บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 ครุภัณฑ์

เครื่อง HPLC model LC-3A บริษัท Shimadzu, Japan

เครื่อง Lyophillizer model 77400 บริษัท Labconco corp., USA.

เครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสง (Spectrophotometer) model Spectronic 20D บริษัท Milton roy company, USA.

เครื่องเลี้ยงเชื้อควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Rotary shaker) model G76D บริษัท New bronswick scientific co. inc., USA.

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 0.4 ไมโครเมตร

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

กล้องจุลทรรศน์ stereoscopic model SMZ-10 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

019274

2.2 วัสดุและเคมีภัณฑ์

2.2.1 ฝักอ่อนและเมล็ดพันธุ์ของข้าวโพดที่ใช้ในการทดลอง

สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่

1. สายพันธุ์สุวรรณ 3 ซึ่งเป็นพันธุ์ผสมเปิด (synthetic line)
2. สายพันธุ์ KTX 3101 ซึ่งเป็นพันธุ์ลูกผสม 3 ทาง(three way cross)
3. สายพันธุ์ KSX 2301 ซึ่งเป็นพันธุ์ลูกผสม 2 ทาง (two way cross)
4. สายพันธุ์ Ki7 ซึ่งเป็นพันธุ์ผสมตัวเอง (inbred line)

ฝักอ่อนและเมล็ดพันธุ์ของข้าวโพดได้รับความอนุเคราะห์และกรุณาเพาะพันธุ์ให้โดยคุณ สรรเสริญ และคุณ ชบา จำปาทอง จากศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อ.ปากช่อง จ. นครราชสีมา

2.2.2 สารเคมี (Chemical reagent)

ชื่อสารเคมี	บริษัท
Clorox	ลีเวอร์บาร์เธอร์ประเทศไทย
Methanol	Malinckrodt, USA.
Chloroform	Merck, Germany
2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid) Casein hydrolysate 2-Mercaptoethanol	Fluka, Switzerland

ชื่อสารเคมี	บริษัท
L-proline L-methionine L-ethionine OPA (o-phthalaldehyde)	Sigma chemical Co., U.S.A

2.3 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์แขวนลอย

อาหารสูตร MS ของ Murashige and Skoog (1962) (ภาคผนวกที่ 2)

อาหารสูตร N_6 ของ Chu et al. (1975) (ภาคผนวกที่ 3)

2.4 สภาวะมาตรฐานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องที่มีชั้นสำหรับวางเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงในที่มืด และที่สว่าง โดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 23-27 ^{o}C ให้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำการย้ายเนื้อเยื่อทุก 3 สัปดาห์

2.5 การเตรียมอาหารแข็งและอาหารเหลว

ดูดสารอาหารจาก stock ที่เตรียมไว้ ใส่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นประมาณ 500 มล. เติมสารควบคุมการเจริญและน้ำตาลซูโครส คนให้ละลายแล้วนำไปปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ปรับ pH ให้ได้ 5.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ถ้าเป็นอาหารแข็งเติมผงวุ้นลงไป 7 กรัมต่อลิตร ต้มให้วุ้นละลายแล้วเทใส่ภาชนะตามต้องการ นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยง

2.6 การเตรียมคัพภะของข้าวโพดที่ใช้เป็นแหล่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำฝักอ่อนอายุ 12-17 วันหลังผสม ซึ่งแกะเปลือกนอกและไหมออกแล้ว ผ่าครึ่งตามขวางเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กัน ในกรณีของเมล็ดพันธุ์ ใช้เมล็ดพันธุ์ที่ตากแห้งฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ 20 เปอร์เซนต์ ที่มีทวีน 20 (tween 20) 2-3 หยด เขย่าเป็นเวลา 20 นาที ล้างฝักอ่อนและเมล็ดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

