บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์

เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) Laboratory Hot Plate PC-101, Corning Glass Works, Corning, NY ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องเขย่าแบบหมุน (Phychrotherme rotary incubator shaker) รุ่น Innova^{TM} 4330 ของ New Brunwick Scientific Co., Inc. New Jersey, ประเทศสหรัฐอเมริกา

ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) ยี่ห้อ Cambridge ของบริษัท Dwyer Instrument, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

ตู้อบไมโครเวฟ รุ่น NE-7670 ยี่ห้อ National ของบริษัท Matsushita Electric Industrial Co., Ltd., ประเทศญี่ปุ่น

มาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 501 ของบริษัท Horiba, ประเทศญี่ปุ่น

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-26 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation ประเทศญี่ปุ่น และรุ่น KT-30SD ของบริษัท ALP Co., Ltd, Tokyo ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องอบฆ่าเชื้อแบบแห้ง (Hot air oven) รุ่น 94789 ของบริษัท Contherm Scientific Ltd., ประเทศนิวซีแลนด์

เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AE-240 ยี่ห้อ Mettler ของบริษัท Mettler Instrumente, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

เครื่องชั่งหยาบ รุ่น PM6100 ยี่ห้อ Mettler ของบริษัท Mettler Instrumente, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

2.1.2 สารเคมี

สารเคมี		บริษัทผู้ผลิต
กรดไฮโดรคลอลิก	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
เอทานอล	กรมสรรพสามิต	ประเทศไทย
เบนซิลอะดีนีน	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
กรดอินโดลแอซีติก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดอินโดลบิวทีริก	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
กรดแนพทาลีนแอซีติก	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
ไคเนทิน	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
โฟลโรกลูซินอล	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดจิบเบอเรลลิก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
คลอรอกซ์	The Clorox Company	ประเทศสหรัฐอเมริกา
ไทรทอน เอ็กซ์-100	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
แอมโมเนียมไนเทรต	AJAX Chemical	ประเทศออสเตรเลีย
โพแทสเซียมไนเทรต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
กรดบอริก	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
แมงกานีสซัลเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โพแทสเซียมไอโอไดด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
ซิงค์ซัลเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมโมลิบเดต	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
โคบอลท์คลอไรด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
คอปเปอร์ซัลเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
แคลเซียมคลอไรด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปทะไฮเดรต	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
ไดโซเดียมเอทิลีนไดอะมีนเททระแอซีติก	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

สารเคมี		บริษัทผู้ผลิต
เฟอรัสซัลเฟต	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
ไมโอ-อิโนซิทอล	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
กรดนิโคทินิก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
ไพริดอกซิน	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
ไทมีนไฮโดรคลอริก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
ไกลซีน	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
น้ำตาลทราย (ซูโครส)	มิตรผล	ประเทศไทย
ผงวุ้น	ตรานางเงือก	ประเทศไทย

2.2 พันธุ์เปล้าน้อย

เปล้าน้อยที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นำมาจากต้นเปล้าน้อยที่ปลูกไว้ในแปลงทดลองของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นรวบรวมต้นเปล้าน้อยที่ได้จาก จ.ประจวบคีรีขันธ์ และ จ.นครพนม

2.3 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเกิดยอดจำนวนมาก (multiple shoots)

2.3.1 การเตรียมเนื้อเยื่อพืช

นำเนื้อเยื่อของเปล้าน้อยสายพันธุ์ IBGE 2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้มีการคัดเลือกว่ามีปริมาณเปลาโนทอลสูงและมีสิ่งเจือปน (impurity) ในปริมาณน้อยมาก (ชลิดา เล็กสมบูรณ์ และ วีระเดช สุขเอียด, 2539) มาฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิว โดยมีวิธีการฟอกฆ่าเชื้อดังนี้

