บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

วัสดุ

1. พืชทดลอง งานวิจัยนี้ใช้พืชทดลอง 3 ชนิด ได้แก่

1.1 แครอท (Daucus carota Linn.) พันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ พันธุ์คูโรดาโกซัน (Kurodagosun) ซึ่งเป็นพันธุ์ปลูกและเป็นที่นิยมบริโภคกันโดยทั่วไป

1.2 ยาสูบ (Nicotiana rustica Linn.) เป็นยาสูบพันธุ์ป่า มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาเหนือ แผ่นใบเป็นรูปไข่ (ovate) หรือรูปรี (elliptic) ยาวประมาณ 15-30 เซนติเมตร กว้าง 10 เซนติเมตร ก้านใบยาว 1 ใน 3 ของตัวใบ ไม่นิยมนำมาทำเป็นบุหรี่หรือยาเส้น แต่จะใช้เป็นต้นแม่พันธุ์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืช เพราะมีลักษณะทนทานต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี

1.3 หน่อไม้ฝรั่ง หรือ asparagus (Asparagus officinalis Linn.) พันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้แก่พันธุ์ ยูนิเวอร์ซิตี ออฟ แคลิฟอร์เนีย 309 (University of California 309) จากการทดสอบของศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผัก พบว่าเป็นพันธุ์ที่แข็งแรง ทนทานต่อโรคราสนิม (rust fungi) ให้ผลผลิตดีกว่าพันธุ์อื่น ๆ มีขนาดของหน่อที่ใหญ่กว่า และสามารถให้ผลผลิตได้ดีทั้งหน่อขาวและหน่อเขียว

2. สารเคมี ได้แบ่งประเภทของสารเคมีออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมาก (macronutreint element) และธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย (micronutrient element) วิตามิน สารควบคุมการเจริญของพืช สารเคมีทั้งหมดจะใช้เกรด AR (analytical reagent) มีปริมาณและความเข้มข้นตามสูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อดังแสดงไว้ในภาคผนวก ก

2.1.2 สารเคมีที่ใช้ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ ได้แก่

Clorox (sodium hypochlorite 5.25%)

95% และ 70% ethyl alcohol

Tween-20

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการผลิตเมล็ดพืชเทียม ได้แก่

Sodium alginate

Calcium nitrate

2.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับการศึกษา synchronization โดยวิธี discontinuous density gradient centrifugation ได้แก่

Ficoll

Percoll

Mannitol

Sucrose

2.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับการศึกษาควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราในเมล็ดพืชเทียม ได้แก่

Benomyl

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1.1 เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดแก้วฝาเกลียวสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร สูง 7.5 เซนติเมตร ขวดแก้วรูปชมพู่ (Elenmayer flask) ขนาด 200, 250 และ 500 มิลลิลิตร ขวดแก้วปรับปริมาตร (volumatic flask) ขนาด 100, 500 และ 1000 มิลลิลิตร กระบอกตวง ขนาด 25, 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร จานเลี้ยงเชื้อ (Petri-dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.5 และ 9.5 เซนติเมตร และแท่งแก้วคน

1.2 เครื่องมืออื่น ๆ ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ หม้อนึ่งอัดความดัน ตู้อบแห้ง เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง เครื่องเขย่า (shaker) เตาไมโครเวฟ บีคเกอร์พลาสติค ปากคีบ ด้ามมีดและใบมีดผ่าตัดเบอร์ 11 กระดาษอลูมิเนียม และกระดาษไข

1.3 ชั้นสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ ชั้นมืดและชั้นสว่าง ชั้นสว่างใช้หลอดฟลูออเรสเซนซ์ของ Phillips T.L.40 W/33 ความเข้มของแสง 1,500-2,000 ลักซ์ ช่วงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ช่วงมืด 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิทั้งของชั้นมืดและชั้นสว่าง 23-25 องศาเซลเซียส

2. อุปกรณ์สำหรับศึกษากระบวนการเกิด somatic embryogenesis

2.1 อุปกรณ์สำหรับศึกษาเซลล์และกระบวนการเกิดเอมบริออยด์

กล้องจุลทรรศน์คอมเพานด์ พร้อมอุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ

กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ พร้อมอุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ

สไลด์หลุม (hanging drop slide) พร้อมแผ่นแก้วปิด

เครื่องมือนับจำนวนเซลล์ ใช้เครื่องมือนับจำนวนเม็ดเลือด (haemocytometer)

อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ บีคเกอร์ หลอดหยดพร้อมลูกบีบยาง เข็มเขี่ย ปากคีบ และจานเลี้ยงเชื้อ

2.2 อุปกรณ์สำหรับการกรองเซลล์และเอมบริออยด์ ได้แก่

ตะแกรงสแตนเลส-สตีลและผ้ากรอง ที่มีรูขนาด 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิเมตร

Komagome pipette พร้อมลูกบีบยาง

อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ บีคเกอร์ แท่งแก้วคน ปากคีบ ช้อนตักสาร ขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร และจานเลี้ยงเชื้อ

3. อุปกรณ์สำหรับศึกษา synchronization โดยวิธี discontinuous density gradient centrifugation ได้แก่

เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)

ผ้ากรองที่มีขนาดของรู 26, 31, 47, 81, 161 และ 270 µm

หลอด centrifuge ขนาด 10 มิลลิลิตร

Komagome pipette พร้อมลูกบีบยาง

อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ บีคเกอร์ แท่งแก้วคน กระบอกตวง ปากคีบ กระดาษอลูมิเนียม กระดาษพาราฟิล์ม และจานเลี้ยงเชื้อ

4. อุปกรณ์สำหรับศึกษาการผลิตเมล็ดพืชเทียม

4.1 อุปกรณ์สำหรับผลิตเมล็ดพืชเทียม ได้แก่

Komagome pipette ขนาดความยาว 26 เซนติเมตร พร้อมลูกบีบยาง

อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ บีคเกอร์ แท่งแก้วคน ปากคีบ ช้อนตักสาร ขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร และจานเลี้ยงเชื้อ

4.2 อุปกรณ์สำหรับเพาะเมล็ดพืชเทียม ได้แก่

ขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

Vermiculite

ดิน : ทราย (1 : 1 โดยปริมาตร)

อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ ปากคีบ ช้อนตักสาร กระดาษอลูมิเนียม และกระดาษพาราฟิล์ม

4.3 อุปกรณ์สำหรับเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียม ได้แก่

