโดยหาจาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100$$

จากนั้นจึงทำการ subculture ลงในอาหารชนิดเดิม สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

2.6.3 การศึกษาการเกิดแคลลัส และต้นในอาหารสูตร B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล.

จากการทดลองที่ 2.6.2 พบว่าอาหารสูตร B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล. สามารถเกิดออร์แกนโนเจเนซิส จึงนำอาหารสูตรนี้มาศึกษาลักษณะรูปแบบของการเจริญตลอดจนการเกิดใบและต้น โดยทำการทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ใช้ตัวอย่างเพาะเลี้ยงจำนวน 80 ชิ้น นำไปศึกษาการเจริญโดย ทุกๆ 7 วัน เก็บตัวอย่างครั้งละ 6 ขวดนำไปหาน้ำหนักสด และแห้ง ในขณะที่อีกกลุ่มหนึ่งใช้ตัวอย่าง 60 ชิ้น แล้วติดตามผลการทดลองโดย คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและเปอร์เซ็นต์การเกิด regeneration โดยหาจาก

$$\%\ \text{regeneration} = \frac{\text{แคลลัสที่เกิดอวัยวะ}}{\text{แคลลัสทั้งหมด}} \times 100$$

การทดลองนี้จะทำการ subculture เมื่อครบ 30 วัน

2.6.4 การเกิดแคลลัสและต้นในอาหารที่เสริมด้วยแอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)

ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหาร B5 โดยเติม NH_4NO_3 ลงไป 1,650 มก./ล. (เท่ากับปริมาณในสูตรอาหาร MS) และเสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล. BA 1 มก./ล. ทำการทดลองใช้ชิ้นพืช 80 ชิ้น เมื่อครบ 30 วัน จึงหาเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสแล้วจึง subculture ลงในอาหารชนิดเดิม เลี้ยงต่อไปสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น หา % regeneration

2.6.5 การหาอัตราส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสและการเกิดต้น

ใช้อาหาร B5 เสริมด้วย NH_4NO_3 1650 มก./ล. ที่มีส่วนผสม(combination) ของฮอร์โมน 2 ชนิดคือ BA 1,2,3,4 มก./ล. และ NAA 0.10,0.15,0.20 มก./ล. ได้อาหารทั้งหมด 12 สูตร แต่ละสูตรทำการทดลอง 40 ซ้ำ

หลังจากเลี้ยงไปครบ 30 วัน หาเปอร์เซ็นต์ การเกิดแคลลัส ดูลักษณะแคลลัสทั่วๆไป แล้วจึงทำการ subculture แคลลัสทั้งหมดลงในอาหารชนิดเดิม นำไปเลี้ยงต่อ สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นและหา % regeneration

2.6.6 การเกิดแคลลัสและต้น ในอาหาร B5 สูตรดัดแปลง (Modified B5)

การดัดแปลงอาหารสูตร B5 (Modified B5) นั้นทำตามงานวิจัยของ Wright (1987) โดยเติม L-glutamine 1 กรัม/ล. เพื่อให้เป็นแหล่งไนโตรเจนเพิ่มขึ้นและเติม adenine sulfate 40 มก./ล. โดยเรียกอาหารชนิดว่า CS23 ทำการทดลองใช้ชิ้นพืช 80 ชิ้นต่อ 1 สูตรอาหาร โดยใช้อาหาร

3 สูตรดังกล่าวดังต่อไปนี้

1. CS23 เสริมด้วย 2,4-D 0.5 มก./ล. (ตามงานของ Wright)
2. CS23 เสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล. และ BA 1 มก./ล.
3. CS23 เสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.