ส่วนยอด ตัดยอดเปล้าน้อยความยาว 5-6 นิ้ว มาตัดใบออก ล้างด้วยน้ำสะอาด โดยตัดกิ่งของเปล้าน้อยให้ได้ขนาด 1 นิ้ว นำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 70%(v/v) นาน 2 นาที แล้วฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอรอกซ์ 10%(v/v) ที่มีการเติมไทรทอน เอ็กซ์-100 0.05%(v/v) เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำที่ขจัดไอออนออกและนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตัดเฉพาะบริเวณที่มีเนื้อเยื่อปลายยอดและตาข้างนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตรมูราชิเกะและสคูค (Murashige และ Skoog 1962, MS) (ส่วนประกอบและวิธีการ เตรียมดูในภาคผนวก ก-ค) เพื่อใช้สำหรับการทดลอง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนปล้อง ตัดเนื้อเยื่อส่วนปล้องของเปล้าน้อย ให้ได้ขนาด 1 นิ้ว ทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธีการเช่นเดียวกันกับส่วนยอด ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ หนาประมาณ 1 มิลลิเมตร นำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้สำหรับการทดลอง

2.3.2 การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากชิ้นส่วนปลายยอดและตาข้าง

เลี้ยงปลายยอดและตาข้างของเปล้าน้อยบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และอาหารสูตร MS ที่เติมไคเนทิน (Kinetin, Kn) หรือ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0, 5.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับโฟลโรกลูซินอล (Phloroglucinol; PG) ความเข้มข้น 1.62 กรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดจิบเบอเรลลิก (Gibberellic acid, GA_3) ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังตาราง 2-1 มีการเติมซูโครส 3%(w/v) วุ้น 7%(w/v) ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 เลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในสภาพที่ได้รับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 3000 ลักซ์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 3 สัปดาห์ บันทึกลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ นับจำนวนยอดต่อชิ้นและเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด} = \frac{\text{จำนวนเนื้อเยื่อที่เกิดยอด}}{\text{จำนวนเนื้อเยื่อทั้งหมดที่ไม่มีการปนเปื้อน}} \times 100$$

ตาราง 2-1 สูตรอาหารร่วมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้เลี้ยงส่วนปลายยอดและตาข้างของเปล้าน้อยเพื่อชักนำให้เกิดยอด

สูตรอาหาร MS	Kn มิลลิกรัมต่อลิตร	BA มิลลิกรัมต่อลิตร	PG กรัมต่อลิตร	GA_3 มิลลิกรัมต่อลิตร
1	0	0	0	0
2	0.5	0	0	0
3	1.0	0	0	0
4	5.0	0	0	0
5	10.0	0	0	0
6	0	0.5	0	0
7	0	1.0	0	0
8	0	5.0	0	0
9	0	10.0	0	0
10	0	1.0	1.62	0.03

2.3.3 การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากชิ้นส่วนของปล้อง

เลี้ยงส่วนปล้องของเปล้าน้อยบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติมเบนซิลอะดีนีน (N_6-benzyladenin, BA) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 3%(w/v) วุ้น 7%(w/v) ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 เลี้ยงเนื้อเยื่อที่สภาพที่ไม่ให้แสง ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่ทุก 3 สัปดาห์ สังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ นับจำนวนยอดต่อชิ้น และวัดเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด} = \frac{\text{จำนวนเนื้อเยื่อที่เกิดยอด}}{\text{จำนวนเนื้อเยื่อทั้งหมดที่ไม่มีการปนเปื้อน}} \times 100$$

2.4 การเพิ่มปริมาณยอด

2.4.1 ตำแหน่งของปล้อง

เก็บชิ้นส่วนปล้องเปล้าน้อยโดยแบ่งเป็น 3 ส่วน ดังนี้

1. ปล้องที่ 1-3
2. ปล้องที่ 4-7
3. ปล้องที่ 8-11

นำเนื้อเยื่อดังกล่าวข้างต้นมาเพาะเลี้ยงตามวิธีการในข้อ 2.3.3 ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 3 สัปดาห์ บันทึกลักษณะการเปลี่ยนแปลงและการเจริญของเนื้อเยื่อ นับจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนปล้อง และเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

2.4.2 ฤดูกาลที่เก็บชิ้นส่วนพืช

เพาะเลี้ยงส่วนปล้องของเปล้าน้อยทุกเดือนตั้งแต่เดือนมกราคม ถึง เดือนธันวาคม รวม 12 เดือน ตามวิธีการในข้อ 2.3.3 สังเกตและบันทึกลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ นับจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนปล้องและเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

2.4.3 การลอกเปลือกต่อการเกิดสีน้ำตาล (browning) ของชิ้นส่วนปล้อง

นำส่วนปล้องของเปล้าน้อยมาตัดเพาะเลี้ยงเป็น 2 วิธีการ คือ วิธีการที่ 1 ตัดปล้องขนาด 1 มิลลิเมตร (control) เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร วิธีการที่ 2 ตัดชิ้นส่วนปล้องโดยลอกส่วนของเปลือกออก ให้เหลือแต่เนื้อสีขาวด้านใน เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกัน เลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพที่ไม่ให้แสงตามวิธีการในข้อ 2.3.3 สังเกตและบันทึกการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเช่นเดียวกับข้อ 2.3.3

2.4.4 ขนาดความสูงของยอดที่เหมาะสมก่อนนำมาเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง

นำยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปล้องในที่สภาพที่ไม่ให้แสง ที่มีความสูงต่างๆ คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสงตามวิธีการในข้อ 2.3.3 โดยพิจารณาความสมบูรณ์ของยอดที่ได้ สังเกตการเจริญและพัฒนาของยอด

2.4.5 การเลี้ยงชิ้นส่วนปล้องในสภาพที่ไม่ให้แสงต่อการเกิดยอดใหม่ที่สมบูรณ์

นำยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปล้องในสภาวะที่มีแสง ซึ่งมีลักษณะเหี่ยวโทรม มีสีน้ำตาล (เกิด phenolic compound หรือเกิด browning) มีอาการแคระไม่เจริญเติบโต กลับไปไว้ในสภาพที่ไม่ให้แสงอีกครั้ง โดยสังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อและยอด รวมทั้งบันทึกจำนวนยอดที่เกิดขึ้นใหม่

2.4.6 การใช้ต้นพันธุ์จากแหล่งต่างๆ ในการชักนำให้เกิดยอด

นำต้นเปล้าน้อยที่ได้จากแหล่งปลูกในบริเวณ จ.ประจวบคีรีขันธ์ และ จ.นครพนม ซึ่งเก็บรวบรวมปลูกในบริเวณแปลงเพาะชำของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แก่ IBGE 2, Tiwa 2, TA 1, NP 23, Tone 1, Tone 2 และ SK 1 มาเพาะเลี้ยงตามวิธีการในข้อ 2.3.3 สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อและบันทึกผลตามข้อ 2.3.3

2.5 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตในการชักนำให้ยอดเปล้าน้อยเกิดราก

2.5.1 ศึกษาฮอร์โมนกลุ่มออกซินและผงถ่านในการชักนำให้ยอดจากปล้องเปล้าน้อยเกิดราก

นำยอดเปล้าน้อยที่ได้จากการเลี้ยงชิ้นส่วนปล้องในข้อ 2.3.3 ที่มีต้นสมบูรณ์แข็งแรงและมีความสูงของยอด 1.0-2.0 เซนติเมตร มีใบสีเขียว 2 ใบขึ้นไป เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และ MS ที่เติม IAA หรือ IBA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติมผงถ่าน 3%(w/v) และ MS ที่เติม IAA หรือ IBA ที่ความเข้มข้น 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับผงถ่าน 3%(w/v) รวม 10 สูตร ดังตาราง 2-2 ทุกสูตรมีการเติมซูโครส 3%(w/v) วุ้น 7%(w/v) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 เลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพที่ให้แสงตามวิธีการในข้อ 2.3.3 สังเกตลักษณะรากและวัดเปอร์เซ็นต์การเกิดราก

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดราก} = \frac{\text{จำนวนเนื้อเยื่อที่เกิดราก}}{\text{จำนวนเนื้อเยื่อทั้งหมด}} \times 100$$

ตาราง 2-2 สูตรอาหารร่วมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินและผงถ่านในการชักนำให้ยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปล้องเกิดราก

