## 3. วิธีการทดลอง

**วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ** แผนการศึกษาและรายละเอียดอุปกรณ์และสารเคมีที่จำเป็นแสดงเป็นหัวข้อ ส่วนรายละเอียดการศึกษาจะอธิบายในแต่ละตอน (ภาพที่ 2)

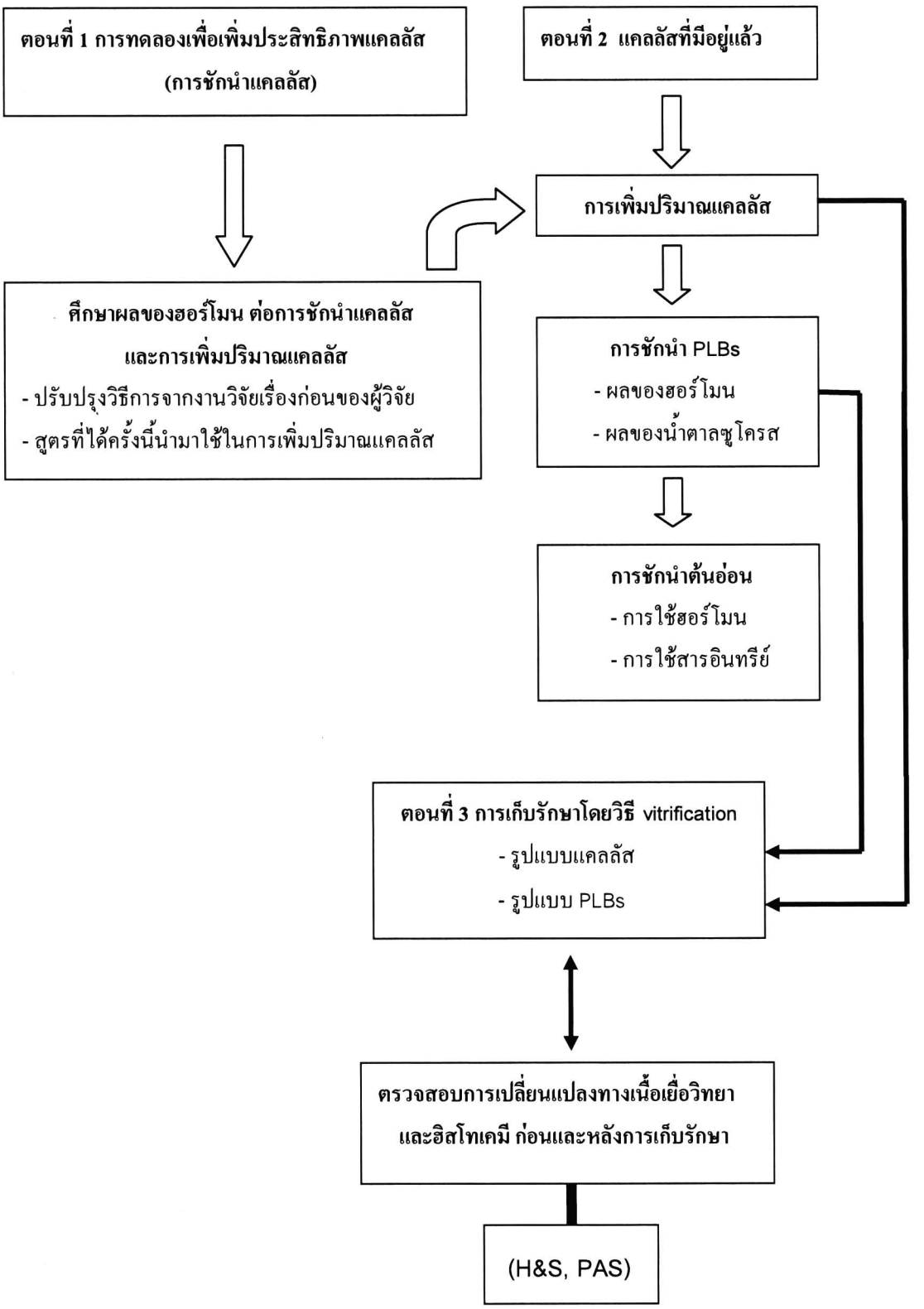
**พืชที่ทำการศึกษา** ฝักกล้วยไม้กล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล ( *Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz.) ที่มีอายุประมาณ 6-7 เดือน

