บทที่ 2
วิธีการทดลอง

วัสดุ

พืชทดลอง

พืชที่ใช้ในการทดลอง คือโป๊ยเซียน (*Euphorbia milii* Desmoulin) พันธุ์สร้อยรัชนี

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ
   - เอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์
   - คลอรอกซ์ และสารจับใบทวีน 20 (tween 20)
2. สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหาร Murashige และ Skoog (MS) (ภาคผนวก ข)
3. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชได้แก่ 2,4-D BA NAA IBA IAA 2iP และ Kinetin
4. สารเคมีที่ใช้ในการแยกโพรโทพลาสต์

   เอนไซม์ได้แก่ Cellulase ‘‘Onozuka R-10’’ (Yakult Honsha Co., Ltd. Lot # 201050) Driselase (Kyowa Hakko Co., Ltd. Lot # 4111) และ Macerozyme R-10 (Yakult Honsha Co., Ltd. Lot # 202018)
5. สารเคมีที่ใช้ปรับแรงดันออสโมติก คือ น้ำตาลแมนนิทอล
6. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมวอชชิ่งโซลูชั่น หรือ CPW (cell protoplast washing solution) (ภาคผนวก ค)
7. สารเคมีสำหรับย้อมตรวจสอบความมีชีวิตและการสร้างผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ ได้แก่ ฟลูออเรสซีนไดอะซีเตด (Fluorescein diacetate, FDA) และสารแคลคอฟลอไวท์ (Calcoflour white, CFW) ตามลำดับ
8. เครื่องแก้วและพลาสติก ได้แก่ บิกเกอร์ ฟลาสก์ ขวดแก้วพร้อมฝาปิด ขวดพลาสติก จานเลี้ยงเชื้อ ตะแกรงกรองขนาด 141 และ 43 ไมโครเมตร กระบอกตวง ปิเปต พาสเจอร์ปิเปต ไมโครปิเปต หลอดเซนตริฟิวจ์ สไลด์ กระจกปิดสไลด์ และ สไลด์นับเม็ดเลือด (Hemacytometer slide)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ METTLER รุ่น PJ 100 และ 400 ตามลำดับ)
- เตาแม่เหล็กไฟฟ้า (stirring hot plate) (ยี่ห้อ Heidolph รุ่น MR 300)
- เครื่องวัดความเป็นด่าง (pH meter) (ยี่ห้อ Horiba รุ่น pH – METER F-13)
- เตาอบไมโครเวฟ (microwave oven) (ยี่ห้อ SHARP รุ่น R- 245)
- หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) (ยี่ห้อ EYELA รุ่น MAC-601)

2. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow carbinet)

3. เครื่องมือที่ใช้ในการย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อและโพรโทพลาสส์ ได้แก่ ปากคีบ มีดผ่าตัด จานเลี้ยงเชื้อ พาราฟิล์ม ลูกยาง หลอดหยด ตะแกรงวางหลอดทดลอง

4. เครื่องเขย่าที่ปรับอุณหภูมิได้ (incubator shaker) (ยี่ห้อ BENCH-TOP ORBITAL รุ่น 01 2116)

5. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมเอนไซม์

- เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) (ยี่ห้อ EC รุ่น HN-S II)
- เครื่องกรองจุลินทรีย์ (Milipore filter set)
- กระดาษกรอง (Millipore paper) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

6. กล้องจุลทรรศ์แบบอินเวอร์เตด (Olympus inverted research microscope model IMT-2) ที่มีอุปกรณ์ระบบ fluorescence, phase contrast และ differential interference contrast (DIC) ที่ใช้ Mercury lamp OSRAM HBO 100 W เป็นแหล่งกำเนิดแสง

7.โทรทัศน์พร้อมเครื่องวีดีโอบันทึกภาพ

8. เครื่องพิมพ์ภาพจากวีดีโอ (video printer)

9. กระดาษอัดรูปจาก Sony UPC -1010

10. ฟิล์มสี Kodak color ASA 200

11.ชั้นสำหรับวางขวดเพาะเลี้ยงติดหลอดไฟโกรลักซ์ความเข้มแสง 1,500-2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