สูตรอาหาร MS	IAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	IBA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	activated carbon % (w/v)
1	0	0	0
2	0	0	3
3	1	0	0
4	1	0	3
5	1.5	0	0
6	1.5	0	3
7	0	1	0
8	0	1	3
9	0	1.5	0
10	0	1.5	3

2.5.2 ศึกษาฮอร์โมนกลุ่มออกซินในการชักนำให้ยอดจากปล้องของเปล้าน้อยเกิดราก

นำยอดเปล้าน้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนของปล้องในข้อ 2.3.3 ที่มีต้นและใบสมบูรณ์แข็งแรงและมีความสูงของยอด 1.0-2.0 เซนติเมตร มีใบสีเขียว 2 ใบขึ้นไป มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และ MS ที่เติม IAA หรือ IBA ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับคือ 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดรากรวม 9 สูตร ดังตาราง 2-3 ทุกสูตรมีการเติมซูโครส 3%(w/v) วุ้น 7%(w/v) มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 เลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพที่ให้แสงตามวิธีการในข้อ 2.3.3 สังเกตลักษณะรากและวัดเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเช่นเดียวกับข้อ 2.5.1

ตาราง 2-3 สูตรอาหารร่วมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินในการชักนำให้ยอดที่ได้จากชิ้นส่วนปล้องเกิดราก

สูตรอาหาร MS	IAA (มิลลิกรัมต่อลิตร.)	IBA (มิลลิกรัมต่อลิตร)
1	0	0
2	0.1	0
3	0.3	0
4	0.5	0
5	0.7	0
6	0	0.1
7	0	0.3
8	0	0.5
9	0	0.7

2.5.3 ศึกษาฮอร์โมนกลุ่มออกซินและสภาพการเพาะเลี้ยงในการชักนำให้ยอดจากปล้องเปล้าน้อยเกิดราก

นำยอดเปล้าน้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปล้องในข้อ 2.3.3 ที่มีต้นและใบสมบูรณ์แข็งแรงและมีความสูงของยอด 1.0-2.0 เซนติเมตร มีใบสีเขียว 2 ใบขึ้นไปมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต, MS ที่มีการเติมฮอร์โมน IAA, IBA หรือ NAA ที่ความเข้มข้น 7 ระดับคือ 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพที่ไม่ให้แสง 2 สัปดาห์ก่อนออกสู่สภาพแสง และเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพที่ให้แสงตลอด สังเกตการเกิดรากและวัดเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเช่นเดียวกับข้อ 2.5.1

2.6 การย้ายต้นเปล้าน้อยออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก

ทำการย้ายต้นเปล้าน้อยออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกตามวิธีการของธวัชชัย วรรธนะวลัญช์ (2532) โดยใช้วัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของดิน : ทราย : ขุยมะพร้าว ในอัตราส่วน 1:1:1 ให้ความชื้นสูงในระยะแรก หลังจากนั้นจึงค่อยๆ ลดความชื้นลง บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอด

2.7 คำนวนต้นทุนการผลิตและจำนวนต้นที่ได้ภายในระยะเวลา 1 ปี

คำนวนจาก

1. ค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการทดลอง
    - 1.1 ค่าสึกหรอ เช่น ค่าขวดเพาะเลี้ยง
    - 1.2 ค่าใช้จ่ายที่หมดไป
        - ค่าสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
        - ค่าสารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ คลอรอกซ์ และแอลกอฮอล์
        - ค่าน้ำที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
        - ค่าไฟฟ้า ได้แก่ หลอดฟลูออเรสเซ็นต์ ไมโครเวฟ หลอดไฟในตู้ปลอดเชื้อ เครื่องปรับอากาศ และมาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง
2. ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง

    เวลาในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปล้อง 1 ชิ้น จนได้ต้นที่มีรากสมบูรณ์
3. จำนวนต้นที่ได้ภายในระยะเวลา 1 ปี

    จำนวนต้นเปล้าน้อยที่คาดว่าจะได้ในระยะเวลา 1 ปี