(สูตร 2 และ 3 อัตราส่วนของฮอร์โมนได้จากการทดลองที่ 2.6.5)

นำไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อครบ 30 วันดูเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส แล้วจึงย้ายแคลลัสทั้งหมดลงในอาหารชนิดเดิม สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

2.7 การเกิดแคลลัสและการกลับคืนเป็นต้นจากเนื้อเยื่อส่วนไฮโปคอทิล (hypocotyl)

2.7.1 การเตรียมเนื้อเยื่อส่วนไฮโปคอทิลให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ

ทำการทดลองเหมือน การทดลองข้อ 2.6.1 เมื่อถั่วเหลืองงอกได้ 7 วัน จึงนำมาตัดส่วนไฮโปคอทิล ตรงที่ต่ำกว่าข้อใบเลี้ยง (cotyledonary node) ลงมา 2,4 และ 6 มม.และส่วน epicotyl (ส่วนที่อยู่เหนือข้อใบเลี้ยง) 2 มม. นำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วย คลอร็อกซ์ 15% นานประมาณ 15 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วอีก 2 ครั้ง เก็บไว้ทำการทดลองต่อไป (ทำในสภาพปลอดเชื้อทั้งหมด)

2.7.2 การเกิดแคลลัสและการเกิดต้นจากส่วนไฮโปคอทิลและอีพิคอทิล

เตรียมอาหารที่ใช้ในที่นี้ใช้สูตร RV-5 (Freytag 1989) แต่เสริมด้วยชนิดและความเข้มข้น ของฮอร์โมน แบ่งเป็น 3 สูตรดังนี้

2.7.2.1 IAA 0.10 มก./ล. และ BA 0.4 มก./ล.

2.7.2.2 IAA 0.25 มก./ล. และ BA 0.4 มก./ล.

2.7.2.3 NAA 0.25 มก./ล. และ BA 1 มก./ล.

นำชิ้นส่วน ไฮโปคอทิล ที่ตำแหน่งต่าง ๆ และอีพิคอทิลที่เตรียมไว้มาเลี้ยงในอาหารแต่ละสูตรที่เตรียมได้ โดยทำการทดลอง ใช้ส่วนต่าง ๆ 80 ชิ้นต่ออาหาร 1 สูตร นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น โดยดูเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และ % regeneration

2.7.3 การหาอัตราส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นจากส่วนไฮโปคอทิล

อาหารที่ใช้คืออาหารสูตร RV-5 โดยใช้ฮอร์โมน 2 ชนิด ซึ่งได้จากการเตรียมอาหารให้มี ส่วนผสม ของฮอร์โมน BA 0.5,1,2,3 มก./ล. กับ IAA 0.1,0.2,0.3, และ 0.4 มก./ล. ทำให้ได้อาหารทั้งหมด 12 สูตร แต่ละสูตรทำการทดลอง 60-ซ้ำ นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นหาเปอร์เซนต์ การเกิดแคลลัส และ % regeneration

2.7.4 การใช้อาหารที่สามารถชักนำให้เกิดต้นจากไฮโปคอทิล ไปใช้ชักนำให้เกิดต้นในเนื้อเยื่อใบคู่แรก

อาหารที่ใช้คือ RV-5 โดยใช้อาหารที่มีส่วนผสมของ ฮอร์โมน 2 ชนิดคือ BA 0.5,1,2,3 มก./ล. และ NAA 0.1, 0.15, 0.20, และ 0.25 มก./ล. โดยทำการทดลองทั้งหมด 40 ซ้ำ เมื่อครบ 30 วัน จึงทำการ subculture ลงในอาหารชนิดเดิม ดูเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส และ % regeneration

2.8 การชักนำให้เกิดรากจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยง

นำยอดที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงนำให้เกิดต้นจากใบ และไฮโปคอทิล มาตัดตรงบริเวณที่ใกล้กับแคลลัสมากที่สุด จากนั้นจึงนำไปปักลงในอาหารที่คาดว่าจะทำให้เกิดราก 2 ชนิดคือ

2.8.1 B5 เสริมด้วย IBA 5 มก./ล.

2.8.2 B5 เสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล. และ BA 4 มก./ล. ซึ่งเป็นสูตรที่ให้รากมากที่สุด (การทดลองที่ 2.6.5)