วิธีการ

การทดลองแบ่งออกเป็น 2 ตอน คือ

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโป๊ยเซียน
2. การแยกและเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์โป๊ยเซียน

ตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโป๊ยเซียน

1.1 การชักนำแคลลัสจากลำต้น ข้อ และ ใบ โป๊ยเซียน

- ลำต้น

นำลำต้นโป๊ยเซียนพันธุ์สร้อยรัชนีโดยวัดจากส่วนยอดลงมา 5-6 เซนติเมตร ตัดหนามทิ้ง แล้วนำลำต้นมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมสารจับใบทวีน 20 จำนวน 3-4 หยด นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำ ลำต้นที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดตามขวางให้มีความยาวประมาณ 3-5 มิลลิเมตร หลังจากนั้น นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4-D 2iP และ Kinetin ในระดับความเข้มข้นต่างๆดังนี้ 0.0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 1)

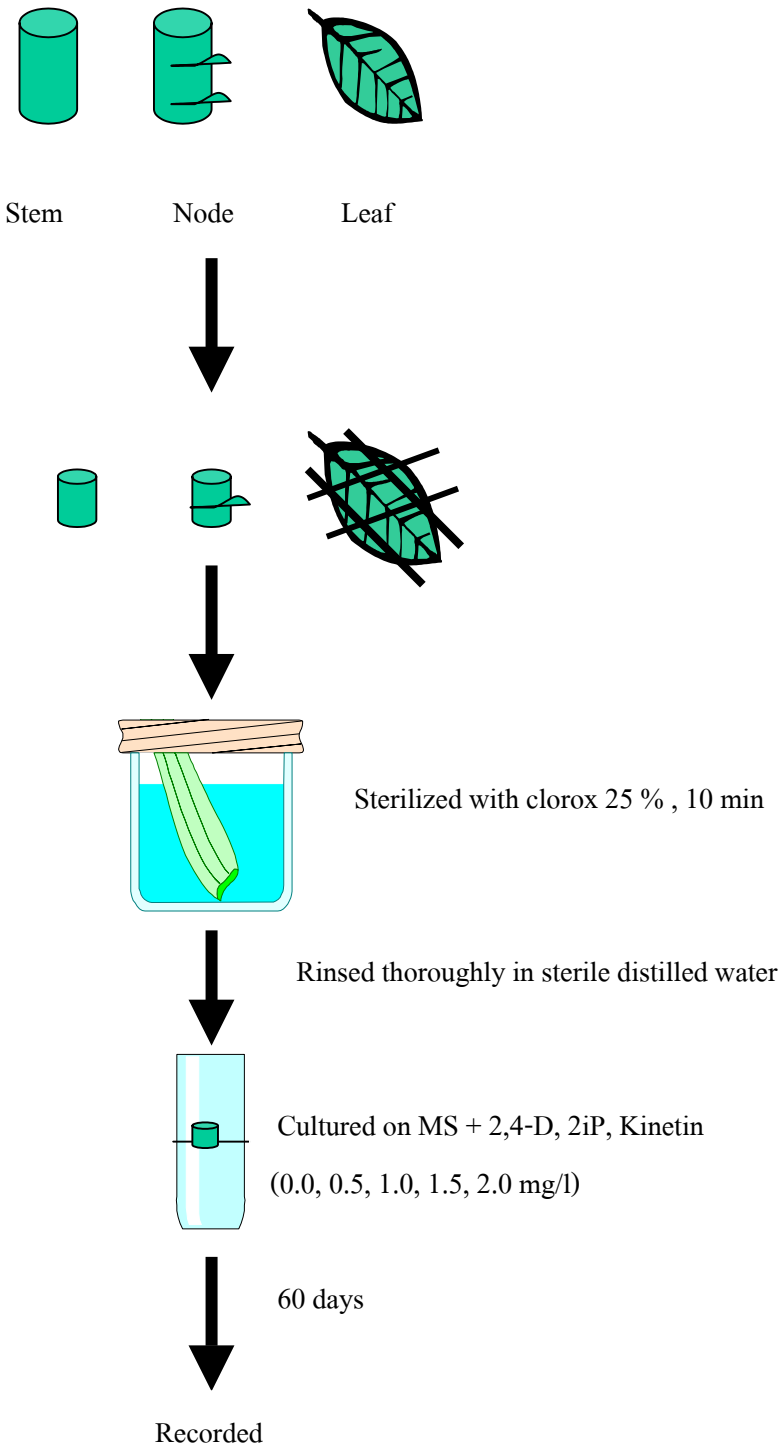
- ข้อ

ส่วนข้อของโป๊ยเซียนจะใช้ข้อที่ 3-5 วัดจากส่วนปลายยอดลงมา ตัดหนามทิ้ง และทำการทดลองเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงลำต้น (ภาพที่ 1)