2.6.1 การเตรียมคัพภะแก่

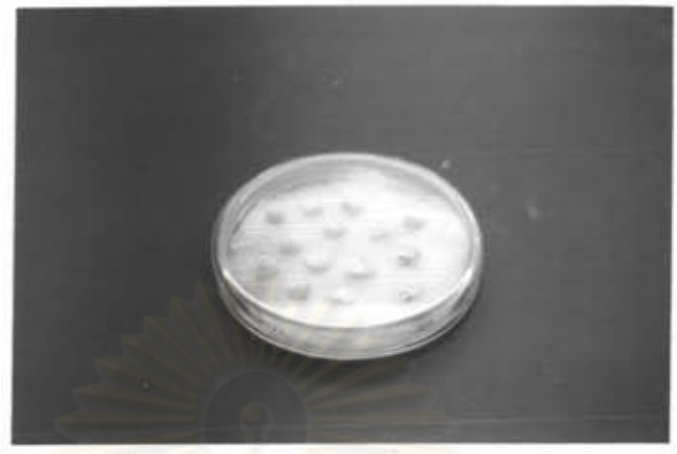
นำเมล็ดพันธุ์ที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ 20 เปอร์เซนต์ ที่มีทวีน 20 2-3 หยด เขย่าเป็นเวลา 20 นาที ล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แช่เมล็ดในสารละลายซุ่มน้ำที่ใส่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร (รูปที่ 2.1) ทั้งหมดอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ (ใส่เมล็ดจานละ 10-15 เมล็ด) ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เมล็ดอ่อนตัวลง ใช้มีดแยกเอาคัพภะซึ่งจะอยู่ติดกับด้านหนึ่งของเมล็ดออกจากส่วนของเมล็ดข้าวโพด

2.6.2 การเตรียมคัพภะอ่อน

นำฝักอ่อนของข้าวโพดที่แบ่งครึ่ง และฟอกฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว ตัดด้านปลายลงในแนวตั้ง แล้วใช้มีดเฉือนส่วนปลายของเมล็ดข้าวโพดตลอดตามแนวยาวของฝักออกประมาณ 2 มม. (รูปที่ 2.2) ใช้ปลาย spatula ที่สะอาดเสียบเข้าไปในเมล็ดตามแนวนอนบริเวณกลางเมล็ด และเอาส่วนด้านล่างซึ่งประกอบไปด้วย endosperm และคัพภะอ่อนออกมา แยกเอาคัพภะอ่อนไปใช้ในการทดลองต่อไป (ทุกขั้นตอนทำในสภาวะปลอดเชื้อ)

2.7 การศึกษาอิทธิพลของลักษณะทิศทางการวางคัพภะอ่อนต่อการเกิดเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

นำคัพภะอ่อนของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 ที่แยกได้จากฝักอายุประมาณ 12-15 วัน ไปเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส สูตร N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล., casein hydrolysate 200 มก./ล. และซูโครส 20 ก./ล., โดยทำการวางคัพภะบนผิวของอาหารด้วยลักษณะที่แตกต่างกันคือ วางด้าน scutellum ให้สัมผัสกับอาหาร จำนวน 40 ชิ้น และอีก 40 ชิ้น วางด้าน embryonic axis ให้สัมผัสกับอาหารนำไปเพาะเลี้ยงในที่มืด หลังจาก 4 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงและคำนวณเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส



รูปที่ 2.1 การเตรียมเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเพื่อแยกคัพภะแก่โดยแช่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

A B C

รูปที่ 2.2 การเตรียมฝักข้าวโพดเพื่อแยกคัพภะอ่อน โดยตัดส่วนปลายของเมล็ดออกประมาณ 1-2 มม.

A. ฝักข้าวโพดอายุประมาณ 14 วันหลังผสม

B. ฝักข้าวโพดที่ถูกเฉือนผิวด้านบนออกไปประมาณ 2 มม.

C. spatula ที่ใช้ในการแคะคัพภะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$$\text{เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนคัพภะที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนคัพภะทั้งหมด}} \times 100$$

2.8 การคัดเลือกข้างโพดสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้น

2.8.1 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะแก่

สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองเป็นสูตร N_6 และ MS ดัดแปลงโดยงานวิจัยของ Kamo และคณะ (1985) มีดังต่อไปนี้

N_6P1 = N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล. casein hydrolysate 200 มก./ล., ซูโครส 20 ก./ล.

N_6P2 = N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล. casein hydrolysate 200 มก./ล., ซูโครส 20 ก./ล.

MSP1 = MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล. casein hydrolysate 200 มก./ล., ซูโครส 20 ก./ล.