ขวดแก้วพร้อมฝาเกลียวสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

กล่องพลาสติคใส ขนาด 17.5x25x9.5 เซนติเมตร

อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ ช้อนตักสาร กระดาษกรอง กระดาษอลูมิเนียม กระดาษพาราฟิล์ม และปากคีบ

วิธีดำเนินการทดลอง

1. แผนการดำเนินการทดลอง

การผลิตเมล็ดพืชเทียมโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อมีขั้นตอนในการดำเนินการทดลองโดยสังเขปตลอดโครงการ ดังแสดงไว้ตามแผนภาพที่ 1

2. การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ

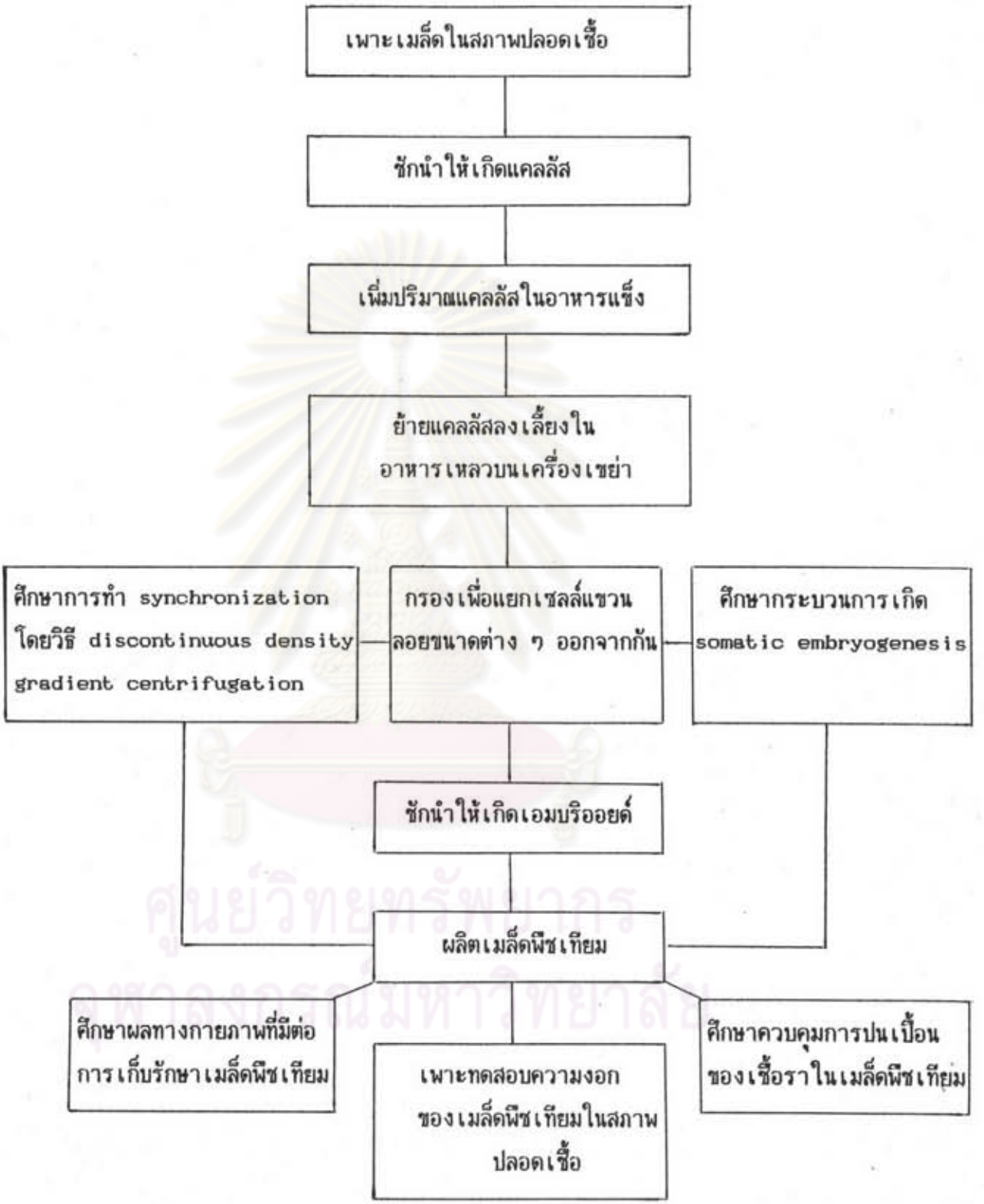
อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้ในงานวิจัยนี้เตรียมตามสูตรต่าง ๆ ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ก โดยจัดแบ่งสูตรอาหารออกเป็น

2.1 สูตรอาหารสำหรับเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ (seed germination medium)

ใช้สูตรอาหารพื้นฐานของ Murashige and Skoog (1962) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญของพืช บรรจุอาหารวุ้นลงในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละประมาณ 50 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยกระดาษอลูมิเนียม

2.2 สูตรอาหารสำหรับชักนำแคลลัส (callus induction medium)

ใช้สูตรอาหารพื้นฐานของ Murashige and Skoog (1962) ดัดแปลงโดยการเติมสารควบคุมการเจริญของพืชที่เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด บรรจุอาหารวุ้นลงในขวดแก้วพร้อมฝาเกลียวสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ขวดละประมาณ 12.5 มิลลิลิตร สำหรับชักนำแคลลัสจากส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้ายาสูบและแครอท



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพที่ 1 แผนดำเนินการทดลองโดยสังเขป

สำหรับการชักนำแคลลัสจากส่วนตาข้าง (lateral bud) และตายอด (terminal bud) ของหน่อไม้ฝรั่งนั้นใช้สูตรอาหารพื้นฐานของ White (1963) ที่ดัดแปลงตามวิธีการของ Steward et al., (1971) โดยการเติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซนต์ และ NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรทดลองที่ 1 และใช้สูตรอาหารพื้นฐานของ Murashige and Skoog (1962) ที่ดัดแปลงตามวิธีของ Redenbeaugh et al., (1987) เป็นสูตรทดลองที่ 2 สำหรับสูตรทดลองที่ 3 ปรับปรุงจากสูตรทดลองที่ 1 และ 2 (ภาคผนวก ก ข้อ 1)

2.3 สูตรอาหารสำหรับชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ (embryoid induction medium)

