บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วิธีดำเนินการ

1. ศึกษาชิ้นส่วนพืช และสูตรอาหารต่อการเกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส

เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ และข้อหน้าวัวจากหลอดทดลองอายุ 2 สัปดาห์ ในอาหารที่แตกต่างกัน 5 สูตร คือ MS, ½ MMS, MMS, WPM, LS (Linsmaier & Skoog) และ VW (Vacin & Went) เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และ BA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ไฟตาเจล 0.17 เปอร์เซ็นต์ และปรับ pH 5.7 เพาะเลี้ยงในขวด 4 ออนซ์ บรรจุอาหาร 15 มิลลิลิตร โดยวางเลี้ยงในสภาพมืด ที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ บันทึกประเภทของแคลลัสที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหาร โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Completely randomized design) ในแต่ละสูตรอาหารทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 5 ชิ้นส่วน เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's multiple range test) จากนั้นทำการตรวจสอบเนื้อเยื่อวิทยา เอนไซม์ และโปรตีน ดังวิธีการต่อไปนี้

1.1 การตรวจสอบเนื้อเยื่อวิทยา

นำตัวอย่างของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส ที่ชักนำได้จากอาหารสูตร WPM มาแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ (FAA: Formalin-acetic acid-alcohol) (Sess, 1958 อ้างโดย ลักขนา, 2548) เป็นเวลา 10 วันที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปดึงน้ำออกจากเซลล์ในเอทธิลแอลกอฮอล์ และ บิวธิลแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ทำการฝังชิ้นส่วนตัวอย่างในพาราฟิน และทำการตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัดล้อหมุน (microtome) ย้อมสีริบบอน 2 สี คือ แซฟรานิน และ ฟาสท์กรีน บันทึกลักษณะเนื้อเยื่อของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส (ภาคผนวก ข)

1.2 การตรวจสอบเอนไซม์โดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

นำตัวอย่างเมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัส และแคลลัสที่มีลักษณะของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส จากการตรวจสอบด้วยเนื้อเยื่อวิทยา มาบดกับบัฟเฟอร์สำหรับสกัดเอนไซม์ ปริมาตร 5 เท่าของน้ำหนักแคลลัสในโกร่งเย็นจนละเอียด แล้วจึงนำของเหลวที่ได้เทใส่หลอดเอฟเพนดอร์ฟ ปั่นเหวี่ยงด้วยไมโครเซนตริฟิวก์ที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดเอฟเพนดอร์ฟที่สะอาด แล้วแยกเอนไซม์ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟริ-ซิสแนวตั้ง ใช้ตัวกลางเป็นเจลโพลีอะคริลาไมด์แบบไม่ต่อเนื่อง ประกอบด้วย Stacking gel และส่วน separating gel (ดูรายละเอียดภาคผนวก ค) ดูดสารละลายส่วนใสที่สกัดมา 15 ไมโครลิตร ผสมกับ bromophenol blue 2 ไมโครลิตร หยอดใส่ร่องหวีบนแผ่นเจลที่เตรียมไว้ แยกเอนไซม์ในสารละลายอิเล็กโตรดบัฟเฟอร์ ภายใต้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที ตรวจสอบเอนไซม์ในระบบเอสเตอเรส เปอร์ออกซิเดส มาเลทดีไฮโดรจีเนส และแอซิดฟอสฟาเทส ย้อมสีในที่มืด บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 80 รอบต่อนาที จนเห็นแถบไซโมแกรมชัดเจน ไม่เปลี่ยนแปลง แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง บันทึกผลทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของไซโมแกรม

1.3 การตรวจสอบโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE

เตรียมตัวอย่างเมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัส และแคลลัสที่มีลักษณะของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส มาบดรวมกับบัฟเฟอร์สำหรับสกัดโปรตีน ปริมาตร 4 เท่าของน้ำหนักตัวอย่าง ในโกร่งเย็นจนละเอียด แล้วจึงนำของเหลวที่ได้เทใส่หลอดเอฟเพนดอร์ฟต้มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที แช่น้ำแข็งทันที แล้วจึงปั่นเหวี่ยงด้วยไมโครเซนตริฟิวก์ที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใส ใส่หลอดเอฟเพนดอร์ฟที่สะอาด แล้วแยกโปรตีนด้วยเครื่องอิเล็ก-โตรโฟริซิสแนวตั้ง ใช้ตัวกลางเป็นเจลโพลีอะคริลาไมด์แบบไม่ต่อเนื่อง ประกอบด้วย stacking gel (4%) และส่วน separating gel (7.5%) (ดูรายละเอียดภาคผนวก ง) ดูดสารละลายส่วนใสที่สกัดและโปรตีนมาตรฐานมา 15 ไมโครลิตร ผสมกับ bromophenol blue 2 ไมโครลิตร หยอดใส่ร่องหวีบนแผ่นเจลที่เตรียมไว้ แยกโปรตีนในสารละลายอิเล็กโตรดบัฟเฟอร์ ภายใต้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที ย้อมสีโปรตีนในเจลโดยวิธี Coomassie brilliant blue R-250 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงล้างด้วยสารละลายล้างหลายๆ ครั้งจนเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนอย่างชัดเจน บันทึกผลทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของรูปแบบโปรตีน และไซโมแกรมของเอนไซม์ระหว่างแคลลัสทั้งสองประเภท

2. ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำ และเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส

เพาะเลี้ยงเมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัส ในอาหารจากวิธีการข้อ 1 ร่วมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน 6 ชนิด คือ

ชนิดที่ 1	2,4-D ความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ Kinetin 0.5 และ1.0 มิลลิกรัม/ลิตร
ชนิดที่ 2	2,4-D ความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ BA 0.5 และ1.0 มิลลิกรัม/ลิตร
ชนิดที่ 3	TDZ ความเข้มข้น 0.75 และ1.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ BA 0.5 และ1.0 มิลลิกรัม/ลิตร
ชนิดที่ 4	TDZ ความเข้มข้น 0.75 และ1.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ Kinetin 0.5 และ1.0 มิลลิกรัม/ลิตร
ชนิดที่ 5	TDZ ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร
ชนิดที่ 6	TDZ ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และ 2,4-D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม/ลิตร

อาหารแต่ละชนิดเติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และไฟตาเจล 0.17 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH 5.7 เพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส บันทึกผลภายหลังการวางเลี้ยง 16 สัปดาห์ บันทึกขนาดของแคลลัสที่เพิ่มขึ้น และการเกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส และจำนวนยอด เปรียบเทียบกันในสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ละชนิด โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD ทำทรีตเมนต์ละ 5 ซ้ำ ๆ ละ 20 ชิ้นส่วน เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

3. ศึกษาการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสในอาหารเหลว

นำชิ้นส่วนของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสที่ชักนำได้จากการศึกษาที่ 2 ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MMS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ Kinetin ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ1.0 มิลลิกรัม/ลิตร หรือ BA ความเข้มข้น 0.5 และ1.0 มิลลิกรัม/ลิตร อาหารแต่ละชนิดเติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และปรับ pH 5.7 เพาะเลี้ยงในขวด 4 ออนซ์ บรรจุอาหาร 15 มิลลิลิตร วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วคงที่ 80 รอบ/นาที ที่ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ เป็นเวลา 14 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการย้ายเลี้ยงทุกสัปดาห์ เป็นเวลานาน 16 สัปดาห์ นับจำนวนเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส และชั่งน้ำหนักแคลลัสเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD โดยทำทรีตเมนต์ละ 5 ซ้ำ ๆ ละ 10 ชิ้นส่วน เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

4. ศึกษาการงอกของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส

นำเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA หรือ NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และปรับ pH 5.7 เพาะเลี้ยงในขวด 4 ออนซ์ บรรจุอาหาร 15 มิลลิลิตร วางเลี้ยงที่ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกจำนวนราก ความยาวของราก จำนวนใบ ความยาวใบ และการเกิดคลอโรซีส เปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD ทำทรีตเมนต์ละ 5 ซ้ำ ๆ ละ 10 ชิ้นส่วน ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