MSP2 = MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล. casein hydrodysate 200 มก./ล., ซูโครส 20 ก./ล.

สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองได้แก่ สุวรรณ 3 และ KTX 3101 นำคัพภะแก่ที่แยกได้ผ่าครึ่งตามความยาวออกเป็น 2 ส่วน เลี้ยงบนอาหารทั้ง 4 สูตร โดยวางด้านที่ถูกตัดให้สัมผัสกับอาหาร เพาะเลี้ยงในที่มืด หลังจาก 4 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงและคำนวณเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส

2.8.2 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะอ่อน

สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองได้แก่ สุวรรณ 3, KTX 3101, KSX 2301 และ Ki 7 นำคัพภะอ่อนที่แยกได้เลี้ยงบนอาหารสูตร N_6P1, N_6P2, MSP1 และ MSP2 โดยวางด้าน embryonic axis ให้สัมผัสกับอาหาร เพาะเลี้ยงในที่มืด หลังจาก 21 วัน ย้ายแคลลัสลงบนอาหารใหม่สูตรเดิม โดยตัดส่วนของยอดหรือรากที่เกิดจากคัพภะทิ้งไป คำนวณเปอร์เซนต์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเกิดแคลลัสหลังจากเลี้ยงต่อไปอีก 1 สัปดาห์

2.8.3 การหวนกลับเป็นต้นจากแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะแก่และคัพภะอ่อน

นำแคลลัสที่เกิดจากคัพภะซึ่งได้จากการทดลองข้อ 2.8.1 และ 2.8.2 ไปเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้นซึ่งเป็นสูตร N_6 และ MS ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Kamo (1985) ดังนี้

NF = N_6 ที่เสริมด้วย L-proline 2.3 ก./ล., casein hydrolysate 200 มก./ล., ซูโครส 60 ก./ล.

MSF = MS ที่เสริมด้วย L-proline 2.3 ก./ล., casein hydrolysate 200 มก./ล., ซูโครส 60 ก./ล.

สำหรับแคลลัสที่ชักนำจากสูตรพื้นฐาน N_6 ใช้อาหารสูตร NF และแคลลัสที่ชักนำจากสูตรพื้นฐาน MS ใช้สูตร MSF เพาะเลี้ยงในที่มีแสง หลังจาก 30 วัน คำนวณ % plant regeneration จากสูตร

$$\% \text{ plant regeneration} = \frac{\text{จำนวนแคลลัสที่เกิดยอด}}{\text{จำนวนแคลลัสทั้งหมด}} \times 100$$

2.8.4 การจำแนก(classification)ชนิดของแคลลัสที่ชักนำจากคัพภะอ่อน

แคลลัสที่ได้จากการทดลองในข้อ 2.8.2 สามารถจำแนกออกเป็น 2 ชนิด ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน คือ

ชนิดที่ 1 แคลลัสชนิดเนื้อแน่น (compact callus) ลักษณะเป็นแคลลัสที่แข็งเกาะตัวกันค่อนข้างแน่น สีเหลืองอ่อน มีการเจริญเร็วกว่า

ชนิดที่ 2 แคลลัสชนิดเนื้อหลวม (friable callus) ลักษณะเป็นแคลลัสที่เกาะตัวกันหลวม ๆ ชุ่มน้ำ สีขาวอมน้ำตาล มีการเจริญช้ากว่า

นำแคลลัสชนิดเนื้อหลวม ของสายพันธุ์สุวรรณ 3, KSX 2301, KTX 3101 Ki7 และแคลลัสชนิดเนื้อแน่นของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6P1 เลี้ยงบน

อาหารชักนำให้เกิดต้นสูตร NF และ MSF เพาะเลี้ยงในที่มีแสงเป็นเวลา 30 วัน คำนวณ % plant regeneration ของแคลลัสทั้ง 2 ชนิด ในอาหารแต่ละสูตร

2.9 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3

2.9.1 การศึกษาขนาดของคัพภะที่เหมาะสมในการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส

จากการทดลองที่ 2.8.4 พบว่าแคลลัสชนิดเนื้อแน่น (compact) เท่านั้นที่พัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้ คือเป็นเอมบริโอเจนิกแคลลัส ดังนั้นในการทดลองจะใช้ค่าเปอร์เซนต์การเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส เป็นตัวเปรียบเทียบประสิทธิภาพของปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลกระทบโดยตรงและโดยอ้อมต่อการหวนกลับเป็นต้นใหม่

$$\text{เปอร์เซนต์การเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนแคลลัสชนิดเนื้อแน่น (compact)}}{\text{จำนวนคัพภะทั้งหมด}} \times 100$$

2.9.2 การศึกษาชนิดของอาหารและสารควบคุมการเจริญที่เหมาะสมต่อการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส

นำสายพันธุ์สุวรรณ 3 มาศึกษาการชักนำให้เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสในอาหารสูตรต่าง ๆ สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองมีดังต่อไปนี้

N_6N1 = N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., casein hydrolysate 200 มก./ล., ซูโครส 20 ก./ล.

N_6P1 = N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล., casein hydrolysate 200 มก./ล., ซูโครส 20 ก./ล.

N_6P2 = N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล., casein hydrolysate 200 มก./ล., ซูโครส 20 ก./ล.

N_6P4 = N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 4 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล., casein hydrolysate 200 มก./ล., ซูโครส 20 ก./ล.

N_6S1 = N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล., casein hydrolysate 200 มก./ล., ซูโครส 60 ก./ล.

MSN1 = MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., casein hydrolysate 200 มก./ล., ซูโครส 20 ก./ล.

MSP1 = MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล., casein hydrolysate 200 มก./ล., ซูโครส 20 ก./ล.

MSP2 = MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ล., L-proline 2.3 ก./ล., casein hydrolysate 200 มก./ล., ซูโครส 20 ก./ล.

ใช้คัพภะอ่อนขนาดประมาณ 1.5 มม. เลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ โดยวางด้าน embryonic axis ให้สัมผัสกับอาหาร เพาะเลี้ยงในที่มืด หลังจาก 21 วัน ย้ายแคลลัสที่ได้ลงบนอาหารใหม่สูตรเดิม คำนวณเปอร์เซนต์การเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสหลังจากเลี้ยงต่อไปอีก 1 สัปดาห์

2.10 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3

2.10.1 การศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัส

นำเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร N_6P1 มาศึกษาการเจริญในสภาวะที่มีแสงและในที่มืด โดยใช้เอมบริโอเจนิกแคลลัสน้ำหนักเฉลี่ย 50 มิลลิกรัมต่อชิ้น เลี้ยงบนอาหาร N_6P1 ปริมาตร 5 มิลลิกรัมต่อขวด จำนวน 20 ขวด นำ 10 ขวดเพาะเลี้ยงในที่มีแสง และอีก 10 ขวดเพาะเลี้ยงในที่มืด ชั่งน้ำหนักแคลลัสก่อนและหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน หาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักทั้ง 2 สภาวะ เปรียบเทียบอัตราการเจริญของแคลลัสเป็นอัตราส่วนน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสที่เลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน (ก.) กับน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสเริ่มต้น (ก.) (final : initial)

2.10.2 การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ

หลังจากชักนำให้คัพภะอ่อนของข้าวโพดสายพันธุ์สุวรรณ 3 เกิดเอมบริโอ-เจนิกแคลลัสบนอาหารสูตรต่าง ๆ นำเอมบริโอเจนิกแคลลัสที่ได้มาศึกษาอัตราการเจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรเดิมคือ N_6N1, N_6P1, N_6P2, MSN1, MSP1, MSP2 และ N_6S1 โดยใช้แคลลัสน้ำหนักชิ้นละประมาณ 60–70 มิลลิกรัม เลี้ยงบนอาหารปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อขวด จำนวน 10 ขวด ในอาหารต่าง ๆ แต่ละสูตร เพาะเลี้ยงในที่มืด ชั่งน้ำหนักแคลลัสก่อนเพาะเลี้ยงบนอาหาร และหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน หาค่าเฉลี่ยของน้ำหนัก เปรียบเทียบการเจริญ (วิธีข้อ 2.10.1)

2.11 การศึกษาการเจริญและการพัฒนาไปเป็นต้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3

2.11.1 การศึกษารูปแบบการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัส

นำเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ซึ่งเจริญบนอาหารสูตร N_6P1 มาศึกษาลักษณะการเจริญ โดยนำแคลลัสน้ำหนักชิ้นละประมาณ 100 มิลลิกรัม เลี้ยงบนอาหารสูตร N_6P1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อขวด จำนวน 20 ขวด ติดตามการเจริญโดยชั่งน้ำหนักสดของแคลลัสทุก ๆ สัปดาห์

2.11.2 การศึกษาลักษณะการพัฒนาไปเป็นต้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัส

ศึกษาพัฒนาการในการหวนกลับเป็นต้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัส โดยนำเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 (อาหารสูตร N_6P1) ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้น NF ในที่มีแสง บันทึกลักษณะและการเปลี่ยนแปลงภายนอกในช่วงระยะการเจริญและพัฒนาต่าง ๆ กัน โดยใช้ภาพถ่ายจากกล้องถ่ายรูป และภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ stereoscope ตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยงบนอาหารจนเป็นต้นสมบูรณ์

2.12 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการหวนกลับเป็นต้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัส

2.12.1 การศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการชักนำให้เกิดต้น

นำเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6P1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.0 เซนติเมตร จำนวน 60 ชิ้น เลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้นสูตร NF โดยแบ่งจำนวนแคลลัสออกเป็น 3 ส่วนเท่า ๆ กัน ส่วนแรก 20 ชิ้น เพาะเลี้ยงในที่มีแสง 4,000 ลักซ์ ส่วนที่สอง 20 ชิ้น เพาะเลี้ยงในที่มีแสง 2,000 ลักซ์ และส่วนสุดท้าย 20 ชิ้น เพาะเลี้ยงในที่มืด หลังจาก 30 วัน คำนวณ % plant regeneration ในทั้ง 3 สภาวะ

2.12.2 การศึกษาอิทธิพลของขนาดและน้ำหนักของแคลลัสต่อการชักนำให้เกิดต้นและจำนวนยอด

นำเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหารสูตร N_6P1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.25, 0.50 และ 1.0 เซนติเมตร ชุดละ 20 ตัวอย่าง ชั่งน้ำหนักและหาค่าเฉลี่ยน้ำหนักของแคลลัสแต่ละขนาด นำไปเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้นสูตร NF เพาะเลี้ยงในที่มีแสง หลังจาก 30 วัน คำนวณ % plant regeneration และนับจำนวนยอด หาค่าจำนวนยอดต่อต้นแคลลัสและจำนวนยอดต่อกรัมของแคลลัสแต่ละขนาดที่ใช้ทดลอง

$$\text{จำนวนยอดต่อแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนยอดทั้งหมดที่สามารถนับได้}}{\text{จำนวนแคลลัสทั้งหมดที่เกิดยอด}}$$

$$\text{จำนวนยอดต่อกรัมแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนยอดต่อแคลลัส}}{\text{น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัส}}$$

2.13 การศึกษาความเสถียรของเอมบริโอเจนิกแคลลัส

2.13.1 การศึกษาอิทธิพลของอายุเอมบริโอเจนิกแคลลัสต่อการหวนกลับเป็นต้น

ทำการศึกษาความสามารถในการหวนกลับเป็นต้นของเอมบริโอเจนิกแคลลัสเมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลานาน โดยนำเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ซึ่งเลี้ยงต่อเนื่องบนอาหารสูตร N_6P1 อายุ 6, 12, 16 และ 18 เดือน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้นสูตร NF ในที่มีแสงเป็นเวลา 30 วัน นับจำนวนแคลลัสที่เกิดยอด ทำการคำนวณเปรียบเทียบ % plant regeneration ของแคลลัสซึ่งมีอายุต่าง ๆ กัน

