บทที่ 2

วิธีการทดลอง

ครุภัณฑ์

เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave) บริษัท Hearson,England

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) model CG 835 บริษัท Scott Gerate, Germany

ตู้ย้ายเนื้อเยื่อที่มีบรรยากาศปลอดภัย (Laminar Flow) model BHA 48 บริษัท Biohazard, Italy

เครื่องเขย่า (laminar shaker orbital) model RO 5 บริษัท Gerhardt, Germany

ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) บริษัท Astell Hearsan

เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง model BA 4100 S บริษัท Sartorius, Germany

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง Type 1702 บริษัท Sartorius, Germany

กล้องจุลทรรศน์ Stereoscopic model SMZ-10 บริษัท Nikon,Japan

เรือนปลูกพืชทดลองหลังคากระจก

วัสดุและเคมีภัณฑ์

1. ต้นและเมล็ดที่ใช้ในการทดลอง

เมล็ดกวาวเครือขาว และท่อนพันธุ์จากอำเภอดอยเต่า จังหวัดเชียงใหม่

2. <u>แบคทีเรียทดลอง</u>

แบคทีเรีย <u>Agrobacterium rhizogenes</u> สายพันธุ์

A_4 (Nakamura et al.,1988)

A_4RSII (ติดต่อส่วนตัว)

A_4RSII GUS (ติดต่อส่วนตัว)

ATCC15834 (ติดต่อส่วนตัว)

R1601 (ติดต่อส่วนตัว)

3. <u>สารเคมี</u> แบ่งเป็น 4 ส่วน

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตามสูตร MS (Murashige and Skoog,1962), B5 (Gamborg et al., 1968), SH (Schenk and Hildebrandt,1972), WPM (Lloyd and Mccowm, 1980) ที่มีวุ้นชนิดมาตรฐาน และสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช

3.2 สารเคมีที่ทำให้ปลอดเชื้อ ได้แก่ 95 % ethyl alcohol, clorox, Tween 20 และ claforan (Hoechst Japan Ltd.)

3.3 สารเคมีที่ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ตามสูตร YEB (Vervliet et al.,1975)

3.4 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบเบื้องต้นของสารสกัดจากพืช ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นบาง ได้แก่ absolute ethanol, Chlorofrom, methanol และแผ่นซิลิกาเจล หนา 0.2 มม. (Silica gel 60 F_{254}) (บริษัท Merck, Damstadt, Germany)

<u>การเตรียมอาหารและภาวะมาตรฐานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช</u>

ดูดอาหารจาก stock ที่เตรียมไว้ในสูตร ใส่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นประมาณ 500 มล. เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและน้ำตาลซูโครส คนให้ละลายแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl)

หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ให้ได้ 5.6-5.8 ถ้าเป็นอาหารแข็งเติมผงวุ้นลงไป 8 กรัมต่อลิตร ต้มให้วุ้นละลายและเทใส่ภาชนะตามต้องการ นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ. เป็นเวลา 15 นาที ถ่ายลงในภาชนะ ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปเพาะเลี้ยง ในห้องเพาะเลี้ยงที่มีชั้นสำหรับวางเนื้อเยื่อในที่มืดและสว่างโดยควบคุมอุณหภูมิ ให้อยู่ในช่วง 25±2 °ซ. ให้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชม. ต่อวัน

<u>การเตรียมอาหารและภาวะมาตรฐานในการเลี้ยงแบคทีเรีย</u>

ชั่งอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย <u>Agrobacterium rhizogenes</u> ตามสูตร YEB (ภาคผนวก ก) ใส่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นประมาณ 500 มล. คนให้ละลายแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริก หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้ 1.2 เติมผงวุ้น 15 กรัมต่อลิตร ในการเตรียมอาหารแข็ง ต้มให้วุ้นละลายและเทใส่ภาชนะตามต้องการนำไปอบฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ. เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปเพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 28 °ซ. บนเครื่องเขย่า (ในกรณีอาหารเหลว) ที่มีความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง

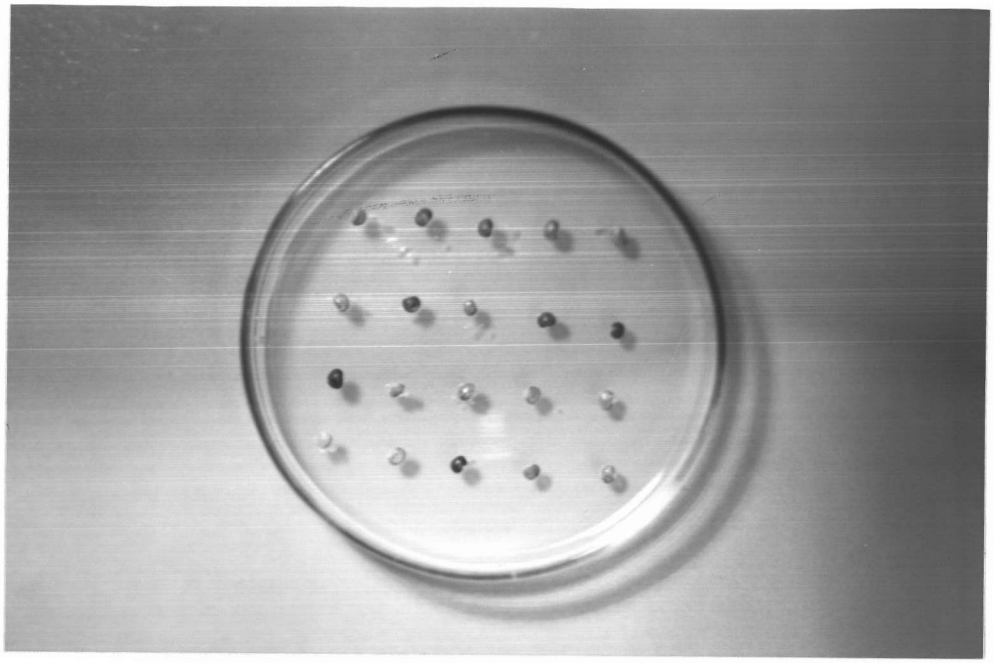
<u>การเตรียมเมล็ดและท่อนพันธุ์กวาวเครือ</u>

นำเมล็ดและท่อนพันธุ์กวาวเครือมาล้างน้ำสะอาดและฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ (clorox) ความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่มีทวีน-20 (Tween-20) 2-3 หยด เขย่าเป็นเวลา 40-60 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

5.1 <u>การเตรียมต้นพันธุ์</u>

นำเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะในจานเลี้ยงเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 ซม. ที่มีอาหารสูตร MS จานละ 20 เมล็ด (รูป 2.1) รอเมล็ดงอกและย้ายลงขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เลี้ยงต้นประมาณ 30-45 วัน จะได้ต้นที่เจริญเต็มขวดมีข้อ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.1 ลักษณะเมล็ดพันธุ์กวาวเครือขาวที่ใช้ในการทดลอง

ประมาณ 6-8 ข้อ (รูป 2.2) ซึ่งพร้อมนำไปทำการทดลองต่อ

2. การเตรียมท่อนพันธุ์

พืชทดลองส่วนยอด (shoot) ใช้ส่วนปลายสุดของกิ่งยาวประมาณ 1 ซม. ส่วนข้อ (node) ใช้ข้อที่ 4-6 ถัดลงมาจากปลายยอด ยาวประมาณ 1-2 ซม. ส่วนราก (root) ยาวประมาณ 2.5 ซม. (รูป 2.3)

