บทที่ 2

วิธีการทดลอง

วัสดุ

1. พืชทดลอง : ผลสุกปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอร่า (*Elaeis guineensis* Jacq. cv. Tenera)
2. สารเคมีต่างๆ
   2.1 สารเคมีที่ใช้ฟอกฆ่าเชื้อ เช่น เอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ คลอรอกซ์ ทวีน 20
   2.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร คือ
      2.2.1 สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Y_3 (Euwens, 1976) (ภาคผนวก ก) ได้แก่ ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง สารประกอบธาตุเหล็ก สารอินทรีย์ต่าง ๆ
      2.2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) ได้แก่ ABA, 2iP, 2,4-D, BA, dicamba, kinetin, NAA และ น้ำมะพร้าว (coconut water, CW)
      2.2.3 ผงวุ้น เช่น วุ้นตรานางเงือก เจลไลท์
      2.2.4 ผงถ่าน (activated charcoal, AC)
   2.3 สารเคมีที่ใช้ทำความสะอาดเครื่องแก้ว เช่น ทีโพล ซันไลต์
3. วัสดุที่ใช้ในการเตรียมเมล็ดปาล์ม
   2.3 กรรไกรตัดกิ่งไม้
   2.4 ถุงพลาสติกชนิดใส
   2.5 ถังพลาสติก
   2.6 ค้อน
   2.7 ถุงมือ
4. วัสดุที่ใช้สำหรับการเตรียมอาหารพวกเครื่องแก้วและพลาสติก เช่น บิกเกอร์ ฟลาสก์ กระบอกตวง ขวดใส่สารเคมี ขวดแก้วและฝาปิด แท่งแก้วคนสาร แท่งแม่เหล็ก ปิเปต
5. วัสดุที่ใช้ในตู้ปลอดเชื้อ เช่น ด้ามมีด ใบมีด ปากคีบ จานเลี้ยงเชื้อปลอดเชื้อ ผ้าสำหรับเช็ดพื้นตู้ กระบอกฉีดแอลกอฮอล์ ขวดใส่แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

6. เครื่องกรองจุลินทรีย์ และกระดาษกรอง ขนาด 0.45 ไมครอน

7. อื่น ๆ เช่น กระดาษฟอยล์ จุกสำลี ฟองน้ำ แปรงล้างขวด

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร
   - เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง (Mettler รุ่น PJ 100 และ 400 ตามลำดับ)
   - เครื่องคนสารระบบแม่เหล็ก (magnetic stirring hot plate) (Heidolph รุ่น MR 300)
   - เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (Horiba รุ่น F-13)
   - ตู้อบไมโครเวฟ (microwave oven) (Sharp รุ่น R-245)
   - หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) (Eyela รุ่น MAC-601)
2. ตู้ปลอดเชื้อ (larminar air flow carbinet)
3. ตะเกียงและถังแก๊ส
4. เครื่องเขย่า (orbital shaker) (Firstek Sciencific รุ่น S103)
5. กล้องจุลทรรศ์แบบอินเวอร์เตด (Olympus inverted research microscope model IMT-2)
6. กล้องถ่ายรูปและอุปกรณ์
7. ชั้นวางอาหาร
8. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีชั้นวางขวดเพาะเลี้ยงที่มีหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์สีขาวความเข้มแสง 1,500-2,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงแสงต่อวัน อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส

วิธีการวิจัย

แบ่งวิธีการวิจัยเป็น 3 ขั้นตอน คือ

1. การเตรียมชิ้นส่วนปาล์มน้ำมัน
2. การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว
3. การทดลอง

แบ่งการทดลองเป็น

3.1 การชักนำต้นจากไซโกติกเอ็มบริโอ

3.2 การชักนำแคลลัสจากไซโกติกเอ็มบริโอ

3.3 การเพิ่มปริมาณแคลลัส

3.4 การชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

3.5 การชักนำให้เกิดต้นจากเอ็มบริออยด์

1. การเตรียมชิ้นส่วนปาล์มน้ำมัน (ภาพที่ 11)