ใช้สูตรอาหารพื้นฐานของ Murashige and Skoog (1962) ที่ไม่เติมออกซิน (auxin) สำหรับชักนำให้เกิดเอมบริออยด์จากแคลลัสของแครอทและยาสูบ ส่วนการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์จากแคลลัสของหน่อไม้ฝรั่งใช้สูตรทดลองตามภาคผนวก ก ข้อ 2 อาหารสำหรับชักนำเอมบริออยด์เป็นอาหารเหลวที่บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 200 มิลลิลิตร ขวดละ 25 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยกระดาษอลูมิเนียม

อาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทั้งหมดนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดัน 1.1 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15-20 นาที

3. การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

3.1 การเพาะเมล็ดพืชในสภาพปลอดเชื้อ (seed germination in aseptic condition)

นำเมล็ดที่เจริญเต็มที่ของหน่อไม้ฝรั่ง แครอท และยาสูบ มาฆ่าเชื้อที่ผิวเปลือกเมล็ด (surface sterilization) ด้วย clorox (sodium hyperchlorite 5.25%) ตามวิธีของ Vajrabhaya and Vajrabhaya (1986) ดังนี้

1. ล้างเมล็ดพืชด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ เติม tween 20 ลงไปประมาณ 6 หยดต่อน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร เขย่านาน 3 นาที
2. ล้างด้วย 70% ethyl alcohol 1 นาที
   ล้างด้วย 20% clorox 20 นาที
   ล้างด้วย 15% clorox 20 นาที
   ล้างด้วย 10% clorox 20 นาที
   ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วอย่างน้อย 3 ครั้ง

3. ตักเมล็ดพืชลงเก็บในจานเลี้ยงเชื้อ

4. ย้ายเมล็ดลงไปเลี้ยงในอาหารวุ้นที่เตรียมไว้สำหรับเพาะเมล็ด โดยใส่ขวดละประมาณ 5 เมล็ด

นำขวดที่เพาะเมล็ดไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีความเข้มของแสง 1,500-2,000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 23-25 องศาเซลเซียส จนกระทั่งต้นกล้าพืชมีความแข็งแรงพอที่จะนำมาศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.2 <u>การชักนำให้เกิดแคลลัส</u> (callus induction)

ในยาสูบและแครอททำโดยนำต้นกล้าพืชที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อมาตัดเป็นท่อน ๆ ยาวประมาณท่อนละ 3 มิลลิเมตร โดยตัดแยกส่วนของพืชออกเป็น ไฮโปโคทิล (hypocotyl) ก้านใบ ใบ ลำต้นและราก หลังจากนั้นนำส่วนของพืชไปเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของแคลลัสจากส่วนต่าง ๆ ของพืช ทั้งในที่มืดและที่มีแสงสว่าง

การชักนำแคลลัสของหน่อไม้ฝรั่งจากส่วนตายอดและตาข้าง ใช้มีดตัดส่วนของใบเกล็ดที่ปิดตายอดและตาข้างทิ้งไป นำเฉพาะส่วนของตายอดและตาข้างมาเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสตามภาคผนวก ก ข้อ 1 ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของแคลลัสที่ชักนำจากตายอดและตาข้างในที่มืดในอาหารสูตรทดลองทั้ง 3 สูตร

บันทึกผลการทดลองโดยการให้คะแนนแคลลัสทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในระหว่างการชักนำแคลลัสจะย้ายเนื้อเยื่อ (sub-culture) ไปเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำแคลลัสใหม่ทุก ๆ 2 สัปดาห์

3.3 <u>การเพิ่มปริมาณแคลลัส</u> (callus muliplication)

หลังจากชักนำแคลลัสจนครบ 8 สัปดาห์ นำแคลลัสที่ได้มาเพิ่มปริมาณแคลลัสโดยตัดแบ่งแคลลัสออกเป็นก้อนเล็ก ๆ แต่ละก้อนมีน้ำหนักประมาณ 1.0 มิลลิกรัม เลี้ยงในอาหารวุ้นสูตรชักนำแคลลัสขวดละก้อน และย้ายลงอาหารใหม่ทุก ๆ 2 สัปดาห์

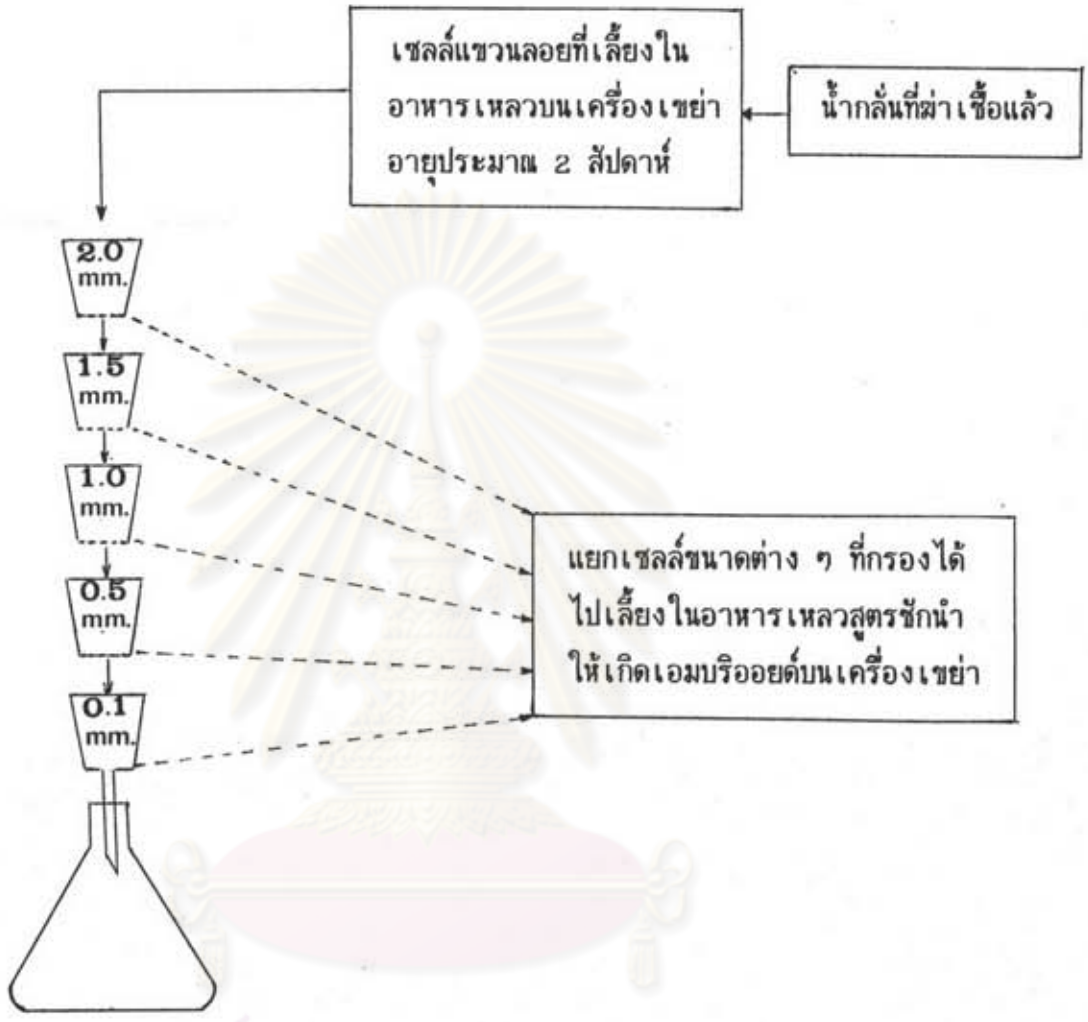
3.4 <u>การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย</u> (suspension culture)