จากนั้นจึงนำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

2.9 การเลี้ยงต้นถั่วเหลืองที่เกิดขึ้นจากการกลับคืนเป็นต้นจากแคลลัส

จากการทดลองที่ผ่านมา พบว่าในบางแคลลัสนั้น สามารถที่จะเกิดขึ้นได้ทั้งรากและยอด การนำแคลลัสที่เกิดขึ้นแบบนี้ ไปเลี้ยงให้เจริญต่อไป เป็นขั้นตอนสำคัญวิธีการที่ใช้คือ ทำการนึ่งฆ่าเชื้อ vermiculite ซึ่งเป็นพวก supporter สำหรับเพาะปลูกต้นไม้ นานประมาณ 20 นาที จากนั้นจึงเติมอาหารสูตรใช้เลี้ยงแคลลัสในขณะนั้นลงไปพอให้มีความชื้นพอเหมาะอย่าให้ vermiculite แฉะมากเกินไปจากนั้นจึงนำแคลลัสที่มีทั้งยอดและรากใส่ลงไป นำไปไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ให้อยู่ในสภาพที่ใกล้เคียงเหมือนกับก่อนที่จะย้ายลง vermiculite ให้มากที่สุด คอยเติมอาหารลงไปบ่อยๆ อย่าให้ vermiculite แห้ง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของต้นถั่วเหลืองเพาะเลี้ยง

2.10 การแยกโปรโตพลาสต์

2.10.1 การเตรียมเอนไซม์สำหรับแยกโปรโตพลาสต์

สำหรับการแยกโปรโตพลาสต์นั้นเอนไซม์ที่จำเป็นในการแยกนั้นมีอยู่ 2 ชนิดคือ เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) โดยจะไปย่อยส่วนเซลลูโลส (cellulose) ที่เป็นผนังเซลล์ และเอนไซม์เพคติเนส (pectinase) ซึ่งจะไปย่อย ส่วนเพคติน (pectin) ซึ่งเป็นสารที่เชื่อมเซลล์ให้ติดกัน โดยเพคติเนสจะทำให้เซลล์หลุดออกมาเป็นเซลล์เดี่ยว และเซลลูเลสจะเข้าไปย่อยผนังเซลล์ให้เหลือแต่เซลล์ที่มีเฉพาะเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane)

สำหรับเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้ในการทดลองคือ Cellulase "Onosuka" R10 และ เพคติเนสที่ใช้คือ Macerozyme "Onozuka" R10 โดยจะเตรียมเอนไซม์โดยละลายลงในสารละลาย CPW (ภาคผนวกที่ 7) และเติมสารแมนนิทอล (mannitol) เพื่อเป็นสารที่จะรักษาระดับ osmotic pressure ของโปรโตพลาสต์ไม่ให้แตกหรือเหี่ยว เนื่องจากความแตกต่างของความดันภายนอกและภายในของโปรโตพลาสต์

2.10.2 สภาวะที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์

ทำการแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้ petri dish ขนาด 6 ซม. เป็นภาชนะที่ใช้ใส่แคลลัสและสารละลายเอนไซม์ เมื่อใส่เอนไซม์แล้วทำการเขย่าด้วย rotary shaker ที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที และใช้ผ้าดำคลุมเพื่อไม่ให้ถูกแสง โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 20-25 °C

2.10.3 การนับปริมาณโปรโตพลาสต์

ทำการนับด้วยเครื่อง ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) โดยหยดสารละลายเอนไซม์ที่มีโปรโตพลาสต์ซึ่งเขย่าให้เข้ากันดีแล้ว ตรงบริเวณด้าน

ข้างของสไลด์ทั้ง 2 ด้าน ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที เพื่อให้โปรโตพลาสต์นอนก้น จึงนับจำนวน

การนับจำนวนนั้นให้นับจำนวน 8 ช่อง เมื่อได้จำนวนโปรโตพลาสต์แล้วนำมาคูณด้วย 5000 จะได้เป็นจำนวนโปรโตพลาสต์/มล. (ดูภาคผนวกที่ 8) (วิชชา, 2524)

2.2.4 การหาเปอร์เซนต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

สีที่ใช้ย้อมคือ fluorescein diacetate (ดูภาคผนวกที่ 9) โดยใช้โปรโตพลาสต์ 1 หยด ผสมกับสีย้อม 1 หยด นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ fluorescense นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เรืองแสงและจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมดใน 1 field หา % viability จาก

$$\% \text{ viability} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เรืองแสง}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

