บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

ส่วนที่ 1 การตรวจสอบสายพันธุ์ทานตะวันที่มียีนควบคุมการผลิตละอองเกสรเพศผู้ในไซโต-พลาสซึมแบบปกติที่ระดับดีเอ็นเอ และคัดเลือกสายพันธุ์สำหรับใช้ในการทดลองแยกเพาะเลี้ยง และรวมโปรโตพลาสต์

1.1 สายพันธุ์ทานตะวัน

สายพันธุ์ทานตะวันที่นำมาใช้ในการทดลองแยก เพาะเลี้ยง และรวมโปรโตพลาสต์ ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ คือ (1) สายพันธุ์ 10A เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นในประเทศไทย มีลักษณะเด่นคือ ให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูงถึง 41.40 เปอร์เซ็นต์ มีศักยภาพในการให้ลูกผสมที่ดี และมียีนควบคุมการเป็นหมัน ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์จาก ศ. ดร.ไพศาล เหล่าสุวรรณ และผศ. ดร.ฐิติพร มะชิโกวา (2) สายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติ จาก North Central Regional Plant Introduction Station รัฐไอโอวา สหรัฐอเมริกา โดยทำการคัดเลือกเพียง 1 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ได้แก่ Ames 3225, PI 221693, PI 307831, PI 318468, PI 377528, PI 420138, PI 431511, PI 441983, PI 480472 และ PI 500689 (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และฐิติพร มะชิโกวา, ติดต่อส่วนบุคคล) ซึ่งในเบื้องต้นคาดว่าสายพันธุ์ดังกล่าวมีไซโตพลาสซึมปกติทั้งหมด อย่างไรก็ตาม เพื่อความถูกต้อง จึงนำสายพันธุ์เหล่านี้มาตรวจสอบที่ระดับดีเอ็นเอเพื่อยืนยันการมีไซโตพลาสซึมปกติก่อนคัดเลือกไปใช้ในการถ่ายทอดไซโตพลาสซึมปกติให้กับสายพันธุ์ 10A โดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์ต่อไป

1.2 การตรวจสอบที่ระดับดีเอ็นเอและคัดเลือกสายพันธุ์ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติ

การตรวจสอบความปกติและเป็นหมันของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่ถูกควบคุมโดยยีนในไซโต-พลาสซึมในทานตะวันสามารถทำได้อย่างรวดเร็วด้วยการตรวจสอบที่ระดับดีเอ็นเออย่างจำเพาะเจาะจงที่ตำแหน่งของยีน *atpA* และบริเวณใกล้เคียง โดยอาศัยความแตกต่างของจำนวนและขนาดของท่อนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธีลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) เมื่อใช้ ไพรเมอร์ (primer) 3 ชนิด ที่สามารถระบุความแตกต่างของยีนดังกล่าวได้ (Rieseberg et al., 1994) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการมีไซโตพลาสซึมปกติและเป็นหมัน

ชื่อ	ลำดับเบส (5' → 3')
atpAF	GCCGCTAAACGATCGGACCAGACAGGCGCA
orfH522R	GCCCTTAGGGCCACCTTGTTGCGAAGTCAG
orfH873R	GTGGAAATCCCGGGGGAGCCCGTTCCTAGA

1.2.1 การสกัดดีเอ็นเอทานตะวัน

สกัดดีเอ็นเอทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติ จาก North Central Regional Plant Introduction Station จำนวน 10 สายพันธุ์ เพื่อตรวจสอบและยืนยันการมีไซโตพลาสซึมปกติ และสายพันธุ์ 10A เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบแถบดีเอ็นเอของการมีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.2.1.1 บดใบอ่อนทานตะวันในโกร่งที่มีไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด แล้วเติม extraction buffer [3% (w/v) cetyl trimethylammonium bromide (CTAB), 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA (pH 8.0), 2% (w/v) polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) และ 0.2% (v/v) β-mercaptoethanol] 700 µl ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°ซ เป็นเวลา 30 นาที โดยเขย่าหลอดทุก 5 นาที

1.2.1.2 เติม 24 : 1 chloroform : isoamyl alcohol ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

