บทที่ 2

วิธีการทดลอง

ครุภัณฑ์

เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave) บริษัท Hirayama manufacturing corporation model HA-30

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) บริษัท Radiometer model PHM 83 Autocal

ตู้ย้ายเนื้อเยื่อที่มีบรรยากาศปลอดเชื้อ (Laminar flow) บริษัท ISSCO model 25

เครื่องกรองจุลินทรีย์ (Swinnex) พร้อมกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

เครื่องอบไมโครเวฟ (Microwave oven) บริษัท NEC model MC-300 TE

เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง Type 1507 บริษัท Sartorius, Germany

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง Type 1702 บริษัท Sartorius, Germany

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี่ (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) model LC-3A บริษัท Shimadzu, Japan

ตู้อบ บริษัท Memmert, Germany

เครื่องเลี้ยงเชื้อควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Rotary shaker) model G76D บริษัท New bronswick scientific co.inc., USA.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัสดุและเคมีภัณฑ์

1. เมล็ดพันธุ์หญ้าหวานที่ใช้ในการทดลอง

เมล็ดพันธุ์หญ้าหวาน (Stevia rebaudiana Bertoni) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทศิลป์อุดมเกษตรกรรม จังหวัดเชียงรายโดยผ่านศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. สารเคมี

คลอรอกซ์ (clorox) สารละลายที่มีโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCL) 0.525% เป็นองค์ประกอบ บริษัทลีเวอร์บราเธอร์ประเทศไทย

เอธานอล 70% และ 95% องค์การเภสัชกรรม

NAA (1-napthalene acetic acid) บริษัท Fluka., Switzer-land

2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) บริษัท Fluka., Switzerland

BA (Benzyladenine) บริษัท Sigma Chemicals Co.,U.S.A.

kinetin บริษัท Sigma Chemical Co.,U.S.A.

แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCo_3$) บริษัท Sigma Chemicals Co.,U.S.A.

สติวีรอไซด์ (Stevioside) บริษัท Sigma Chemicals Co.,U.S.A.

อะซีโตไนไตรล์ (Acetonirtrile) ชนิด HPLC grade บริษัท E.Merck Damstadt, Germany

ผงวุ้น (Agar powder) ห้างหุ้นส่วนจำกัด วอร์ด เมดิก

สารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้นอกจากที่กล่าวนี้ เป็นสารเคมีอยู่ในระดับเกรดวิเคราะห์ สั่งซื้อจากบริษัท Sigma Chemicals Co.,U.S.A. บริษัท BDH Chemical Ltd., England บริษัท Fluka., Switzerland เป็นต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ของ Murashige and Skoog (1962) (ภาคผนวกที่ 1)

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร B5 ของ Gamborg O.L. (1970) (ภาคผนวกที่ 2)

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร N6 ของ Chu et al. (1975) (ภาคผนวกที่ 3)

สภาวะมาตรฐานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องที่ประกอบด้วยชั้นสำหรับวางเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงในที่มืดและที่สว่างโดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 25± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซ็นต์ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ดูดสารอาหารจากสารละลายเริ่มต้น (stock) ที่เตรียมไว้ตามความเข้มข้นที่ต้องการ (ภาคผนวกที่ 1-3) ใส่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นประมาณ 500 มล. เติมสารควบคุมสารควบคุมการเจริญเติบโตและน้ำตาลซูโครสส 30 กรัมต่อลิตร คนให้ละลายแล้วนำไปปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ปรับ พีเอช 5.7 ด้วยกรด-ไฮโดรคลอริก (HCI) หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เติมผงวุ้น 7 กรัมต่อลิตร ต้มจนวุ้นละลาย เทใส่ภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะปลูกต้นหญ้าหวาน

นำเมล็ดพันธุ์หญ้าหวานที่ได้รับมาจากบริษัทศิลป์อุดมเกษตรกรรม จังหวัดเชียงรายไปปลูกลงกระถางใช้ดินร่วนซุย ตั้งกระถางให้ได้รับแสงแดด รดน้ำให้ความชื้นทุกเช้าเย็น

การเพาะเลี้ยงต้นหญ้าหวานในสภาพปลอดเชื้อ

1. การเพาะเมล็ด

นำเมล็ดหญ้าหวานที่เก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิ 17 องศาเซลเซียส มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมทวีน 20 (Tween 20) ปริมาณ 1-2 หยด เป็นเวลา 20 นาที ล้างเมล็ดให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งนำไปเพาะบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2. การเพาะเลี้ยงส่วนกิ่ง

ตัดกิ่งที่แข็งแรงความยาวจากปลายยอดประมาณ 7 เซนติเมตร จากต้นหญ้าหวานที่ปลูกในธรรมชาติ นำมาล้างด้วยน้ำจนสะอาด ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมทวีน 20 ปริมาณ 1-2 หยด เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การศึกษาการเจริญเติบโตของพืชต่อขนาดภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

1. การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการถ่ายขวดของการเลี้ยงต้นในภาชนะขนาดต่าง ๆ กัน

ทำการย้ายต้นจากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้ออายุ 4 สัปดาห์ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ในภาชนะขนาดต่าง ๆ กันดังนี้

ขวดตรงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5 ซม. ความสูง 6.0 ซม.

ขวดตรงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.0 ซม. ความสูง 18.0 ซม.

ขวดรูปชมพู่ขนาด 125, 250, 500 และ 1000 มล.

สังเกตการเจริญเติบโตของพืชและระยะเวลาที่เหมาะสมในการถ่ายขวด

2. การศึกษาความหนาแน่นของการเลี้ยงต้นในภาชนะขนาดต่างๆ กัน

ตัดยอดความยาว 2 ซม. จากต้นหญ้าหวานที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตในภาชนะขนาดต่าง ๆ กัน ดังนี้

ขวดตรงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.0 ซม. ความสูง 18.0 ซม. : จำนวนยอด 19,37 ยอด

ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. : จำนวนยอด 19,37 ยอด

ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. : จำนวนยอด 31,61 ยอด

สังเกตการเจริญเติบโตของพืช

<u>การเพิ่มจำนวนต้นโดยการตัดยอดอย่างต่อเนื่อง</u>

นำต้นหญ้าหวานที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ มาทำการตัดยอดเพื่อเพิ่มจำนวนต้นโดยทำการทดลองแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ทำการตัดยอด 50 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาการตัดทุกช่วง 15 วัน และกลุ่มที่ 2 ทำการตัดยอด 100 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาการตัดทุกช่วง 30 วัน บันทึกผลจำนวนยอด และสังเกตการเจริญเติบโตของพืช

การเพาะเลี้ยงอวัยวะส่วนต่าง ๆ ของต้นหญ้าหวาน

ทำการเตรียมชิ้นส่วนต่าง ๆ จากต้นหญ้าหวานที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ดังนี้

ใบ ใช้ใบอ่อนคู่แรก นำมาตัดขนาด 0.5 x 0.5 ซม.

ยอด ตัดปลายยอด ความยาว 0.5 ซม.

ลำต้น ตัดลำต้นเป็นท่อน ความยาว 0.5 ซม.

ราก ตัดปลายราก ความยาว 0.5 ซม.

นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สังเกตการเกิดแคลลัส ลักษณะแคลลัสโดยคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายและเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การตาย} = \frac{\text{จำนวนเนื้อเยื่อที่ตาย}}{\text{จำนวนเนื้อเยื่อทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนเนื้อเยื่อทั้งหมด}} \times 100$$

การชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบ

1. การเตรียมเนื้อเยื่อพืชสำหรับเพาะเลี้ยง

นำต้นหญ้าหวานที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ มาตัดแยกเอาส่วนใบอ่อนคู่ที่ 1 และ 2 นำไปตัดให้มีขนาด 0.5x0.5 ซม. บนจานเพาะเชื้อโดยใช้มีดผ่าตัดปลอดเชื้อ จากนั้นใช้ปากคีบชุบแอลกอฮอล์ลนไฟ ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น คีบชิ้นส่วนใบไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ที่บรรจุในภาชนะปิดฝา นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2. การหาชนิดและอัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัส

ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เตรียมไว้ ในอาหารสูตร MS แปรผันชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งในกลุ่มออกซิน (NAA, 2,4-D) และกลุ่มไซโตไคนิน (BA, kinetin) นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ติดตามสังเกตการเกิดแคลลัส คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และให้คะแนนการเกิดแคลลัส

3. การศึกษาชนิดของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัส

ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อนในอาหาร 3 สูตร คือ MS, B5 และ N6 ที่เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในที่มีแสงและที่มืด ติดตามสังเกตการเกิดแคลลัส ลักษณะแคลลัส คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

4. การติดตามการเจริญของแคลลัส

การหาน้ำหนักสด ติดตามการเจริญของแคลลัสโดยการชั่งน้ำหนักแคลลัสสดในสภาพปลอดเชื้อด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง และนำชิ้นแคลลัสกลับไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเดิม ติดตามการเพิ่มของน้ำหนักทุกสัปดาห์

การหาน้ำหนักแห้ง ติดตามการเจริญของแคลลัสโดยสุ่มตัวอย่าง 10 ขวด นำแคลลัสไปอบในตู้อบแห้งอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ติดตามการเจริญทุกสัปดาห์

5. การชักนำให้เกิดแคลลัสและยอด

ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อน ในอาหารสูตร MS เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน คือ NAA และ 2,4-D ปริมาณ 2 และ 0.5 มก./ล. ตามลำดับ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน คือ BA และ kinetin ปริมาณ 0.5 และ 2 มก./ล. นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในที่มีแสงและที่มืดสังเกตลักษณะแคลลัส คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและเปอร์เซ็นต์การเกิด regeneration โดยใช้สูตร

$$\%\text{regeneration} = \frac{\text{แคลลัสที่เกิดอวัยวะ}}{\text{แคลลัสทั้งหมด}} \times 100$$

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. การศึกษาชนิดของวิตามินที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสและยอด

ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อน ในอาหารสูตร MS ใส่วิตามินตามสูตร Nitsch (1969) เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ติดตามสังเกตการเกิดแคลลัสคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และเปอร์เซ็นต์การเกิด regeneration

7. การชักนำให้เกิดราก

นำแคลลัสที่เกิดการพัฒนาเป็นยอดแล้ว ย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA 0.1 มก./ล. ติดตามสังเกตการเกิดราก

<u>การชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดจำนวนมาก (multiple shoot) จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอด</u>

1. การเตรียมเนื้อเยื่อพืชสำหรับเพาะเลี้ยง

นำต้นหญ้าหวานที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ มาตัดส่วนยอดอ่อนให้มีขนาด 0.5 ซม. บนจานเพาะเชื้อโดยใช้มีดผ่าตัดปลอดเชื้อ จากนั้นใช้ปากคีบชุบแอลกอฮอล์ลนไฟ ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น คีบชิ้นส่วนยอดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ที่บรรจุอยู่ในภาชนะปิดฝา นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2. การชักนำให้เกิดแคลลัสและต้น

ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดอ่อน โดยนำเนื้อเยื่อที่เตรียมไว้มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

สูตร 1 MS เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.

สูตร 2 MS เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ kinetin 2 มก./ล.

สูตร 3 MS เสริมด้วย NAA 0.2 มก./ล. และ kinetin 2 มก./ล.

สูตร 4 MS เสริมด้วย kinetin 8 มก./ล.

สูตร 5 B5 เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.

สูตร 6 N6 เสริมด้วย NAA 2 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.

นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในที่มีแสง สำหรับอาหารสูตรที่ 1 และ 2 ทำการเพาะเลี้ยงทั้งในที่มีแสงและในที่มืด ติดตามผลการทดลองโดยคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอดต่อแคลลัส และเปอร์เซ็นต์การเกิดราก

3. การหาอัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดจำนวนมาก

ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดอ่อน ในอาหารสูตร MS ที่แปรผันความเข้มข้นของ kinetin ในระดับ 0,2,4,6,8,10,12,14,16 และ 24 มก./ล. นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อติดตามสังเกตการเปลี่ยนแปลง คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอดต่อแคลลัส

<u>การชักนำให้เกิดรากจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ</u>

1. ทำการชักนำให้เกิดรากโดยนำแคลลัสที่เกิดยอดจำนวนมาก ย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ทำการแปรผันปริมาณ NAA ในระดับ 0,0.01, 0.05,0.1,0.5 และ 1.0 มก./ล.

2. นำยอดที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยง มาตัดตรงบริเวณที่ใกล้กับแคลลัสมากที่สุดนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สังเกตการเกิดราก ลักษณะรากและคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดราก

<u>การวิเคราะห์ปริมาณสตีวีรอไซด์</u>

1. การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างใบจากต้นธรรมชาติ แคลลัสและส่วนใบ ลำต้น รากจากพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามกำหนดเวลา นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนกระทั่งน้ำหนักแห้งคงที่

2. การสกัดแยกสตีวีรอไซด์จากตัวอย่างพืช

นำตัวอย่างที่บดแล้วชั่งน้ำหนัก 1.0 กรัม เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.3 กรัม และน้ำ 6 มิลลิลิตร กวนให้ผสมกันแล้ววางไว้นาน 15 ชั่วโมง นำมาสกัดโดยการให้ความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น เติมอะซีโตไนไตรล์ 18 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่าน millipore filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำสารละลายไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

3. วิธีวิเคราะห์ปริมาณสตีวีรอไซด์ด้วยเทคนิค HPLC

นำสารละลายที่เตรียมไว้มาทำการวิเคราะห์โดยการฉีดสารละลาย 10 ไมโครลิตร เข้าเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี โดยมีสภาวะดังนี้

Column : Lichrosorb-NH_2

Eluent : acetonitrile : H_2O = 4:1

Flow rate : 0.8 ml/min

Detector : UV 210 nm

คำนวณปริมาณสตีวีรอไซด์จากเส้นกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 6)

<u>การย้ายต้นลงปลูกในดิน</u>

นำต้นหญ้าหวานที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีรากสมบูรณ์ มาล้างวุ้นที่ติดอยู่บริเวณรากออกให้หมด นำมาปลูกในดิน หุ้มปากกระถางด้วยถุงพลาสติกวางไว้บนจานรองมีน้ำหล่อ รอจนต้นหญ้าหวานสามารถตั้งตัวได้จึงนำถุงพลาสติกออก บันทึกผลโดยการสังเกตและถ่ายภาพ