-ใบ

นำใบมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมสารจับใบทวีน 20 จำนวน 3-4 หยด นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นนำใบที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดเส้นขอบใบออก ตัดใบลักษณะตามขวางให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตรโดยให้ติดเส้นกลางใบ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงลำต้น (ภาพที่ 1)

บันทึกผลการทดลอง หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 60 วัน โดยการนับจำนวนลำต้น ข้อ และ ใบ ที่เกิดแคลลัส สังเกตลักษณะ สี และวัดขนาดของแคลลัส



ภาพที่ 1 การชักนำแคลลัสจาก ลำต้น ข้อ และใบโป๊ยเซียน

Figure 1 Callus induction from stem node and leaf of *E. milii* Desmoulin.

1.2 การชักนำให้แคลลัสเจริญเป็นยอด

นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงลำต้น ข้อ และใบ บนอาหารสูตรที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1.1 ตัดให้เป็นรูปสีเหลี่ยมจตุรัสขนาด 1 x 1 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA ในระดับความเข้มข้นต่างๆดังนี้ 0.0 1.0 3.0 5.0 และ 7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

บันทึกผลการทดลองหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 90 วันโดยนับจำนวนแคลลัสที่พัฒนาเป็นยอด สังเกตขนาดและลักษณะของสีใบ และนับจำนวนยอดที่เกิดขึ้นในแต่ละแคลลัส

1.3 การชักนำยอดให้เจริญเป็นราก

นำยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตรที่เหมาะจากการทดลองที่ 1.2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA IBA และ IAA ในระดับความเข้มข้นต่างๆดังนี้ 0.0 1.0 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

บันทึกผลการทดลองหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 30 วัน โดยการสังเกตลักษณะสีและขนาดของราก และนับจำนวนรากที่เกิดต่อยอด

สภาวะการเพาะเลี้ยงและการวิเคราะห์ผลการทดลอง

ทุกการทดลองในหัวข้อที่ 1.1 1.2 และ 1.3 เก็บรักษาขวดเพาะเลี้ยงภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยวางเลี้ยงภายใต้สภาพแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส โดยทำการทดลองสูตรอาหารละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด และเปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan ' s Multiple Range Test) วิเคราะห์โดยใช้โปรมแกรม IERI STAT

1.4 การอนุบาลต้นโป๊ยเซียนหลังออกจากขวดเพาะเลี้ยง

นำต้นโป๊ยเซียนมาล้างวุ้นออกให้หมด แช่ในน้ำนาน 10 นาที แล้วนำต้นที่ได้ไปอนุบาลในเวอร์มิคูไลต์นาน 30 วัน ภายใต้อุณหภูมิห้อง 25 ± 2 องศาเซลเซียส โดยรดน้ำสัปดาห์ละครั้ง หลังจากนั้นนำไปปลูกในดินที่ผสมไว้และรดน้ำบริเวณโคนต้นวันเว้นวัน และต้องคอยดูแลการให้น้ำและแสงให้เพียงพอ หลังจากนั้นประมาณ 30 วัน ให้เริ่มใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 จนออกดอก

บันทึกผลการทดลอง ลักษณะของลำต้น ใบ และเปอร์เซ็นต์การรอดตลอดระยะเวลาที่อนุบาลจนกระทั่งออกดอก

ตอนที่ 2 การแยกและเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์โป๊ยเซียน

ใช้ใบจากต้นโป๊ยเซียนที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ อายุประมาณ 30 วัน โดยใช้ใบน้ำหนัก 1 กรัม ต่อสารละลายเอนไซม์ 10 มิลลิลิตร

วิธีเตรียมสารละลายเอนไซม์

1. เตรียมวอชชิ่งโซลูชั่น ปริมาตร 1 ลิตร ปรับพีเอช 5.7

2.ละลายเอนไซม์ และเติมน้ำตาลแมนนิทอล ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ตามปริมาตรที่ต้องการในวอชชิ่งโซลูชั่น

3.นำสารละลายเอนไซม์ไปปั่นแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วที่ระดับ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บเอาเฉพาะส่วนใสของสารละลายเอนไซม์ ทิ้งตะกอนไป

4.ทำสารละลายเอนไซม์ให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องกรองจุลินทรีย์โดยกรองผ่านกระดาษกรองจุลินทรีย์ ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บเอนไซม์ไว้ในตู้เย็นที่ช่องแช่แข็ง

วิธีการแยกโพรโทพลาสต์

1. นำใบโป๊ยเซียนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ อายุประมาณ 30 วัน ชั่งใบหนัก 1 กรัม หั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ ตามขวางของใบขนาดประมาณ 0.5 – 2.0 มิลลิเมตร ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร (ภาพที่ 1)

2. ดูดสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีชิ้นส่วนของใบอยู่

3. นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 50 รอบต่อนาที ในสภาพมืด อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

4.เมื่อครบเวลาที่กำหนดใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดสารละลายเอนไซม์ซึ่งมีโพรโทพลาสต์อยู่ นำไปกรองด้วยตะแกรงกรองขนาด 141 ไมโครเมตร และ 43 ไมโครเมตร ตามลำดับ

5.นำสารแขวนลอยของโพรโทพลาสต์ไปปั่นแยกส่วนด้วยความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

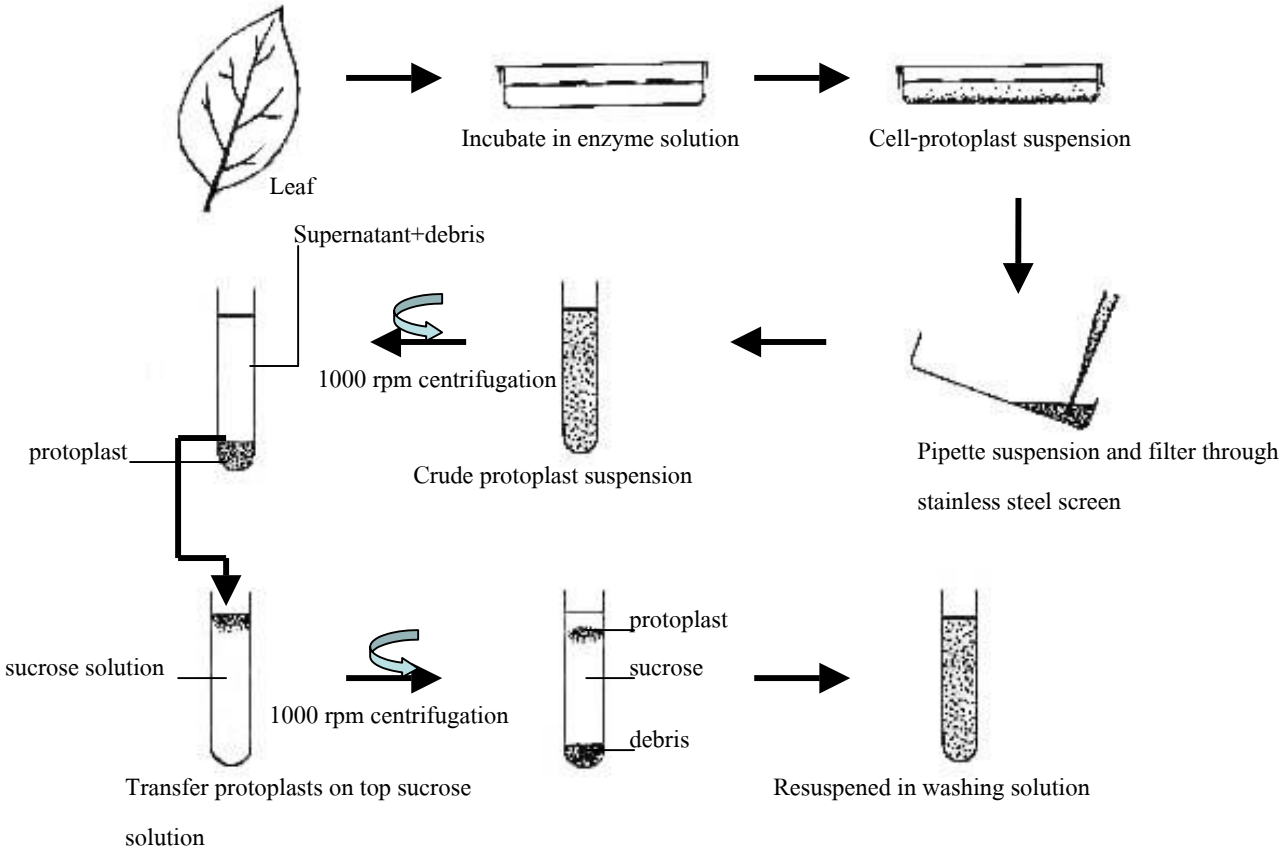
6.ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดสารละลายเอนไซม์ออก นำโพรโทพลาสต์มาทำให้สะอาดโดยวิธีการลอยตัว (floatation method) ด้วยสารละลายซูโครส 0.6 โมลาร์ โดยดูดสารละลายซูโครสปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ แล้วใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดโพรโทพลาสต์ซึ่งแขวนลอยอยู่ในวอชชิ่งโซลูชั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ค่อยๆปล่อยโพรโทพลาสต์ลงบนผิวหน้าของสารละลายซูโครส นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

7.หลังจากปั่นแยกสารละลายจะแบ่งเป็น 2 ชั้น โพรโทพลาสต์จะแขวนลอยอยู่ส่วนบนของสารละลายซูโครส ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดโพรโทพลาสต์ที่ลอยอยู่ข้างบนมาล้างด้วยวอชชิ่งโซลูชั่น 1 ครั้ง ปั่นแยกด้วยความเร็ว และเวลาเท่าเดิม

8.แขวนลอยโพรโทพลาสต์ไว้ในวอชชิ่งโซลูชั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร

วิธีการเก็บผลการศึกษา

ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดโพรโทพลาสต์ที่แขวนลอยอยู่ในวอชชิ่งโซลูชั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่ในสไลด์สำหรับนับเม็ดเลือด ซึ่งมีปริมาตรข้างละ 0.1 ลูกบาศก์มิลลิลิตร สุ่มนับจำนวนโพรโทพลาสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ทำ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำนับจำนวนโพรโทพลาสต์ 10 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย และบันทึกผล



ภาพที่ 2 วิธีแยกโพรโทพลาสต์

Figure 2 Protoplast isolation procedure.

2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์โป๊ยเซียน

2.1.1 ระดับออสโมลาริตี้

ใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์เทน 1 เปอร์เซ็นต์ ไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์ อาร์เทน 0.5 เปอร์เซ็นต์ และมีแมนนิทอล ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.4 0.5 0.6 และ 0.7 โมลาร์ เป็นออสโมติคัม

2.1.2 ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์

-ทำการศึกษาของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์โดยทดลองในสารละลายเอนไซม์ 4 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน (ตารางที่ 1)

- สารละลายเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด มี แมนนิทอล 0.4 โมลาร์(จากการศึกษาในข้อ 2.1.1) เป็นออสโมติคัม

ตารางที่ 1 ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์

Table 1 Types and concentrations of enzymes

Enzyme	Concentration		
	Cellulase R-10 (%)	Driselase (%)	Macerozyme R-10 (%)
E1	1	-	-
E2	1	-	0.5
E3	1	0.5	-
E4	1	0.5	0.5

2.1.3 การเก็บใบไว้ในที่มืด

-นำใบโป๊ยเซียนเก็บไว้ในตู้มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำใบ ไปแยกโพรโทพลาสต์ในสารละลายเอนไซม์ E4 (จากการศึกษาในข้อ 2.1.2)

-ตรวจนับจำนวนโพรโทพลาสต์เปรียบเทียบระหว่างต้นที่เก็บใบไว้ในที่มืดกับต้นที่ไม่ได้เก็บใบไว้ในที่มืด

2.1.4 ระยะเวลาการอินคิวเบทต่อความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์

-นำใบโป๊ยเซียนที่เก็บไว้ในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาแยกโพรโทพลาสต์ในสารละลายเอนไซม์ E4 โดยบ่มในสภาวะเดิมเก็บผลการศึกษาที่เวลา 2 3 และ 4 ชั่วโมง

-นับจำนวนโพรโทพลาสต์ และตรวจสอบความมีชีวิต

สภาวะการแยกโพรโทพลาสต์และการวิเคราะห์ผลการทดลอง

การทดลองในหัวข้อ 2.1.1 2.1.2 2.1.3 และ 2.1.4 การแยกโพรโทพลาสต์วางย่อยบนเครื่องเขย่าความเร็ว 50 รอบต่อนาที ในสภาพมืด อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส เก็บผลการศึกษาที่เวลา 4 ชั่วโมง เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำนับจำนวนโพรโทพลาสต์ 10 ครั้ง และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยใช้ DRMT วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม IERI STAT

2.2 การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์โป๊ยเซียน

วิธีเตรียมโพรโทพลาสต์สำหรับการเพาะเลี้ยง

1.นำโพรโทพลาสต์มาทำให้สะอาดโดยวิธีการลอยตัว (floatation method) ด้วยสารละลายซูโครส 0.6 โมลาร์ โดยดูดสารละลายซูโครสปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ แล้วใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดโพรโทพลาสต์ซึ่งแขวนลอยอยู่ในวอชชิ่งโซลูชั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ค่อยๆปล่อยโพรโทพลาสต์ลงบนผิวหน้าของสารละลายซูโครส นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

2.หลังจากปั่นแยกสารละลายจะแบ่งเป็น 2 ชั้น โพรโทพลาสต์จะแขวนลอยอยู่ส่วนบนของวอชชิ่งโซลูชั่นใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดโพรโทพลาสต์ที่ลอยอยู่ข้างบนมาล้างด้วยอาหารเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ 1 ครั้ง ปั่นแยกด้วยความเร็ว และเวลาเท่าเดิม

3.ปรับความหนาแน่นของโพรโทพลาสต์ตามต้องการในอาหารเพาะเลี้ยงปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยง

วิธีตรวจสอบความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์

1.เตรียมสารละลายสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตตให้มีความเข้มข้น0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยชั่งฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต 0.25 มิลลิกรัม ละลายในอะซีโตนปริมาตร 50 มิลลิลิตร) จากนั้นหยดสารละลายฟลูออเรสซีนไดอะซีเตตลงในแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ ทีละหยดจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากลักษณะใสเป็นขุ่น และมีความขุ่นคงที่

2.หยดสารละลาย สีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตตจากข้อ 1 จำนวน 1 หยด ลงบนตัวอย่างโพรโทพลาสต์ที่อยู่บนแผ่นสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

3.หลังจากทิ้งไว้ ประมาณ 2 - 5 นาที นำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ระบบอินเวอร์เตด โพรโทพลาสต์ที่มีชีวิตจะเรืองแสงสีเหลืองเขียว สุ่มนับจำนวนโพรโทพลาสต์ที่มีชีวิตโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ดังสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์โพรโทพลาสต์ ที่มีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนโพรโทพลาสต์ที่เรืองแสง}}{\text{จำนวนโพรโทพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

วิธีตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์

1.เตรียมสารละลายสีแคลคอฟลอร์ไวท์ ความเข้มข้น 0.1 ปอร์เซ็นต์ ในสารละลายแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ (โดยชั่งแคลคอฟลอร์ไวท์ 0.02 กรัม ละลายในสารละลายแมนนิทอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร)

2.หยดสารละลายสีแคลคอฟลอร์ไวท์ จำนวน 1 หยด ลงบนตัวอย่างโพรโทพลาสต์ที่อยู่บนแผ่นสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

3.นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบอินเวอร์เตด โพรโทพลาสต์ที่มีผนังเซลล์จะเห็นการเรืองแสงของผนังเซลล์เป็นวงรอบนอกเยื่อหุ้มเซลล์

วิธีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์โป๊ยเซียน

2.2.1 วิธีการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์

นำโพรโทพลาสต์ความหนาแน่น 1 x 10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แมนนิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ โดยวิธีการต่างๆ ดังนี้คือ

วิธีที่ 1 เพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ในอาหารเหลว โดยเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร พันรอบจานเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม นำไปเลี้ยง

วิธีที่ 2 เพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ในอาหารแข็ง โดยการเติมโพรโทพลาสต์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในอาหารเติมวุ้นอะกาโรส เข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงที่ 26 – 28 องศาเซลเซียส ผสมลงในจานเลี้ยงเชื้อจนเข้ากันดี พันรอบจานเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม นำไปเลี้ยง

วิธีที่ 3 เพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์แบบวิธี Nurse culture โดยการใช้แคลลัสของโป๊ยเซียนที่มีขนาด 1 เซนติเมตร เป็นเนื้อเยื่อพยาบาล วางเลี้ยงบนอาหารแข็ง หลังจากนั้นนำกระดาษกรอง whatman filter paper No.1 ที่ตัดให้มีขนาด 1.5 x 1.5 เซนติเมตร ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนำไปวางบนก้อนแคลลัส ดูดโพรโทพลาสต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมลงไปบนกระดาษกรอง พันรอบจานเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม นำไปเลี้ยง

วิธีที่ 4 เพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยการเติมโพร-โทพลาสต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในอาหารเติมวุ้นอะกาโรส เข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆให้โพรโทพลาสต์ฝังตัวอยู่ในอาหารวุ้น พันรอบจานเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม นำไปเลี้ยง

นำโพรโทพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 วิธี ไปเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของโพรโทพลาสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อินเวอร์เตต โดยสังเกตลักษณะ และการเจริญของโพรโทพลาสต์ทุกวันหลังจากการเพาะเลี้ยง ตรวจสอบความมีชีวิต และการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโพรโทพลาสต์ บันทึกผลแต่ละวิธีการเลี้ยงเปรียบเทียบกันหลังจากเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์

2.2.2 ความหนาแน่นของโพรโทพลาสต์ เริ่มต้นที่ใช้เพาะเลี้ยง

นำโพรโทพลาสต์ที่แยกจากใบมาเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แมนนิทอล 0.4 โมลาร์ วุ้นอะกาโรส 0.3 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงฆ่าเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ความหนาแน่นของโพรโทพลาสต์เริ่มต้นที่เพาะเลี้ยง คือ 5×10^4 1×10^5 และ 5×10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนแปลงของโพรโทพลาสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อินเวอร์เตด ตรวจสอบความมีชีวิต และการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโพรโทพลาสต์ เปรียบเทียบกันในแต่ละความหนาแน่น หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี DMRT วิเคราะห์โดยใช้โปรมแกรม IERI STAT

2.2.3 ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์

นำโพรโทพลาสต์ จำนวน 1×10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MS ที่เติมแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ และมีสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ (ตารางที่ 2)

บันทึกผลโดยเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของโพรโทพลาสต์ในอาหารแต่ละสูตร โดยสังเกตลักษณะของโพรโทพลาสต์ ตรวจสอบความมีชีวิต การสร้างผนังเซลล์ใหม่ และการแบ่งเซลล์ของโพรโทพลาสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เตด หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

ตารางที่ 2 ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์

Table 2 Types of medium for protoplast culture.

Type of medium	Growth regulators (mg/l)		
	2,4-D	BA	NAA
1	0.5	0.5	-
2	1.0	1.0	-
3	1.5	1.5	-
4	2.0	2.0	-
5	-	0.5	0.5
6	-	1.0	1.0
7	-	1.5	1.5
8	-	2.0	2.0
9	-	2.0	1.0
10	-	3.0	1.0
11	-	4.0	1.0
12	-	5.0	1.0
13	0.5	1.0	1.0
14	1.0	1.0	1.0
15	1.5	1.0	1.0
16	2.0	1.0	1.0