2.13.2 การศึกษาอิทธิพลของอายุเอมบริโอเจนิกแคลลัสต่อการเจริญ

ศึกษาการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัสที่มีอายุในการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องแตกต่างกัน โดยนำเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ซึ่งเพาะเลี้ยงต่อเนื่องบนอาหารสูตร N_6P1 ที่มีอายุในการเพาะเลี้ยง 6, 12, 16 และ 18 เดือน น้ำหนักเฉลี่ยชิ้นละประมาณ 50-70 มิลลิกรัม เลี้ยงบนอาหารสูตร N_6P1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อขวด ทำการทดลองอายุละ 10 ชิ้น เพาะเลี้ยงในที่มืด ชั่งน้ำหนักแคลลัสก่อนเพาะเลี้ยงบนอาหารและหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน หาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักของแคลลัสอายุต่าง ๆ เปรียบเทียบการเจริญตามวิธีข้อ 2.10.1

2.14 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย

2.14.1 การศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย

สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองได้แก่ สูตร N_6 และ MS ดัดแปลงโดยงานวิจัยของ Kamo (1986) มี 4 สูตรดังนี้

LN1 = N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล.,
L-proline 0.69 ก./ล., casein hydrolysate
100 มก./ล., ซูโครส 20 ก./ล.

LN2 = N_6 ที่เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ล.,
L-proline 0.69 ก./ล., casein hydrolysate
100 มก./ล., ซูโครส 20 ก./ล.

LMS1 = MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล.
L-proline 0.69 ก./ล., casein hydrolysate
100 มก./ล., ซูโครส 20 ก./ล.

LMS2 = MS ที่เสริมด้วย 2,4-D 2 มก./ล.,ล
L-proline 0.69 ก./ล., casein hydrolysate
100 มก./ล., ซูโครส 20 ก./ล.

นำเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 บนอาหาร N_6P1 มาตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 0.1 x 0.1 เซนติเมตร นำแคลลัสน้ำหนักสด 0.5 กรัม ใส่ในอาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร สูตรอาหารละ 2 ขวด เพาะเลี้ยงในที่มืดบน rotary shaker ที่เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน ชั่งน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยในอาหารสูตรต่าง ๆ เปรียบเทียบการเจริญ (วิธีข้อ 2.10.1)

2.14.2 การศึกษาลักษณะและรูปแบบการเจริญของเซลล์แขวนลอย

นำเซลล์แขวนลอยของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ในอาหารเหลวสูตร LN1 และ LN2 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน มาศึกษาการเจริญ โดยนำเซลล์แขวนลอยมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ใช้เซลล์เริ่มต้นปริมาณ 0.05 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ในอาหาร 25 มิลลิลิตร เขย่าในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ในที่มืด บน rotary shaker ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 สัปดาห์ สุ่มตัวอย่าง 2 ขวด ของแต่ละสูตรอาหารมาหาน้ำหนักแห้งทุก ๆ 7 วัน

2.14.3 การชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอย

นำเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวสูตร LN1 อายุ 60 วัน ในที่มืด กรองด้วยตะแกรงไนลอน (nylon sieve) ขนาด 500 ไมโครเมตร นำส่วนที่กรองได้ไปกรองผ่าน

กระดาษกรองอีกครั้งหนึ่ง นำเซลล์ที่กรองได้ทั้ง 2 ส่วน แยกไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร N_6P1 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นนำไปชักนำให้เกิดต้นบนอาหารสูตร NF (วิธีข้อ 2.8.3)

2.15 การสกัดกรดอะมิโนอิสระ (free amino acid) (Bieleski และ Turner, 1966)

นำแคลลัส (น้ำหนักสด 0.5-1.0 กรัม) ใส่ในสารละลายของเมทธานอล, คลอโรฟอร์ม และน้ำ (อัตราส่วน 12:5:3 โดยปริมาตร) จำนวน 3 มิลลิลิตร นำไปแช่แข็งไว้ที่ -70 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ที่ได้นำมาบดให้ละเอียดด้วย Duall conical glass homogenizer ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนน้ำใสไว้ นำส่วนตะกอนไปสกัดซ้ำด้วยสารละลายเดิมปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกตะกอนเก็บส่วนน้ำใสที่ได้รวมกับครั้งแรก เติมคลอโรฟอร์ม และน้ำลงไป 1.5 และ 2.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ สารละลายจะแบ่งเป็น 2 ชั้น เก็บชั้นเมทธานอลกับน้ำซึ่งอยู่ชั้นบน นำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่อง Lyophillizer จากนั้นนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเมทไธโอนีนอิสระต่อไป

2.16 การวิเคราะห์ปริมาณเมทไธโอนีนอิสระ

2.16.1 การวิเคราะห์ปริมาณเมทไธโอนีนอิสระด้วยวิธี HPLC (Lenda และ Svenneby, 1980)

2.16.1.1 การตรวจวัดปริมาณโดยวิธี HPLC จำเป็นต้องเตรียมอนุพันธ์ของเมทไธโอนีนก่อน โดยใช้ derivertization reagent ซึ่งประกอบไปด้วย o-phthalaldehyde 10 มิลลิกรัม ละลายอยู่ใน absulute ethanol 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติม 2-mercaptoethanol 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย 0.4 M boric acid pH 10.4 เก็บสารละลายภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน อุณหภูมิ -20 °C

2.16.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณเมทไธโอนีนทำได้โดย นำสารที่ต้องการวิเคราะห์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ derivertization reagent 100 ไมโครลิตร หลังจากผสมเป็นเวลา 90 วินาที ฉีดสารผสม 5-20 ไมโครลิตร เข้าสู่เครื่อง HPLC คำนวณหาปริมาณเมทไธโอนีนในสารตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเมทไธโอนีน

ทำการสร้างกราฟมาตรฐานของเมทไธโอนีน โดยใช้เมทไธโอนีนบริสุทธิ์ความเข้มข้น 5, 10, 25 และ 50 nmole/ml เป็นสารมาตรฐาน โดยการนำไปทำ derivertization สภาวะเช่นเดียวกับสารตัวอย่าง แล้วฉีดสารผสม 5 ไมโครลิตร เข้าสู่เครื่อง HPLC เขียนกราฟระหว่างปริมาณเมทไธโอนีน กับ peak area ที่อ่านได้จากเครื่อง Intergrator ทำการทดลองความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ

2.16.1.3 ใช้ column ชนิด reverse phase (C_{18}) ของ Lichrocart 125-4 และใช้ 40 % เมทธานอล ใน 0.1 M โพแทสเซียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.5 เป็น mobile phase โดยมี flow rate เท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้ fluorescence detector เป็นเครื่องตรวจวัดปริมาณ

2.16.2 การวิเคราะห์ปริมาณเมทไธโอนีนอิสระด้วยวิธีทางชีวภาพ (bioassay)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณเมทไธโอนีนอิสระโดยใช้แบคทีเรีย Escherichia coli สายพันธุ์ที่เป็น methionine auxotroph (ได้รับจาก Dr. Larry Wiater, Yale University) โดยสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างเมทไธโอนีนบริสุทธิ์ กับสัมประสิทธิ์การเจริญ (specific growth rate, u) ของ E. coli ในอาหารเหลวสูตร David minimum medium (ภาคผนวกที่ 4) ซึ่งมีเมทไธโอนีน 0.001, 0.05, 0.1, 0.6 และ 1.0 ไมโครกรัม ในอาหารปริมาตร 3 มิลลิลิตร ในหลอดเลี้ยงเชื้อขนาด 10 มิลลิลิตร ใช้เชื้อเริ่มต้นให้มีค่าความขุ่น (turbidity) ที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.05 เลี้ยงในสภาวะที่ให้อากาศด้วยเครื่องเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (rotary shaker) เขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบ/นาที อุณหภูมิ 35 ^{o}C ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วัดค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตรทุก ๆ 2 ชั่วโมง จนเซลล์หยุดการเจริญ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การเจริญจากสูตร

$$U = \frac{\ln N - \ln N_o}{(t - t_o)}$$

N_o = ความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร ของเซลล์ที่เวลาเริ่มต้น

N = ความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร ของเซลล์ที่เวลาสุดท้าย

t = เวลาเริ่มต้น

t_o = เวลาสุดท้าย

การวิเคราะห์ปริมาณเมทไธโอนีนในสารตัวอย่างทำได้โดยใส่สารสกัด (การทดลองข้อ 2.15) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแทนเมทไธโอนีน จากนั้นนำค่าความขุ่นที่วัดได้เปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานแล้วคำนวณปริมาณของเมทไธโอนีนอิสระในตัวอย่าง