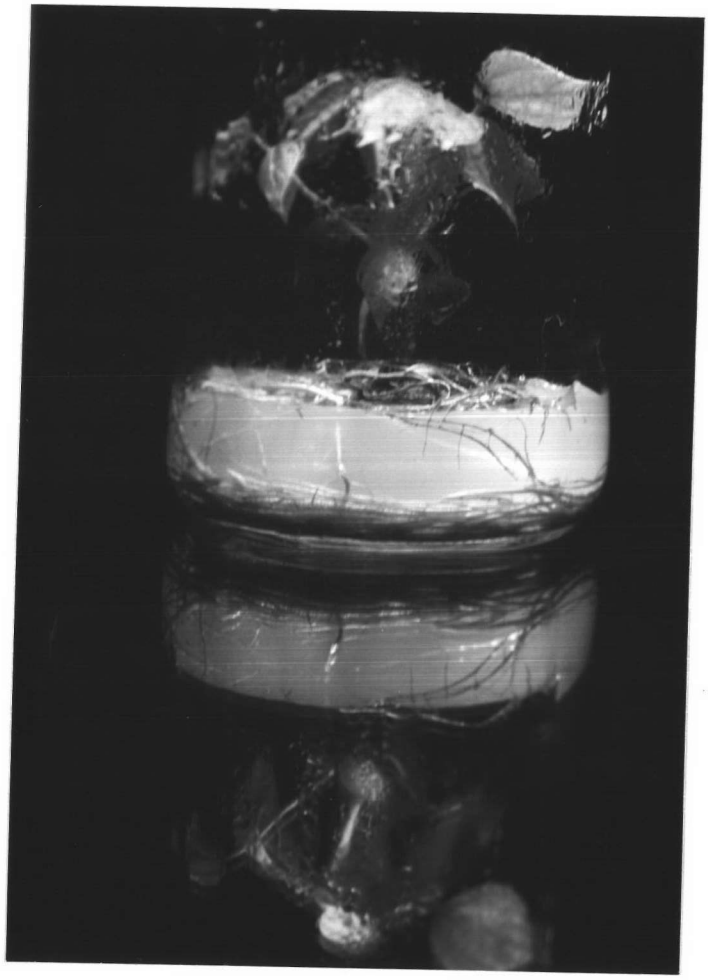
ศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาเนื้อเยื่อ

1. อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินต่อเนื้อเยื่อพืชส่วนต่างๆ

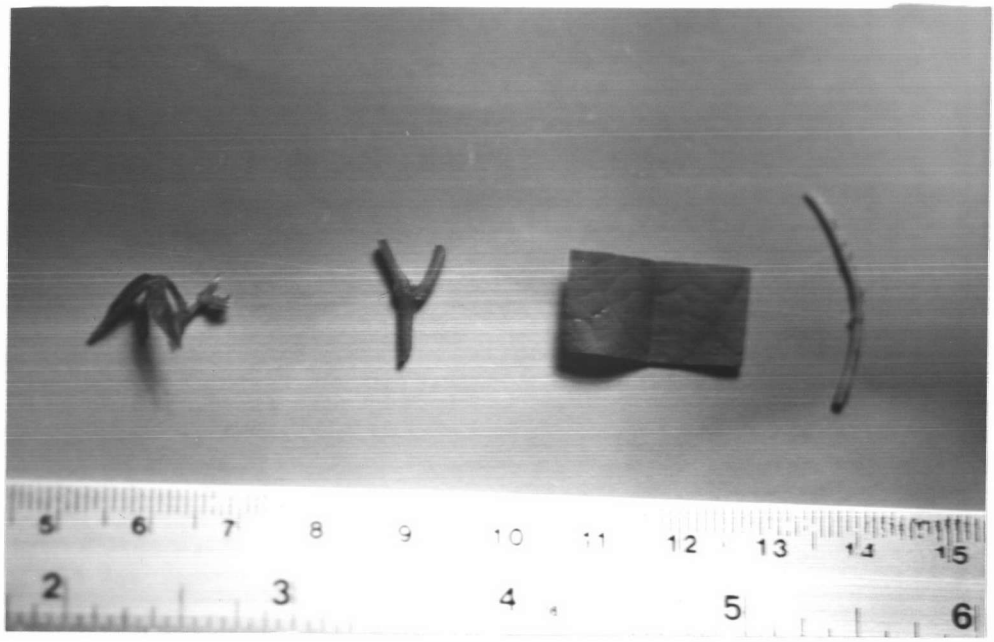
นำส่วนยอด ข้อ รากและใบของกวาวเครือ จากต้นในสภาพปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีออกซิน ชนิด IAA NAA และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มก.ต่อลิตร วิธีการทดลองละ 8 ซ้ำ หลังจาก 4 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลง และบันทึกน้ำหนักแคลลัส