5. ศึกษาชนิดของวุ้นที่มีผลต่อการงอกของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส

นำเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MMS เติม TDZ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ BA 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และปรับ pH 5.7 โดยใช้วุ้นต่างชนิดกัน ดังนี้

ชนิดที่ 1 Agar-Agar 0.75%

ชนิดที่ 2 Phytagel 0.18%

ชนิดที่ 3 Agarose 0.75%

ชนิดที่ 4 Bacto agar 0.75%

เพาะเลี้ยงในขวด 4 ออนซ์ บรรจุอาหาร 15 มิลลิลิตร โดยวางเลี้ยงที่ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมง/วัน ที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์ เป็นเวลานาน 16 สัปดาห์ บันทึกผลโดยตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การงอก และจำนวนยอดเปรียบเทียบกันในวุ้นแต่ละชนิดที่ทำการทดสอบ โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD ทำทรีตเมนต์ละ 5 ซ้ำ ๆ ละ 10 ชิ้นส่วน เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

6. ศึกษาผลของระยะเวลาในการย้ายเลี้ยงต่อเปอร์เซ็นต์ความงอก และลักษณะผิดปกติ

นำเมอริสเต็มมาติกโนดูลาแคลลัสวางเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MMS เติม TDZ ร่วมกับ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และไฟตาเจล 0.17 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH 5.7 เพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส ลักษณะความผิดปกติทางสัณฐานของต้นที่พัฒนา หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1, 3, 6, 9, 12, 15 และ 18 เดือน ตรวจสอบลักษณะผิดปกติด้วยเทคนิคไอโซไซม์

6.1 การตรวจสอบเอนไซม์โดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

เก็บตัวอย่างใบของต้นหน้าวัวที่มีลักษณะใบเรียวผิดปกติ และใบจากต้นที่ปกติ มาบดกับบัฟเฟอร์สำหรับสกัดเอนไซม์ ปริมาตร 5 เท่าของน้ำหนักใบพืช ตามวิธีการในข้อ 1.2 บันทึกผลความแตกต่างของไซโมแกรม

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

การศึกษานี้ใช้ต้นหน้าวัวสายพันธุ์สุลต่าน เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MMS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ใช้ชิ้นส่วนของใบ และข้อ เพาะเลี้ยงในอาหารโดยตรง และใช้ชิ้นส่วนเหล่านี้ในการศึกษาชักนำการเกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสต่อไป

1.2. สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง

อาหารที่ใช้ในการศึกษาเพาะเลี้ยงหน้าวัวเป็นอาหารสูตร MS, ½ MMS, MMS, WPM, LS และ VW โดยที่อาหารสูตร MMS เป็นอาหารที่ดัดแปลงจากสูตร MS ปกติ คือมีการลดองค์ประกอบของธาตุอาหารหลักบางตัวลงครึ่งหนึ่งจากสูตรเดิมเหลือความเข้มข้น ดังนี้ NH_4NO_3 825 มิลลิกรัม/ลิตร, KNO_3 950 มิลลิกรัม/ลิตร และ KH_2PO_3 85 มิลลิกรัม/ลิตร และยังลดความเข้มข้นของ $FeSO_47H_2O$ เป็น 13.9 มิลลิกรัม/ลิตร และ Na_2EDTA 18.65 มิลลิกรัม/ลิตร และมีการเติมอะดีนีนซัลเฟตความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ปรับ pH 5.7 แล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.05 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที

1.3 โปรตีนมาตรฐาน

- LMW Electrophoresis calibration kit บริษัท Pharmacia Biotech
- HMW-SDS Calibration kit บริษัท Pharmacia Biotech

1.4 สารเคมี

1.4.1 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารสูตร MS, ½ MMS, MMS, WPM, LS และ VW (รายละเอียดองค์ประกอบแสดงในภาคผนวก ก)
- สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 2,4-D และสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน TDZ BA และ KN
- อะดีนีนซัลเฟต
- Agar-Agar (ห้างหุ้นส่วนจำกัด พัฒนาสินเอ็นเตอร์ไพรส์)
- Phytagel (บริษัท Sigma)
- Agarose (บริษัท Sigma ชนิด II-A; medium EEO)
- Bacto agar (บริษัท Difco)
- น้ำตาลซูโครส

1.4.2 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบเอนไซม์ และโปรตีน

- สารเคมีที่ใช้สกัดเอนไซม์ และโปรตีน ประกอบด้วย Tris-HCl, Na_2EDTA, SDS, glycerol, 2-Mercapthoethanol และ bromophenol blue
- สารเคมีสำหรับการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส และ SDS-PAGE ประกอบด้วย Tris-HCl, glycine, acrylamide gel, N,N,N′,N′-tetramethyl ethylenediamine (TEMED), ammonium persulfate (APS) และ SDS
- สารเคมีสำหรับสีย้อมเอนไซม์ระบบเอสเตอเรส ประกอบด้วย Phosphate buffer (monobasic sodium phosphate และ dibasic sodium phosphate), Fast blue B Salt และ α-Napthyl acetate ระบบเปอร์ออกซิเดส ประกอบด้วย 3-Amino-9-ethylcarbazole, β –Napthol, acetone, Tris-HCl, acetic acid, hydrogen peroxide (H_2O_2) ระบบมาเลทดีไฮโดรจีเนส ประกอบด้วย Tris-HCl, DL-Malate, β-Nicotinamide adenine dinucleotide Monohydrate (NAD^+), N-methylphenszonium methyl sulfate (PMS), Methyhthiazolydiphenyl tetrazolium bromide (MTT)

ระบบแอซิดฟอสฟาเทส ประกอบด้วย Na acetate, $MgCl_2.6H_2O$, Fast garnet GBC salt และ α-Napthyl acid phosphate

- สารเคมีสำหรับสีย้อมโปรตีนในเจล และสารเคมีสำหรับสารละลายล้าง ประกอบด้วย Coomassie brilliant blue R-250, methanol และ acetic acid

1.4.3 สารเคมีที่ใช้ศึกษาเนื้อเยื่อวิทยา

- สารเคมีสำหรับวิธีพาราฟิน ประกอบด้วย ethyl alcohol, butyl alcohol, acetic acid, formalin, parafin oil, plain knox gelatin, glycerin และ plenol crystal
- สารเคมีสำหรับการย้อมสี ประกอบด้วย safranin o, methyl cellosolve, ethyl alcohol, sodium acetate, formalin, methyl cellosolve, absolute alcohol, clove oil, xylene, clove oil, Canada balsam

2. อุปกรณ์การทดลอง

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- อุปกรณ์ในการเตรียมอาหาร ประกอบด้วย เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง หม้อนึ่งความดันไอ ตู้อบไมโครเวฟ เครื่องคนอัตโนมัติ และแท่งแม่เหล็ก
- อุปกรณ์ในการย้ายเลี้ยง ประกอบด้วย ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เครื่องเขย่าเลี้ยง ปากคีบ กระดาษชำระ ด้ามมีด และใบมีดผ่าตัด
- เครื่องแก้ว ประกอบด้วย ปิเปต กระบอกตวง ขวดปรับปริมาตร บีกเกอร์ ฟลาสก์ จานเพาะเลี้ยง และขวดเพาะเลี้ยง

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบเอนไซม์ และโปรตีน

- อุปกรณ์สำหรับสกัดเอนไซม์ และโปรตีน ประกอบด้วย โกร่ง หลอดเอฟเพนดอร์ฟ และเครื่องเซนตริฟิวก์
- เครื่องอิเล็กโตรโฟริซิสแนวตั้ง และเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ศึกษาเนื้อเยื่อวิทยา

- เครื่องตัดล้อหมุน
- เครื่องอุ่นสไลด์
- ตู้อบ
- กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ
- กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เต็ด
- กล้องถ่ายรูป
- อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ กระดาษฟอยล์ พู่กัน เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์ กระจกปิดสไลด์ และแท่นพลาสติกสำหรับยึดแท่งพาราฟิน