บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

ในการศึกษานี้ใช้ต้นสะเดาช้างอายุ 1 และ 3 ปี ซึ่งปลูกในถุงพลาสติกและดูแลในสภาพความเข้มแสง 3,910-4,072 ลักซ์ ให้น้ำวันเว้นวัน (สำหรับต้นอายุ 3 ปี) และให้ทุกวัน (สำหรับต้นอายุ 1 ปี) ให้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 เดือนละครั้ง ใช้ใบจากต้นอายุ 3 ปี มาศึกษาการชักนำแคลลัส และนำแคลลัสที่ได้มาศึกษาการชักนำพืชต้นใหม่ และเพาะเลี้ยงเซลล์ชัสเพนชั่น กรณีการศึกษาการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ใช้ใบสะเดาช้างอายุ 1 ปี ที่อยู่นอกหลอดทดลอง

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- สารเคมีที่ใช้เตรียมธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรองของอาหารสูตร MS
- น้ำตาลซูโครส เคซีนไฮโดรไลเสท และ polyvinylpyrrolidone (PVP)
- สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA, dicamba, 2,4-D, KN และ BA
- เอนไซม์ที่ใช้แยกโปรโตพลาสต์ คือ เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์เอส (Yakult Honsha Co., Ltd.) , เซลลูเลส (จากเชื้อ *Trichoderma viride* ; Sigma) และ มาเซอโรไซม์ อาร์-10 (Yakult Honsha Co., Ltd.)
- แมนนิทอล ซอร์บิทอล
- สารเคมีบัฟเฟอร์ (2N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES)
- สารเคมีตรวจสอบความมีชีวิต คือ fluorescein diacetate (FDA)

2. อุปกรณ์การทดลอง

- เครื่องแก้ว ประกอบด้วยฟลาสก์ ปิเปต กระบอกตวง ขวดปรับปริมาตร บีกเกอร์ จานเพาะเลี้ยง
- อุปกรณ์ในการย้ายเลี้ยง ประกอบด้วยปากคีบ ด้ามมีดและใบมีดผ่าตัด กระดาษชำระ พาราฟิล์ม แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ตู้ย้ายเลี้ยง

- อุปกรณ์ในการแยกโปรโตพลาสต์ ประกอบด้วยกรรไกรพร้อมใบมีดโกน เครื่องเขย่า ผ้ากรองมิราคลอทขนาด 30 ไมโครเมตร พาสเจอร์ปิเปต ลูกยางสำหรับดูด หลอดเซนตริฟิวก์ขนาด 15 มิลลิลิตร กล้องจุลทรรศน์อินเวอร์เต็ด และฟลูออเรสเซนส์
- อุปกรณ์ในการเตรียมอาหาร ประกอบด้วยเครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ตู้อบแห้งและอบฆ่าเชื้อ ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –30 องศาเซลเซียส
- อุปกรณ์อื่น ๆ กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ พร้อมชุดบันทึกภาพ

วิธีการศึกษา

1. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างแคลลัสจากใบอ่อนสะเดาช้าง

นำใบอ่อนสะเดาช้างที่มีขนาดใบกว้าง 2.43±0.4 เซนติเมตร และยาว 7.73±0.2 เซนติเมตร มาล้างด้วยน้ำประปา โดยให้ไหลผ่านประมาณ 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำยาล้างจานซันไลต์ แล้วนำไปจุ่มแช่ในเอทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที แช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ ทวีน-20 1-2 หยดต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร นำไปวางบนเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3-5 ครั้ง ภายในตู้ย้ายเลี้ยง แล้วตัดขอบใบและเส้นกลางใบทิ้งคงเหลือแผ่นใบ ตัดให้มีขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร วางเลี้ยงให้ด้านหลังใบสัมผัสอาหาร สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA หรือ 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นของ NAA และ 2,4-D ใช้ร่วมกับ BA หรือ KN เข้มข้น 0.2, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตเพาะเลี้ยงใช้จำนวน 20 ชิ้น เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25.5±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,350 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส นับจำนวนโนดูล และสังเกตสีโครงสร้าง และบริเวณที่สร้างแคลลัส ในแต่ละความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตเปรียบเทียบกัน

2. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญของแคลลัส

ตัดแยกแคลลัสออกจากชิ้นส่วนใบที่นำมาชักนำแคลลัส แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA หรือ KN เข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5 และ 1.0 และ 2,4-D เข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ BA หรือ KN เข้มข้น 0.2, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตเพาะเลี้ยงแคลลัสจำนวน 10 ชิ้น ที่อุณหภูมิ 25.5±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,350 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน วัดขนาดแคลลัสส่วนที่ยาวที่สุดของชิ้นส่วนก่อนและหลังจากเพาะเลี้ยง 1 เดือน จากนั้นหาผลต่างของขนาดแคลลัสก่อนและหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ เพื่อหาขนาดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น ในแต่ละความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตเปรียบเทียบกัน

3. ผลของความเข้มข้นของ BA ต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่

นำคอมแพคแคลลัสซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มาชักนำพืชต้นใหม่บนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.0, 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นของ BA เพาะเลี้ยงแคลลัส 10 ชิ้นส่วน ที่อุณหภูมิ 25.5±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกการสร้างพืชต้นใหม่จากแคลลัสในแต่ละความเข้มข้นของ BA เปรียบเทียบกัน

4. ผลของเคซีนไฮโดรไลเสทต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากแคลลัส

นำแคลลัสจากการทดลองที่ 3 มาชักนำพืชต้นใหม่บนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ PVP เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมหรือไม่เติมเคซีนไฮโดรไลเสท 500 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละทรีตเมนต์เพาะเลี้ยงแคลลัส 8 ชิ้นส่วน ที่อุณหภูมิ 25.5±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน หลังการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ บันทึกการสร้างพืชต้นใหม่ในแต่ละทรีตเมนต์เปรียบเทียบกัน

5. ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบสะเดาช้าง

นำใบอ่อน ใบย่อยชุดที่ 2 นับจากยอดของสะเดาช้างที่มีความกว้าง 2.0-2.5 เซนติเมตร ความยาว 6.5-7.0 เซนติเมตร มาล้างน้ำประปาไหลผ่าน ประมาณ 30 นาที ล้างด้วยน้ำยาล้างจานซันไลต์ ประมาณ 3-5 นาที แล้วนำไปจุ่มแช่ในเอทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับทวีน-20 1-2 หยดต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำใบสะเดาช้างที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาหั่นฝอยจำนวน 1 กรัม จุ่มแช่ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ หรือเอนไซม์เซลลูเลส เข้มข้น 15 และ 30 ยูนิต แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับเอนไซม์มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เอนไซม์ข้างต้นละลายในสารละลายแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 5.7-5.8 แล้วกรองฆ่าเชื้อด้วยกระดาษกรองมิลลิพอร์ ขนาดช่อง 0.22 ไมโครเมตร ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว อินคิวเบทชิ้นส่วนใบในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาด 15x60 มิลลิเมตร พันด้วยพาราฟิล์ม อินคิวเบทบนเครื่องเขย่าไปมาที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ในสภาพความเข้มแสงต่ำ นาน 3-10 ชั่วโมง จึงนำไปกรองด้วยมิราคลอทฆ่าเชื้อ ขนาดช่อง 30 ไมโครเมตร ซึ่งวางในกรวยพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง

4 เซนติเมตร ผ่านไปยังหลอดปั่นขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ 800 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ดูดเก็บเอนไซม์ และล้างตะกอนโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายล้าง (สารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เติมธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองสูตร MS ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.7) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร 2 ครั้ง จากนั้นใช้พาสเจอร์ไปเปตดูดเป๋าให้เข้ากันแล้วลอยบนสารละลายซูโครส เข้มข้น 21 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อแยกโปรโตพลาสต์จากตะกอนเซลล์ นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดเก็บโปรโตพลาสต์จากตอนกลางระหว่างสารละลายซูโครสและสารละลายล้าง แล้วล้างด้วยสารละลายล้าง 2 ครั้ง ตรวจสอบจำนวนโปรโตพลาสต์โดยหยดซัสเพนชั่นของโปรโตพลาสต์บนสไลด์นับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และตรวจสอบความมีชีวิตโดยใช้สารละลายโปรโตพลาสต์ 100 ไมโครลิตร ย้อม FDA เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เท่ากัน ดูดเป๋าให้เข้ากันในสไลด์หลุม ทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาที ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ดูการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนที่ช่วงความยาวคลื่น 300-400 นาโนเมตร นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เรืองแสงสีเขียว-เหลืองต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด คำนวนเป็นเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ทดสอบโดยใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

6. ผลของชนิดและความเข้มข้นของออสโมติคัมต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

แยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนสะเดาช้างนอกหลอดทดลองใบย่อยชุดที่ 2 นับจากยอด ที่มีความกว้าง 2.0-2.5 เซนติเมตร ยาว 6.5-7.0 เซนติเมตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ มาเซอไรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ปรับความดันออสโมติกด้วยแมนนิทอล หรือซอร์บิทอล เข้มข้น 0.5 0.6 และ 0.7 โมลาร์ หรือ แมนนิทอล ร่วมกับ ซอร์บิทอล เข้นข้นชนิดละ 0.25, 0.3 และ 0.35 โมลาร์ อินคิวเบทที่อุณหภูมิ 25.5±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าไปมาที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที ในที่ความเข้มแสงต่ำ นำไปแยกโปรโตพลาสต์ ด้วยวิธีการในข้อ 5 นับจำนวนและตรวจสอบความมีชีวิต เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของออสโมติคัมโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT

7. ผลของขนาดใบต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

นำใบนอกหลอดทดลองก้านใบย่อยชุดที่ 2 นับจากยอด ที่มีความกว้าง 1.5-2.0, 2.1-3.0 และ 3.1-4.0 เซนติเมตร จุ่มแช่ใบที่หั่นฝอยน้ำหนัก 1 กรัม ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส

เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งละลายในแมนนิทอล 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร อินคิวเบทเป็นเวลา 3 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าไปมาที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที ในที่ความเข้มแสงต่ำ นำไปแยกโปรโตพลาสต์ ด้วยวิธีการในข้อ 5 นับจำนวนและตรวจสอบความมีชีวิต เปรียบเทียบกันในแต่ละขนาดใบโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT

8. ผลของวิธีการเตรียมใบสะเดาช้างที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์ต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษาวิธีการเตรียมใบสะเดาช้างที่จะนำมาแยกโปรโตพลาสต์ 4 วิธี คือ เก็บใบย่อยชุดที่ 2 นับจากยอดมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว ชั่งน้ำหนักให้ได้ 1 กรัม แล้วนำไปวางในจานเพาะเลี้ยงฆ่าเชื้อ วางในจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหารสูตร MS เติม BA และ 2,4-D อย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แช่ใบในสารละลายล้างโปรโตพลาสต์ที่ประกอบด้วยแมนนิทอล เข้มข้น 0.4 โมลาร์ ทั้ง 3 วิธี เก็บในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และใบสดที่ไม่ผ่านการเตรียมด้วยวิธีการใด ๆ อินคิวเบทใบที่เตรียมทั้ง 4 วิธี ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเอนไซม์มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ในที่ความเข้มแสงต่ำ ที่อุณหภูมิ 26$\pm$1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ทำการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการในข้อที่ 5 บันทึกจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์เปรียบเทียบกันในแต่ละวิธีการเตรียม

9. ผลของแหล่งชิ้นส่วนพืชต่อจำนวน และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

ในการศึกษานี้ใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นในการแยกโปรโตพลาสต์จาก 3 แหล่ง คือ ใบ แคลลัส และเซลล์ซัสเพนชั่น ดังนี้คือ

ใบ : ใช้ใบย่อยชุดที่ 2 จากนอกหลอดทดลอง จุ่มแช่ใบที่หั่นฝอยน้ำหนัก 1 กรัม ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และแมนนิทอล เข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร อินคิวเบทเป็นเวลา 3 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าไปมาที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที ในที่ความเข้มแสงต่ำ

แคลลัส : ได้จากการเพาะเลี้ยงใบ และเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 4 สัปดาห์ หลังการย้ายเลี้ยง ชั่งน้ำหนักให้ได้ 1 กรัม แช่ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วม

กับ มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และแมนนิทอล เข้มข้น 0.3 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร อินคิวเบทบนเครื่องเขย่าไปมาที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ในที่ความเข้มแสงต่ำ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

เซลล์ซัสเพนชั่น : ชักนำจากแคลลัสโดยเขย่าเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าแบบวงกลม ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,200 ลักซ์ หลังจากย้ายเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น 5 วัน ปรับปริมาตรตะกอนเซลล์โดยเทเซลล์ซัสเพนชั่นลงในหลอดเซนตริฟิวก์ (ปริมาตร 20 มิลลิลิตร) ปล่อยให้เซลล์ตกตะกอนปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้เวลาประมาณ 5 นาที แล้วดูดอาหารออก จากนั้นเทสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ และแมนนิทอล เข้มข้น 0.3 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไปแทน เขย่าให้เข้ากัน แล้วเทลงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกฆ่าเชื้อขนาด 15x60 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปอินคิวเบทในสภาพความเข้มแสงต่ำ บนเครื่องเขย่าแบบไปมาที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ในที่ความเข้มแสงต่ำ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

เมื่ออินคิวเบทครบตามเวลาที่กำหนด ทำการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการในข้อที่ 5 นับจำนวนและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบ แคลลัส และเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม ไฟต้าเจล เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ 2,4-D เข้มข้น 0.5-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอล (ความเข้มข้นเท่ากับสารละลายเอนไซม์) เปรียบเทียบจำนวนโปรโตพลาสต์ จำนวนวันที่เริ่มแบ่งเซลล์ เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์และแตกหน่อ เปรียบเทียบกันระหว่างโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบ แคลลัส และเซลล์ซัสเพนชั่น

10. ผลของความหนาแน่นในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

ใช้โปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบสะเดาช้างนอกหลอดทดลอง ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ นำโปรโตพลาสต์มาปรับความหนาแน่นที่ใช้ในการเลี้ยง 4 ระดับ คือ $5x10^4$, $1x10^5$, $5x10^5$ และ $1x10^6$ ต่อมิลลิลิตร แล้วเพาะเลี้ยงแบบฝังเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ไฟต้าเจล เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.4 โมลาร์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ 2,4-D ชนิดละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่ากัน ตรวจสอบการแบ่งเซลล์หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ และการแตกหน่อเปรียบเทียบกันในแต่ละความหนาแน่นที่ใช้เลี้ยง

11. ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบนอกหลอดทดลอง ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์เอส เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยความหนาแน่นเริ่มต้น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ไฟต้าเจล เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.4 โมลาร์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ dicamba เข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ เติมอาหารเหลวที่ลดความเข้มข้นของออสโมติคัมลงจากเดิม 0.1 โมลาร์ ภายใต้สภาพแสงต่ำ อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส บันทึกผลการแบ่งเซลล์และการแตกหน่อของโปรโตพลาสต์เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตและออสโมติคัมหลังเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์

12. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและการลดออสโมติคัมหลังจากเพาะเลี้ยง 1-2 วัน ต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบนอกหลอดทดลอง ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์เอส เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยความหนาแน่นเริ่มต้น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ไฟต้าเจล เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ แมนนิทอล เข้มข้น 0.4 โมลาร์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ NAA เข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นใช้ร่วมกับ BA หรือ KN เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยง 1-2 วัน แบ่งโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กัน โดยชิ้นหนึ่งยังอยู่ในจานเพาะเลี้ยงเดิม ส่วนอีก 1 ชิ้น นำไปใส่จานเพาะเลี้ยงใหม่แล้วเติมอาหารสูตรเดียวกับที่เพาะเลี้ยงเริ่มต้นแต่ลดความเข้มข้นของออสโมติคัมเป็น 0.3 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ ภายใต้สภาพแสงต่ำ อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส บันทึกผลการแบ่งเซลล์และการแตกหน่อของโปรโตพลาสต์เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต และการลดหรือไม่ลดออสโมติคัมหลังเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์