2.10.5 การแยกโปรโตพลาสต์จาก ใบ ใบเลี้ยง และไฮโปคอทิล

ทำการเพาะเมล็ดถั่วเหลือง (การทดลองที่ 2.6.1) เมื่อต้นถั่วอายุครบ 10 วันจึงจะนำมาทดลองแยกโปรโตพลาสต์ โดยส่วนใบ และใบเลี้ยงตัดด้วยใบมีดโกนให้มีขนาดความกว้างไม่เกิน 0.1-0.2 มม. สำหรับส่วนไฮโปคอทิลนั้น ตัดตามขวางให้มีความหนาประมาณ 0.1-0.2 มม. นำไป อินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์ที่มี ส่วนผสม (combination) ของเอนไซม์เซลลูเลส 0.2,0.5,1,2,3 และ 4% และความเข้มข้นของเอนไซม์มาเซอโรไซม์ 0.2, 0.3,0.5,1 รวม 24 ความเข้มข้น โดยแต่ละความเข้มข้นใส่เอนไซม์ประมาณ 3 มล. และใช้ใบ ใบเลี้ยง และไฮโปคอทิล ประมาณ 0.3 กรัม ทำการทดลองใน

petri dish ขนาด 6 ซม. นำไปเขย่าบน rotary shaker ความเร็ว 100 รอบ/นาที ในที่มืด ตรวจดูปริมาณโปรโตพลาสต์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1-24

2.10.6 การแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัส

2.10.6.1 การศึกษาชนิดของแคลลัสที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัส 2 ชนิดคือ

ชนิดที่ 1 เป็นแคลลัสแบบเนื้อแน่น(compact) ลักษณะจะเป็นแคลลัสที่แข็ง มีสีเขียวเข้ม โดยจะเลี้ยงอยู่ในอาหาร B5 เสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล. BA 1 มก./ล. และ NH_4NO_3 1650 มก./ล.

ชนิดที่ 2 เป็นแคลลัสแบบ เนื้อเกาะกันหลวม(friable) แคลลัสชนิดนี้จะเป็นแคลลัสที่เกาะกันหลวมๆ มีลักษณะฉ่ำน้ำ โดยจะเลี้ยงอยู่บนอาหาร B5 เสริมด้วย BA 2 มก./ล. 2,4-D 2 มก./ล. และ NH_4NO_3 1650 มก./ล.

นำแคลลัสแต่ละชนิดมาหั่นให้ได้ชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 0.1X0.1 ซม. โดยแบบcompactนำไปอินคิวเบทในสารละลายเอนไซม์ที่มีส่วนผสม(combination) ของเซลลูเลส 0.2, 0.5, 1, 2,3,และ 4 % และความเข้มข้นของมาเซอเรไซม์ 0.2, 0.3,0.5,1 รวม 24 ความเข้มข้น ส่วนแบบ friable นำไป อินคิวเบท ในสารละลายที่มีความเข้มข้นของเซลลูเลส 2 % และมาเซอเรไซม์ 0.5% นับปริมาณโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นด้วย haemecytometer

2.10.6.2 การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์มาเซอเรไซม์ที่พอเหมาะในการแยก แคลลัสให้เป็นเซลล์เดี่ยว

ความเข้มข้นของเอนไซม์มาเซอเรไซม์ที่ใช้คือ 0.1,0.5,1 และ 2% ละลายใน CPW ที่มีความเข้มข้นของแมนนิทอล 9% หั่นแคลลัสให้ได้ขนาด

ประมาณ 0.1X0.1 ซม. ใส่ลงไปในสารละลายเอนไซม์นับปริมาณเซลล์เดี่ยวที่เกิดขึ้นหลังจากอินคิวเบตเวลา 2 และ 4 ชั่วโมง ด้วย haemacytometer

2.10.6.3 การศึกษาอัตราส่วนความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์

หั่นแคลลัสให้มีขนาดประมาณ 0.1X0.1 ซม. จากนั้นจึงนำไป อินคิวเบท ในสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นของ เซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 0.5:0.5, 1:0.5, 2:0.5, 3:0.5, และ 4:0.5 ตามลำดับ โดยใช้ความเข้มข้นของแมนนิทอล 10% และใช้เซลล์ 0.3 กรัมต่อเอนไซม์ 3 มล. ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นจึงทำการนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เวลา 2 ชั่วโมง

2.10.6.4 การศึกษาอัตราส่วนของปริมาณแคลลัสกับปริมาณของสารละลายเอนไซม์ที่เหมาะสม

เนื่องจากว่า petri dish ขนาด 6 ซม. จะใส่เอนไซม์ได้ประมาณ 3 มล. ขณะเขย่าจะทำให้ไม่กระฉอกออกมา จึงต้องหาปริมาณแคลลัสที่พอเหมาะกับเอนไซม์เมื่อจะทำให้เอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยากับแคลลัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ชั่งแคลลัสมา 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, และ 0.5 กรัม มา อินคิวเบท ในสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นเซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 4:0.5 ความเข้มข้นของแมนนิทอล 10% ใช้เอนไซม์ 3 มล. ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นที่เวลา 2 ชั่วโมง

2.10.6.5 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์

นำแคลลัสมา อินคิวเบท ในสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นของเซลลูเลสต่อมาเซอริไซม์ 4:0.5 ความเข้มข้นของแมนนิทอล 10 % นับจำนวน โปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นทุก ๆ ชั่วโมง

2.10.6.6 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมนนิทอลในการแยกโปรโตพลาสต์

นำแคลลัสมา อินคิวเบท ในสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นของ เซลลูเลสต่อมาเซอริไซม์ 4:0.5 โดยจะแปรผัน ความเข้มข้นของแมนนิทอล 8,9,10,11,12,และ 13 % ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เวลา 2 ชั่วโมง

2.10.6.7 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์

นำแคลลัสมา อินคิวเบท ในสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นของเซลลูเลสต่อมาเซอริไซม์ 4:0.5 ความเข้มข้นของแมนนิทอล 10% ปรับ pH ให้เป็น 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, และ 6.0 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เวลา 2 ชั่วโมง

2.10.6.8 การศึกษาผลกระทบของเกลือแร่และบัฟเฟอร์ที่มีประสิทธิภาพในการแยกโปรโตพลาสต์

นำแคลลัสมา อินคิวเบท ในสารละลายความเข้นข้นของเซลลูเลสต่อมาเซอริไซม์ 4:0.5 ความเข้มข้นแมนนิทอล 10% สารที่ใช้ทดลองใส่ลงไปมี $CaCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM, และMES 10 mM โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นที่เวลา 2 ชั่วโมง

2.10.6.9 การศึกษาผลของระยะการเจริญเติบโต (growth stage) ต่อการแยกโปรโตพลาสต์

เลี้ยงแคลลัสในอาหาร B5 เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ทุก ๆ 7 วัน ทำการหาน้ำหนักแห้ง และแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นของเซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 4:0.5 ซึ่งมีแมนนิทอล 10%

2.10.7 การแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย

2.10.7.1 การคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมสำหรับเตรียมเซลล์แขวนลอยเพื่อแยกโปรโตพลาสต์

อาหารที่ใช้ในการทดลองมีอยู่ 7 สูตร คือ

1. B5 เสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล. BA 1 มก./ล. และ NH_4NO_3 1650 มก./ล.
2. B5 เสริมด้วย BA 2 มก./ล. NAA 0.15 มก./ล. และ NH_4NO_3 1650 มก./ล.
3. MS เสริมด้วย BA 1 มก./ล. NAA 0.15 มก./ล.
4. MS เสริมด้วย BA 2 มก./ล. NAA 0.15 มก./ล.
5. RV-5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล. NAA 0.15 มก./ล.
6. RV-5 เสริมด้วย BA 0.4 มก./ล. NAA 0.10 มก./ล.
7. B5 เสริมด้วย BA 2 มก./ล. 2,4-D 2 มก./ล. NH_4NO_3 1650 มก./ล.