2. การทำงานร่วมกันของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน และไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

นำส่วนข้อของกวาวเครือจากโรงเพาะชำมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่มีออกซินชนิด NAA และไซโตไคนินชนิด BA ที่ความเข้มข้น 0.0 1.0 2.0 และ 4.0 มก.ต่อลิตร สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ และทำการทดลองคล้ายกันแต่ใช้ส่วนข้อของกวาวเครือจากต้นในสภาพปลอดเชื้อ นอกจากนี้ยังเพิ่มวิธีการทดลองของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นระดับ 0.5 มก.ต่อลิตร วิธีการทดลองละ 6 ซ้ำ หลังจาก 4 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลง



รูปที่ 2.2 ลักษณะต้นกวาวเครือขาว ที่ใช้ทำการทดลอง เลี้ยงบนอาหารสูตร WPM + 0.5Fe (อายุ 4 สัปดาห์)



รูปที่ 2.3 ลักษณะชิ้นส่วนพืชทดลองส่วนยอด (A) ข้อ (B) ใบ (C) และราก (D) จากพืชรูปที่ 2.2

ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส

1. ศึกษาอิทธิพลของเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ

นำส่วนยอด ข้อ และใบ มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 2.0 มก.ต่อลิตร และมี BAP 0.0 และ 0.5 มก.ต่อลิตร การทดลองละ 10 ซ้ำ หลังจาก 4 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลง

2. ศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส

นำส่วนยอดและข้อกวาวเครือขาวมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี NAA และ BAP ความเข้มข้น 0.5 มก.ต่อลิตร ในภาวะที่รับแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชม.ต่อวัน และในภาวะที่มืด วิธีการทดลองละ 10 ซ้ำ หลัง 4 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงและบันทึกน้ำหนักแคลลัส

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงและชักนำให้เกิดการงอกใหม่ของแคลลัส

นำแคลลัสสีเขียวปนเหลือง ลักษณะแบบยุ่ย (friable) จากการชักนำส่วนยอดด้วย NAA และ BAP 0.5 มก.ต่อลิตร มาทำการทดลอง ในภาวะมีแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชม.ต่อวัน วิธีการทดลองละ 10 ซ้ำ หลังจาก 4 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงและบันทึกน้ำหนัก

1. การศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในช่วงที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงแคลลัส

1.1 ระดับความเข้มข้น BAP ที่แตกต่างร่วมกับ NAA 0.5 มก.ต่อลิตร

นำแคลลัสมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS มี NAA 0.5 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ BAP ระดับความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มก.ต่อลิตร

1.2 ระดับความเข้มข้น NAA ที่แตกต่างร่วมกับ BAP 1.0 มก.ต่อลิตร

แคลลัสเลี้ยงบนอาหารสูตร MS มี BAP 1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ NAA ระดับความเข้มข้น 0.0 0.25 0.5 0.75 และ 1.0 มก.ต่อลิตร

2. <u>การศึกษาอิทธิพลของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงแคลลัส</u>

แคลลัสเลี้ยงบนอาหารสูตร MS B5 WPM SH ที่มี NAA และ BAP 0.5 และ 1.0 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ

3. <u>การศึกษาระดับความเข้มข้นอาหารต่อการเจริญของแคลลัส</u>

แคลลัสเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ระดับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง 0.5 0.75 1.00 1.25 1.50 เท่าของ MS ปกติทุกวิธีการทดลองใส่น้ำตาล 30 กรัม วุ้น 8 กรัม และ NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร

4. <u>ศึกษาระยะเวลาต่อการเจริญของแคลลัส</u>

4.1 ภาวะแสง

แคลลัสเลี้ยงในอาหารสูตร MS มี NAA และ BAP 0.5 และ 1.0 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ เลี้ยงในภาวะแสงประมาณ 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชม.ต่อวัน และในภาวะปราศจากแสง สังเกตการเปลี่ยนแปลงและบันทึกน้ำหนักทุก 1 สัปดาห์

4.2 สูตรอาหาร

แคลลัสเลี้ยงในอาหารสูตร MS 1.25xMS และ WPM มี NAA และ BAP 0.5 และ 1.0 มก.ต่อลิตร ในภาวะมีแสง สังเกตการเปลี่ยนแปลงและบันทึกน้ำหนักทุก 1 สัปดาห์

5. <u>ศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อทิศทางการเจริญของแคลลัส</u>

5.1 ความเข้มข้น BAP ต่อการเจริญของแคลลัสที่ NAA 0.25 และ 0.5 มก.ต่อลิตร

แคลลัสเลี้ยงในอาหารสูตร 1.25 x MS มี NAA 0.25 0.5 มก. ต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 2.0 4.0 และ 8.0 มก.ต่อลิตร ในภาวะมีแสง

5.2 ความเข้มข้น Kinetin ต่อการเจริญของแคลลัส

แคลลัสเลี้ยงในอาหารสูตร MS NAA ต่อ BAP 0.5 และ 1.0 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ ที่มี Kinetin ความเข้มข้น 0 1 2 4 และ 8 มก.ต่อลิตร ในภาวะมีแสง

5.3 ความเข้มข้น TDZ ต่อการเจริญของแคลลัส

เลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร 1.25xMS 1.25xMS ที่มี NAA 0.5 มก.ต่อลิตร และ 1.25xMS ที่มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ ในแต่ละสูตรอาหารมี TDZ ระดับความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 2.0 4.0 8.0 และ 16.0 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ ในภาวะมีแสง

5.4 ความเข้มข้น GA_3 ต่อการเจริญของแคลลัส

เลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร MS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก. ต่อลิตร ซึ่งมี GA_3 ระดับความเข้มข้น 0.0 0.1 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 4.0 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ ในภาวะมีแสง

5.5 ความเข้มข้น ABA ต่อการเจริยของแคลลัส

เลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร 1.25xMS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0

มก.ต่อลิตร ซึ่งมี ABA ระดับความเข้มข้น 0.0 0.25 0.5 1.0 2.0 4.0 และ 8.0 มก.ต่อลิตร ในภาวะมีแสง

6. ศึกษาปัจจัยบางอย่างเพิ่มเติมต่อการเจริญของแคลลัส

6.1 ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล

เลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร 1.25xMS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ซึ่งมีน้ำตาลระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 2 3 4 5 6 7 และ 8 ในภาวะมีแสง

6.2 ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอล (glycerol)

เลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร 1.25xMS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ซึ่งมีกลีเซอรอลระดับความเข้มข้น 0 100 200 300 400 และ 500 มิลลิโมลต่อลิตร ในภาวะมีแสง

6.3 ระดับความเข้มข้นของไมโออิโนซิทอล (mio-inositol)

เลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร 1.25xMS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ mio-inositol ระดับความเข้มข้น 100 250 500 และ 1000 มก.ต่อลิตร ในภาวะมีแสง

6.4 ระดับความเข้มข้นของเคซีนไฮโดรไลเซต (casein hydrolysate)

เลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร MS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับเคซีนไฮโดรไลเซตระดับความเข้มข้น 0.0 0.25 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตร ในภาวะมีแสง

6.5 ระดับความเข้มข้นของผงถ่าน (charcoal)

เลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร MS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก. ต่อลิตร ร่วมกับผงถ่านระดับความเข้มข้น 0.0 0.05 0.25 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตร ในภาวะมีแสง

6.6 ซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$)

เลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร 1.25xMS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) ระดับความเข้มข้น 0.0 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิโมล ในภาวะมีแสง

6.7 Amino acid

เลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร 1.25xMS มี NAA ต่อ BAP 0.5:1.0 มก.ต่อลิตร ร่วมกับกรดอะมิโน 4 ชนิด คือ L-Arginine L-Asparagine Glycine L-Glutamine 40 40 20 60 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับที่ไม่มีกรดอะมิโน

6.8 ระดับความเข้มแสง

เลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร 1.25xMS มี NAA 0.5 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ BAP 1.0 1.5 และ 2.0 มก.ต่อลิตร ในภาวะแสง 2000 และ 3000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชม.ต่อวัน

<u>การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด</u>

1. <u>อิทธิพลของอาหารต่อการชักนำให้เกิดยอด</u>

1.1. อิทธิพลของสูตรอาหาร

นำส่วนข้อมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS SH WPM ที่มี BAP 0.0 0.25 0.5 1.0 และ 2.0 มก.ต่อลิตร หลังจาก 4 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลง

และย้ายในอาหารสูตรเดิมที่ปราศจาก BAP สังเกตการเปลี่ยนแปลงหลังจาก 4 สัปดาห์

1.2 อิทธิพลของชิ้นส่วนพืชทดลอง

นำส่วนข้อ และยอดมาเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ที่มี BAP 0.25 และ 0.5 มก.ต่อลิตร

1.3 การเปลี่ยนแปลงสารบางตัวในสูตร WPM

1.3.1 ระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)

นำส่วนข้อมาเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM มี BAP 0.25 มก.ต่อลิตร ที่มีแอมโมเนียมไนเตรทความเข้มข้น 0 100 200 400 และ 800 มิลลิโมล

1.3.2 ระดับน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์ (Sorbital)

นำส่วนข้อมาเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM BAP 0.25 มก. ต่อลิตร ที่มีอัตราส่วนของน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์ (Sorbital) 60:0 90:0 60:50 และ 30:100 มิลลิโมล

2. <u>ศึกษาอิทธิพลของสารเร่งการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มจำนวนยอด</u>

ใช้อาหารสูตร WPM เพิ่มธาตุเหล็ก 0.5 เท่า เป็นอาหารสูตร WPM พื้นฐาน ในการเพิ่มจำนวนยอดและชักนำให้เกิดการยืดตัวของตายอด

2.1 ระดับความเข้มข้นของ BAP

นำส่วนข้อเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่มี BAP 0 0.1 0.2 0.25 0.3 0.4 และ 0.5 มก.ต่อลิตร

2.2 การทำงานร่วมกันของ NAA และ BAP

นำส่วนช้อเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐาน ที่มี BAP 0.25 มก.ต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.0 0.1 และ 0.2 มก.ต่อลิตร

2.3 ระดับความเข้มข้นของ TDZ

นำส่วนช้อเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐาน มี NAA 0.0 และ 0.5 มก. ต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ระดับความเข้มข้น 0.1 0.5 1.0 2.0 4.0 และ 8.0 มก. ต่อลิตร

<u>การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการยืดตัวของตายอด</u>

1. <u>ระดับความเข้มข้นของ GA_3 ของการยืดตัวของตาจากส่วนช้อ</u>

นำส่วนช้อมาเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐาน ที่มี GA_3 0 0.1 0.25 0.5 1.0 2.0 และ 4.0 มก.ต่อลิตร หลัง 4 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลง และย้ายลงในอาหารสูตร WPM ที่มี NAA 1 มก.ต่อลิตร หลังจาก 4 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงอีกครั้ง

2. <u>ระดับความเข้มข้นน้ำตาลต่อการยืดตัวของตายอด</u>

นำส่วนช้อและยอดมาเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐาน ที่มีน้ำตาลร้อยละ 1.5 2.0 2.5 และ 3.0