เมื่อต้องการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย จะย้ายแคลลัสจากขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อในข้อ 3.3 ลงมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำแคลลัสบนเครื่องเขย่า เพื่อเขย่าให้กลุ่มของเซลล์ที่ประกอบกันเป็นแคลลัสแยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือกลุ่มเซลล์เล็ก ๆ เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณเซลล์ และนำไปศึกษา somatic embryogenesis โดยละเอียดต่อไป

3.5 <u>การกรองเซลล์แขวนลอย</u> (filtration of suspension cell)

เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลวครบ 2 สัปดาห์แล้ว นำเซลล์แขวนลอยนั้นมากรองเพื่อแยกเซลล์แขวนลอยขนาดต่าง ๆ ออกจากกัน โดยกรองด้วยตะแกรงกรองที่มีรู

ขนาดต่าง ๆ ได้แก่ 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 และ 0.1 มิลลิเมตร ตามแผนภาพที่ 2 โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้



แผนภาพที่ 2 แสดงขั้นตอนการแยกเซลล์แขวนลอยขนาดต่าง ๆ ออกจากกัน

1. นำเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าเทลงบนตะแกรงที่มีรูขนาดใหญ่ที่สุดไปจนถึงตะแกรงที่มีรูขนาดเล็กที่สุดตามลำดับ เซลล์แขวนลอยจะไหลผ่านตะแกรงที่มีรูขนาดต่าง ๆ กัน ทำให้สามารถแยกเซลล์ที่มีขนาดต่างกันออกจากกัน

2. เทน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วตามลงไปบนตะแกรง เพื่อช่วยให้เซลล์ลอดผ่านตะแกรงได้ดีขึ้น ขั้นตอนนี้อาจทำซ้ำมากกว่า 1 ครั้ง

3. นำเซลล์ขนาดต่าง ๆ ที่แยกไว้ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์บนเครื่องเขย่า

ศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงและการเจริญของเซลล์ขนาดต่าง ๆ ที่ได้จากการกรอง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์คอมเพานด์และกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ เพื่อประกอบการศึกษา somatic embryogenesis โดยละเอียดต่อไป

3.6 ศึกษาการทำ synchronization โดยวิธี discontinuous density gradient centrifugation ของแครอท

การศึกษาในเรื่องนี้เลือกใช้เฉพาะเซลล์แครอท โดยนำเซลล์แขวนลอยของแครอทที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีอายุประมาณ 14 วัน มากรองผ่านตะแกรงกรองหรือผ้ากรองที่มีรูขนาด 161, 81, 47, 31 และ 26 ไมครอน ตามลำดับ เก็บเซลล์แขวนลอยที่ค้างอยู่บนผ้ากรองแต่ละขนาด ยกเว้นขนาดที่ใหญ่กว่า 161 ไมครอน นำมาศึกษาการทำ fractionation ของเซลล์โดยวิธี discontinuous density gradient centrifugation ตามวิธีการของ Fujimura and Komamine (1984) ตามแผนภาพที่ 3 โดยมีเทคนิคและวิธีการดังต่อไปนี้

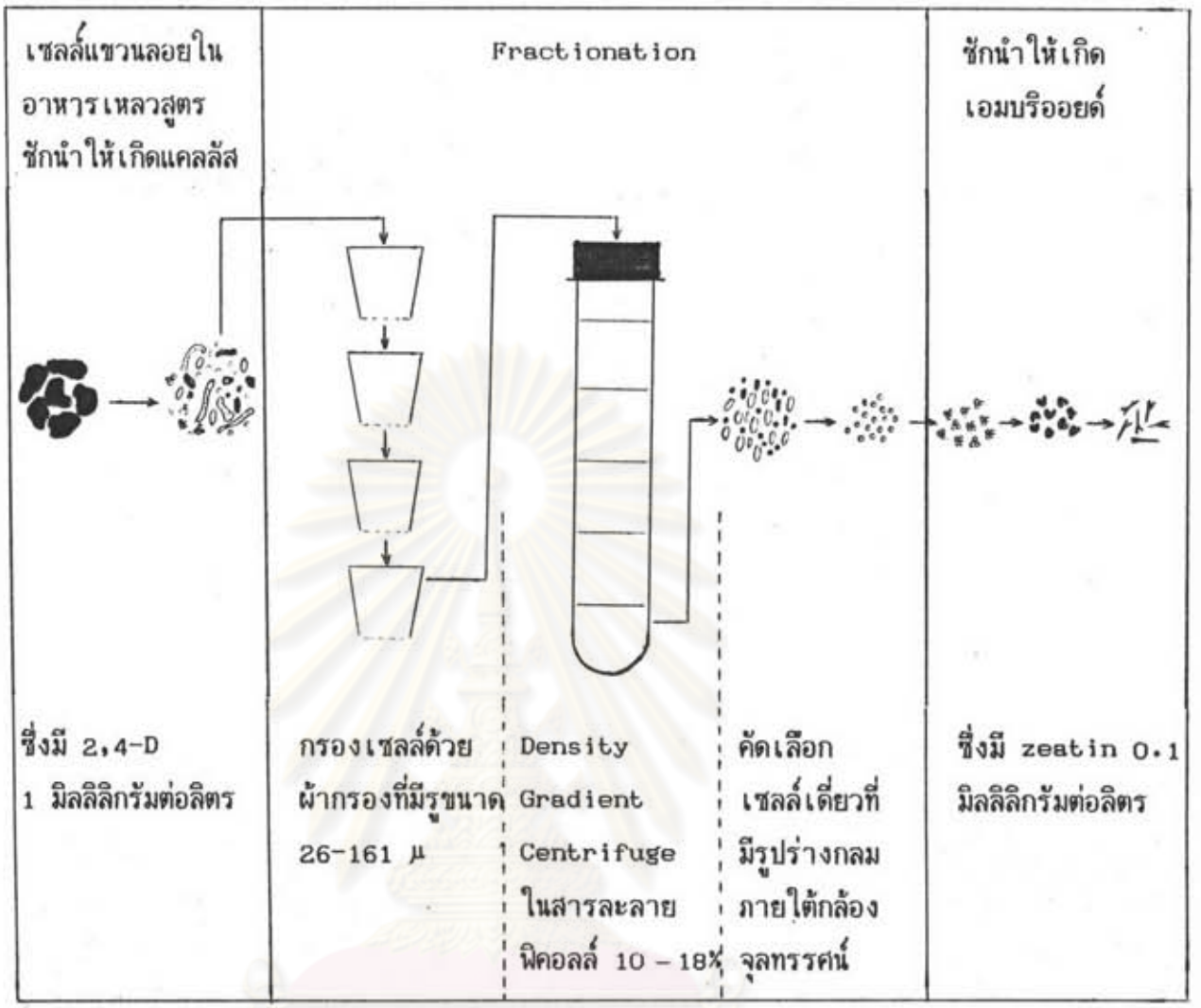
1. บรรจุความเข้มข้นของสารละลายฟิคอลล์ 18, 16, 14, 12 และ 10 เปอร์เซนต์ ตามลำดับก่อนหลัง ลงในหลอด centrifuge ขนาด 15 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม 2 เปอร์เซนต์ซูโครส อีก 1.5 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นออสโมติคัม การเติมสารละลายฟิคอลล์และซูโครสต้องทำอย่างระมัดระวังภายใต้สภาวะที่ปลอดเชื้อ สารละลายฟิคอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันจะแยกชั้นกัน

2. บรรจุเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการกรอง ลงในหลอด centrifuge ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 หลอดละประมาณ 1 มิลลิลิตร โดยใส่อย่างระมัดระวังไว้ส่วนบนสุด แล้วปิดหลอด centrifuge ด้วยกระดาษอลูมิเนียมที่ฆ่าเชื้อแล้ว

3. นำหลอด centrifuge ไปเหวี่ยงในเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 50 g เวลา 1 นาที แล้วทำซ้ำอีกครั้งด้วยแรงเหวี่ยง 150 g เวลา 4 นาที

4. เซลล์แขวนลอยที่อยู่บนสารละลายฟิคอลล์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์จะตกตะกอนแยกกันอยู่บนผิวหน้าของสารละลายฟิคอลล์ระหว่างความเข้มข้นที่ต่างกันและบริเวณก้นหลอด แยกเซลล์เดี่ยวขนาดต่าง ๆ ออกเป็นชั้น ๆ

5. ดูดเซลล์ในแต่ละชั้นด้วย Komagome pipette ออกมาอย่างระมัดระวัง โดยแยกดูดแต่ละชั้นออกจากกัน นำไปใส่ในอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ที่บรรจุอยู่ในหลอด centrifuge 10 มิลลิลิตร เหวี่ยงในเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยแรง 50 g เวลา 30 วินาที ดูดเอาส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งแล้วเติมอาหารเหลวลงไปใหม่ โดยทำซ้ำกัน 3 ครั้ง เพื่อขจัดเอาสารละลายฟิคอลล์ออกจากเซลล์ทั้งหมด เซลล์ที่ได้จากการปั่นแยกโดยวิธีนี้จะเป็นเซลล์ที่มีขนาดเท่ากัน (homogeneous) จำนวนมาก



แผนภาพที่ 3 ขั้นตอนการศึกษา synchronization โดยวิธี discontinuous density gradient centrifugation จากเซลล์แขวนลอยของแครอท (Daucus carota) ตาม Fujimura and Komamine (1984)

6. ทำ manual picking-up โดยใช้ Komagome pipette คัดเลือก เก็บเฉพาะเซลล์เดียวที่มีรูปร่างกลม มี cytoplasm มาก นิวเคลียสขนาดใหญ่ และเซลล์มีขนาดเท่า ๆ กัน จะได้ homogeneous cell ที่มีขนาดเท่ากันมากยิ่งขึ้น

นำ homogeneous cell ที่ได้มาเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ ที่บรรจุอาหาร 10 มิลลิลิตร ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า ศึกษาการเจริญและการพัฒนาของเซลล์เดี่ยว นับจำนวนเซลล์ที่ได้ด้วยเครื่องมือนับจำนวนเซลล์ ศึกษาลักษณะและรูปร่างของเซลล์และเอมบริออยด์ในระยะต่าง ๆ

พร้อมทั้งวัดขนาดของเซลล์ เขียนแผนภูมิหรือกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดเอมบริออยด์และจำนวนของเอมบริออยด์ในระยะต่าง ๆ กับระยะเวลาที่ใช้ในการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ บันทึกภาพที่ได้ประกอบการศึกษา

3.7 <u>การชักนำให้เกิดเอมบริออยด์</u> (embryoid induction)

นำกลุ่มของเซลล์ที่มีขนาดต่าง ๆ กัน มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ (ภาคผนวก ก ข้อ 2) บนเครื่องเขย่า อุณหภูมิ 23-25 องศาเซลเซียส ความเข้มของแสง 1,500 ลักซ์ ช่วงแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน

บันทึกผลการทดลองโดยการนับจำนวนเซลล์และเอมบริออยด์ในระยะต่าง ๆ พร้อมทั้งศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ขนาดต่าง ๆ ว่าเซลล์ขนาดใดจะมีอัตราการเปลี่ยนแปลงมาเป็นเอมบริออยด์ได้ดีที่สุด เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตรการเจริญของเอมบริออยด์ระยะต่าง ๆ กับระยะเวลาที่ใช้ในการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ พร้อมทั้งบันทึกภาพที่ได้ประกอบการศึกษา

3.8 <u>ศึกษากระบวนการเกิด somatic embryogenesis</u>

เมื่อนำ homogeneous cell มาเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดเอมบริออยด์แล้ว ศึกษาขั้นตอนของการเจริญจากเซลล์เดี่ยวจนได้เอมบริออยด์ในระยะต่าง ๆ คือ globular stage early-heart stage heart stage late-heart stage และ torpedo stage จากการสังเกตและการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์คอมเพานด์และกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ วัดขนาดและนับจำนวนเอมบริออยด์ระยะต่าง ๆ พร้อมทั้งบันทึกภาพที่ได้ประกอบการศึกษา

