

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. ผักกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร ได้แก่
 - เครื่องชั่ง (Balance)
 - เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
 - เตาอบความร้อน (Hot air water)
 - หม้อนึ่งความดันไอ (Auto clave)
 - เครื่องแก้ว ได้แก่ หลอดทดลอง กระบอกตวง ขวดแก้ว ปิเปต กรวยแก้ว แท่งแก้ว
3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการย้ายเนื้อเยื่อ
 - ตู้อบเชื้อ
 - ตะเกียงแอลกอฮอล์
 - จานแก้ว
 - มีดผ่าตัดแบบต่างๆ
 - ปากคีบ
 - ขวดอาหาร
 - อุปกรณ์อื่นๆ เช่นไม้ขีดไฟ

หมายเหตุ : อุปกรณ์ทุกอย่างต้องผ่านการอบหรือนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการตัดเนื้อเยื่อ
 - ใบมีด
5. สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่
 - 5.1 สารเคมีสำหรับฆ่าเชื้อ
 - แอลกอฮอล์ 95 %
 - แอลกอฮอล์ 70 %
 - น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ
 - 5.2 สารเคมีที่ใช้เตรียมสูตรอาหาร
 - Vacin and went (VW)
 - Murashige and Skoog(MS)
 - จิตราพรรณ

5.3 สารเคมีควบคุมการเจริญเติบโต
- ไฮโดรโคติน (BA และ โคเนติน)

5.4 สารโคลชิซิน

6. สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีเนื้อเยื่อ

1. แอลกอฮอล์ 70%, 95% และ 100%

2. SaffraninO

3. Xylene

4. คานาดาบาลซัม

7. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Culture room)

8. ชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อ

9. เครื่องควบคุมเวลา (Timer)

10. หลอดไฟ และหลอด UV

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การเพิ่มปริมาณ **protocorm-like bodies (plbs)** ของกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง โดยวิธี การผ่าโปรโตคอร์ม² ทิศทางด้วยกันคือ ผ่าครึ่งตามขวาง และการผ่าครึ่งตามยาว

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง

นำฝักอ่อนของกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง (*Dendrobium formosum*) อายุประมาณ 3 เดือน นำมาเพาะเลี้ยงจนเกิดเป็น **protocorm-like bodies** แล้วนำโปรโตคอร์มของกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงอายุ 6 เดือนหลังจากการเพาะเมล็ด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร นำมาผ่าตามแนวขวางออกเป็น 2 ส่วน (ได้แวนขยายขนาด 4x) โดยแยกเป็นส่วนด้านบนและส่วนด้านล่าง และผ่าตามยาว แบ่งออกเป็นสองส่วนเช่นกัน

2. อาหารที่ใช้เลี้ยงในการทดลอง

นำโปรโตคอร์มที่ผ่าทั้ง 2 ตำแหน่ง เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร **Vacin and Went (VW)** (1949) ดัดแปลงโดยเติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิตรต่อลิตร และผงถ่านกัมมันต์ 0.1 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหารแข็งสูตร **Murashige and Skoog (MS)** (1962) และอาหารสูตรจิตราพรธน (2536) ดัดแปลงโดยเติมผงถ่านกัมมันต์ 0.1 กรัมต่อลิตร

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงนี้ปรับให้มีค่า pH อยู่ที่ 5.8 ± 0.2 และเติมผงวุ้น 0.25% (gelrite) และนำอาหารที่เตรียมนี้มาเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดันระดับ 104 kPa อุณหภูมิ 121°C นาน 20 นาที

3. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ **factorial in CRD**(completely randomized design) ประกอบด้วยโปรโตคอร์มที่ได้จากการผ่าตามแนวขวาง แยกเป็นส่วนบน และส่วนล่าง และ โปรโตคอร์มที่ผ่าตามแนวยาว ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน ทำการเปรียบเทียบระหว่างการใช้ปัจจัย 2 ปัจจัยคือ

ปัจจัยแรก คือ สูตรอาหารที่ใช้ มี 3 สูตร คือ สูตร VW , MS และ จิตราพรธน

ปัจจัยที่สอง คือ ชิ้นส่วนของโปรโตคอร์มที่ทำการผ่าตามแนวขวางแบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยแยกเป็นส่วนด้านบนและส่วนด้านล่าง และผ่าตามยาว แบ่งเป็น 2 ส่วนเช่นกัน (ซ้ายและขวา)

หลังจากนำเนื้อเยื่อโปรโตคอร์มที่ผ่าในแนวต่างๆลงเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ทั้ง 3 สูตร ในสภาพปลอดเชื้อ นำขวดเพาะเลี้ยงวางบนชั้นวางขวดที่มีหลอดฟลูออเรสเซนต์สีขาว ซึ่งให้แสงสว่างนาน 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิห้อง 25 ± 2 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยง

โปรโตคอร์มนาน 45 วัน การทดลองนี้ทำ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด ขวดละ 5 ซีน หลังจากบันทึกอัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์ม (ร้อยละ) อัตราโปรโตคอร์มที่งอกขึ้นมาใหม่ (ร้อยละ) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นและให้คะแนนขนาดของกลุ่มโปรโตคอร์มที่เกิดขึ้น แบ่งเป็น 3 ระดับ ดังนี้

ระดับคะแนน	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโปรโตคอร์ม
1 คะแนน	1-3 มิลลิเมตร
2 คะแนน	3.1-5 มิลลิเมตร
3 คะแนน	5.1 มิลลิเมตรขึ้นไป

หลังจากได้ชิ้นส่วน และสูตรอาหารที่เหมาะสมแล้ว ทำการเปรียบเทียบชนิดของไฮโดโคติน (BA และ โคเนติน) ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนของโปรโตคอร์ม ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

นำขวดเนื้อเยื่อทั้ง 10 ทริตเมนต์ วางขวดเพาะเลี้ยงบนชั้นวางขวดเพาะเลี้ยงที่มีหลอดฟลูออเรสเซนต์สีขาว ซึ่งให้แสงสว่างนาน 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายขวดเปลี่ยนอาหารทุกๆ 15 วัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละทริตเมนต์ทำ 5 ซ้ำๆ ละ 1 ขวดๆ ละ 5 ซีน

บันทึกจำนวน(ร้อยละ) การรอดชีวิตของโปรโตคอร์ม การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

การทดลองที่ 2 ศึกษาถึงความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสมของการใช้สาร โคลชิซิน (colchicine) กับ โปรโตคอร์มของกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง

Protocorm-like bodies ของกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง อายุ 6 เดือนหลังจากการเพาะเมล็ด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร และโปรโตคอร์มที่ได้ทำการผ่า(จากการทดลองที่ 1)เลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร Vacin and Went (1949) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ที่มีสารโคลชิซินความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 0.01, 0.05, 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลานานต่างกันคือ 1, 3, 5, 7 และ 9 วัน จากนั้นย้ายลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Vacin and Went (1949) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นเวลานาน 30 วัน วางขวดเพาะเลี้ยงบนชั้นวางขวดเพาะเลี้ยงที่มีหลอดฟลูออเรสเซนต์สีขาว ซึ่งให้แสงสว่างนาน 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายขวดเปลี่ยนอาหารทุกๆ 15 วัน วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD มีทั้งหมด 25 ทริตเมนต์ แต่ละทริตเมนต์ทำ 5 ซ้ำๆ ละ 1 ขวดๆ ละ 5 โปรโตคอร์ม บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโปรโตคอร์ม ในแต่ละทริตเมนต์

นำโปรโตคอร์มที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยที่ผ่านการแช่สารโคลชิซินในอาหารเหลว นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Vacin and Went (1949) เป็นเวลา 30 วันแล้ว ทำการชักนำให้

โปรโตคอร์มพัฒนาไปเป็นต้น โดยนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลงที่เติม น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับกล้วยบด 100 กรัม น้ำต้มจากมันฝรั่ง 50 กรัม และผงถ่านกัมมันต์ 0.1 กรัม นำขวดเพาะเลี้ยง เลี้ยงบนชั้นวางขวดเพาะเลี้ยงที่มีหลอดฟลูออเรสเซนต์สีขาว ซึ่งให้แสงสว่างนาน 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส นาน 60 วัน โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 15 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละทรีทเมนต์ทำ 5 ซ้ำๆ ละ 1 ขวดๆ ละ 5 โปรโตคอร์ม บันทึกจำนวนต้นที่รอด เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

การทดลองที่ 3 การตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ

การตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอทำได้โดย นำไปตรวจด้วยเครื่อง flow cytometer ในการทดลองนี้ใช้เครื่องรุ่น PA II ใช้แหล่งแสงเหนือม่วง(UV) ร่วมกับสาร 4'6-diamidino-2-phenylindole(DAPI dye) ของบริษัท Partec ประเทศเยอรมัน

โดยทำการบดต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง 0.1-0.5 กรัม ใน CyStain UV Ploidy buffer ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ทำการกรองสารแขวนลอยนิวเคลียสผ่านตัวกรองขนาด 30 ไมโครเมตร เติม CyStain UV Ploidy buffer ลงในสารแขวนลอยเพิ่มอีก 500 ไมโครลิตร นำตัวอย่างที่ได้เข้าเครื่องวัดด้วย flow cytometer และบันทึกผลที่เกิดขึ้น

การทดลองที่ 4 ทางด้านสัณฐานวิทยาของใบต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง

ทำการส่องนับจำนวนเซลล์คุมของต้นกล้วยไม้ในหน่วยพื้นที่ และทำการวัดขนาดของเซลล์คุมใบ เปรียบเทียบระหว่างต้นกล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินและไม่ได้รับ

การทดลองที่ 5 ทางด้านกายวิภาคของรากต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง

ทำการตัดตามขวาง (free hand x-section) รากของต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างต้นกล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซินและไม่ได้รับ

การวิเคราะห์ผล

สถิติที่ใช้วิเคราะห์ผลการวิจัยมีดังนี้

การเพิ่มปริมาณ protocorm-like bodies (plbs) ของกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง โดยวิธี การผ่าโปรโตคอร์ม 2 ทิศทางด้วยกันคือ ผ่าครึ่งตามขวาง และการผ่าครึ่งตามยาว

- สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ factorial in CRD (completely randomized design) จากนั้นทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างการทดลองโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$)

เปรียบเทียบชนิดของไฮโดรโคติน (BA และ โคเนติน) ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เลี้ยงเงินหลวง

- สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ CRD (completely randomized design) จากนั้นทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างการทดลองโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$)

ศึกษาความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสมของการใช้สาร โคลชิซิน

- สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ CRD (completely randomized design) จากนั้นทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างการทดลองโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$)

ศึกษาถึงจำนวนเซลล์คุมที่เกิดจากต้นอ่อนกล้วยไม้ที่ได้รับสารโคลชิซิน

- สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ CRD (completely randomized design) จากนั้นทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างการทดลองโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$)

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มการทดลองเดือนมกราคม 2552 สิ้นสุดการทดลอง กุมภาพันธ์ 2553