<u>การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดราก</u>

1. <u>การชักนำให้เกิดรากโดยสารเร่งการเจริญเติบโต</u>

1.1 ปริมาณน้ำตาลที่มีผลช่วยในการชักนำให้เกิดรากที่ NAA 1 และ 2 มก.ต่อลิตร

นำกิ่งกวาวมีข้อประมาณ 2-3 ข้อ มาปักชำบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA 1 และ 2 มก.ต่อลิตร และน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 1 2 และ 3 หลังจาก 4 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลง และบันทึกผลการทดลอง

1.2 สูตรอาหารต่อการชักนำให้เกิดราก

นำกิ่งกวาว มีข้อประมาณ 2-3 ข้อ มาปักชำบนอาหารสูตร MS SH และ WPM ทุกสูตรใช้น้ำตาลร้อยละ 2 บันทึกจำนวนต้นที่เกิดรากทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.3 ระดับความเข้มข้นของธาตุอาหารสูตร MS และ WPM

นำกิ่งกวาวมีข้อประมาณ 2-3 ข้อ มาปักชำบนอาหารสูตร MS และ WPM ซึ่งมีระดับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักและรอง ปกติ ลดลง 0.75 และ 0.5 เท่าของสูตรปกติ ทุกวิธีการทดลองใช้ NAA 1 มก.ต่อลิตร น้ำตาลร้อยละ 2

2. <u>การชักนำให้เกิดรากโดย Agrobacterium rhizogenes</u>

นำส่วนใบและรากกวาว มาแช่ในอาหารเหลว YEB ที่มี <u>Agrobacterium rhizogenes</u> สายพันธุ์ต่าง ๆ คือ A_4 A_4RSII A_4RSII_{GUS} ATCC 15834 และ RI601 ในระยะที่กำลังเจริญเติบโตดี (log phase) เป็นเวลา 2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ก่อนนำไปวางบนอาหารสูตร MS และสูตร MS ที่มี NAA ต่อ BAP 0.5:0.5 มก.ต่อลิตร เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ใช้ยาสูบ (<u>Nicotiana plumbaginifolia</u>) ในการทำการทดลองเปรียบเทียบ

<u>การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงรากพืชแบบแขวนลอย</u>

นำรากกวาวความยาวประมาณ 2.5 ซม. จำนวน 2 ชิ้น น้ำหนักประมาณ 0.15-0.20 กรัม มาเลี้ยงในขวดทดลองขนาด 250 มล. ที่มีอาหารเหลว 100 มล. ในที่มืดบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 90 รอบต่อนาที หลัง 4 สัปดาห์ บันทึกการเปลี่ยนแปลง

1. <u>สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงราก</u>

นำรากกวาวที่ได้จากต้นที่เพาะเมล็ด มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS SH B5 และ WPM หลัง 4 สัปดาห์ บันทึกการเปลี่ยนแปลง

2. <u>ระยะเวลาต่อการเจริญของราก</u>

เลี้ยงรากธรรมชาติและรากจากการชักนำด้วย NAA 1.0 กรัมต่อลิตร ในอาหารสูตร MS สังเกตการเปลี่ยนแปลง และบันทึกน้ำหนักทุก 1 สัปดาห์

3. <u>ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล</u>

เลี้ยงรากในอาหารสูตร MS ที่มีน้ำตาลร้อยละ 1 2 3 4 และ 5

4. <u>ระดับความเข้มข้นของ NAA ต่อรากธรรมชาติและรากที่ได้จากการชักนำด้วย NAA 1.0 มก.ต่อลิตร</u>

เลี้ยงรากธรรมชาติและรากจากการชักนำด้วย NAA 1.0 มก.ต่อลิตร ในอาหารสูตร MS ที่มี NAA 0.0 0.1 0.5 และ 1.0 มก.ต่อลิตร

<u>ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเลี้ยงต้นกวาว</u>

1. <u>ศึกษาอิทธิพลของสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงต้น ในสภาพปลอดเชื้อ</u>

นำต้นกวาวที่ได้จากการชักนำให้เกิดรากด้วย NAA 1 มก.ต่อลิตร น้ำตาลร้อยละ 2 ในอาหารสูตร WPM มาเลี้ยงในขวดขนาด 200 มล. ที่มีอาหารสูตร MS SH และ WPM การทดลองละ 15 ขวด หลังจาก 4 สัปดาห์ บันทึกการเปลี่ยนแปลง

2. <u>ศึกษาอิทธิพลของสารอาหารเพิ่มเติมในการเลี้ยงต้นกวาว</u>

นำต้นกวาวมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ WPM ที่มีการเพิ่มธาตุเหล็กจากสูตรอาหารเดิมอีก 0.5 เท่า และเพิ่มธาตุเหล็กในรูป FeEDTA และแคลเซียมในรูป $CaCl_2$ จากสูตรอาหารเดิมอีก 0.5 เท่า การทดลองละ 15 ขวด หลังจาก 4 สัปดาห์

บันทึกการเปลี่ยนแปลง

ศึกษาการขยายพันธุ์ต้นกวาวในสภาพแวดล้อมภายนอก

1. การขยายพันธุ์โดยวิธีปักชำกิ่งพันธุ์ในสภาพแวดล้อมภายนอก

นำกิ่งพันธุ์กวาวจากอำเภอดอยเต่า จังหวัดเชียงใหม่ มาปลูกในเรือนปลูกพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในวัสดุปลูกผสมระหว่างดิน ขุยมะพร้าว ทราย ปุ๋ยเทศบาล ในอัตราส่วน 1:1:1:1 กิ่งพันธุ์นำมาแช่ในสารเร่งรากพืช (exotic) เป็นเวลา 5 นาที และไม่แช่ในสารเร่งรากพืช ศึกษาการเกิดรากและแตกหน่อ และอัตรารอดในระยะเวลา 2 เดือน

2. ต้นกวาวที่ได้จากการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองสู่สภาพแวดล้อมภายนอก

นำต้นกวาวที่ได้จากการชักนำให้เกิดรากในหลอดทดลอง นำมาทดลองเลี้ยงในเรือนเพาะชำในวัสดุปลูกเช่นเดียวกับกิ่งชำ ศึกษาสภาพการเจริญเติบโตและอัตราการรอดชีวิตในช่วงเวลา 2 เดือน

การเตรียมตัวอย่างพืชและสกัดสาร

นำหัวกวาวเครือขาวจากต้นในเรือนเพาะชำ แคลลัสจากการชักนำและรากที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ ในภาวะปลอดเชื้อ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ น้ำหนัก 10 กรัม มาบดรวมกับไนโตรเจนเหลว จนกระทั่งเป็นผง สกัดสารจากพืชโดยหมักกับเอธานอลบริสุทธิ์ 20 มล. ในขวดแก้วปิด ระยะเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดกรองกากออกด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1) นำส่วนของสารละลายสกัดจากพืชที่กรองแล้วมาทำให้เข้มข้น โดยการระเหยให้แห้งโดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (water bath) จนกระทั่งเหลือสารละลายเข้มข้น 2 มล.

การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากกวาวเครือขาว ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นบาง

สารละลายเข้มข้น 10 ไมโครลิตร มาจุด (spot) บนแผ่นโครมาโทกราฟีแผ่นบางขนาด 10 x 20 ซม.^{2} ที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล (Silica gel 60 F_{254}) นำไปแยกในภาชนะแก้วปิดสนิท ที่มีสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมธานอล (Ingham et al.,1986) อัตราส่วน 90 : 10 เป็นตัวชะจากข้างล่างขึ้นข้างบน ในแนวตั้งฉาก (ascending) เมื่อแนวของตัวทำละลายเคลื่อนที่จนเกือบถึงด้านบนสุดของแผ่นซิลิกา นำแผ่นออกจากสารละลายไปติดตามและบันทึกผลการแยกสารเบื้องต้นด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ที่ ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร (long wavelength) คำนวณค่าคงที่ R_f (relative fraction) แต่ละจุดเปรียบเทียบกัน