**สูตรอาหารเพาะลี้ยง** (ภาคผนวก)

จากการศึกษาเบื้องต้น (preliminary studies) พบว่าสูตรอาหารที่ใช้ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล ในแต่ละระยะการเจริญเติบโตมี 3 สูตร

| | |
|---|---|
| สูตรอาหาร CIM | ใช้ในการทดลองการชักนำแคลลัส (เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ) |
| สูตรอาหาร PLBIM | ใช้ในการทดลองการชักนำโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ |
| สูตรอาหาร SLIM | ใช้ในการชักนำต้นอ่อน |

โดยทุกสูตรจะปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 และ 1 นอร์มัล จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที




**ภาพที่** 2 ไดอะแกรมแสดงแผนการทดลอง

**สารเคมี**

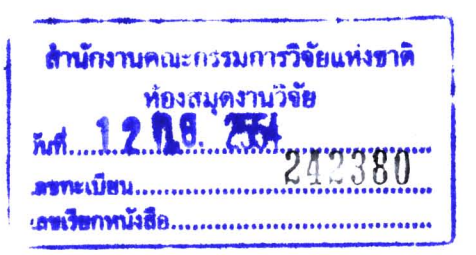
1. สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ
   - เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์
   - คลอรอกซ์ และทวีน 20

2. สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
   - สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ (ภาคผนวก)
   - สารเคมีที่ใช้ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหาร คือ สารละลายกรดไฮโดรคลอริก และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ความเข้มข้น 0.1 และ 1 นอร์มัล)
   - สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน คือ 2,4-D (บริษัท Sigma) และ NAA (บริษัท Fluka) และสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนิน คือ TDZ (บริษัท Sigma)
   - น้ำตาลซูโครส
   - ไฟตาเจล (Phytagel; บริษัท Sigma)
   - วุ้น (ตรานางเงือก)
   - ผงถ่านกัมมันต์ (บริษัท Riedel-de Haën)
   - มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L.)
   - กล้วยหอมทอง (Musa (AAA group) "Kluai Hom Thong") ระยะที่เปลือกมีสีเขียวอมเหลือง

3. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

   *สารเคมีสำหรับวิธีพาราฟิน*
   - acetic acid
   - butyl alcohol
   - ethyl alcohol
   - formaldehyde
   - liquid paraffin
   - paraplast plus

   *สารเคมีสำหรับการย้อมสี*
   - absolute ethyl alcohol
   - acidulated water
   - ammomium hydroxide



- cloved oil
- hematoxylin
- ethyl alcohol
- fast green
- Hi-mo
- lithium carbonate
- picric acid
- safranin O
- xylene
- clearite

*สารเคมีสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด* (scanning electron microscope; SEM) ประกอบด้วย

- formalin
- acetic acid
- absolute ethyl alcohol
- triton x-100
- NaH2PO4.2H2O
- Na2HPO4

## อุปกรณ์

1, อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ/ เตรียมอาหาร

- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Ohaus รุ่น SPS 601
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น Drogon 303
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ยี่ห้อ Orion รุ่น SA 520
- เตาอบไมโครเวฟ ยี่ห้อ Best Plus รุ่น MO-140
- หม้อนึ่งความดันไอ ยี่ห้อ Tomy รุ่น SS-320
- เตากวนแม่เหล็กไฟฟ้า ยี่ห้อ Framo-Gerätetechnik รุ่น M 21/1
- กระบอกฉีดยา (syringe)
- ปากคีบ
- มีดผ่าตัด
- จานเพาะเลี้ยงที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

- ตะเกียงแก๊ส
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air-flow cabinet) ยี่ห้อ ISSCO รุ่น ER-7800
- ตู้อบเครื่องแก้ว ยี่ห้อ Termaks รุ่น T 1119 UV
- เครื่องเขย่าเลี้ยงด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที
- เครื่องวัดความเข้มแสง ยี่ห้อ Microvolt Integrator รุ่น MV 2
- หลอดทดลอง
- กระดาษอะลูมิเนียม
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
- อุปกรณ์เครื่องแก้ว เช่นกระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ จานเพาะเลี้ยงแท่งแก้วคน บีกเกอร์ ปิเปตขนาดต่างๆ ขวดปรับปริมาตร และขวดแก้วเพาะเลี้ยง

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

- เครื่องไมโครโทม (microtome) ยี่ห้อ AO รุ่น 820 SPENCER
-เครื่องอุ่นสไลด์ ยี่ห้อ Kunz instruments รุ่น HP 3
- อ่างลอยเนื้อเยื่อ (floating bath)
- ตู้อบแห้ง ยี่ห้อ Memmert
- ตู้ดูดไอสารเคมี (flume hood) ยี่ห้อ Flexlab รุ่น SH-150 และยี่ห้อ Astecair รุ่น 3000L
- เครื่องฝังชิ้นเนื้อเยื่อ (paraffin embedding center) ยี่ห้อ Leica
- ตู้หลอมพาราฟิน ยี่ห้อ Gallenkamp
- กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ยี่ห้อ Zeiss รุ่น Stemi DV 4
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงยี่ห้อ Olympus รุ่น CH 30
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงยี่ห้อ Olympus รุ่น BX 51 พร้อมกล้องถ่ายรูป (Olympus DP71)
- กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5800LV และยี่ห้อ FEI รุ่น Quanta 400
- กล้องถ่ายรูป ยี่ห้อ Panasonic รุ่น DMC-FZ 18
- กล่องเก็บสไลด์
- กล่องพักสไลด์
- บล็อกพลาสติก (embedding ring)
- กระทงโลหะ (mold)
- อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ขวดเก็บตัวอย่าง แผ่นสไลด์ กระจกปิดสไลด์ พู่กันเข็มเขี่ย มีดไมโครโทม ปากคีบ คอปปลิ้นจาร์ (coplin jar)

## ตอนที่ 1 : การทดลองเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพแคลลัส (การชักนำแคลลัสจากเมล็ด)

### 1.1. ผลของฮอร์โมน TDZ ร่วมกับ 2,4 D ต่อการเกิดเป็นแคลลัส

นำฝักกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลมาตัดแต่ง ทำความสะอาดด้วยน้ำยาทำความสะอาด และน้ำประปา 2- 3 ครั้ง นำฝักมาจุ่มในแอลกอฮอลล์ (ethanol 95 %) แล้วผ่านเปลวไฟ แช่ใน 20% คลอร๊อกซ์ 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง เปิดฝักออกเขี่ยเมล็ดลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อวางบนเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที วางในห้องที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ย้ายเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร CIM ร่วมด้วยฮอร์โมน 2,4-D (0,1,5 mg/l) และ TDZ (0, 0.1 ,0.5 mg/l ) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 9 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองทำ 10 ซ้ำ วางในห้อง ที่อุณหภูมิประมาณ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 1 เดือน แล้วจึงนำมาเพาะเลี้ยงโดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เก็บผลการทดลองเป็นเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ให้แคลลัส หรือเป็นโพรโทคอร์มคำนวณจากสูตรต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่เกิดเป็นแคลลัส}}{\text{จำนวนเมล็ดที่มีชีวิตทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงในขวด}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทคอร์ม} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่เกิดเป็นโพรโทคอร์ม}}{\text{จำนวนเมล็ดที่มีชีวิตทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงในขวด}} \times 100$$

## ตอนที่ 2 : การศึกษาจากแคลลัสที่มีอยู่แล้ว

### 2.1. การเพิ่มปริมาณแคลลัส

ทำการทดลองและปรับปรุงสูตรโดยใช้ข้อมูลร่วมกับงานวิจัยอีกเรื่องหนึ่งเพื่อศึกษาการเพิ่มปริมาณแคลลัสโดยใช้สภาวะการให้แสงในการทดลอง

**การชักนำแคลลัสเข้าแผนการเจริญเติบโต โดยผ่านระยะต่าง ๆ จนเกิดต้น**

### 2.2. การชักนำโพรโทคอร์มไลค์บอดี้หรือ PLBs / เพิ่มปริมาณ PLBs จากแคลลัส

#### 2.2.1. ผลของฮอร์โมน TDZ ร่วมกับ NAA ต่อการเกิดเป็น PLBs

โดยการย้ายเลี้ยงแคลลัส ลงบนอาหารแข็งสูตร PLBIM (protocorm - like body induction medium) ร่วมด้วย ฮอร์โมน NAA (0, 0.1 ,0.5 mg/l) และ TDZ (0, 0.5, 1 mg/l ) วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง ละ 10 ซ้ำ ใช้แคลลัสเริ่มต้น 20 มิลลิกรัม/ ขวดทดลอง วางเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มแสง 23 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ย้ายเลี้ยงทุก 1 เดือน เป็นเวลา 4 เดือน เดียวกับที่กล่าวข้างต้น ทำการทดลองเป็นเวลา 3-6 เดือน เก็บผลการทดลองเป็นน้ำหนักสดของ PLB ที่เพิ่มขึ้น ดังนี้น้ำหนักสดรวมของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้กับแคลลัสที่เพิ่มขึ้น และเปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (คำนวณตามสูตรด้านล่าง)

น้ำหนักสดรวมของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้กับแคลลัสที่เพิ่มขึ้น

= น้ำหนักโพรโทคอร์มไลค์บอดี้กับแคลลัสที่เกิดขึ้น - น้ำหนักเริ่มต้นของแคลลัส

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้} = \frac{\text{จำนวนขวดที่เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้}}{\text{จำนวนขวดทั้งหมดที่เพาะเลี้ยง}} \times 100$$

#### 2.2.2. ผลของน้ำตาลซูโครสต่อการเกิดเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้หรือ PLBs

ศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสปริมาณ 0, 10, 20, 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมและไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้

นำแคลลัสที่มีน้ำหนักประมาณ 8 มิลลิกรัมของน้ำหนักสด เลี้ยงบนอาหารสูตร PLBIM ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข้อมูลจากการทดลองเบื้องต้น) ร่วมกับน้ำตาลซูโครสปริมาณ 0, 10, 20, 30 กรัมต่อลิตร โดยทำการทดลองชุดการทดลองละ 7 ซ้ำ วางเลี้ยงในสภาพที่มีความเข้มแสง 23 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ย้ายเลี้ยงทุก 1 เดือน เป็น

เวลา 4 เดือน บันทึกผลการทดลองเป็นน้ำหนักสดรวมของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้กับแคลลัสที่เพิ่มขึ้น และเปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (คำนวณตามสูตรที่กล่าวมาแล้ว)

**2.3. การชักนำ PLBs ให้เป็นต้น**

**2.3.1. ผลของฮอร์โมนต่อการเกิดเป็นต้น**

ทำการย้ายเลี้ยงโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ บนอาหารแข็งสูตร PLBIM ร่วมด้วย TDZ 0.5 mg/l และ NAA 0.1 mg/l และเก็บผลการทดลองทุกเดือนเป็นระยะเวลา 4 เดือน เพื่อตรวจสอบความสามารถในการเกิดยอดและการเจริญเติบโตต่อไปได้หรือไม่ ในสภาวะที่มีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต

**2.3.2. ผลของสารอินทรีย์ (กล้วยบดและมันฝรั่งบด) ต่อการเกิดเป็นต้น**

ศึกษาผลของมันฝรั่ง และกล้วยหอมทองต่อการเจริญของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้เป็นต้น โดยนำกล้วยหอมทองและมันฝรั่งต้มสุกมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น ใช้โพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (ระยะที่มีความสูง/ยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร) น้ำหนักเริ่มต้น 20 มิลลิกรัม เลี้ยงบนอาหารสูตร SLIM ร่วมกับมันฝรั่งบดปริมาณ 0, 20, 50 กรัมต่อลิตร หรือกล้วยหอมบดปริมาณ 0, 20, 50 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ประมาณ 5.8 โดยทำการทดลองชุดการทดลองละ 10 ซ้ำ วางเลี้ยงในสภาพที่มีความเข้มแสง 23 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3-4 เดือน บันทึกผลการทดลองเป็นจำนวนยอดที่เกิดขึ้นต่อน้ำหนักโพรโทคอร์มไลค์บอดี้เริ่มต้น เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและปริมาณของสารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติ

**ตอนที่ 3 : การเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (-196 °C ) โดยวิธี vitrification**

**เก็บชิ้นส่วนพืชในรูปแบบแคลลัส/ และในรูปแบบ PLBs**

1 นำตัวอย่างพืชจากระยะ PLBs ทำการปรับสภาพชิ้นส่วนพืชโดยเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ที่เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.3 M เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง โดยวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 110 รอบต่อนาที

2 ตัดตัวอย่างเป็นชิ้นขนาด 1 มิลลิเมตรใส่ในหลอด cryotube ลดปริมาณน้ำภายในเซลล์ก่อนทำการทดลองโดยการแช่ในอาหารเหลวสูตร PLBIM ที่มี กลีเซอรอล (glycerol) เข้มข้น 2 M และ น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.4 M (loading solution) เป็นเวลา15 นาที ดูดสารละลายทิ้ง

3 ทำการศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่สารละลาย plant vitrification solution (PVS 2 ) ซึ่งประกอบด้วย กลีเซอรอล 30%(w/v) เอธิลีนไกลคอล (ethylene glycol ) 15%(w/v) และไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) 15%(w/v) โดยศึกษาที่ระยะเวลาต่างๆกัน ดังนี้ 0 20 40 60 80 100 และ 120 นาที ทำการทดลอง 7 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองทำ 5 ซ้ำ โดย 1 ซ้ำใช้ตัวอย่าง 10 ชิ้น นำชิ้นส่วนพืชจากทุกการทดลองมาเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาผ่านกระบวนการอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ดูดสารละลาย PVS 2 ทิ้ง

4 ล้างตัวอย่างโดยการแช่ในอาหารเหลวสูตร PLBIM ที่เติมซูโครส 1.2 M (unloading solution) เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายทิ้ง และเก็บตัวอย่างหลังการทดลองมาตรวจสอบลักษณะทางเซลล์ หรือเนื้อเยื่อ ตลอดจนฮิสโตเคมี

**วิธีการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาและฮิสโตเคมี**

ตรวจสอบลักษณะทางเนื้อเยื่อและฮิสโตเคมี ก่อนและหลังการเก็บรักษาชิ้นส่วน ในไนโตรเจนเหลว เตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศ์แบบใช้แสงด้วยวิธีพาราฟิน (Johensen,1964) ย้อม 2 สี ด้วยสีฮีมาท็อกไซลินและซาฟรานิน (hematoxylin และ safranin) ย้อมด้วย PAS (periodic acid Shiff reaction) และ Oil red O เพื่อตรวจดูสารประเภทคาร์โบไฮเดรตและไขมัน ตามลำดับ

**การวิเคราะห์ข้อมูล**

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้สถิติ( statical analysis ) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิเคราะห์ตามแผนการทดลองดังที่ได้กล่าวไปแล้ว และใช้ข้อมูลทางเนื้อเยื่อวิทยา(Histological observation ) ร่วมประกอบคำอธิบาย สรุปและประเมินผลตามลำดับ