1.2.1.3 ถ่ายน้ำใสส่วนบนใสใน microcentrifuge tube หลอดใหม่ แล้วเติม 5 M NaCl ปริมาตร 0.5 เท่า จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol แช่เย็น ปริมาตร 1 เท่า กลับหลอดไปมาอย่างนุ่มนวล แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20°ซ ข้ามคืน

1.2.1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทน้ำใสส่วนบนทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง และตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง

1.2.1.5 ละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer [Tris-EDTA buffer; 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) และ 1 mM EDTA (pH 8.0)] 50 µl เติม RNAse (1 mg/ml) 10 µl แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 หรือ -20°ซ (Owens, 2003) เพื่อใช้ในการทดสอบโดยวิธี PCR

1.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรวจสอบ

1.2.2.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรวจสอบด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่ atpAF, orfH522R และ orfH873R (ตารางที่ 1)

1.2.2.2 เตรียม reaction mix (10 µl/ reaction) ซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ 50 ng, 0.4 µM orfH522R primer, 0.4 µM orfH873R primer, 0.4 µM atpAF primer, 0.1 mM dNTP, 1x buffer, 2 mM $MgCl_2$, 0.5 unit Taq DNA polymerase และใช้สภาวะสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้ 94°ซ เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 1 รอบ 94°ซ เป็นเวลา 1 นาที, 62°ซ เป็นเวลา

1 นาที และ 72°ซ เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 35 รอบ และ 72°ซ เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ (Rieseberg et al., 1994)

1.2.3 การตรวจสอบรูปแบบแถบดีเอ็นเอ

1.2.3.1 นำดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR มาตรวจสอบจำนวนและขนาดแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis บน 1% (w/v) agarose โดยให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

1.2.3.2 ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูภายใต้เครื่อง UV transilluminator ทานตะวันสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติจะแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 870 bp เพียงแถบเดียว ส่วนสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมเป็นหมันจะแสดงแถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ ขนาด 1,450 และ 870 bp (Rieseberg et al., 1994)

1.2.4 การคัดเลือกสายพันธุ์

คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติเพียง 1 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ดังกล่าวต้องสามารถผลิตเมล็ดพันธุ์ได้จำนวนมากด้วย

ส่วนที่ 2 การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน

ศึกษาอิทธิพลของชนิดเนื้อเยื่อ สายพันธุ์ วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่มีต่อการให้ผลผลิต ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต เมื่อแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวันด้วยเอนไซม์ผสม

2.1 การเตรียมเนื้อเยื่อพืช

เนื้อเยื่อพืชทั้งส่วนลำต้นอ่อนและใบเตรียมได้จากการเพาะเมล็ด และปลูกเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

2.1.1 การฟอกฆ่าเชื้อ

2.1.1.1 ฟอกฆ่าเชื้อผิวเปลือกเมล็ดทานตะวันด้วย 20% (v/v) clorox (2% (w/v) sodium hypochlorite) เป็นเวลา 20-60 นาที (ขึ้นอยู่กับสภาพเมล็ด) แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก

2.1.1.2 ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดที่แกะเปลือกแล้วด้วย 20% (v/v) clorox เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

2.1.1.3 ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดอีกครั้งโดยแช่ใน 5% (v/v) H_2O_2 เป็นเวลา 5 นาที แล้วลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออก

2.1.1.4 เพาะเมล็ดลงบนอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) (ตารางภาคผนวกที่ 1) ที่มี 2% (w/v) sucrose และ 0.8% (w/v) agar

2.1.2 การปลูกเลี้ยง

2.1.2.1 เนื้อเยื่อลำต้นอ่อน ปลูกเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 7 วัน

2.1.2.2 เนื้อเยื่อใบ ปลูกเลี้ยงโดยให้แสงที่ความเข้ม 2,000 ลักซ์ นาน 16 ชม./วัน เป็นเวลา 14 วัน (ดัดแปลงจาก Taski-Ajdukovic et al., 2006) จากนั้นตัดส่วนยอดของลำต้นไปปลูกเลี้ยงใน vermiculite ปลอดเชื้อที่เติมอาหารเหลว MS ที่มี 2% (w/v) sucrose จนกระทั่งต้นโต และแตกใบอ่อน มีใบจริง 4-6 ใบ ใช้ใบจริงที่แผ่เต็มที่แล้วในการแยกโปรโพตลาสต์

2.2 การแยกโปรโตพลาสต์

แยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน โดยจัดทรีตเมนต์แบบแฟกตอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (factorial in CRD) จำนวน 5 ซ้ำ ประกอบด้วย 3 ปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ดังแสดงในตารางที่ 2

2.2.1 การเตรียมเนื้อเยื่อก่อนย่อยผนังเซลล์

2.2.1.1 การแยกโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อน หั่นลำต้นอ่อนจำนวน 1 ก. เป็นท่อน ขนาด 5-10 มม. ผ่าครึ่งตามแนวยาว แล้วบ่มแช่ในสารละลายแยกโปรโตพลาสต์ ปริมาตร 15 มล. ที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 60 นาที (Krasnyanski and Menczel, 1993)

2.2.1.2 การแยกโปรโตพลาสต์จากใบ หั่นใบทานตะวันจำนวน 1 ก. เป็นชิ้น ขนาด 2 มม.^{2} ในสารละลายแยกโปรโตพลาสต์ แล้วบ่มแช่ในสารละลายแยกโปรโตพลาสต์ ปริมาตร 15 มล. ที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 60 นาที

2.2.2 การย่อยผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์ผสม

2.2.2.1 ใช้ปิเปตดูดสารละลายแยกโปรโตพลาสต์ทิ้ง แล้วเติมสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 15 และ 25 มล. สำหรับเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบ ตามลำดับ

2.2.2.2 บ่มย่อยผนังเซลล์ที่อุณหภูมิ 25°ซ ในที่มืด พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 70 และ 30 รอบต่อนาที สำหรับเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบ ตามลำดับ ตามระยะเวลาของแต่ละวิธีการ

2.2.2.3 กรองแยกโปรโตพลาสต์ออกจากเศษเนื้อเยื่อด้วยผ้าไนลอน และ nylon filter ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 62 และ 40 ไมโครเมตร ตามลำดับ

2.2.2.4 นำสารละลายเอนไซม์ที่มีโปรโตพลาสต์ไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนโปรโตพลาสต์ ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วใช้ปิเปตค่อย ๆ ดูดสารละลายเอนไซม์ทิ้ง

2.2.2.5 ล้างเอนไซม์ออกจากตะกอนโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายแยกโปรโตพลาสต์ ปริมาตร 10 มล. แล้วปั่นเหวี่ยงตกตะกอนโปรโตพลาสต์ที่ความเร็ว 1,000

รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที โดยล้าง 2 ครั้ง จากนั้นละลายตะกอนโปรโต-พลาสต์ด้วยสารละลายแยกโปรโตพลาสต์ปริมาตร 1-2 มล. (ขึ้นอยู่กับปริมาณตะกอนโปรโตพลาสต์)

2.2.2.6 นำสารละลายโปรโตพลาสต์จากข้อ 2.2.2.5 เติมลงบนสารละลายซูโคลส (0.5 M sucrose, 14 mM $CaCl_2.2H_2O$, 3 mM MES, pH 5.6) ปริมาตร 10 มล. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใช้ปิเปตดูดโปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ ซึ่งลอยอยู่ระหว่างสารละลายทั้งสองออกมาอย่างระมัดระวัง (Henn et al., 1998b)

2.3 บันทึกผลการทดลอง

1. **ผลผลิตโปรโตพลาสต์ (จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อน้ำหนักเนื้อเยื่อ 1 ก.)** โดยนับจำนวนโปรโตพลาสต์ด้วย haemacytometer จำนวน 10 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ย แล้วนำไปคำนวณความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ในปริมาตร 1 มล. จากนั้นคำนวณผลผลิตโปรโตพลาสต์จากสูตรด้านล่าง

   ผลผลิตโปรโตพลาสต์ = ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ × ปริมาตรของโปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ทั้งหมด

2. **เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์** โดยการย้อมสีโปรโตพลาสต์ด้วย fluorescine diacetate (FDA) (ตารางภาคผนวกที่ 2) แล้วนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิต (เรืองแสงสีเขียว) และจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด (เรืองแสงและไม่เรืองแสง) ใน 1 microscopic field แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตตามสูตรด้านล่าง ทำการสุ่มนับจำนวน 10 fields ต่อ 1 ตัวอย่าง แล้วหาค่าเฉลี่ย

   $$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์เรืองแสง}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

3. **จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิต** คำนวณได้จากสูตรด้านล่าง

   จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต = ผลผลิตโปรโตพลาสต์ × เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ / 100

2.4 วิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความปรวนแปรทางสถิติ (analysis of variance; ANOVA) ของผลผลิตโปรโต-พลาสต์ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของสายพันธุ์ วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์

ตารางที่ 2 ปัจจัยสายพันธุ์ วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase สำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน

เนื้อเยื่อ	สายพันธุ์	วิธีการ	เอนไซม์และโปรตีน	Isolation solution	pH	อุณหภูมิ (°ซ)	ระยะเวลาบ่มย่อย (ชม.)	อ้างอิง
ลำต้นอ่อน	10A และ PI 441983	M1	1% (w/v) macerozyme[1/], 1% (w/v) BSA และ 0.5, 1.0 หรือ 1.5% (w/v) cellulase[2/]	336 mM KCl, 16 mM $CaCl_2$ และ 3 mM MES	5.7	25	4	Binsfeld et al. (2000)
		M2	0.5% (w/v) macerozyme และ 0.5, 1.0 หรือ 1.5% (w/v) cellulase	308 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 41.7 mM $CaCl_2.2H_2O$ และ 3.3 mM MES	5.6	25	16	Krasnyanski and Menczel (1995)
ใบ	10A และ PI 441983	M3	0.05% (w/v) pectolyase[3/], 0.75% (w/v) macerozyme, 0.005% (w/v) driselase[4/], 1% (w/v) BSA และ 0.1, 0.5, 1.0 หรือ 1.5% (w/v) cellulase	340 mM KCl, 1.4 mM $CaCl_2.2H_2O$ และ 3 mM MES	5.6	25	16	Henn et al. (1998b)
		M4	0.05% (w/v) driselase, 0.02% (w/v) macerozyme, 0.1% (w/v) BSA และ 0.1, 0.5, 1.0 หรือ 1.5% (w/v) cellulase	336 mM KCl, 13.6 mM $CaCl_2$ และ 3.59 mM MES	5.7	25	16	Keller et al. (1997)
		M5	0.05% (w/v) pectolyase และ 0.1, 0.5, 1.0 หรือ 1.5% (w/v) cellulase	0.5 M mannitol และ 20 mM MES	5.6	25	6	Özdemir et al. (2002)

[1/] Macerozyme R-10, Kinki Yakult MFG, Japan

[2/] Cellulase Onozuka R-10, Yakult Honsha, Japan

[3/] Pectolyase, from *Aspergillus japonicus*, Sigma-Aldrich, Germany

[4/] Driselase, from *Basidiomycetes*, Sigma-Aldrich, Germany

ส่วนที่ 3 ศึกษาการเพาะเลี้ยงและปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและพัฒนาของโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน

ศึกษาอิทธิพลของวิธีการเพาะเลี้ยง ซึ่งประกอบด้วยชนิดอาหารและขั้นตอนการเพาะเลี้ยงต่างกัน ได้แก่ L4 regeneration (Lenée and Chupeau, 1986; ตารางภาคผนวกที่ 3) และ mKM regeneration (Wingender et al., 1996; ตารางภาคผนวกที่ 4) และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ ได้แก่ 5×10^3 และ 5×10^4 โปรโตพลาสต์/มล. เมื่อเพาะเลี้ยงในรูปแบบ agarose droplet (Shillito et al., 1983) ที่มีต่อการเจริญและพัฒนาของโปรโตพลาสต์เนื้อเยื่อลำต้นอ่อนจากทานตะวันสายพันธุ์ 10A และเนื้อเยื่อใบจากทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 ไปสู่การสร้างกลุ่มโคโลนี โดยจัดทรีตเมนต์แบบแฟกตอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 5 ซ้ำ สำหรับแต่ละแหล่งโปรโตพลาสต์

3.1 การเพาะเลี้ยงในรูปแบบ agarose droplets

3.1.1 การเตรียมโปรโตพลาสต์

3.1.1.1 ตรวจนับความหนาแน่น และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์บริสุทธิ์

3.1.1.2 ปรับความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ด้วยอาหารเหลวชนิด L4M หรือ mKM โดยให้มีความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตที่ 1×10^4 และ 1×10^5 โปรโตพลาสต์/มล.

3.1.2 การเตรียม agarose

3.1.2.1 เตรียม 0.6% (w/v) agarose ปริมาตร 4 เท่า ในน้ำกลั่น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

3.1.2.2 ผสมอาหารเหลวเข้มข้น 2 เท่า ชนิด L4M และ mKM กับ agarose ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในขณะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิประมาณ 70-80°ซ ในอัตราส่วน 1:1

3.1.3 การทำ droplets

3.1.3.1 ผสมโปรโตพลาสต์จากข้อ 3.1.1.2 กับอาหารจากข้อ 3.1.2.2 (ขณะอาหารมีอุณหภูมิประมาณ 40°ซ) ในอัตราส่วน 1:1 โดยผสมให้โปรโตพลาสต์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งอาหาร

3.1.3.2 ใช้ปิเปตดูดส่วนผสมจากข้อ 3.1.3.1 ปริมาตร 100 µl หยดลงในจานพลาสติกที่เย็น จำนวน 20 หยด/จาน แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ ในที่มืด เป็นเวลา 1 ชม. โดยทำทั้งหมด 5 จาน/ตัวอย่าง

3.1.3.3 เติมอาหารเหลว L4M และอาหารเหลว mKM ปริมาตร 7 มล. รอบ ๆ agarose droplets แล้วปิดผนึกจานพลาสติกด้วยพาราฟิล์ม

3.2 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยง

3.2.1 วิธี L4 regeneration

3.2.1.1 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°ซ ในที่มืด เป็นเวลา 10 วัน

3.2.1.2 ย้ายมาเพาะเลี้ยงในสภาพมีแสงประมาณ 2,000 ลักซ์ นาน 16 ชม./วัน และเปลี่ยนอาหารเหลวรอบ ๆ agarose droplets โดยใช้ปิเปตดูดอาหารเดิมปริมาตร 0.5 เท่า ทิ้ง แล้วเติมอาหารเหลว L'4M ที่ปริมาตรเดียวกันลงไปแทน เปลี่ยนอาหารเช่นนี้ทุก 1 สัปดาห์ กระทั่งเกิดการสร้างโคโลนี และไมโครแคลลัส

3.2.2 วิธี mKM regeneration

3.2.2.1 สัปดาห์ที่ 1 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว mKM ที่เติม 4 μM BAP, 5 μM NAA และมี osmolarity อยู่ที่ 600 mosmol kg H_2O^{-1} และเลี้ยงในที่มืด

3.2.2.2 สัปดาห์ที่ 2 เปลี่ยนอาหารเป็นอาหารเหลว mKM ที่เติม 10 μM 2,4-D และมี osmolarity อยู่ที่ 500 mosmol kg H_2O^{-1} และเลี้ยงในที่มืด

3.2.2.3 สัปดาห์ที่ 3 เปลี่ยนอาหารเป็นอาหารเหลว mKM ที่เติม 4 μM BAP, 0.5 μM NAA และมี osmolarity อยู่ที่ 400 mosmol kg H_2O^{-1} และเลี้ยงในที่มืด

3.2.2.4 สัปดาห์ที่ 4 เปลี่ยนอาหารเป็นอาหารเหลว mKM ที่เติม 4 μM BAP, 0.5 μM NAA และมี osmolarity อยู่ที่ 300 mosmol kg H_2O^{-1} แล้วย้ายไปเลี้ยงในที่มีแสงประมาณ 2,000 ลักซ์ นาน 16 ชม./วัน

3.3 บันทึกผลการทดลอง

1. **เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 21 วัน** โดยนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีการแบ่งเซลล์ และจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด (แบ่งเซลล์และไม่แบ่งเซลล์) ใน 1 microscopic field ภายใต้กล้อง Inverted microscope ที่กำลังขยาย 100X จำนวน 125 fields ทำการสุ่มนับ 5 จาน/ตัวอย่าง 5 หยด/จาน และ 5 microscopic fields/หยด แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ดังสูตรด้านล่าง

$$\text{เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีการแบ่งเซลล์}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