นำแคลลัสที่เลี้ยงจากส่วนใบคู่แรก มาตัดเป็นชิ้นเล็กขนาดประมาณ

0.1X0.1 ซม. จากนั้นจึงนำมาใส่ลงในอาหารแต่ละสูตรที่เตรียมไว้ นำไปเขย่าบน rotary shaker ความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นจึงนำมากรองด้วย nylon seive ขนาด 100 µm เพื่อที่จะแยกเอาก้อนเซลล์ขนาดใหญ่ออกไป จากนั้นจึงนำไปเลี้ยงในอาหารชนิดเดิม บน rotary shaker เมื่อครบ 30 วัน สังเกตลักษณะทั่ว ๆ ไป ของเซลล์ สังเกตดูความหนาแน่นและลักษณะโดยทั่วๆ ไป ของเซลล์แขวนลอย

2.10.7.2 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

อาหารที่ใช้คือ B5 เสริมด้วย BA 2 มก./ล. 2,4-D 2 มก./ล.และ NH_4NO_3 1650 มก./ล. ทำการเลี้ยงนาน 30 วัน จากนั้นจึงกรองเซลล์ด้วย nylon seive ขนาด 100 µm กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 อีกครั้งหนึ่ง ใส่เซลล์ลงในอาหารโดยมีความเข้มข้น 0.001 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ต่ออาหาร 10 มล. นำไปเลี้ยงบน rotary shaker ความเร็ว 100 รอบ/ต่อนาที ในห้องเพาะเลี้ยง จากนั้นทุก ๆ 7 วัน นำเซลล์ออกมา 20 มล. หาน้ำหนักแห้ง

2.10.7.3 การศึกษาปริมาณเซลล์เริ่มต้นของถั่วเหลืองในการแยกโปรโตพลาสต์

กรองเซลล์แขวนลอยด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นจึงนำเซลล์มา 0.3 กรัม (น้ำหนักสด) ไป อินคิวเบท ในสารละลายเอนไซม์มาเซอิรไซม์ ความเข้มข้น 1% จากนั้นจึงนำไปเขย่าบน rotary shaker 100 รอบ/นาที ในที่มืด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นับเซลล์ด้วย haemacytometer ที่เวลา 2 ชั่วโมง

2.10.7.4 การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย

ทำการทดลองโดยใช้เซลล์ 0.3 กรัม ต่อ เอนไซม์ 3 มล. ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.10.6.3

2.10.7.5 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอย

ใช้สารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นของเซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์3:0.5 และใช้เซลล์ 0.3 กรัมต่อเอนไซม์ 3 มล. ทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.10.6.5

2.10.7.6 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมนนิทอลในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แแขวนลอย

นำเซลล์แขวนลอย 0.3 กรัมมา อินคิวเบท ในสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นเซลลูเลส ต่อมาเซโรไซม์ 3:0.5 ความเข้มข้นของแมนนิทอลตั้งแต่ 8 ถึง 13% ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.10.6.6

2.10.7.7 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แแขวนลอย

นำเซลล์แขวนลอย 0.3 กรัม มา อินคิวเบท ในสารละลายเอนไซม์ที่ความเข้มข้นของเซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 3:0.5 pH ตั้งแต่ 5.0 ถึง 6.0 ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.10.6.7

2.10.7.8 การศึกษาผลกระทบของเกลือแร่และบัฟเฟอร์ที่มีประสิทธิภาพในการแยกโปรโตพลาสต์

นำเซลล์แขวนลอย 0.3 กรัม มา อินคิวเบท ในสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นของเซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 3:0.5 ที่มีสาร $CaCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM และ MES 10 mM ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.10.6.8

2.10.7.9 การศึกษาผลของระยะการเจริญเติบโต (growth stage) ต่อการแยกโปรโตพลาสต์

เลี้ยงแคลลัสในอาหาร B5 เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ทุก ๆ 7 วัน ทำการทดลองหาน้ำหนักแห้ง และแยกโปรโตพลาสต์ โดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นของเซลลูเลส ต่อมาเซโรไซม์ 3:0.5 แมนนิทอล 10% ทำการทดลองเช่นเดียงกับการทดลองที่ 2.10.6.9

