บทที่ 3

วิธีการวิจัย

การสร้างพันธุ์ยาสูบลูกผสมที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่าง โดยวิธีการทางโปรโตพลาสต์เทคโนโลยีในครั้งนี้แบ่งการศึกษาหลักออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

1. การเพาะเลี้ยงอับเรณูของยาสูบ 2 พันธุ์ ได้แก่ TN 90 และ Xanthi nc
2. การรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างยาสูบพันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู โดยการใช้กระแสไฟฟ้า

การเพาะเลี้ยงอับเรณูของยาสูบพันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc

การเตรียมพืช ปลูกต้นยาสูบในเรือนทดลองโดยการเพาะเมล็ด ดูแลรักษาต้นยาสูบด้วยการใส่ปุ๋ยและฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชอย่างสม่ำเสมอ ตลอดจนควบคุมอุณหภูมิในโรงเรือนให้อยู่ในระดับ 25 °C เมื่อยาสูบอยู่ในระยะเริ่มออกดอก ตัดช่อดอกใส่ในถุงพลาสติกที่มีกระดาษชุบน้ำให้ชื้นเพื่อกันการเหี่ยวของดอก แล้วนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ (cold pretreatment) ที่ 4 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการเกิดต้นอ่อนจากอับเรณู

การฆ่าเชื้อ เลือกดอกยาสูบที่ตูมและเพิ่งมองเห็นกลีบดอกอยู่เหนือกลีบเลี้ยงเพียงเล็กน้อย (ขนาดดอกประมาณ 10-15 มม.) มาฆ่าเชื้อที่ผิวโดยการจุ่มในเอธิลอัลกอฮอล์ 70% ทิ้งไว้ให้แห้งพอหมาด แล้วแช่ดอกในสารละลาย Clorox 10% ผสม Tween 20 ประมาณ 1-2 หยด นาน 15 นาที เขย่าเป็นระยะ ๆ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วอีก 3 ครั้ง ๆ ละประมาณ 5 นาที

การแยกอับเรณู นำดอกที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาวางบนจานแก้วใช้ปากคีบปลายแหลม (tweezer) เขี่ยให้กลีบดอกแยกออกจากกันจนมองเห็นอับเรณู สะกิดให้อับเรณูหลุดออกจากก้านชู (filament) โดยสะกิดตรงโคนในตำแหน่งรอยต่อของอับเรณูกับก้านชูอับเรณูพอดี โดยไม่ให้ส่วนของอับเรณูช้ำหรือมีก้านชูอับเรณูติดมา

การทดลองที่ 1 ศึกษาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของต้นอ่อนยาสูบจากอับเรณู

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ทำ 10 ซ้ำ มี 2 วิธีการโดยใช้อาหารสูตร Nitsch and Nitsch (1969) ที่เติม activated charcoal 2.0% และผสมวุ้น 0.5% เพื่อให้ได้อาหารกึ่งแข็ง และอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) ที่ปราศจากสารเร่งการเจริญเติบโต และผสมวุ้น 0.7% วางอับเรณูบนอาหารที่ใช้เลี้ยงจำนวน 5 อันต่อขวดแล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 24-27 °C ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนส์ที่ความเข้มของแสง 2,000 ลักซ์ นาน 14 ชั่วโมงสลับกับในที่มืดอีก 10 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกจำนวนของอับเรณูที่งอก วันที่งอก การเจริญเติบโต เช่น การสร้างยอดและราก แล้วนำข้อมูลไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การทดลองที่ 2 ตรวจสอบระดับชุดของโครโมโซม (ploidy level) ของต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู

2.1 การวัดขนาดของเซลล์ปากใบ (stomatal measurement) และการศึกษาลักษณะในทางเกษตร (agronomic performance) บางประการ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ทำ 10 ซ้ำ มี 4 วิธีการ ใช้ต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู (haploid) และต้นยาสูบปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ด (diploid) ทั้ง 2 พันธุ์ เป็นวิธีการ โดยตัดใบมาบันทึกความกว้างและความยาวของเซลล์ปากใบและนับจำนวนคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์ปากใบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตามวิธีการของ Reed (1993) ส่วนการศึกษาลักษณะบางประการในทางเกษตร ทำการทดลองในเรือนกระจกโดยเพาะเมล็ดยาสูบพันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc เพื่อใช้เป็นวิธีการชุดเปรียบเทียบ (control) เมื่อต้นกล้าอายุได้ 45 วันจึงทำการย้ายปลูกลงในกระถาง พร้อมกับย้ายต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูในอาหารสังเคราะห์ลงปลูก บันทึกลักษณะบางประการในทางเกษตรของต้นยาสูบที่ได้เปรียบเทียบกันทั้ง 2 แหล่ง ตามวิธีการของ Kasperbauer *et al.* (1983) ได้แก่ ความกว้างและความยาวของใบ อัตราส่วนระหว่างความกว้างต่อความยาวของใบ จำนวนวันที่ออกดอก จำนวนใบต่อต้น และความสูงของต้น แล้วนำข้อมูลไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ

2.2 การตรวจนับโครโมโซม

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ทำ 10 ซ้ำ มี 4 วิธีการ ใช้ต้นยาสูบทั้ง 2 พันธุ์ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู (haploid) และที่ได้จากการเพาะเมล็ด (diploid) และตรวจนับจำนวนแท่งโครโมโซมด้วยวิธี Enzymatic Maceration/Air-Drying Method (EMA) (Fukui, 1996)

การทดลองที่ 3 การทดสอบความต้านทานต่อ TMV ของต้นยาสูบพันธุ์ Xanthi nc ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู

นำ clone ยาสูบแฮพลอยด์พันธุ์ Xanthi nc ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูทั้งหมด ลงปลูกในกระถางแล้วเก็บไว้ในสภาพเรือนทดลอง จากนั้นปลูกเชื้อไวรัส TMV โดยวิธีกล เพื่อทดสอบความต้านทานต่อ TMV โดย clone ที่ต้านทานจะแสดงอาการ local lesion หลังจากการปลูกเชื้อ

<u>การรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างยาสูบพันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู</u>

การเตรียมเอนไซม์ เตรียมสารละลายเอนไซม์ Macerozyme R 10 ร่วมกับเอนไซม์ Cellulase โดยชั่ง Macerozyme R 10 0.6 กรัม Cellulase 1.0 กรัม และ Stock ของสารละลาย SLLX × Major (10×) 1.9 มล. นำมาผสมกับสารละลายแมนนิทอล 0.35 โมลาร์ โดยปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 5.7 แล้วกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาด 0.22 ไมครอน แล้วเก็บเอนไซม์ที่อุณหภูมิ –30 °C

การเตรียมสารละลายสำหรับล้างโปรโตพลาสต์ (washing solution) ใช้สารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.35 โมลาร์ ซึ่งเตรียมโดยชั่ง mannitol 63.76 กรัม, MES 1.07 กรัม และ $CaCl_2.2H_2O$ 0.147 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.6 ฆ่าเชื้อโดยการนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

การแช่ใบพืชในส่วนประกอบของเอนไซม์ นำใบยาสูบมาลอกเซลล์ชั้นนอกด้านท้องใบออก ตัดเป็นชิ้นขนาดเล็กแล้วนำมาแช่ในเอนไซม์ปริมาตร 10 มล. ในจานเลี้ยงเชื้อขนาด 9 ซม. บ่มในสภาพแสงสลัวที่อุณหภูมิ 25 ±2 °C เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง

การแยกโปรโตพลาสต์ หลังจากการบ่มใบยาสูบในสารละลายเอนไซม์แล้ว นำสารละลายผสมของโปรโตพลาสต์กับเศษพืชมากรองผ่านไนลอนเมชขนาดช่อง 77 μ ใส่หลอดปั่นขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายเอนไซม์ตอนบน (supernatant) ออก ล้างตะกอนโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายล้างสำหรับล้าง นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วดูดออกเพื่อกำจัดสารละลายเอนไซม์ออกให้หมด แล้วนำตะกอนโปรโตพลาสต์ไปลอยบนสารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทำให้บริสุทธิ์ โดยปั่นที่ความเร็ว 700 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ใช้พาสเจอร์ไปเปตดูดเก็บโปรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์ ซึ่งจะลอยอยู่ตรงกลางระหว่างสารละลายแมนนิทอลและสารละลายซูโครส นำมาล้างอีก 2 ครั้งในสารละลายล้างปริมาตร 8 มิลลิลิตร ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์โดยการหยดสารละลายโปรโตพลาสต์ลงบนฮีมาไซโตมิเตอร์ เพื่อนับจำนวนโปรโตพลาสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกผล จำนวน ขนาด และรูปร่างโปรโตพลาสต์

การรวมโปรโตพลาสต์ นำโปรโตพลาสต์ที่ได้ในความเข้มข้นที่เหมาะสมมาผ่านกระบวนการรวมด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยเครื่อง Shimadzu Somatic Hybridizer รุ่น SSH-10 หลังจากนั้นนำโปรโตพลาสต์มาเพาะเลี้ยงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PS (1981) ที่เติม NAA เข้มข้น 2.25 มก./ล. ร่วมด้วย Zeatin เข้มข้น 0.75 มก./ล. และสารละลายแมนนิทอล เข้มข้น 0.35 โมลาร์ ปริมาตร 1 มล. ในจานพลาสติกปลอดเชื้อขนาด 15×60 มม. วางเลี้ยงในที่มืดอุณหภูมิ 26 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำมาไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพที่ควบคุมความชื้นของบรรยากาศประมาณ 85% และความเข้มแสงประมาณ 800-1,200 ลักซ์ หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ จึงเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่โดยดูดเอาอาหารเก่าออก แล้วเติมอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมซูโครส เข้มข้น 3.0%, 2, 4 -D เข้มข้น 0.25 มก./ล., BAP เข้มข้น 2.0 มก./ล. และแมนนิทอล เข้มข้น 0.35 โมลาร์ สังเกตการพัฒนาของโปรโตพลาสต์เป็นระยะ ๆ

การตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์โดยใช้สารละลายฟลูออเรสซินไดอะซีเตท (FDA) เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เติมลงในสารละลายโปรโตพลาสต์ในอัตราส่วนที่เท่ากันผสมให้เข้ากันดี ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที นำไปหยดบนสไลด์หลุม ปิดด้วยกระจกปิดแล้วนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรส-เซนส์ โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอเรสทำปฏิกิริยากับ FDA แล้วเรืองแสงสีเขียวเหลืองภายใต้คลื่นอัลตร้าไวโอเลต นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตเปรียบเทียบกับโปรโตพลาสต์ทั้งหมด คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ดังนี้ คือ

$$\% \text{ ความมีชีวิตโปรโตพลาสต์} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เรืองแสง} \times 100}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}}$$

พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ หลังจากตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PS (1981) เป็นเวลา 7 วันแล้วเปลี่ยนอาหารใหม่สูตร MS (1962) ที่เติมซูโครส เข้มข้น 3.0%, 2, 4 -D เข้มข้น 0.25 มก./ล., BAP เข้มข้น 2.0 มก./ล. และแมนนิทอล เข้มข้น 0.25 โมลาร์ แล้ววัดพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ ได้แก่ การแบ่งเซลล์ และการสร้างหน่อ ก่อนที่จะมีการเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ต่อไป

การทดลองที่ 1 การคัดเลือกลูกผสม

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ทำ 4 ซ้ำ มี 3 วิธีการ ใช้ลูกผสมที่ได้จากการรวมกันของโปรโตพลาสต์ยาสูบพันธุ์ TN 90 + Xanthi nc ที่เป็น haploid เป็นวิธีการ เปรียบเทียบกับชุดเปรียบเทียบอีก 2 วิธีการ คือ โปรโตพลาสต์จากยาสูบพันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc บันทึกจำนวนกลุ่มเซลล์ (calli) ที่งอก ขนาดและลักษณะ เปรียบเทียบกัน จากนั้น นำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองที่ 2 การตรวจนับโครโมโซมของต้นยาสูบที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ทำ 4 ซ้ำ มี 3 วิธีการ ใช้ต้นยาสูบที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างพันธุ์ TN 90 + Xanthi nc เปรียบเทียบกับชุดเปรียบเทียบ คือ ต้นยาสูบที่ได้จากการแยกโปรโตพลาสต์ของยาสูบพันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc (unfused) บันทึกจำนวนโครโมโซมแล้ว นำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองที่ 3 การทดสอบความต้านทานต่อโรคใบด่างของลูกผสม ในสภาพเรือนกระจก

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ทำ 4 ซ้ำ มี 3 วิธีการ ใช้ยาสูบปกติพันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc ที่ได้จากการเพาะเมล็ด และพันธุ์ลูกผสม TN 90 + Xanthi nc ที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์เป็นวิธีการ แต่ละวิธีการปลูกยาสูบ 10 กระถาง ๆ ละ 1 ต้น รวมปลูกยาสูบทั้งหมด 120 ต้น ทดสอบการเกิดโรคโดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล โดยการใช้ผงคาร์โบรันดัม บันทึกผลโดยการสำรวจหาระดับความต้านทานต่อโรคไวรัส โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Todd (1981) จากนั้นนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองที่ 4 การทดสอบความต้านทานต่อโรคใบด่างของลูกผสมในสภาพไร่

วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ (RCB) ทำ 4 ซ้ำ มี 3 วิธีการ ใช้ยาสูบปกติพันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc ที่ได้จากการเพาะเมล็ด และพันธุ์ลูกผสม TN 90 + Xanthi nc ที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์เป็นวิธีการ แต่ละวิธีการปลูกยาสูบ 2 แปลง ๆ ละ 2 แถว ๆ ละ 12 ต้น ระยะปลูก 0.60×1.20 ม. รวมปลูกทั้งหมด 576 ต้น ทดสอบความต้านทานโดยการปล่อยให้เกิดโรคตามสภาพธรรมชาติ บันทึกผลโดยการสำรวจหาระดับความต้านทานต่อโรคไวรัสโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Todd (1981) จากนั้น นำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติ