วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษารวบรวมพันธุ์กล้วยท้องถิ่นภาคใต้ของประเทศไทย

รวบรวมและศึกษาพฤกษศาสตร์พันธุ์กล้วยท้องถิ่นภาคใต้ของประเทศไทย รวมทั้งการนำมาปลูก ณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์เพื่อการขยายพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุ์ต่อไปด้วย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สำรวจข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับพันธุ์กล้วยท้องถิ่นภาคใต้
2. ออกสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างพันธุ์กล้วยท้องถิ่นภาคใต้
3. จัดเก็บพันธุ์กล้วยท้องถิ่นภาคใต้ โดยการปลูกในแปลงปลูกและเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพพืชของ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อประโยชน์ต่อการศึกษาและค้นคว้าวิจัยต่อไปด้วย

การทดลองที่ 2 การเพิ่มจำนวนกล้วยแต่ละพันธุ์ในห้องปฏิบัติการด้วยเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

กล้วยที่เก็บรวบรวมไว้ได้มีทั้งหมด 14 ชนิด แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งปลูกในเรือนต้นไม้ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อีกส่วนหนึ่งนำมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดังนี้

วัสดุ

พืชทดลอง

พืชที่ใช้ในการทดลอง คือ หน่อกล้วย

1. สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ
   - เอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์
   - คลอรอกซ์ และสารจับใบทวีน 20 (Tween 20)
2. สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) (ภาคผนวก)
3. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชได้แก่ BA และน้ำมะพร้าว

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ Mettler รุ่น PJ 100 และ 400 ตามลำดับ)

- เตาแม่เหล็กไฟฟ้า (Stirring hot plate) (ยี่ห้อ Heidolph รุ่น MR 300)

- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (ยี่ห้อ Horiba รุ่น pH - METER F-13)

- เตาอบไมโครเวฟ (Microwave oven) (ยี่ห้อ Sharp รุ่น R-245)

- หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave) (ยี่ห้อ Eyela รุ่น MAC-601)

2. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow cabinet)

3.เครื่องมือที่ใช้ในการย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ปากคีบ มีดผ่าตัด จานเลี้ยงเชื้อ พาราฟิล์ม

4. เครื่องแก้วและพลาสติก ได้แก่ บีกเกอร์ ฟลาสก์ ขวดแก้วพร้อมฝาปิด ชุดกรอง Costar μStar® แผ่นกรองขนาด 0.22 ไมครอน กระบอกตวง ปิเปต หลอดแก้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร

5. ชั้นสำหรับวางขวดเพาะเลี้ยงติดหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์สีขาวความเข้มแสง 28 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาทีเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

6. เครื่องปรับอุณหภูมิและความชื้น และนาฬิกาควบคุมเวลา

วิธีการ

การทดลองที่ 2.1

1. ขุดหน่อกล้วยที่แทงขึ้นมาจากพื้นดินสูงประมาณ 30-60 เซนติเมตร ล้างดินออกให้หมด (ภาพที่ 2a, b) ตัดปลายด้านบนของหน่อทิ้งและลอกกาบใบจนเหลือความสูงประมาณ 20-25 เซนติเมตร (ภาพที่ 2c) ล้างด้วยน้ำยาทำความสะอาด (Detergent) แล้วตามด้วยน้ำล้างออกให้สะอาด จากนั้นลอกกาบใบจนพบตาข้างแล้วใช้มีดแซะให้ได้รูปทรงลูกบาศก์ขนาด 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร ส่วนตาที่อยู่ตรงกลางหน่อเป็นตายอดตัดให้เหลือความยาว 5-6 เซนติเมตร

2. นำชิ้นส่วนตายอด และตาข้าง แช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อสองขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 แช่ชิ้นส่วนลงในสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารจับใบทวีน 20 ปริมาณ 2 หยด นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง

ขั้นที่ 2 แช่ชิ้นส่วนลงในสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารจับใบทวีน 20 ปริมาณ 2 หยด นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง (ภาพที่ 2d)

3. ตัดแต่งชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เสียหายจากการสัมผัสกับคลอรอกซ์ให้มีขนาดประมาณ 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร (ภาพที่ 2e) จากนั้นวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำมะพร้าว 15 % (ภาพที่ 2f)

4. ย้ายเลี้ยงทุกๆ 3 สัปดาห์ โดยตัดส่วนที่เกิดสีดำออก แล้ววางเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิม บันทึกลักษณะการเปลี่ยนแปลง การพัฒนาของชิ้นส่วนต่างๆ และระยะเวลาของชิ้นส่วนในการพัฒนาเป็นต้น

อาหารเพาะเลี้ยงทุกสูตรใช้น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นตรานางเงือก 0.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และปรับค่าพีเอชเป็น 5.8 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล หรือไฮโดรเจนคลอไรด์ 0.1 นอร์มอล ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

การทดลองที่ 2.2

หลังจากการเพาะเลี้ยงตายอดและตาข้างเป็นเวลา 60 วันตายอดและตาข้างจะพัฒนาเป็นต้นเล็กๆ ที่สมบูรณ์เป็นจำนวนมาก จึงได้นำใบอ่อนของต้นกล้วยที่พัฒนามาจากตายอดและตาข้างและใบอ่อนของต้นกล้วยจากธรรมชาติมาทำการวิเคราะห์ด้วยโฟลไซโทเมทรี เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ด้วยการวิเคราะห์หาขนาดจีโนมโดยประยุกต์วิธีการของ Otto (1990) ดังนี้

1. ตัดแยกใบอ่อนกล้วยแต่ละสายพันธุ์มาประมาณ 20 – 30 มิลลิกรัม

2.วาง แช่ใบอ่อนของต้นกล้วยในจานเพาะเชื้อที่มีสารละลาย LB01 buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

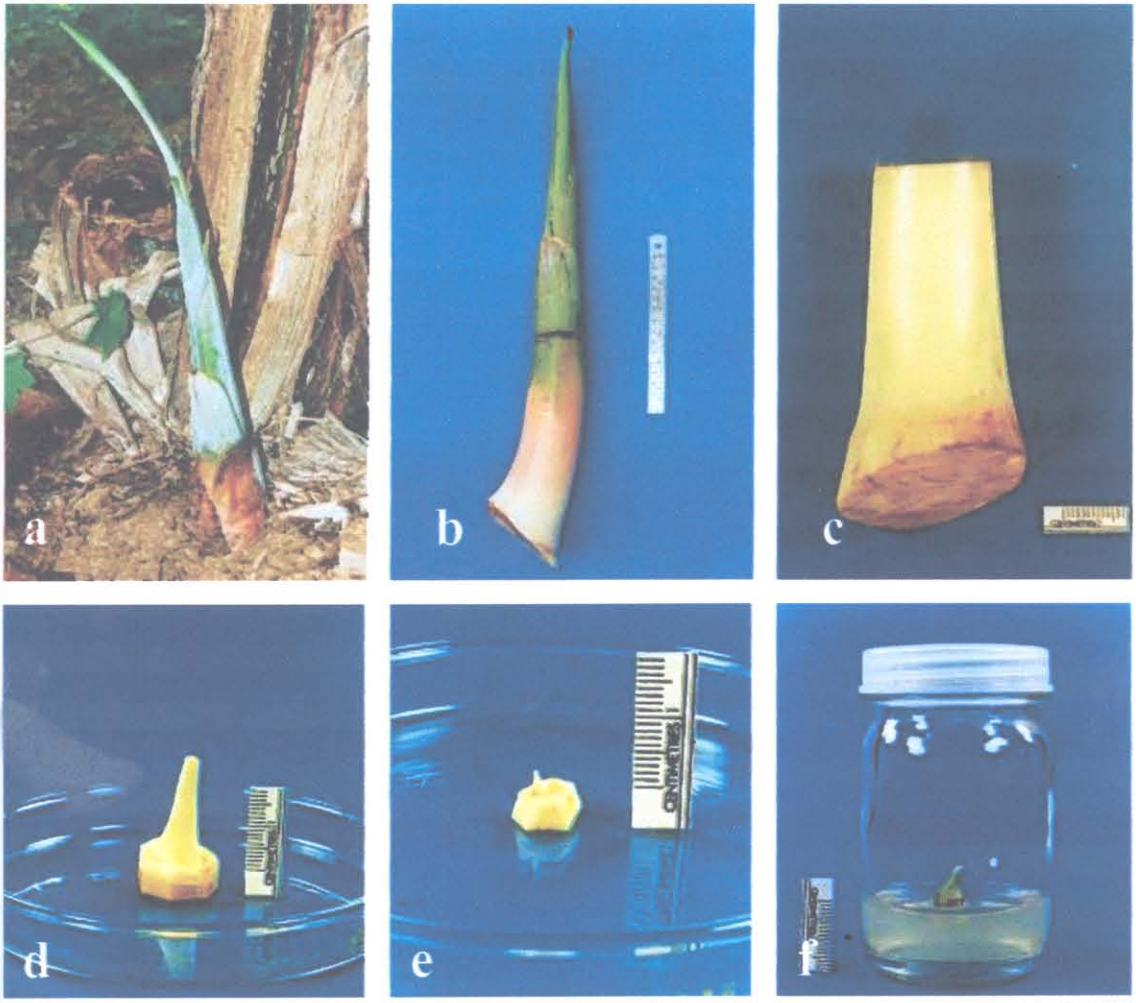
3. เติมสาร Propidium iodide และ RNase อย่างละ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.ทิ้งไว้สักครู่นำจานเพาะเชื้อวางบนถาดน้ำแข็งแล้วหั่นชิ้นส่วนใบอ่อนกล้วยให้ละเอียด

5. ใส่ Mercaptoethanol 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้สักครู่

6. กรองด้วย nylon mesh ขนาด 50 ไมโครเมตร ใส่ในหลอดทดลอง เก็บไว้ในที่มืดและเย็น

7. นำสารละลายไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโทเมทรี FACScalibur Becton Dickinson โดยใช้ *Zea mays* CE-777 (2C = 5.43 pg DNA) เป็น Internal reference standard



ภาพที่ 2 ลักษณะหน่อ ตายอดและตาข้างของกล้วย a, b) ขนาดของหน่อที่ใช้ในการทดลองนี้ c) หน่อที่ตัดจนเหลือความยาว 20-25 เซนติเมตร ลอกกาบชั้นนอก และฟอกด้วยน้ำยาทำความสะอาด d) ชิ้นส่วนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อสองขั้นตอน e) ชิ้นส่วนที่ผ่านการตัดแต่ง f) ชิ้นส่วนที่วางเลี้ยงบนอาหารชักนำต้นสูตรMS

การทดลองที่ 3 การเก็บรักษาสายพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์ในห้องปฏิบัติการ

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงตายอดและตาข้างจนได้ต้นอ่อนเล็กๆจำนวนมากพอ นำต้นกล้วยที่ได้ไปทำการทดลองการลดการเจริญเติบโตในหลอดทดลองในอาหารสูตรต่างๆ โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้

1. เลือกต้นอ่อนกล้วยที่มีใบอ่อน 2 ใบ และมีความยาวประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร (ภาพที่ 3a)
2. นำต้นอ่อนที่เลือกไว้ วางเลี้ยงลงในอาหารสูตรต่างๆ ที่ได้ทดลอง (ภาพที่ 3b)
3. นำไปเลี้ยงที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส

อาหารเพาะเลี้ยงทุกสูตรปรับค่าพีเอชเป็น 5.8 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล หรือไฮโดรเจนคลอไรด์ 0.1 นอร์มอล ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ซึ่งอาหารแต่ละขวดมีปริมาตร 15 มิลลิลิตร โดยแบ่งเป็น 3 การทดลองซึ่งสูตรอาหารที่ใช้มีดังนี้

3.1 ลดธาตุอาหารหลัก (Macronutrients) ของสูตรอาหาร MS

1. MS + วุ้น 0.8 % + น้ำตาล 3 % (ตัวควบคุม)
2. ¾ MS + วุ้น 0.8 % + น้ำตาล 3 %
3. ½ MS + วุ้น 0.8 % + น้ำตาล 3 %
4. ¼ MS + วุ้น 0.8 % + น้ำตาล 3 %

3.2 ทดสอบความเข้มข้นของวุ้น

1. ½MS + วุ้น 0.8 % + น้ำตาล 3 % (ตัวควบคุม)
2. ½ MS + วุ้น 1.0 % + น้ำตาล 3 %
3. ½ MS + วุ้น 1.2 % + น้ำตาล 3 %
4. ½ MS + วุ้น 1.4 % + น้ำตาล 3 %

3.3 ทดสอบความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส

1. ½ MS + วุ้น 1.4 % + น้ำตาล 3 % (ตัวควบคุม)
2. ½ MS + วุ้น 1.4 % + น้ำตาล 6 %
3. ½ MS + วุ้น 1.4 % + น้ำตาล 9 %

a b

ภาพที่ 3 ลักษณะปลายยอดกล้วย (a) ขนาดปลายยอดกล้วยที่ใช้ในการทดลองนี้ (b) ชิ้นส่วนปลายยอดที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้