3.9 <u>การผลิตเมล็ดพืชเทียม</u> (artificial seed production)

เมื่อกลุ่มของเซลล์พัฒนาเป็นเอมบริออยด์ในระยะ torpedo แล้ว นำมากรองบนตะแกรงเพื่อแยกเอมบริออยด์ระยะ torpedo ที่มีขนาดต่างกันออกจากกัน เพื่อให้ได้เอมบริออยด์ที่มีขนาดสม่ำเสมอกันมากยิ่งขึ้น หลังจากนั้นนำเอมบริออยด์ที่กรองได้มาผลิตเป็นเมล็ดพืชเทียมภายใต้สภาวะที่ปลอดเชื้อ โดยวิธีการดังต่อไปนี้

1. ผสมเอมบริออยด์ที่ได้จากการกรองลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Murashige and Skoog (1962) ที่เติม sodium alginate 2 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งใช้เป็นเอนโดสเปิร์มเทียม (artificial endosperm) ของเอมบริออยด์ ใช้แท่งแก้วคนให้เอมบริออยด์แขวนลอยและกระจายในอาหารให้มากที่สุด

2. ใช้ Komagome pipette ดูดอาหารที่มีเอมบริออยด์ผสมอยู่นั้นมาหยดลงในสารละลายของ calcium nitrate 100 mM จะได้เมล็ดพืชเทียมที่มีลักษณะคล้ายเม็ดสาคูใส ๆ มองเห็นเอมบริออยด์สีเขียวอยู่ภายใน โดยมี calcium alginate ซึ่งเกิด

จากปฏิกิริยาของ sodium alginate กับ calcium nitrate ทำหน้าที่เป็นเปลือกเมล็ดพืชเทียม (artificial seed coat)

3. กรองเมล็ดพืชเทียมที่ได้บนตะแกรง แล้วล้างเมล็ดพืชเทียมด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วบนตะแกรงประมาณ 3 ครั้ง เพื่อขจัดเอาสารละลาย calcium nitrate ออกไปให้หมด

นำเมล็ดพืชเทียมที่ได้มาทดสอบความงอก และวิธีการเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียมตามขั้นตอนต่อไป

3.10 <u>ทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมในสภาพปลอดเชื้อ</u> (artificial seed germination testing aseptic condition)

นำเมล็ดพืชเทียมที่ผลิตได้มาเพาะในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุ vermiculite (เป็นวัสดุปลูก) ขวดละ 15 กรัม และผสมสูตรอาหารทดลองแบบต่าง ๆ ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดัน เปรียบเทียบผลของสูตรอาหาร MS (1962) Modified W.P. formular (WP) ตาม Bentley (1985) ในภาคผนวก ก ข้อ 3 และน้ำประปา ต่อการงอกของเมล็ดพืชเทียมที่เพาะในสภาพปลอดเชื้อ ดังนี้

<u>สัญลักษณ์ที่ใช้ในการทดลอง</u>

vermiculite 15 กรัมต่อขวด
- อาหารเหลวสูตร MS — A_1
- น้ำปุ๋ยสูตรดัดแปลง WP — A_2
- น้ำประปา — A_3

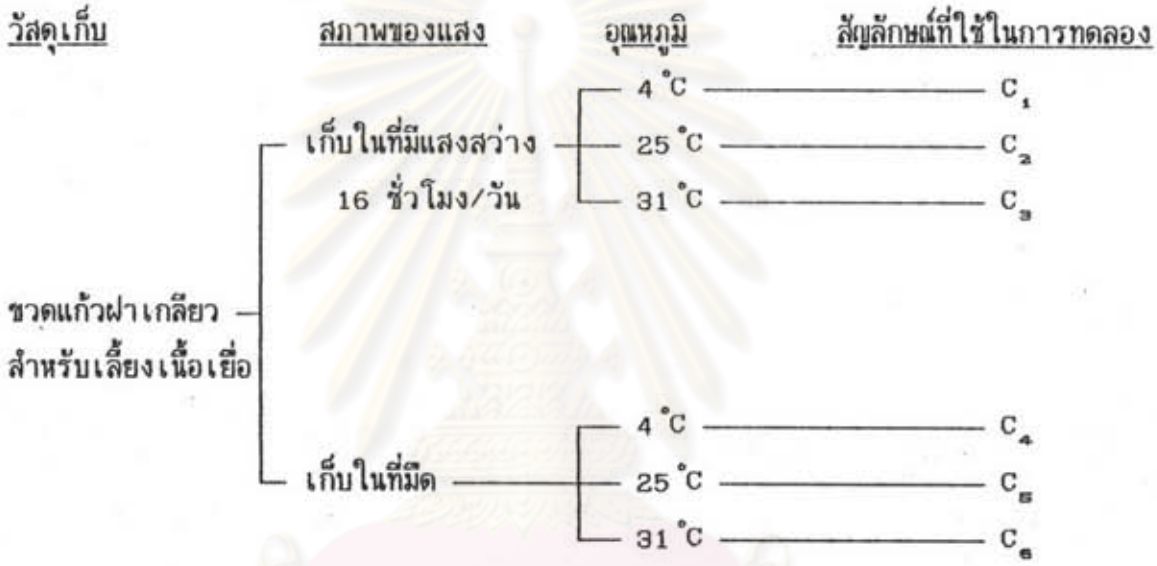
เพาะเมล็ดพืชเทียมขวดละ 50 เมล็ด ชุดการทดลอง (treatment) ละ 8 ขวด รวม 400 เมล็ด นำขวดแก้วรูปชมพู่ที่เพาะเมล็ดไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบนชั้นสว่าง ความเข้มของแสง 2,000 ลักซ์

นับจำนวนเมล็ดพืชเทียมที่มีการงอกของเอมบริออยด์ออกมาพ้น artificial seed coat ในแต่ละขวด บันทึกผลการทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมตามวิธีมาตรฐานสากลในการทดสอบความงอกของเมล็ดพืช ตามวิธี ISTA (International Seed Testing Association) แล้วหาเปอร์เซนต์การงอกของเมล็ดพืชเทียมในแต่ละชุดการทดลอง

3.11 <u>การศึกษาผลทางกายภาพที่มีต่อการเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียมของแครอท</u>

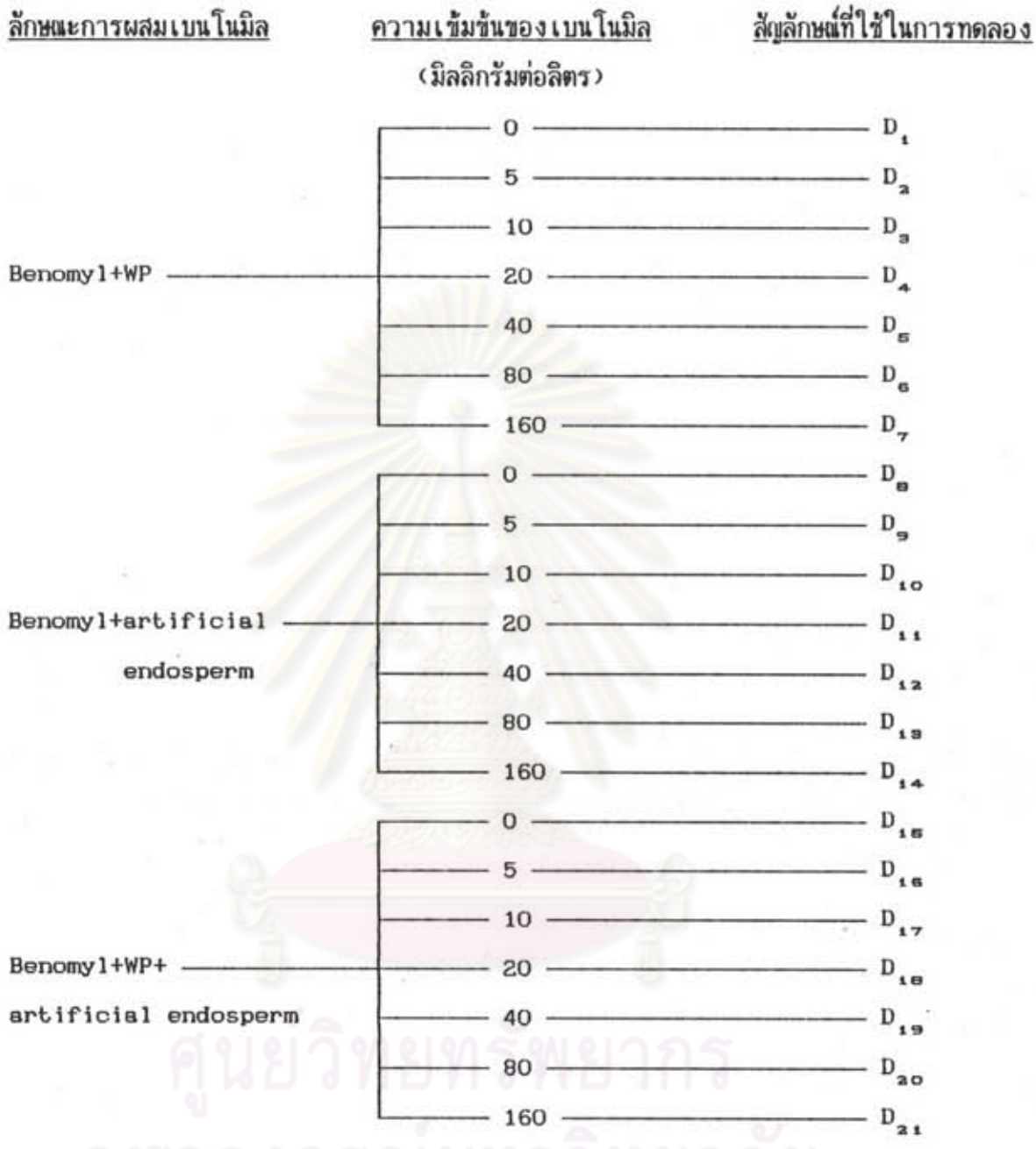
นำเมล็ดพืชเทียมแครอทที่ผลิตได้มาศึกษาผลทางกายภาพที่มีต่อการเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียม เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของแสง และอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บ โดยบรรจุ

เมล็ดพืชเทียมลงในวัสดุเก็บซึ่งได้แก่ขวดแก้วฝาเกลียวสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ รองก้นขวดด้วยกระดาษกรอง และเติมอาหารเหลวสูตร MS (1962) เล็กน้อย เพื่อเป็นแหล่งอาหารเสริมให้กับเมล็ดพืชเทียม บรรจุเมล็ดพืชเทียมในวัสดุเก็บชุดละ 50 เมล็ด นำไปเก็บในที่มีสภาพแสงและอุณหภูมิแตกต่างกัน หลังจากนั้นนำเมล็ดพืชเทียมออกมาเพาะทดสอบความงอกในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อหาเปอร์เซนต์การงอกของเมล็ดพืชเทียมทุก ๆ 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แต่ละชุดการทดลองจะมี 8 ซ้ำ (replication) ดังนี้



3.12 การศึกษาควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราในเมล็ดพืชเทียมของแครอท

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาป้องกันการปนเปื้อนของเมล็ดพืชเทียม ได้แก่ เบนโนมิล (Benomyl) เพื่อศึกษาหาความเข้มข้นของเบนโนมิลที่เหมาะสมต่อการป้องกันการปนเปื้อนของเมล็ดพืชเทียมที่เพาะในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้เบนโนมิลความเข้มข้นระดับต่าง ๆ คือ 0, 5, 10, 20, 40, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ผสมลงใน artificial endosperm หรือน้ำปุ๋ยสูตร WP อย่างใดอย่างหนึ่ง หรือผสมลงทั้งใน artificial endosperm และ น้ำปุ๋ยสูตร WP ทั้ง 2 อย่าง ตามแผนภาพดังต่อไปนี้



แต่ละชุดการทดลองจะมี 8 ซ้ำ เพาะเมล็ดพืชเทียมซ้ำละ 50 เมล็ด รวมแต่ละชุดการทดลองมี 400 เมล็ด หาเปอร์เซนต์การงอกของเมล็ดพืชเทียม ศึกษาการงอกของเมล็ดพืชเทียมในแต่ละความเข้มข้นของเบนโนมิล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การเก็บรวบรวมข้อมูลการทดลอง

4.1 การให้คะแนนแคลลัส

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนต่าง ๆ ของพืชที่ใช้ในการทดลอง โดยการให้คะแนนแคลลัสตามเกณฑ์มาตรฐานที่วางไว้ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ติดต่อกัน คะแนนของแคลลัสขึ้นอยู่กับขนาดของแคลลัสที่เกิดขึ้น เกณฑ์การให้คะแนนดังแสดงในแผนภาพที่ 4

ให้คะแนนแคลลัสที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยคะแนนจะขึ้นกับขนาดของแคลลัสที่เกิดขึ้น โดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางแคลลัส

คะแนน 0 — เนื้อเยื่อตาย

คะแนน 1 — เนื้อเยื่อยังมีชีวิตแต่ไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น

คะแนน 2 ○ เนื้อเยื่อเริ่มมีการเจริญไปเป็นแคลลัสพอจะมองเห็นได้ แต่จะมีขนาดของแคลลัสที่เกิดขึ้นโตไม่เกิน 2 มม.

คะแนน 3 ◯ เนื้อเยื่อมีแคลลัสเกิดขึ้นและแคลลัสมีการเจริญต่อไปได้โดยมีขนาดของแคลลัสที่เกิดขึ้นมากกว่า 2 มม. แต่ไม่เกิน 5 มม.

คะแนน 4 เนื้อเยื่อมีขนาดของแคลลัสที่เกิดขึ้นมากกว่า 5 มม. แต่ไม่เกิน 1 ซม.

คะแนน 5 เนื้อเยื่อมีขนาดของแคลลัสที่เกิดขึ้นมากกว่า 1 ซม. แต่ไม่เกิน 1.5 ซม.

คะแนน 6 เนื้อเยื่อมีขนาดของแคลลัสที่เกิดขึ้นมากกว่า 1.5 ซม. แต่ไม่เกิน 2 ซม.

คะแนน 7 เนื้อเยื่อมีขนาดของแคลลัสที่เกิดขึ้นมากกว่า 2 ซม. แต่ไม่เกิน 2.5 ซม.

แผนภาพที่ 4 เกณฑ์การให้คะแนนแคลลัส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความแตกต่าง บันทึกภาพและเขียนแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างคะแนนการเจริญของแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ กับระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4.2 <u>การนับจำนวนเซลล์และเอมบริออยด์</u>

การทำ synchronization โดยวิธี discontinuous density gradient centrifugation จะได้ homogeneous cell ที่เป็นเซลล์เดี่ยวจำนวนมาก การเก็บรวบรวมผลการทดลองจึงใช้วิธีการนับจำนวนเซลล์ของเซลล์เดี่ยว และเอมบริออยด์ระยะ globular ด้วย haemocytometer เก็บผลการทดลองทุกวัน เพื่อศึกษาการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เดี่ยวไปเป็นเอมบริออยด์ในระยะ torpedo โดยวิธีการดังต่อไปนี้

1. haemocytometer จะมีช่องตารางขนาด 0.25x0.25 มิลลิเมตร จำนวน 64 ช่อง

2. เปรียบเทียบจำนวนเซลล์เดี่ยวหรือ globular stage ต่อช่อง หรือจำนวนเซลล์เดี่ยวต่อมิลลิลิตรจะได้

1 ช่อง = 0.25x0.25x0.1 มิลลิเมตร = 0.025x0.025x0.01 เซนติเมตร

= 6.25×10^{-5} มิลลิลิตร

3. สูตรการคำนวณคือ

$$\frac{\text{จำนวนเซลเดี่ยวต่อช่อง}}{6.25 \times 10^{-5} \text{ มิลลิลิตรต่อช่อง}} = \text{จำนวนเซลล์เดี่ยวต่อมิลลิลิตร}$$

4. ปรับความหนาแน่นของเซลล์เดี่ยว หรือเอมบริออยด์ระยะ globular เป็น 1×10^{3} เซลล์ต่อมิลลิลิตร

สำหรับเอมบริออยด์ระยะ early-heart shape, heart shape, late-heart shape และ torpedo shape ซึ่งมีขนาดใหญ่เกินกว่าจะใช้ haemocytometer นับได้ จำเป็นต้องใช้การนับโดยทางอ้อม (indirect countting) โดยการนำเซลล์แขวนลอยประมาณ 1 มิลลิลิตร ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำเอมบริออยด์ 25 มิลลิลิตร ในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 200 มิลลิลิตร ใช้ Komagome pipette ดูดเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวนั้นมาประมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในสไลด์หลุม 1-2 หยด แล้วนับจำนวนเซลล์หรือเอมบริออยด์ทั้งหมดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วนำผลมาคำนวนกลับ โดยหาจำนวนหยดต่อหนึ่งมิลลิลิตร จำนวนประชากรทั้งหมดที่นับได้ถือเป็นจำนวนประชากรต่อ 1 ขวด นำผลการทดลองมาวิเคราะห์ เขียนแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเอมบริออยด์ระยะต่าง ๆ กับระยะเวลาที่ใช้ในการชักนำเอมบริออยด์

T 1809117

4.3 การหาเปอร์เซนต์ความงอกของเมล็ดพืชเทียม

เมื่อทำการทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมในแต่ละชุดของการทดลอง ซึ่งใช้วิธีการทดสอบความงอกตามวิธีมาตรฐานสากลของ ISTA โดยนับจำนวนเมล็ดพืชเทียมที่มีการงอกของเอมบริออยด์พ้นออกมาจากเปลือกเมล็ดพืชเทียม เป็น 1 เมล็ด ไม่ว่าภายใน 1 เมล็ดพืชเทียมนั้นจะบรรจุเอมบริออยด์ไว้ภายในกี่เอมบริออยด์ก็ตาม หลังจากนับครั้งแรก นับครั้งสุดท้าย และเมล็ดที่ตาย ตลอดจนเมล็ดที่งอกผิดปกติแล้ว นำมาหาเปอร์เซนต์การงอกของ เมล็ดพืชเทียม เขียนแผนภูมิแสดงเปอร์เซนต์การงอกของเมล็ดพืชเทียมของพืชแต่ละชนิดที่ทดสอบ

4.4 การหาค่าทางสถิติ

การวางแผนการทดลองตลอดจนงานวิจัยใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Complete Randomized Design) และคิดคำนวณค่าทางสถิติด้วยไมโครคอมพิวเตอร์ โดยใช้ซอฟแวร์ statistical processing system รุ่นที่ 4 ลิขสิทธิ์ของบริษัท Databasic, Inc. ในปี ค.ศ. 1985 โดย Buhyoff, G.I., R.C. Kirk, H.M. Rauscher, R.B. Hull IV, E.E. MacKenna ซึ่งเขียนด้วยภาษาเบสิค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย