บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

แคลลัสกุหลาบมอญที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 เดือน (ทำการย้ายเลี้ยงเดือนละครั้ง)

1.2 สารเคมี

- สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์ สูตร MS สูตร LS และสูตร B5 (Gamborg B5, 1970) (รายละเอียดขององค์ประกอบในภาคผนวก)
- น้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรุคโตส แมนนิทอล และซอร์บิทอล
- PEG (polyethyleneglycol)
- วุ้น Agar-agar
- สารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba, , 2,4-D, NAA, picloram และ BA
- กรดไฮโดรคลอริก
- เมทธานอล และเอทธานอล

2. อุปกรณ์

- เครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ ประกอบด้วย ปิเปต กระบอกตวง ไมโครปิเปต ขวดปรับปริมาตร บีกเกอร์ ขวดบรรจุอาหารขนาด 4 ออนซ์ พร้อมฝาปิด
- อุปกรณ์ในการย้ายเลี้ยง ประกอบด้วย ปากคีบ กระดาษชำระ ตู้ย้ายเลี้ยง ด้ามมีดและใบมีดผ่าตัด
- อุปกรณ์ในการเตรียมอาหาร ประกอบด้วย เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ตู้อบไมโครเวฟ เครื่องคนสารละลาย และแท่งแม่เหล็ก

- อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานิน ประกอบด้วย เครื่องปั่นแยกความเร็วสูง (centrifuge) เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่วางหลอดแก้ว
- อุปกรณ์ในการบันทึกภาพ ประกอบด้วย กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และกล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์เต็ด

วิธีการ

1. การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณของแคลลัสกุหลาบมอญ

นำ friable callus ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของกุหลาบมอญบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 เดือน โดยการย้ายเลี้ยงทุกเดือน ขนาด 0.3–0.5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba หรือ picloram หรือ 2,4-D ความเข้มข้น 1.0, 2.5, 5.0 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นของออกซินเพาะเลี้ยงจำนวน 4 แคลลัสต่อขวด ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1100 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์ก้อนแคลลัสที่เพิ่มปริมาณได้ ประเภทของแคลลัส สีของแคลลัส และขนาดของแคลลัส

2. การศึกษาผลของสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการผลิตแอนโธไซยานินจากแคลลัส

นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไปเลี้ยงในอาหาร 3 สูตร คือ LS, MS หรือ B5 เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (สัดส่วนของออกซิน:ไซโตไคนิน คือ 1:0.5) dicamba 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (สัดส่วนของออกซิน: ไซโตไคนินคือ 1:0.5) NAA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (สัดส่วนของออกซิน:ไซโตไคนินคือ 1:0.1) ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1100 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 2 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์ก้อนแคลลัสที่เพิ่มปริมาณได้ และเปอร์เซ็นต์ก้อนแคลลัสที่เกิดรงควัตถุสีแดงของแอนโธไซยานินเปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดของสูตรอาหารและออกซิน คัดเลือกแคลลัส

จากสูตรอาหารที่มีการสังเคราะห์แอนโธไซยานินสูง และอาหารสูตรที่เหมาะสมจากการทดลองนี้ใช้สำหรับการทดลองต่อไป

3. การศึกษาผลของ BA ที่มีต่อปริมาณผลผลิตแอนโธไซยานินจากแคลลัส

นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม dicamba 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1100 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกเปอร์เซ็นต์ก้อนแคลลัสที่เกิดรงควัตถุสีแดง เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่สร้างแอนโธไซยานินในแคลลัสและวิเคราะห์หาปริมาณแอนโธไซยานินโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ตามวิธีการของ (Zhong และคณะ (1991) อ้างโดย ประสิทธิ (2539)) ดังนี้

นำแคลลัสสดมาสกัดด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก 1 เปอร์เซ็นต์ในเมทานอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในสภาพมืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำมาปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นแยกความเร็วรอบสูง 1000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนบนที่ใส ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 530 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer เพื่อคำนวณหาปริมาณแอนโธไซยานิน

การคำนวณหาปริมาณแอนโธไซยานินโดยใช้สูตร

$$AC = (27.208A + 0.0591)\ DF\ (10/1000XCFW)$$

โดยที่ AC = ปริมาณแอนโธไซยานิน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสดแคลลัส)

A = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance)ที่ช่วงคลื่น 530 นาโนเมตร

CFW = น้ำหนักสดแคลลัส

DF = ปริมาตรสารละลายที่ใช้เจือจาง

กรณีการวัดค่าการดูดกลืนแสง สุ่มตัวอย่างแคลลัสในแต่ละขวด ขวดละ 2 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์หาปริมาณแอนโธไซยานิน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ในแต่ละความเข้มข้นของ BA ที่ทดสอบเพาะเลี้ยง 5 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

4. การศึกษาผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่มีต่อผลผลิตแอนโธไซยานิน

นำแคลลัสที่มีสีแดงสดขนาด 3-.5 มิลลิเมตร ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เหมาะสมจากข้อ 3 เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1100 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกขนาดของแคลลัส เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่สร้างแอนโธไซยานินในแคลลัส และวิเคราะห์หาปริมาณแอนโธไซยานินเช่นเดียวกับวิธีการศึกษาที่ 3 เปรียบเทียบกันในแต่ละระยะเวลาการเพาะเลี้ยง วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละระยะเวลาการเพาะเลี้ยงทำ 5 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ตรวจหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและใช้เวลาที่เหมาะสมจากการทดลองนี้ใช้สำหรับการทดลองต่อไป

5. การศึกษาผลของ pH ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีต่อผลผลิตแอนโธไซยานิน

นำแคลลัสที่มีสีแดงสดขนาด 3–5 มิลลิเมตร ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมที่ปรับ pH ก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อ 5 ระดับ คือ 4.7, 5.2, 5.7, 6.2 และ 6.7 ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1100 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกขนาดของแคลลัส เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่สร้างแอนโธไซยานินในแคลลัส และวิเคราะห์หาปริมาณแอนโธไซยานินเช่นเดียวกับวิธีการศึกษาที่ 3 เปรียบเทียบกันในแต่ละระดับของ pH วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละระดับของ pH ทำการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

6. การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่มีต่อผลผลิตแอนโธไซยานิน

นำแคลลัสที่มีสีแดงสดขนาด 3–5 มิลลิเมตร ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมที่เติมน้ำตาล 3 ชนิดคือ ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส แต่ละชนิดใช้ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 1, 3, 5 และ 7 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1100 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกขนาดของแคลลัส เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่สร้างแอนโธไซยานินในแคลลัส และวิเคราะห์หาปริมาณแอนโธไซยานินเช่นเดียวกับวิธีการศึกษาที่ 3 เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาล วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยแต่ละชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลทำการทดลอง 5 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

7. การศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสร่วมกับสารออสโมติคัมที่มีต่อผลผลิตแอนไซยานิน

นำแคลลัสที่มีสีแดงสดขนาด 3–5 มิลลิเมตร ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมที่เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับน้ำตาลแมนนิทอล ซอร์บิทอล และ PEG แต่ละชนิดใช้ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 1, 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1100 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกขนาดของแคลลัส เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่สร้างแอนโธไซยานินในแคลลัส และวิเคราะห์หาปริมาณแอนโธไซยานินเช่นเดียวกับวิธีการศึกษาที่ 3 เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาล วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยแต่ละชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลทำการทดลอง 5 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

8. การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการผลิตแอนโธไซยานินในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน

นำแคลลัสที่มีสีแดงสดน้ำหนัก 0.5 กรัม ไปเลี้ยงในอาหารสูตร LS เติม dicamba ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารปริมาตร 30 มิลลิลิตร แต่ละความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตเพาะเลี้ยง 4 ฟลาสก์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 200 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกลักษณะ สี การเจริญของเซลล์ซัสเพนชัน และการเกิดแอนโธไซยานินในแต่ละชุดของสารควบคุมการเจริญเติบโตเปรียบเทียบกัน