2.10.8 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

2.10.8.1 การทำโปรโตพลาสต์ให้บริสุทธิ์

หลังจากแยกโปรโตพลาสต์ได้แล้วจึงนำมากรองผ่านผ้ากรอง (nylon net) ที่มีรูขนาด 100 ไมโครเมตร เพื่อขจัดเซลล์ที่ถูกย่อยไม่หมด และเศษเซลล์ขนาดใหญ่ออก จากนั้นจึงนำของเหลวที่กรองได้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนบนออก เติมสารละลาย CPW 10M ลงไป นำไปเซนต์ฟิวจ์ซ้ำอีก 1 ครั้ง เพื่อกำจัดเอนไซม์ออกให้หมด จากนั้นจึงนำเซลล์ที่ได้ ไปใส่ในหลอดที่มีน้ำตาลซูโครส 21% 5 มล. โดยค่อย ๆ หยดเซลล์ที่ผสมอยู่ใน CPW 10M ลงบนผิวหน้าของชั้นสารละลายน้ำตาลซูโครส 21% จากนั้นจึง

I15206543

นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จะอยู่ระหว่างชั้นของสารละลาย CPW 10M กับน้ำตาลซูโครส 21% โดยจะเห็นเป็นแถบสีจาง ๆ ชัดเจน ใช้พาสเจอร์ไปเปตดูดส่วนชั้นบนของ CPW 10M ทิ้งไป แล้วจึงดูดส่วนชั้นของโปรโตพลาสต์ไปล้างด้วยสารละลาย CPW 10M อีกครั้งหนึ่ง เก็บส่วนโปรโตพลาสต์ไว้ศึกษาต่อไป

2.10.8.2 การศึกษาความเข้มข้นของแมนนิทอลที่เหมาะสมในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

ทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร K8P โดยปรับระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลให้มีความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, 10 % จากนั้นเลี้ยงโปรโตพลาสต์ โดยให้มีปริมาณโปรโตพลาสต์ $1X10^5$ โปรโตพลาสต์/มล. ทำการเพาะเลี้ยงใน petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 ซม. โดยให้มีปริมาณอาหาร 1-2 มล. เพื่อที่จะให้มีปริมาณอากาศเพียงพอ ทำการเลี้ยงในที่มืด สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเช่น ดูการสร้างผนังเซลล์ การแบ่งเซลล์ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต ฯลฯ

2.10.8.3 การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร K8P ที่แปรผันปริมาณ zeatin

ทำการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ในอาหาร K8P ที่เสริมด้วย 2,4-D 0.2 มก./ล. BA 0.5 มก./ล. และ NAA 1 มก./ล. จากนั้นจึงใส่ zeatin โดยให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 1, 2,4, และ 8 มก./ล. ใช้ปริมาณโปรโตพลาสต์ $1x10^5$ โปรโตพลาสต์/มล. ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ทำการเพาะเลี้ยงแบบการทดลองข้อ 2.10.5.2 สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น เช่นดูการสร้างผนังเซลล์ การแบ่งเซลล์ และเปอร์เซ็นต์มีชีวิต ฯลฯ

2.11 การชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสเพาะเลี้ยงและแคลลัสที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์

เป็นการทดลองเพื่อที่จะทดสอบความสามารถในการกลับเป็นต้นของแคลลัสที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ และต้องการจะทดสอบว่า แคลลัสที่ทำการเลี้ยงไปเวลานาน ๆ เช่น 6-12 เดือน จะสามารถกลับมาเป็นต้นได้หรือไม่ โดยทำการชักนำแคลลัสที่อายุประมาณ 12 เดือน ในอาหาร B5 ที่เสริมด้วย NH_4NO_3 1650 มก./ล. และแปรผันฮอร์โมน ที่มี ส่วนผสม ของ BA และ NAA โดย BA เท่ากับ 1, 2, 3, 4 มก./ล. และ NAA เท่ากับ 0.15 และ 0.20 มก./ล. รวมเป็น 8 สูตร ทำการทดลองใช้แคลลัส 40 แคลลัสต่ออาหาร 1 สูตร นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยง สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย