บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

1.1.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การทดลองนี้ใช้หน้าวัว 3 สายพันธุ์คือ พันธุ์เปลวเทียนภูเก็ต, วาเลนติโน และโซเน็ต (ภาพที่ 2) โดยพันธุ์เปลวเทียนภูเก็ตเป็นชิ้นส่วนจากภายนอกหลอดทดลองจึงต้องชักนำเป็นต้นภายในหลอดทดลองเสียก่อนเพื่อใช้ชิ้นส่วนจากต้นอ่อน โดยใช้ก้านใบอ่อน และใบอ่อน (อายุ 4 วัน หลังเกิดใบอ่อนของต้นภายนอกหลอดทดลอง) มาฟอกฆ่าเชื้อโดยแช่เอทธานอลความเข้มข้น 70% นาน 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง แล้วแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ เข้มข้น 20% นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ภายในตู้ย้ายเลี้ยง แล้วชักนำแคลลัสบนอาหารสูตร MMS เติม BA ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล นำแคลลัสที่ได้มาชักนำยอดบนอาหารสูตรชักนำยอดและต้นเช่นเดียวกับพันธุ์วาเลนติโนและโซเน็ต แล้วนำต้นอ่อนมาใช้ในการทดลอง

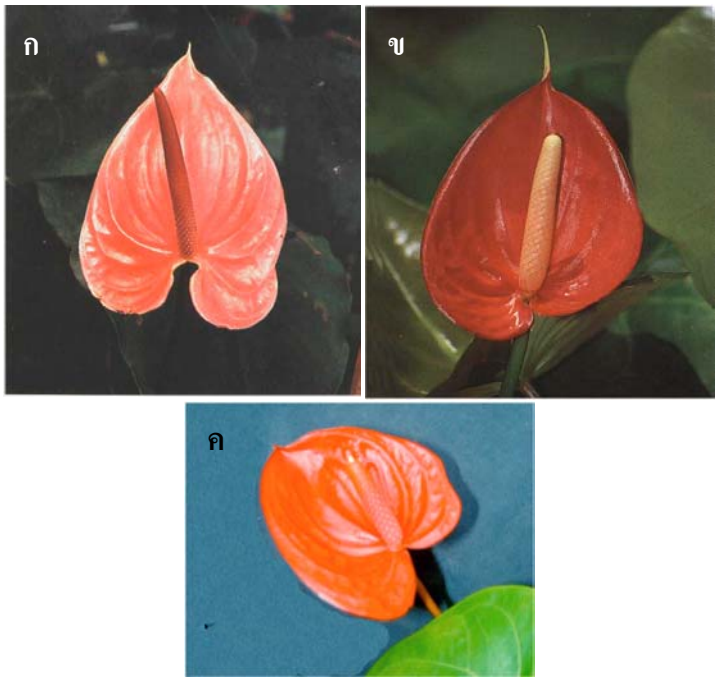
1.1.2 การชักนำการกลายพันธุ์

การศึกษานี้ใช้แคลลัสของหน้าวัวพันธุ์โซเน็ต ซึ่งได้จากการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบอายุ 10 สัปดาห์

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ตารางภาคผนวกที่ 1)
- สารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น TDZ, BA, Dicamba, Picloram, NAA และ 2, 4-D
- น้ำตาลซูโครส
- วุ้นตรานางเงือก
- สารละลายคลอร็อกซ์ 20 %



ภาพที่ 2 ลักษณะหน้าวัวที่ใช้ในการศึกษา (ก) พันธุ์โซเน็ต (ข) พันธุ์เปลวเทียนภูเก็ต (ค) พันธุ์วาเลนติโน

1.2.2 สารเคมีที่ใช้ชักนำการกลายพันธุ์และการตรวจสอบการกลายพันธุ์

- EMS
- สารเคมีที่ใช้สกัดเอนไซม์และการทำอิเล็คโตรโฟริซีส ประกอบด้วย Tris-HCl ค่า pH 8.6 และ 6.8 ความเข้มข้น 1.5 และ 0.5 โมลาร์ ตามลำดับ, PVP, 2-mercapthoethanol, Na_2EDTA, polyacrylamide gel (acrylamide เข้มข้น 30% และ bisacrylamide เข้มข้น 0.8%), N, N, N1, N1-tatramethylenediamine (TEMED), ammonium peroxydisulsulphate (APS) เข้มข้น 10% และ glycine
- สารเคมีย้อมสีเอนไซม์ 7 ระบบ (ตารางภาคผนวกที่ 2)

2 อุปกรณ์ในการทดลอง

- ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- เครื่องวัด pH
- เครื่องคนสารละลาย

- เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องอิเล็กโตรโฟริซิสแนวตั้งและเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- เครื่องเขย่าเลี้ยง
- ไมโครไปเปต
- หม้อนึ่งความดันไอ
- ตู้อบไมโครเวฟ
- ตู้อบแห้ง
- กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ
- กล้องถ่ายรูป
- ปากคีบ ใบมีดผ่าตัดพร้อมด้ามมีด
- เครื่องแก้ว และภาชนะพลาสติกต่างๆ เช่น ขวดปรับปริมาตร กระบอกตวง บิกเกอร์ ฟลาสก์ ไปเปต จานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

วิธีการ

1. การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.1 การศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการชักนำแคลลัส

ใช้ชิ้นส่วนข้อ (ประกอบด้วยตาและก้านใบ) และใบหน้าวัวพันธุ์โซเน็ตซึ่งเป็นวัสดุภายในหลอดทดลอง อายุ 2 สัปดาห์ ภายหลังการย้ายเลี้ยงในอาหารเพิ่มความแข็งแรงของต้น มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร 4 สูตรคือ MS, MMS, WPM และ NN แต่ละสูตรเติม BA และ TDZ ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล น้ำตาลซูโครส 3% วุ้น 0.75% และปรับ pH 5.7 เพาะเลี้ยงภายในขวด 4 ออนซ์ ซึ่งบรรจุอาหาร 15 มล โดยวางให้หลังใบสัมผัสอาหาร ภายใต้สภาพมืด อุณหภูมิ 26 $\pm$ 2 °ซ ชิ้นส่วนใบทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ชิ้นส่วน ชิ้นส่วนข้อทดลอง 2 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ชิ้นส่วน บันทึกการทดลองภายหลังจากเพาะเลี้ยงไปแล้ว 8 สัปดาห์ เปรียบเทียบอัตราการสร้างแคลลัสและชนิดของแคลลัสแต่ละทรีตเมนต์ (treatment)

1.2 การศึกษาผลของสายพันธุ์และชนิดของชิ้นส่วนต่อการชักนำแคลลัส

ใช้หน้าวัว 3 สายพันธุ์ (ปัจจัยที่ 1) คือ พันธุ์เปลวเทียนภูเก็ต, วาเลนติโน และโซเน็ต ภายในหลอดทดลองทั้ง 3 สายพันธุ์ ชิ้นส่วนที่ศึกษา 3 ชนิด (ปัจจัยที่ 2) คือ ใบ ปล้อง (ชิ้นส่วนระหว่างตา) และข้อ อายุ 2 สัปดาห์ ภายหลังการย้ายเลี้ยงในอาหารเพิ่มความแข็งแรงของต้น นำชิ้นส่วนดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MMS เติม BA ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล น้ำตาลซูโครส 3% และวุ้น 0.75% ระดับ pH 5.7 เพาะเลี้ยงในขวด 4 ออนซ์ บรรจุอาหาร 15 มล. แต่ละทรีตเมนต์ทำ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ชิ้นส่วน ภายหลังเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ ภายใต้สภาพมืด อุณหภูมิ 26 $\pm$ 2°ซ บันทึกอัตราการสร้างโนดูลาแคลลัส (nodular callus) และลักษณะแคลลัสเปรียบเทียบกันในแต่ละทรีตเมนต์จัดทรีตเมนต์แบบ 3x2 factorial ในแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) แต่ละทรีตเมนต์เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's multiple range test)

นอกจากนี้ยังศึกษาผลของการสร้างบาดแผลต่อการชักนำแคลลัสที่บริเวณใบของหน้าวัวทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยกรีดให้เป็นบาดแผลตามแนวขวางกับเส้นกลางใบ 1 รอย แต่ละทรีตเมนต์ทำ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ชิ้น ภายหลังเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ ในสภาพมืดที่อุณหภูมิ 26 $\pm$ 2°ซ บันทึกอัตราการสร้างแคลลัสในแต่ละทรีตเมนต์เปรียบเทียบกันในแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

1.3 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างแคลลัส

ใช้หน้าวัวพันธุ์วาเลนติโน โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ และข้อ (อายุ 2 สัปดาห์ ภายหลังการย้ายเลี้ยงในอาหารเพิ่มความแข็งแรงของต้น) บนอาหารสูตร MMS เติมน้ำตาลซูโครส 3% และวุ้น 0.75% สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ คือ BA หรือ TDZ ร่วมกับ NAA, dicamba, picloram และ 2, 4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 1 มก/ล ปรับ pH 5.7 เพาะเลี้ยงภายในขวด 4 ออนซ์ ซึ่งบรรจุอาหาร 15 มล. แต่ละทรีตเมนต์มี 5 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ชิ้นส่วน หลังเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ ในสภาพมืด อุณหภูมิ 26 $\pm$ 2 °ซ บันทึกอัตราการสร้างแคลลัส และลักษณะของแคลลัสแต่ละทรีตเมนต์

1.4 การศึกษาการชักนำยอดจากโนดูลาแคลลัสของหน้าวัว

ย้ายโนดูลาแคลลัสที่ได้จากพันธุ์วาเลนติโน (หั่นให้มีน้ำหนักเริ่มต้นเท่ากัน 1.5 ก) มาศึกษาการชักนำยอดโดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร 2 แบบ (ปัจจัยที่ 1) คืออาหารแข็งและอาหาร

เหลว สูตรอาหารที่ใช้คือ MMS เติมน้ำตาลซูโครส 3% ปรับ pH 5.7 ในอาหารแข็งเติมวุ้นตรานางเงือก 0.75% ซึ่งเพาะเลี้ยงในขวดขนาด 8 ออนซ์ ซึ่งบรรจุอาหาร 20 มล ส่วนอาหารเหลวไม่เติมวุ้นเพาะเลี้ยงใน ฟลาสก์ขนาด 125 มล ปริมาตร 25 มล นอกจากนี้ศึกษาสารเติมอื่นๆ (ปัจจัยที่ 2) ซึ่งประกอบด้วยทรีตเมนต์ดังนี้คือ

1). เคซีนไฮโดรไลเสท (caseinhydrolysate : CH) ความเข้มข้น 500 มก/ล

2). TDZ ความเข้มข้น 0.5 มก/ล และ BA ความเข้มข้น 0.5 มก/ล

3). NAA ความเข้มข้น 1 มก/ล และ BA ความเข้มข้น 1 มก/ล

4). TDZ ความเข้มข้น 0.5 มก/ล BA ความเข้มข้น 0.5 มก/ล และ CH ความเข้มข้น 500 มก/ล

5). NAA ความเข้มข้น 1 มก/ล BA ความเข้มข้น 1 มก/ล และ CH ความเข้มข้น 500 มก/ล

โดยแต่ละทรีตเมนต์ทำ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ชิ้นส่วน ภายหลังการเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 26 $\pm$ 2°ซ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ บันทึกจำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนใบ และลักษณะอื่นๆที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกันในแต่ละทรีตเมนต์ จัดหน่วยทดลองแบบ 2x5 factorial ในแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

2. การชักนำการกลายพันธุ์

2.1 ศึกษาผลของความเข้มข้น EMS และระยะเวลาจุ่มแช่ต่ออัตราการรอดชีวิตโนดูลาแคลลัส

ใช้โนดูลาแคลลัสของหน้าวัวพันธุ์โซเน็ตอายุ 5 วันหลังการย้ายเลี้ยงมาจุ่มแช่ด้วย EMS 5 ระดับความเข้มข้น คือ 0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.0% (ละลาย EMS ด้วยอาหารเหลวสูตร MMS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตบรรจุใน ฟลาสก์ๆ ละ 30 มล) จุ่มแช่นาน 60 และ 90 นาที ในแต่ละทรีตเมนต์ใช้โนดูลาแคลลัส 25 ชิ้น จุ่มแช่บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดกรองแยกโนดูลาแคลลัสออกจากสารละลาย EMS ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อหลายๆครั้ง ซับด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อจนแห้ง จึงนำโนดูลาแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำยอดสูตร MMS เติม BA และ TDZ ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล ภายหลังเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน จึงเริ่มบันทึกอัตราการรอดชีวิตและการสร้างยอดรวม ในแต่ละความเข้มข้นและระยะเวลา โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตรวจหาค่าความเข้มข้นของ EMS ที่ยับยั้งอัตรารอดชีวิตได้ 50% หรือ LD_{50} และในการเพาะเลี้ยงโนดูลาแคลลัส (M1) ที่ได้จากการจุ่มแช่ EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มาเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำยอด นาน 4

สัปดาห์ ได้ยอดในรุ่นที่ 1 (R1) ตัดยอดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำรากแล้วตรวจสอบความแปรผัน จากนั้นนำโนดูลาแคลลัสก้อนเดิมในแต่ละทรีตเมนต์ไปชักนำยอดใหม่จำนวน 5 รุ่น (R1- R5)

2.2 การตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของต้นที่ได้จากการจุ่มแช่ EMS

1) การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐาน

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานของต้นหน้าวัวที่ชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้ EMS ซึ่งนำมาชักนำรากบนอาหารสูตร 1/2MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต นาน 4 สัปดาห์ ในช่วงเวลาดังกล่าวสังเกตลักษณะทางสัณฐานของใบ เช่น สีและรูปร่างใบ จำนวน 5 รุ่น (M1R1- M1R5, M1: โนดูลาแคลลัสที่ชักนำการกลายพันธุ์ครั้งที่ 1 R5: ต้นหน้าวัวที่ชักนำได้จากโนดูลาแคลลัสผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ครั้งที่ 1รุ่นที่ 5)

2) การตรวจสอบโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

เก็บรวบรวมใบที่ 3-6 นับจากยอด ของหน้าวัวต้นที่ได้จากการชักนำยอดจากโนดูลาแคลลัส ในทุกทรีตเมนต์ที่จุ่มแช่ด้วย EMS จำนวน 5 รุ่น (M1R1- M1R5) มาบดร่วมกับบัฟเฟอร์สำหรับสกัดเอนไซม์ (extraction buffer) (ภาคผนวกที่ 1.1 ปริมาตร 30 เท่าของน้ำหนักพืช) ในโกร่งเย็นจนละเอียด จากนั้นจึงนำของเหลวที่ได้เทใส่เอฟเพนดอร์ฟแล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C ดูดสารละลายส่วนใส (supernatant) ส่วนบนออกใส่เอฟเพนดอร์ฟที่สะอาด แล้วนำมาแยกเอนไซม์ด้วยเครื่องอิเลคโตรโฟริซิสแนวตั้ง โดยใช้ตัวกลางหรือตัวค้ำจุนเป็นเจลโพลีอะคริลาไมด์ แบบไม่ต่อเนื่อง ซึ่งประกอบด้วย stacking gel และส่วน separating gel (ตารางภาคผนวกที่ 3) ดูดสารละลายส่วนใสที่สกัดจากตัวอย่างใบหน้าวัวมา 15 ไมโครลิตร ผสมกับ bromphenol blue 2 ไมโครลิตร หยอดใส่ร่องหวีบนแผ่นเจลที่เตรียมไว้ซึ่งแต่ละแผ่นเจลสามารถใส่ตัวอย่างได้ 10 ช่อง หรือ 10 ตัวอย่าง ทดลองพร้อมกันครั้งละ 2 แผ่น แล้วแยกเอนไซม์ในสารละลายอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวกที่ 1.2) ภายใต้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ (สุธีรา, 2545) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือสังเกตจากแถบของ bromphenol blue เคลื่อนที่มาถึงขอบล่างของเจลนำแผ่นเจลมาย้อมสีเพื่อตรวจสอบเอนไซม์ 7 ระบบ คือ

- ระบบเปอร์ออกซิเดส (peroxidase; PER)
- ระบบแอลฟาเอสเตอเรส (α-esterase; EST)
- ระบบแอซิดฟอสฟาเทส (acid phosphatase; ACP)

- ระบบแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase; ADH)
- ระบบแลคเตทดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase; LDH)
- ระบบมาเลทดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase; MDH)
- ระบบชิกิเมทดีไฮโดรจีเนส (shikimic dehydrogenase; SKD)

การย้อมสีเอนไซม์ข้างต้นทำในสภาพมืด บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 80 รอบต่อนาที รอจนเห็นไซโมแกรมชัดเจน คงที่ ไม่เปลี่ยนแปลงจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง เปรียบเทียบความแตกต่างของไซโมแกรมในแต่ละะความเข้มข้นของ EMS กับการไม่จุ่มแช่