1) แกะผลปาล์มน้ำมันสุกออกจากทะลาย

2) ใช้กรรไกรตัดกิ่งไม้ ตัดเอาส่วนเนื้อปาล์มน้ำมันออก

3) อบที่อุณหภูมิ 38-40 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง

4) บรรจุเมล็ดปาล์มที่แห้งสนิทดีแล้วลงในถุงพลาสติกชนิดใส ทุบด้วยค้อนให้กะลาแตกออก แยกส่วนของกะลาออก จะเห็นส่วนเมล็ดใน (เอนโดสเปิร์ม)

5) ตัดส่วนเอนโดสเปิร์มที่มีเอ็มบริโอยู่ภายในเป็นรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 x 0.5 มิลลิเมตร

2. การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว (ทำในตู้ปลอดเชื้อ) (ภาพที่ 12)

1) นำชิ้นส่วนปาล์มน้ำมันที่ผ่านการเตรียมเรียบร้อยแล้ว แช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อฆ่าเชื้อและละลายไขมันบางส่วนออก เป็นเวลา 10 นาที

2) ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยคลอรอกซ์ที่มีโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite) เป็นสารออกฤทธิ์ผสมอยู่ โดยใช้คลอรอกซ์ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับน้ำยาเคลือบผิวทวีน 20 2-3 หยดต่อสารฟอกฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร เวลาที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ 20 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อซ้ำอีกครั้งด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

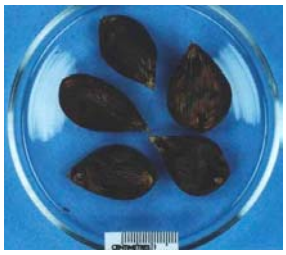
3) แช่น้ำค้างคืนไว้ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 3 วัน ก่อนแซะเอ็มบริโอออกจากส่วนของเอนโดสเปิร์มในสภาพปลอดเชื้อ (ภาพที่ 13) ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตรต่าง ๆ

4) บันทึกผลเป็นเปอร์เซ็นต์ของเนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเอ็มบริโอทั้งหมด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

แกะผลปาล์ม
ออกจากทะลาย

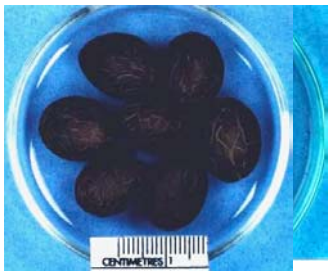
ทะลายปาล์ม

เนื้อปาล์ม



อบที่ 38-40°C
24 h.

กะลา



เอนโดสเปิร์ม

ภาพที่ 11 การเตรียมชิ้นส่วนปาล์มน้ำมัน

Figure 11 Preparation of oil palm explants

ชิ้นส่วนปาล์มน้ำมัน

20% แอลกอฮอล์
20 นาที

40% คลอรอกซ์
20 นาที

20% คลอรอกซ์
20 นาที

ล้างด้วยน้ำกลั่น
ฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

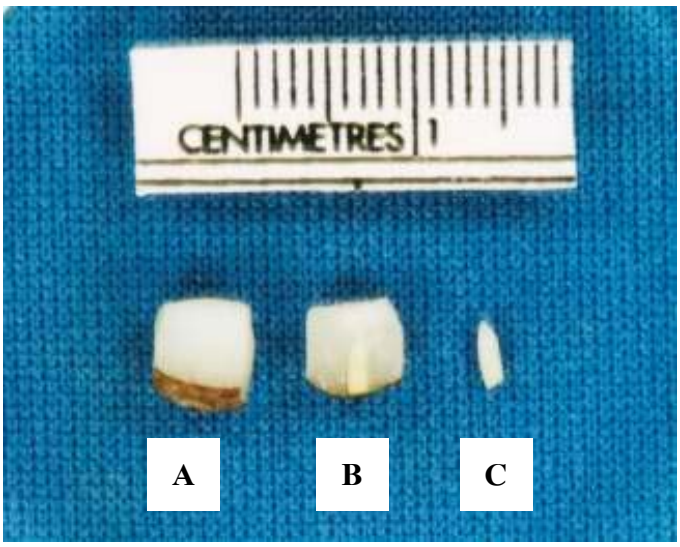
แช่ค้างคืนใน
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 วัน

แซะเอ็มบริโอออก
จากเอนโดสเปิร์ม

เพาะเลี้ยงในอาหาร
สังเคราะห์สูตรต่าง ๆ

ภาพที่ 12 การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว

Figure 12 Surface sterilization



ภาพที่ 13 ชิ้นส่วนปาล์มน้ำมันหลังจากการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว ชิ้นส่วนที่มีเอ็มบริโออยู่ภายใน (A, B) เอ็มบริโอที่แซะออกมา ก่อนนำไปเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ (C)

Figure 13 Oil palm explants after surface sterilization. Explants with embryo inside (A, B) and excised embryos prior to culture in the media (C)

3. การทดลอง

3.1 การชักนำต้นจากเอ็มบริโอ

ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นปาล์มน้ำมันตามปกติ เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ โดยการนำชิ้นส่วนปาล์มน้ำมันมาฟอกฆ่าเชื้อตามวิธีการข้างต้น แซะเอาเฉพาะส่วนของเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันออกจากเอนโดสเปิร์มไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ ดังนี้

S_1 = Y_3 NGR (no growth regulator)

S_2 = Y_3 + BA 4.44 μM + 0.05% AC (บุญสนอง ช่วยแก้ว, 2534)

เพาะเลี้ยงในสภาพมีแสง 16 ชั่วโมงแสงต่อวัน แต่ละหน่วยการทดลองทำ 50 ขวด สังเกตและบันทึกผล การเจริญเติบโตของเอ็มบริโอในอาหารแต่ละสูตร เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์ บันทึกภาพเปรียบเทียบ

3.2 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากเอ็มบริโอ

ศึกษาการเกิดเป็นแคลลัสในอาหารแต่ละสูตร เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสเริ่มต้น โดยการนำชิ้นส่วนปาล์มน้ำมันมาฟอกฆ่าเชื้อตามวิธีการข้างต้น แซะเอาเฉพาะส่วนเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันออกจากเอนโดสเปิร์มไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ ดังนี้

<u>อาหารชุดที่ 1</u>

C_{11} = Y_3 + 2,4-D 12.5 μM (วิสุทธิ์ พัชรพิสุทธิ์สิน, 2532)

C_{12} = Y_3 + 2,4-D 10 μM + 2iP 2.5 μM (Huong และคณะ, 1999)

C_{13} = Y_3 + 2,4-D 500 μM + 0.05% AC

ผลจากการชักนำเอ็มบริโอในอาหารชุดที่ 1 พบว่าเมื่อย้ายแคลลัสที่ชักนำได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลวไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าน้ำหนักแคลลัสเพิ่มขึ้นน้อยกว่าแคลลัสที่ชักนำได้จากการเลี้ยงบนอาหารแข็งมาก ในการทดลองครั้งต่อมา จึงทำการชักนำแคลลัสจากเอ็มบริโอบนอาหารแข็งเท่านั้น และเพิ่มสูตรอาหารที่มี dicamba เพิ่มขึ้นมาอีก 1 สูตร

<u>อาหารชุดที่ 2</u>

C_{21} = Y_3 + 2,4-D 12.5 μM (วิสุทธิ์ พัชรพิสุทธิ์สิน, 2532)

C_{22} = Y_3 + 2,4-D 10 μM + 2iP 2.5 μM (Huong และคณะ, 1999)

C_{23} = Y_3 + 2,4-D 500 μM + 0.3% AC (Teixeira และคณะ, 1995)

C_{24} = Y_3 + dicamba 12.5 μM

เพาะเลี้ยงในสภาพมืด แต่ละหน่วยการทดลองทำ 100 ขวด ทำการเปลี่ยนลงอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ สังเกตและบันทึกผลเปรียบเทียบโดยการชั่งน้ำหนักสดเมื่อแคลลัสอายุ 10 สัปดาห์ บันทึกภาพเปรียบเทียบ

3.3 การเพิ่มปริมาณแคลลัส

ศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสเริ่มต้นเป็นแคลลัสเจริญเติบโตเร็วในอาหารแต่ละสูตรเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณแคลลัส โดยนำแคลลัสเริ่มต้นที่ได้จากการชักนำแคลลัสจากการทดลองที่ 3.2 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ดังนี้

<u>อาหารชุดที่ 1</u>

P_{11} = Y_3 + 2,4-D 10 μM + 0.05% AC

P_{12} = Y_3 + 2,4-D 10 μM + ascorbic acid 250 mg/l (Teixeira และคณะ, 1995)

P_{13} = Y_3 + 2,4-D 2.26μM + kinetin 0.83 μM + ABA 2 μM (Huong และคณะ,1999)

P_{14} = Y_3 + 2,4-D 22.62 μM + 0.05% AC (วิสุทธิ์ พัชรพิสุทธิ์สิน, 2532)

จากผลการทดลอง พบว่าอาหารสูตร B_3 ไม่เหมาะในการเพิ่มปริมาณแคลลัส เนื่องจากมีการปล่อยสารสีน้ำตาลออกมาในอาหารและให้การเจริญเติบโตของแคลลัสน้อยมาก ส่วนสูตรอาหาร B_4 ให้ผลในการเพิ่มปริมาณแคลลัสไม่ต่างกับสูตร B_1 ถึงแม้จะมีการเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D ในการทดลองครั้งต่อมาจึงตัดสูตร B_3 และ B_4 ออก และเพิ่มสูตรอาหารที่มี dicamba และ NAA เพิ่มขึ้นมาเพื่อเปรียบเทียบผลของออกซินชนิดต่าง ๆ ในการเพิ่มปริมาณแคลลัส

<u>อาหารชุดที่ 2</u>

P_{21} = Y_3 + 2,4-D 10 μM + ascorbic acid 250 mg/l (Teixeira และคณะ, 1995)

P_{22} = Y_3 + dicamba 10 μM + ascorbic acid 250 mg/l

P_{23} = Y_3 + NAA 10 μM + ascorbic acid 250 mg/l

P_{24} = Y3 + 2,4-D 10 μM + 0.05% AC

เพาะเลี้ยงในสภาพมีแสง 16 ชั่วโมงแสงต่อวัน แต่ละหน่วยการทดลองทำ 20 ขวด สังเกตและบันทึกผลเปรียบเทียบโดยการชั่งน้ำหนักสดเมื่อแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์ คำนวณหาน้ำหนักแคลลัสที่เพิ่มขึ้นต่อน้ำหนักแคลลัสเริ่มต้น บันทึกภาพเปรียบเทียบ

3.4 การเกิดเอ็มบริโอเจเนซีสจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

ศึกษาการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสในอาหารเหลวแต่ละสูตรเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส โดยการนำแคลลัสเจริญเติบโตเร็วที่ได้จากการทดลองที่ 3.3 น้ำหนักประมาณ 0.25 กรัม เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร สูตรต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

<u>อาหารชุดที่ 1</u>

E_{11} = Y_3 + NAA 15 μM + ABA 2 μM (Teixeira และคณะ, 1995)

E_{12} = Y_3 + 2,4-D 15 μM + ABA 2 μM

E_{13} = Y_3 + 2iP 15 μM + ABA 2 μM

E_{14} = Y_3 + kinetin 15 μM + ABA 2 μM

จากผลการทดลอง พบว่าอาหารสูตร E_{13} และ E_{14} ไม่เหมาะในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย เนื่องจากทำให้แคลลัสและอาหารเป็นสีน้ำตาลดำ ในการทดลองชุดต่อมาจึงตัดสูตรอาหาร E_{13} และ E_{14} ออก และเพิ่มสูตรอาหารที่มี dicamba, BA และไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเพิ่มขึ้นมา เพื่อเปรียบเทียบผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

<u>อาหารชุดที่ 2</u>

E_{21} = Y_3 + ABA 2 μM (Huong และคณะ, 1999)

E_{22} = Y_3 + NAA 15 μM + ABA 2 μM (Teixeira และคณะ, 1995)

E_{23} = Y_3 + dicamba 15 μM + ABA 2 μM

E_{24} = Y_3 + 2,4-D 15 μM + ABA 2 μM

E_{25} = Y_3 + BA15 μM + ABA 2 μM

<u>อาหารชุดที่ 3</u>

ย้ายเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร E_{22} ของอาหารชุดที่ 2 ได้ 4 สัปดาห์ ลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร

S_3 = Y_3 + BA 1 μM + kinetin 0.46 μM (Huong และคณะ, 1999)

เพาะเลี้ยงในสภาพมีแสง 16 ชั่วโมงแสงต่อวัน ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 90 รอบ/นาที ย้ายเลี้ยงลงอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ แต่ละหน่วยการทดลองทำ 3 ฟลาสก์ สังเกตและบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทุก 4 สัปดาห์

3.5 การเกิดต้นจากเอ็มบริออยด์

ศึกษาการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของเอ็มบริออยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้นจากเอ็มบริออยด์ โดยการนำเอ็มบริ-ออยด์ที่ได้จากการทดลองที่ 3.4 (อาหารชุดที่ 1 และ 2) อายุ 3 เดือน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

<u>อาหารชุดที่ 1</u>

T_1 = Y_3 NGR

T_2 = 1/2 Y_3 (Guerra และ Handro, 1998)

T_3 = Y_3 + CW 15%

T_4 = Y_3 + coconut milk 15%

T_5 = Y_3 + AC 0.05%

T_6 = Y_3 + CW 15% + AC 0.05% (วิสุทธิ์ พัชรพิสุทธิ์สิน, 2532)

<u>อาหารชุดที่ 2</u>

โดยการนำเอ็มบริออยด์ที่ได้จากการทดลองที่ 3.4 (อาหารชุดที่ 3) อายุ 2 เดือน มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ดังนี้

S_1 = Y_3 NGR

S_2 = Y_3 + BA 4.44 μM + AC 0.05% (บุญสนอง ช่วยแก้ว, 2534)

เพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงในสภาพมีแสง 16 ชั่วโมงแสงต่อวัน แต่ละหน่วยการทดลองทำ 10 ขวด สังเกตและบันทึกผลทุก 1 เดือน

4. เนื้อเยื่อวิทยาของเอ็มบริโอและเอ็มบริออยด์

นำไซโกติกเอ็มบริโอเริ่มต้นและเอ็มบริออยด์ของปาล์มน้ำมันที่ได้จากการทดลองไปศึกษาลักษณะทางกายวิภาค ด้วยการตัดเนื้อเยื่อตามวิธีการของ Johansen (1968) ทำการบันทึกภาพที่ได้

5. การคำนวณค่าทางสถิติ

การศึกษาเปรียบเทียบอาหารสูตรต่างๆ ในการชักนำแคลลัส โดยการชั่งน้ำหนักสด และการเพิ่มปริมาณแคลลัส โดยคำนวณค่าจากน้ำหนักแคลลัสที่เพิ่มขึ้นต่อน้ำหนักแคลลัสเริ่มต้น นำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธีของ Scheffe วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS 11.0