2. **เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีที่อายุ 35 วัน** โดยนับจำนวนกลุ่มโคโลนีและจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด (รวมโปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แต่ไม่พัฒนาเป็นโคโลนีและไม่แบ่งเซลล์ด้วย) ใน 1 microscopic field ภายใต้กล้อง Inverted microscope ที่กำลังขยาย 100X จำนวน 125 fields ทำการสุ่มนับ 5 จาน/ตัวอย่าง 5 หยด/จาน และ 5 microscopic fields/หยด แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีดังสูตรด้านล่าง

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนี} = \frac{\text{จำนวนกลุ่มโคโลนี}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.4 วิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความปรวนแปรทางสถิติ (ANOVA) ของเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 21 วัน และเปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีที่อายุ 35 วัน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT เพื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ ที่มีผลต่อการแบ่งเซลล์และการพัฒนาเป็นกลุ่มโคโลนีของโปรโตพลาสต์

ส่วนที่ 4 ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ โดยการใช้สารเคมี PEG

ศึกษาอิทธิพลของระดับความเข้มข้น PEG 8000 ที่ 0, 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ ที่ 10, 15 และ 20 นาที ที่มีต่ออัตราการรวมโปรโตพลาสต์ โดยรวมระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนจากสายพันธุ์ 10A กับโปรโตพลาสต์ใบจากสายพันธุ์ PI 441983 จัดทรีตเมนต์แบบแฟกตอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 5 ซ้ำ

4.1 การเตรียมโปรโตพลาสต์

4.1.1 แยกโปรโตพลาสต์และทำให้โปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ปราศจากสิ่งเจือปนซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการรวมโปรโตพลาสต์

4.1.2 ตรวจนับและปรับความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ให้อยู่ที่ 1×10^6 โปรโตพลาสต์/มล. ด้วยสารละลายแยกโปรโตพลาสต์

4.1.3 นำสารละลายโปรโตพลาสต์จากแต่ละแหล่งเนื้อเยื่อผสมเข้าด้วยกันในอัตราส่วน 1:1

4.2 การเตรียมสารละลาย PEG

4.2.1 เตรียม PEG 8000 ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในสารละลายที่ประกอบด้วย 5% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO), 90 mM mannitol, 60 mM $CaCl_2$ และ 25 mM glycine, pH 5.6-5.7 (Binsfeld et al., 2000)

4.3 การชักนำการรวมโปรโตพลาสต์

4.3.1 ผสมสารละลายโปรโตพลาสต์ในข้อ 4.1.3 กับสารละลาย PEG ในอัตราส่วน 1:1 โดยค่อย ๆ เติมสารละลาย PEG ลงในสารละลายโปรโตพลาสต์อย่างช้า ๆ

4.3.2 ตรวจนับการเกิดการรวมโปรโตพลาสต์ที่แต่ละช่วงเวลาภายใต้กล้อง Inverted microscope ที่กำลังขยาย 400X

4.4 บันทึกผลการทดลอง

4.4.1 เปอร์เซ็นต์ binary fusion โดยนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดการรวมกันเพียงสองโปรโตพลาสต์ และจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมดใน 1 microscopic field เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ binary fusion ดังสูตรด้านล่าง ทำการสุ่มนับจำนวน 6 fields แล้วหาค่าเฉลี่ย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 14 พ.ย. 2555
เลขทะเบียน 248745

$$\text{เปอร์เซ็นต์ binary fusion} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิด binary fusion}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

4.4.2 เปอร์เซ็นต์ multi fusion โดยนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดการรวมกันตั้งแต่ 3 โปรโตพลาสต์ขึ้นไป และจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมดใน 1 microscopic field เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ multi fusion ดังสูตรด้านล่าง ทำการสุ่มนับจำนวน 6 fields แล้วหาค่าเฉลี่ย

$$\text{เปอร์เซ็นต์ multi fusion} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิด multi fusion}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

4.5 วิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความปรวนแปรทางสถิติ (ANOVA) ของเปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT เพื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของระดับความเข้มข้น PEG 8000 และระยะเวลาชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ที่มีผลต่ออัตราการรวมโปรโตพลาสต์ทั้ง 2 รูปแบบ