2.17 การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดที่ผลิตเมทไธโอนีนสูง

2.17.1 การศึกษาผลกระทบของเอทไธโอนีนต่อการเจริญของเอมบริโอเจนิกแคลลัส

นำเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 อายุประมาณ 1.5 ปี ที่มีน้ำหนักสดชิ้นละประมาณ 50 มิลลิกรัม เลี้ยงบนอาหารสูตร N_6P1 ที่มีความเข้มข้นของเอทไธโอนีนเท่ากับ 0, 0.0005, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อขวด (ความเข้มข้นละ 10 ชิ้น) เพาะเลี้ยงในที่มืด ชั่งน้ำหนักแคลลัสก่อนเพาะเลี้ยงบนอาหารและหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน หาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักและคำนวณ % Growth โดยให้ค่าที่ได้จากแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีเอทไธโอนีนเป็นค่าควบคุม (control)

$$\% \text{ Growth} = \frac{Xn - Xo}{Xc - Xo} \times 100$$

x_n = น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่มีเอทไธโอนีน ความเข้มข้นต่าง ๆ

x_c = น้ำหนักเฉลี่ยของ control

x_o = น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสที่ใช้เริ่มต้นก่อนเพาะเลี้ยง

2.17.2 การคัดเลือกแคลลัสข้าวโพดที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน

นำเอมบริโอเจนิกแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ที่มีอายุในการเพาะเลี้ยงประมาณ 1.5 ปี เลี้ยงในอาหารสูตร N_6P1 ที่มีความเข้มข้นของเอทไธโอนีน 0.05 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บนจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร จานละ 15 ชิ้น (ความเข้มข้นละประมาณ 35 จาน) ทำการย้ายเนื้อเยื่อที่สังเกตพบว่ายังสามารถเจริญได้ลงบนอาหารใหม่ทุก ๆ 3 สัปดาห์แล้วทำการทดลองต่อเนื่อง

2.17.3 การศึกษาอิทธิพลของเอทไธโอนีนต่อการเจริญของแคลลัสที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน

นำแคลลัสที่ต้านต่อเอทไธโอนีนจากการทดลองที่ 2.17.2 ที่มีอายุในการคัดเลือกประมาณ 6 เดือน มาศึกษาผลกระทบของเอทไธโอนีนต่อการเจริญ โดยใช้แคลลัสน้ำหนักสดชิ้นละประมาณ 30 มิลลิกรัม เลี้ยงบนอาหารสูตร N_6P1 ที่มีเอทไธโอนีนความเข้มข้น 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อขวด (ความเข้มข้นละ 6 ชิ้น) เพาะเลี้ยงในที่มืด ชั่งน้ำหนักแคลลัสก่อนเพาะเลี้ยงบนอาหาร และหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน หาค่าเฉลี่ยของน้ำหนัก คำนวณ % Growth โดยให้แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีเอทไธโอนีนเป็นตัวอย่างควบคุม

2.17.4 การวัดปริมาณเมทไธโอนีนอิสระของแคลลัสที่ต้านทานและไม่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน

นำแคลลัสของสายพันธุ์สุวรรณ 3 ทั้งที่ต้านทานและไม่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน มาทำการสกัดกรดอะมิโนตามวิธีทดลองที่ 2.15 นำสารที่สกัดได้ซึ่งอยู่ในสภาพแห้งละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 0.5-1 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณเมทไธโอนีนด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีทดลองที่ 2.16 ทำการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ คำนวณปริมาณเมทไธโอนีนอิสระ

เป็น นาโนโมลต่อกรัมน้ำหนักสดของแคลลัส (nmole/gFWT) โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของเมทไธโอนีนบริสุทธิ์

2.17.5 การหวนกลับเป็นต้นของแคลลัสที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีน

นำแคลลัสที่ต้านทานต่อเอทไธโอนีนจากการทดลองที่ 2.17.2 มาชักนำให้เกิดต้น โดยย้ายแคลลัสลงบนอาหารสูตร NF เพาะเลี้ยงในที่มีแสง หลังจาก 30 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงและคำนวณ % plant regeneration

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย