บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. วัสดุ

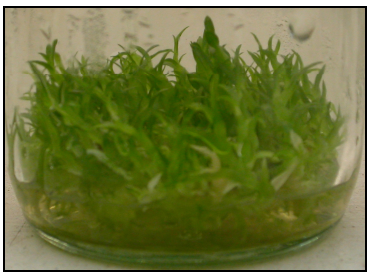
1.1 วัสดุพืช

1.1.1 การเตรียมใบและรากกล้วยไม้เหลืองจันทบูร

ในการศึกษานี้ใช้ต้นกล้ากล้วยไม้เหลืองจันทบูรจากหลอดทดลองบนอาหารสูตร MS free (อาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรดด่าง 5.7 เติมผงวุ้นไฟตาเจล 0.17 เปอร์เซ็นต์) วางเลี้ยงในที่มีแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,900-2,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส ขั้นตอนการเตรียมแสดงในภาพที่ 2 นำใบและรากที่มีอายุ 4 สัปดาห์ มาทำการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ส่วนการชักนำโปรโตคอร์มใช้ชิ้นส่วนปลายยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงในที่มีแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,900-2,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 เดือน จึงนำมาย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม เป็นระยะเวลา 3 เดือน จึงนำมาทำการแยกโปรโตพลาสต์ ขั้นตอนการเตรียมแสดงในภาพที่ 3

1.1.2 การเตรียมต้นยาสูบ *Nicotiana bentamiana*

ต้นยาสูบที่ใช้แยกโปรโตพลาสต์เพื่อทำเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ได้จากการเพาะเมล็ดบนอาหารสูตร MS free (อาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรดด่าง 5.7 เติมผงวุ้น Agar 0.75 เปอร์เซ็นต์) หลังจากเมล็ดงอกจึงย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม ทำการตัดข้อย้ายเลี้ยงทุก 2 สัปดาห์ ขั้นตอนการเตรียมแสดงในภาพที่ 4 จึงใช้ชิ้นส่วนใบมาทำการแยกโปรโตพลาสต์



ต้นกล้ากล้วยไม้เหลืองจันทบูร

ย้ายเลี้ยง ↓

MS + 3% sucrose + pH 5.7 + 0.17% phytagel

แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน | อุณหภูมิ 26±4 °C

1,900-2,000 ลักซ์ ↓

ใบและรากกล้วยไม้อายุ 4 สัปดาห์

ภาพที่ 2 ขั้นตอนการเตรียมชิ้นส่วนใบและรากกล้วยไม้เหลืองจันทบูรเพื่อแยกโปรโตพลาสต์

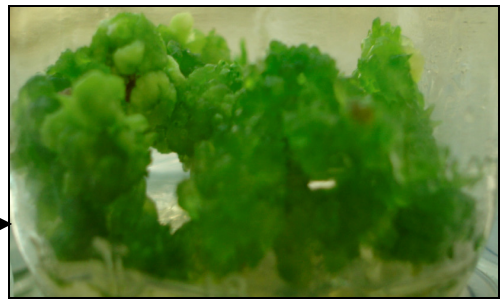
ต้นกล้ากล้วยไม้เหลืองจันทบูร

ย้ายเลี้ยง ↓ ปลายยอด

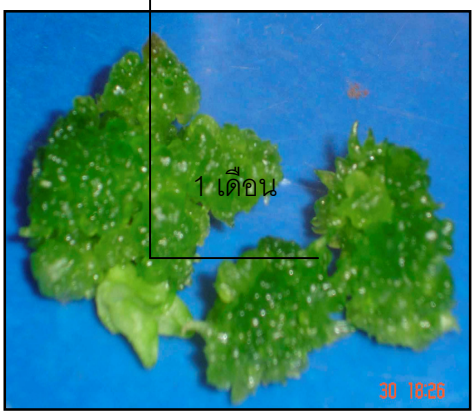
MS + 3% sucrose + 1.0 mg/l 2,4-D + 2.0 mg/l TDZ + pH 5.7 + 0.17% phytagel

แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ↓ อุณหภูมิ 26±4 °C

1,900-2,000 ลักซ์



เป็นระยะเวลา 3 เดือน



โปรโตคอร์มกล้วยไม้อายุ 4 สัปดาห์

ภาพที่ 3 ขั้นตอนการเตรียมชิ้นส่วนโปรโตคอร์มกล้วยไม้เหลืองจันทบูรเพื่อแยกโปรโตพลาสต์

เพาะเมล็ดยาสูบ

แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ↓ อุณหภูมิ 28±0.5 °C

MS free (MS + 3% sucrose + pH 5.7 + 0.75% Agar)

ตัดข้อย้ายเลี้ยง ↓ ทุก 2 สัปดาห์

MS free (MS + 3% sucrose + pH 5.7 + 0.75% Agar)

แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ↓ อุณหภูมิ 28±0.5 °C

ใบยาสูบอายุ 2 สัปดาห์

ภาพที่ 4 ขั้นตอนการเตรียมชิ้นส่วนใบยาสูบเพื่อแยกโปรโตพลาสต์

1.1.3 การเตรียมโปรโตพลาสต์ยาสูบ

โปรโตพลาสต์ยาสูบได้จากการอินคูเบทใบในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ละลายในแมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ ปรับระดับความเป็นกรดด่างของสารละลายเอนไซม์เป็น 5.7 อินคูเบทเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที นำมาแยกโปรโตพลาสต์และปรับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์เป็น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ก่อนนำมาเป็นเซลล์พี่เลี้ยง

1.1.4 การเตรียมเซลล์ซัสเพนชั่นยาสูบ

นำแคลลัสยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แมนนิทอล 0.45 โมลาร์ ปรับความเป็นกรดด่าง 5.7 เป็นระยะเวลา 3 เดือน ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS free ย้ายเลี้ยงทุกเดือน เป็นระยะเวลา 3 เดือน จึงนำแคลลัสมาชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าเลี้ยงด้วยความเร็ว 50 รอบต่อนาทีย้ายเลี้ยงทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ ขั้นตอนการเตรียมแสดงในภาพที่ 5 หลังจากย้ายเลี้ยง 3 วัน กรองด้วยผ้ามิราคลอทขนาด 77 ไมโครเมตร นำเซลล์ขนาดเล็กด้านล่างมาทำเป็นเซลล์พี่เลี้ยง

1.1.5 การเตรียมเซลล์ซัสเพนชั่นกุหลาบมอญ *Rosa damascene* Mill.

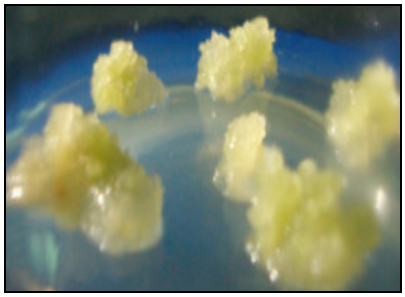
นำแคลลัสกุหลาบมอญที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS [(Linsmaier & Skoog) ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรดด่าง 5.2 เติมผงวุ้น Agar 0.75 เปอร์เซ็นต์ (อัญจนา, 2547) เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์] นำมาชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารเหลวสูตร LS ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารดังกล่าวเติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรดด่าง 5.7 และทำการย้ายเลี้ยงทุกสัปดาห์เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ ขั้นตอนการเตรียมแสดงในภาพที่ 6 หลังจากย้ายเลี้ยง 3 วัน กรองเซลล์ด้วยผ้ามิราคลอทขนาด 77 ไมโครเมตร นำเซลล์ขนาดเล็กด้านล่างมาทำเป็นเซลล์พี่เลี้ยง

โปรโตพลาสต์ ($5x10^5$ ต่อมิลลิลิตร)

แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ↓ อุณหภูมิ 28±0.5 °C

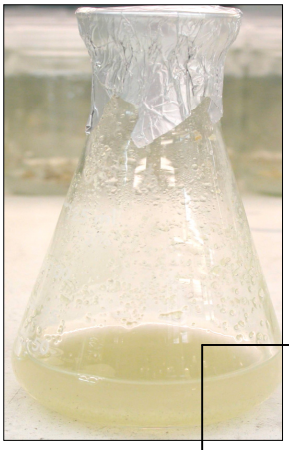
MS + 3% sucrose + 3.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l BA + pH 5.7

3 เดือน ↓ ย้ายเลี้ยง



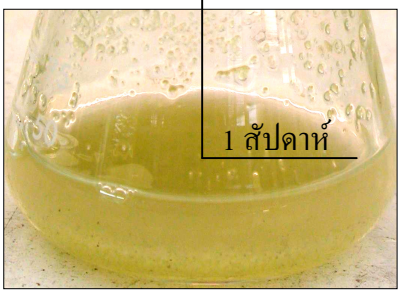
MS free (MS + 3% sucrose + pH 5.7 + 0.75% Agar)

3 เดือน ↓



MS + 3% sucrose + 3.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l BA + pH 5.7

↓ เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์

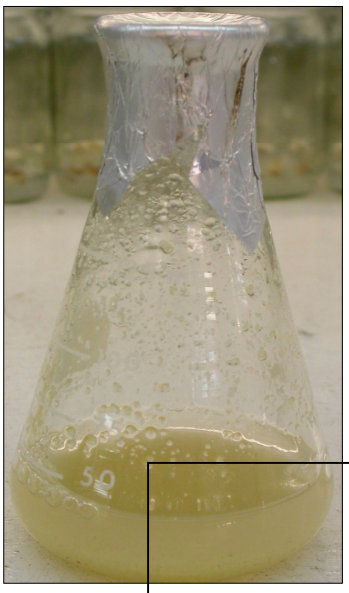


เซลล์ซัสเพนชั่นของยาสูบอายุ 3 วัน

ภาพที่ 5 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ซัสเพนชั่นของยาสูบเพื่อแยกโปรโตพลาสต์

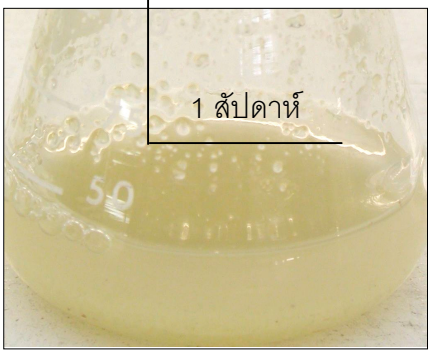
แคลลัสกุหลาบมอญ

แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ↓ อุณหภูมิ 28±0.5 °C



LS + 3% sucrose + 1.0 mg/l dicamba +0.4 mg/l BA + pH 5.7

↓ เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์



เซลล์ซัสเพนชั่นอายุ 3 วัน

ภาพที่ 6 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ซัสเพนชั่นของกุหลาบมอญเพื่อแยกโปรโตพลาสต์

1.1.6 การเตรียมโปรโตพลาสต์กุหลาบมอญ

โปรโตพลาสต์กุหลาบมอญที่ใช้ทำเป็นเซลล์พี่เลี้ยง โดยแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นกุหลาบมอญที่ชักนำในข้อ 1.1.5 อินคูเบทเซลล์ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และเปคโตไลเอสวาย-23 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ละลายในแมนนิทอล เข้มข้น 0.65 โมลาร์ ปรับระดับความเป็นกรดด่างของสารละลายเอนไซม์เป็น 5.7 อินคูเบทข้ามคืนที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที บนเครื่องเขย่าแบบไปมานำมาแยกโปรโตพลาสต์ และปรับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์เป็น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ก่อนทำเป็นเซลล์พี่เลี้ยง

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- สารเคมีที่ใช้เตรียมธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรองของอาหารสูตร MS, VW และ LS (รายละเอียดของสูตรอาหารแสดงในตารางภาคผนวก)
- น้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรุคโตส วุ้นไฟตาเจล อากาโรส และ Agar
- สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA, BA, 2,4-D, dicamba, TDZ และ KN
- เอนไซม์ที่ใช้แยกโปรโตพลาสต์ คือ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 มาเซอโรไซม์อาร์-10 (Yakult Honsha Co. Ltd.) เซลลูเลส (จากเชื้อ *Trichoderma viride* ; Sigma) เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส (Yakult Honsha Co. Ltd.) และเปคโตไลเอสวาย- 23
- แมนนิทอล และซอร์บิทอล
- เอทธานอล 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
- สารเคมีบัฟเฟอร์ 2 (N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES)
- สารเคมีตรวจสอบความมีชีวิต คือ fluorescein diacetate (FDA)

2. อุปกรณ์การทดลอง

- เครื่องแก้วประกอบด้วย ปิเปต ฟลาสก์ กระบอกตวง ขวดปรับปริมาตร บีกเกอร์ จานเพาะเลี้ยงแก้วขนาด 6 และ 14 เซนติเมตร
- อุปกรณ์ในการย้ายเลี้ยงประกอบด้วย ปากคีบ ด้ามมีด และใบมีด

ผ่าตัด กระดาษชำระ พาราฟิล์ม และตู้ย้ายเลี้ยง

- อุปกรณ์ในการแยกโปรโตพลาสต์ ประกอบด้วยกรรไกรพร้อมใบมีดโกนเครื่องเขย่าแบบไปมา ผ้ากรองมิราคลอท ขนาด 77 ไมโครเมตร มิลลิพอร์ พาสเจอร์ปิเปต ลูกยางสำหรับดูด หลอดเซนตริฟิวก์ขนาด 15 มิลลิลิตร เครื่องเซนตริฟิวส์ สไลด์หลุมและกระจกปิดสไลด์ ฮีมาไซโตมิเตอร์ กล้องจุลทรรศน์อินเวอร์เต็ด และฟลูออเรสเซนส์ พร้อมชุดบันทึกภาพ
- อุปกรณ์ในการเตรียมอาหารประกอบด้วย เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องวัดระดับความเป็นกรด-ด่าง ไมโครไปเปต ตู้อบไมโครเวฟ หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ตู้เย็น ตู้อบแห้ง และอบฆ่าเชื้อ ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส
- เครื่องเขย่าเลี้ยง

วิธีการศึกษา

1. วิธีการแยกโปรโตพลาสต์

1.1 การศึกษาผลของชนิดละความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูร

ในการศึกษานี้ใช้ใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูรอายุ 4 สัปดาห์ โดยใช้ใบคู่ที่ 2 และ 3 นับจากยอด จากหลอดทดลองในสภาพปลอดเชื้อ นำใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูรมาหั่นฝอยจำนวน 1 กรัม จุ่มแช่ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 เข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับเอนไซม์มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ MES เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ซึ่งละลายในแมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 5.7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองมิลลิพอร์ขนาดช่อง 0.22 ไมโครเมตร ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว อินคูเบทชิ้นส่วนใบในจานเพาะเลี้ยงขนาด 15x60 มิลลิเมตร พันด้วยพาราฟิล์ม อินคูเบทบนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง จึงนำไปกรองด้วยผ้ากรองมิราคลอทฆ่าเชื้อขนาดช่อง 77 ไมโครเมตร ซึ่งวางในกรวยพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร ผ่านไปยังหลอดปั่นขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 800 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ดูดเก็บเอนไซม์ และล้างตะกอนโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายล้าง (สารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ เติมธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองสูตร MS ปรับความเป็นกรดด่าง 5.7) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร 2 ครั้ง จากนั้นใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดเป่าให้เข้ากัน แล้วลอยบนสารละลายซูโครส เข้มข้น 21 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อแยกโปรโตพลาสต์จากตะกอนเซลล์นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 1000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดเก็บโปรโตพลาสต์จากตอนกลางระหว่างสารละลายล้างและซูโครส แล้วล้างด้วยสารละลายล้าง 2 ครั้ง ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ โดยหยดเซลล์ชัสเพนชั่นของโปรโตพลาสต์บนฮีมาไซโตมิเตอร์นับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และตรวจสอบความมีชีวิตโดยใช้สารละลายล้างโปรโตพลาสต์ 100 ไมโครลิตร ย้อม FDA เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรเท่ากัน 100 ไมโครลิตร ดูดเป่าให้เข้ากันในสไลด์หลุมทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาที ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ดูการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนส์ที่ช่วงความยาวคลื่น 300-400 นาโนเมตร ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เรืองแสงสีเขียว-เหลืองต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของเอนไซม์ที่

ทดสอบ โดยใช้แผนการทดลองแบบ Completely ramdomized design (CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's mutiple range test (DMRT)

1.1.1 หาจำนวนโปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร โดยหยดสารละลายโปรโตพลาสต์ลงบนเครื่องตรวจนับ (hemacytometer) ทิ้งไว้ 2-3 นาที จึงนำมานับจำนวนโปรโตพลาสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วนำมาคำนวณเป็นจำนวนโปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรและจำนวนโปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ดังนี้

จำนวนโปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร $= \mu \times 10^4$

μ = จำนวนโปรโตพลาสต์ที่นับได้บนฮีมาไซโตมิเตอร์

1.1.2 หาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ โดยหยดสารละลายโปรโตพลาสต์ผสมกับสารละลาย FDA ในอัตราส่วนที่เท่ากันทิ้งไว้ 15 นาที จึงตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เรืองแสงสีเขียว-เหลือง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซ็นต์ แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เรืองแสง}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

1.2 การศึกษาผลของแหล่งชิ้นส่วนพืชต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพาสต์

ในการศึกษานี้ใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นในการแยกโปรโตพลาสต์จาก 3 แหล่ง คือ ใบ ราก และโปรโตคอร์ม ดังนี้คือ

ใบ : ใช้ใบอายุ 4 สัปดาห์ โดยใช้ใบคู่ที่ 2 และ 3 จากหลอดทดลองในสภาพปลอดเชื้อ จุ่มแช่ใบที่หั่นฝอยจำนวน 1 กรัม ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ MES เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ละลายในแมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ ปรับความเป็นกรดด่างของเอนไซม์เป็น 5.7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร อินคูเบทเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส

ราก : ใช้รากจากต้นกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อที่ได้จากการวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตอายุ 4 สัปดาห์ จุ่มแช่รากที่หั่นฝอยจำนวน 1

กรัม แช่ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ MES เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ละลายในแมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ ปรับความเป็นกรดด่างของเอนไซม์เป็น 5.7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร อินคูเบทเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส

โปรโตคอร์ม : ใช้ชิ้นส่วนโปรโตคอร์มจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงในที่มีแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,900-2,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลลเซียส ย้ายเลี้ยงทุกเดือนเป็นระยะเวลา 3 เดือน จึงนำโปรโตคอร์มที่มีอายุ 4 สัปดาห์ จุ่มแช่ชิ้นส่วนโปรโตคอร์มที่หั่นฝอยแล้วจนมีขนาดเล็กจำนวน 1 กรัม แช่ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ MES เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ละลายในแมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ ปรับความเป็นกรดด่างของเอนไซม์เป็น 5.7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร อินคูเบทเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส

เมื่ออินคูเบทครบตามเวลาที่กำหนด ทำการแยกโปรโพลาสต์ด้วยวิธีการในข้อที่ 1 ตรวจนับจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบ ราก และโปรโตคอร์ม เปรียบเทียบกันในแต่ละชิ้นส่วนที่ทำการแยกโปรโตพลาสต์ โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบ เทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

1.3 การศึกษาผลของอายุใบต่อจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้ใช้ใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูรอายุ 1, 2, 3, 4 และ 5 สัปดาห์ โดยใช้ใบคู่ที่ 2 และ 3 จากหลอดทดลองในสภาพปลอดเชื้อ จุ่มแช่ใบที่หั่นฝอยจำนวน 1 กรัม ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์ -10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ MES เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ละลายในแมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ ปรับความเป็นกรดด่างของเอนไซม์เป็น 5.7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร อินคูเบทเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส นำไปแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการในข้อที่ 1 ตรวจนับจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ เปรียบเทียบชิ้นส่วนใบในแต่ละสัปดาห์ที่ทำการแยกโปรโตพลาสต์ โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

1.4 การศึกษาผลของเวลาการอินคูเบทต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้ใช้ระยะเวลาในการอินคูเบท 4, 5 และ 6 ชั่วโมง ใช้ใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูรอายุ 4 สัปดาห์ โดยใช้ใบคู่ที่ 2 และ 3 จากหลอดทดลองในสภาพปลอดเชื้อ จุ่มแช่ใบที่หั่นฝอยจำนวน 1 กรัม ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ MES เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ละลายในแมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ ปรับความเป็นกรดด่างของเอนไซม์เป็น 5.7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร อินคูเบทเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส นำไปแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการในข้อที่ 1 ตรวจนับจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ เปรียบเทียบกันในแต่ละเวลาการอินคูเบทที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

1.5 การศึกษาผลของระดับความเป็นกรด-ด่างต่อจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้ใช้ชิ้นส่วนใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูรอายุ 4 สัปดาห์ โดยใช้ใบคู่ที่ 2 และ 3 จากหลอดทดลองในสภาพปลอดเชื้อ จุ่มแช่ใบที่หั่นฝอยจำนวน 1 กรัม ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ MES เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ละลายในแมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 5.5, 5.6, 5.7, 5.8 และ 5.9 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร อินคูเบทเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส นำไปแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการในข้อที่ 1 ตรวจนับจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ เปรียบเทียบกันในแต่ละระดับความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเอนไซม์ ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

1.6 การศึกษาผลของออสโมติคัมต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้ใช้ชิ้นส่วนใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูรอายุ 4 สัปดาห์ โดยใช้ใบคู่ที่ 2 และ 3 จากหลอดทดลองในสภาพปลอดเชื้อ จุ่มแช่ใบที่หั่นฝอยจำนวน 1 กรัม ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ MES เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ปรับความดันออสโมติกของสารละลายเอนไซม์

โดยใช้แมนนิทอล ซอร์บิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ และซอร์บิทอลร่วมกับแมนนิทอล เข้มข้นชนิดละ 0.225 โมลาร์ ปรับความเป็นกรดด่างของสารละลายเอนไซม์เป็น 5.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร อินคูเบทเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26±4 องศาเซลเซียส นำไปแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการในข้อที่ 1 ตรวจนับจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ เปรียบเทียบออสโมติคัมที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

2. วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

2.1 การศึกษาผลของความหนาแน่นในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบกล้วยไม้ที่มีอายุ 4 สัปดาห์ ปรับความหนาแน่นที่ใช้ในการเลี้ยงเป็น 5 ระดับ คือ $5x10^4$, $1 x10^5$, $5 x10^5$, $1 x10^6$ และ $5 x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร แล้วเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิดด้วยพาราฟิล์ม วางเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28±0.5 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการแบ่งเซลล์หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์และการแตกหน่อ เปรียบเทียบกันในแต่ละความหนาแน่นที่ทำการเพาะเลี้ยง โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

2.2 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบกล้วยไม้ที่มีอายุ 4 สัปดาห์ ปรับความหนาแน่นเริ่มต้นเป็น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิดด้วยพาราฟิล์ม วางเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28±0.5 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการแบ่งเซลล์หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ และการแตกหน่อเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต และทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA, KN และ TDZ ความเข้มข้นชนิดละ 1 มิลลิกรัมต่อ

ลิตร ทุกชนิดใช้ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับระดับความเป็นกรดด่าง 5.7 ปิดด้วยพาราฟิล์ม วางเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28±0.5 องศาเซลเซียส หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ ตรวจสอบพัฒนาการในการแบ่งเซลล์ โดยกำหนดให้การแบ่งเซลล์ในช่วง 2-50 เซลล์ เป็น ไมโครโคโลนี และกำหนดให้การแบ่งเซลล์ที่มากกว่า 50 เซลล์ เป็นมาโครโคโลนี โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

2.3 การศึกษาผลของชนิดของน้ำตาลต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบกล้วยไม้ที่มีอายุ 4 สัปดาห์ ปรับความหนาแน่นเริ่มต้นเป็น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคสร่วมกับฟรุคโตส ความเข้มข้นชนิดละ 1.5 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอลหรือซอร์บิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิดด้วยพาราฟิล์ม วางเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28±0.5 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการแบ่งเซลล์หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์และการแตกหน่อ เปรียบเทียบกันในแต่ชนิดของน้ำตาล โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

2.4 การศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบกล้วยไม้ที่มีอายุ 4 สัปดาห์ ปรับความหนาแน่นเริ่มต้นเป็น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS, VW และ VW ที่เติมธาตุอาหารรองของสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง (VW+1/2MS) เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งที่เติมและไม่เติมน้ำมะพร้าว ปิดด้วยพาราฟิล์ม วางเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28±0.5 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการแบ่งเซลล์หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์และการแตกหน่อ เปรียบเทียบกันในแต่สูตรอาหารทั้งที่เติมและไม่เติมน้ำมะพร้าว โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

2.5 การศึกษาวิธีการเลี้ยงต่อการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้แบ่งวิธีการเลี้ยงเป็น 5 วิธีการ ดังนี้คือ

ก. การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (culturing in liquid media)

ข. การเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง (culturing in solid media)

ค. การเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (culturing in semisolid media)

ง. การเพาะเลี้ยงแบบบีดหรือดิสค์ (bead or disc culture)

จ. การเพาะเลี้ยงแบบเทคนิคฟีดเดอร์ (feeder layer technique)

ก. การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว โดยแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้ที่มีอายุ 4 สัปดาห์ ปรับความหนาแน่นเริ่มต้นเป็น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 7ก) ปิดด้วยพาราฟิล์ม

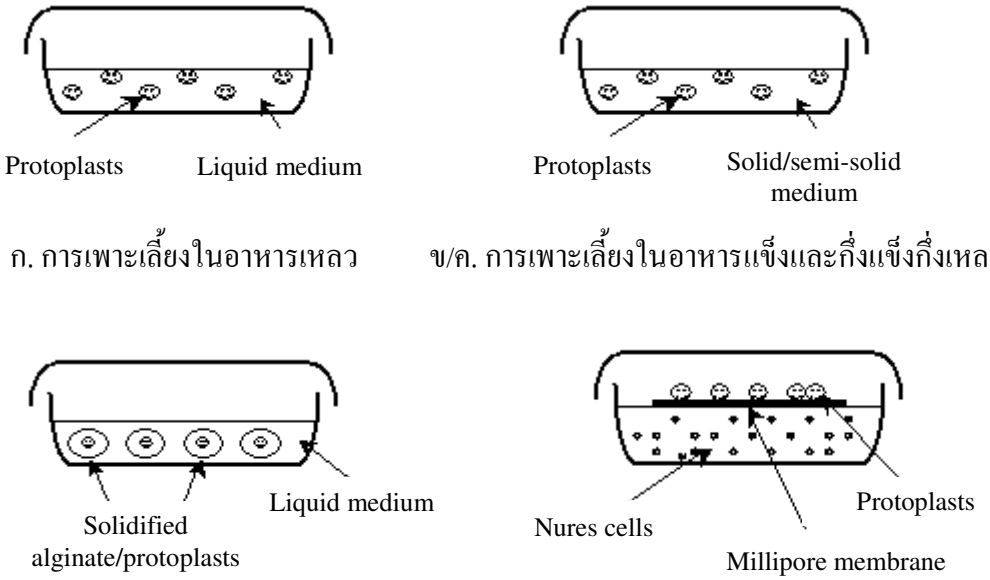
ข. การเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง โดยแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้ที่มีอายุ 4 สัปดาห์ ปรับความหนาแน่นเริ่มต้นเป็น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมวุ้นอากาโรส เข้มข้น 0.65 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 7ข) ปิดด้วยพาราฟิล์ม

ค. การเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้ที่มีอายุ 4 สัปดาห์ ปรับความหนาแน่นเริ่มต้นเป็น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมวุ้นไฟตาเจล เข้มข้น 0.17 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 7ค) ปิดด้วยพาราฟิล์ม

ง. การเพาะเลี้ยงแบบบีดหรือดิสค์ โดยแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้ที่มีอายุ 4 สัปดาห์ ปรับความหนาแน่นเริ่มต้นเป็น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมวุ้น

อากาโรส เข้มข้น 0.65 เปอร์เซ็นต์ และไฟตาเจล เข้มข้น 0.17 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงในจานๆ ละ 10 เม็ด แล้วจึงเติมและไม่เติมอาหารเหลวสูตร MS free (อาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรดด่าง 5.7) (ภาพที่ 7ง) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปิดด้วยพาราฟิล์ม

จ. การเพาะเลี้ยงแบบเทคนิคฟีดเดอร์ โดยแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยไม้ที่มีอายุ 4 สัปดาห์ ปรับความหนาแน่นเริ่มต้นเป็น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร วางเลี้ยงบนโปรโตพลาสต์และเซลล์ซัสเพนชั่นของยาสูบและกุหลาบมอญเปรียบเทียบกัน วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมวุ้นอากาโรส เข้มข้น 0.65 เปอร์เซ็นต์ และไฟตาเจล เข้มข้น 0.17 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 7จ) ปิดด้วยพาราฟิล์ม



ก. การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ข/ค. การเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งและกึ่งแข็งกึ่งเหลว

ง. การเพาะเลี้ยงแบบบีดหรือดีสค์ จ. การเพาะเลี้ยงแบบเทคนิคฟีดเดอร์

ภาพที่ 7 เทคนิคการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการแบบต่างๆ

แต่ละวิธีเพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28±0.5 องศาเซลเซียส ตรวจผลการแบ่งเซลล์หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์และการแตกหน่อ เปรียบเทียบกันในแต่ละวิธีการเพาะเลี้ยง โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT