

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

ตอนที่ 1 การศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อบางส่วนจากต้นกัญชา (Cannabis sativa Linn.)

พืชทดลอง (Plant Materials)

เนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยงใช้ ลำต้น ก้านใบ และใบส่วนยอดของต้นกัญชา ซึ่งวัดจากปลายยอดต่ำลงมา 15 เซนติเมตร ส่วนใบใช้ใบปลายยอดที่แผ่นใบคลี่เต็มที่แล้ว

ต้นกัญชาที่ใช้นำเมล็ดพันธุ์มาจากหมู่บ้านแม่ บ้านช่างเคียน คอยปุย จังหวัดเชียงใหม่ นำมาเพาะแล้วปลูกลงในแปลงบริเวณหมู่บ้านอ่างแก้ว ในมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อายุของกัญชาที่ไร่ประมาณ 2 เดือน ไร่จนกระทั่งกัญชาออกดอกจึงเลือกใช้

วิธีเก็บพืชทดลอง

ในการเก็บส่วนของพืชที่นำมาทดลอง กระทำโดยใช้ใบมีดโกนที่คม ตัดส่วนของลำต้นส่วนยอดระยะห่างจากปลายยอดลงมา 20 เซนติเมตร ถ้าส่วนของพืชที่ไร่เป็นใบ จะตัดบริเวณก้านใบ แล้วใส่ถุงพลาสติก พร้อมน้ำรัศปากดุงให้แน่นควยยางรัศ แล้วรีบนำมาถึงห้องปฏิบัติการ

วันที่ทำการทดลอง

การทดลองเริ่ม เพาะเมล็ดและปฏิบัติในห้องปฏิบัติการตั้งแต่เดือน

มิถุนายน 2527 - พฤษภาคม 2528

เครื่องมือเครื่องใช้

1. เครื่องชั่งอย่างละเอียด (analytical balance)
2. เครื่องชั่งอย่างหยาบ (balance)
3. เครื่องวัด pH แบบ digital pH/temperature meter
4. หมอึ่งความดัน (autoclave)
5. เตาไฟฟ้า
6. หลอดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพร้อมฝาปิด ขนาด 2 x 15 ซม.
7. pipette ขนาด 1, 5 และ 10 ml
8. กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 100 และ 500 ml
9. beaker ขนาด 50, 500, 600 และ 1000 ml
10. stainless beaker ขนาด 2000 ml
11. flask ขนาด 50 และ 100 ml
12. stock bottle ขนาด 500 ml
13. สำลี
14. ตะเกียงแอลกอฮอล์
15. aluminium foil
16. กระดาษชำระ
17. ซอนติกสาร
18. กระดาษโรเนียว ขนาด 6 x 4 นิ้ว
19. แหงแกวคน
20. ปากคืบ
21. ก้านมีด และใบมีดผ่าตัด

22. ไม้อัดไฟ
23. ขวด McCarney
24. ตู้ฉายเนื้อเยื่อ (Laminar flow)
25. ชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งติดหลอด fluorescent ชนิด day light
ชั้นละ 3 หลอด โดยมีระยะห่างจากขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อประมาณ
1.5 ฟุต

สารเคมี

ก. สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช (Plant growth regulators)

1. 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)
ของบริษัท Sigma Chemical Company U.S.A.
2. 6 Benzylamino purine (BA หรือ BAP)
ของบริษัท Sigma Chemical Company U.S.A.
3. Kinetin
ของบริษัท Sigma Chemical Company U.S.A.

ข. สารที่ใช้ทำความสะอาด (disinfectant)

1. Ethanol 95 %
ของบริษัททอยก้า ประเทศไทย
2. Chlorox สูตร pH 11
3. Orthocide
ของบริษัท Chevron Chemical California

4. Streptomycin sulphate

ของบริษัท Thai Meiji Pharmaceutical

5. Lipon-F

ของบริษัท ไลออนส์ ประเทศไทย จำกัด

ค. สารที่ใช้ในการเตรียมอาหารสังเคราะห์หุสเกอร์ Murashige and Skoog
(MS medium)

1. สารอินทรีย์ใช้ระดับ analytical grade

2. น้ำกลั่น

3. ยางวุ้น (Bacto-Agar) Difco Laboratory U.S.A.

4. สารอินทรีย์ และวิตามิน

4.1 น้ำตาลทรายเม็ท (sucrose)

ของบริษัท ทรามิ่งสหธุรกิจจำกัด เชียงใหม่

4.2 วิตามินต่าง ๆ glycine, inosital

ของบริษัท Sigma Chemical Company U.S.A.

ง. สารเคมีที่ใช้ปรับ pH

1. NaOH 1 N

2. HCl 1 N

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมอาหารสังเคราะห์ (Preparation of Media)

ใช้ขวดเก็บ stock (Reagent bottle) เตรียม stock solution ของ Murashige and Skoog (1962) โดยเตรียมเป็น 10 stock solution ซึ่ง stock solution ที่ I-V เตรียมให้มีความเข้มข้นเป็น 100 เท่า ส่วน stock ที่ VI inositol เตรียมให้มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่า และ stock ที่ VII, vitamin เตรียมให้มีความเข้มข้นเป็น 1000 เท่า ส่วน stock ที่ VIII, IX และ X เป็น stock ของสารควบคุมการเจริญ รายการ stock ของสารต่าง ๆ มีดังนี้คือ

Stock solution I (100 เท่า) ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

NH_4NO_3	165	กรัม
KNO_3	190	กรัม

Stock solution II (100 เท่า) ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37	กรัม
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.690	กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.860	กรัม
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0025	กรัม

Stock solution III (100 เท่า) ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	44	กรัม
KI	0.083	กรัม
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0025	กรัม

Stock solution IV (100 เท่า) ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

KH_2PO_4	17	กรัม
H_3BO_3	0.620	กรัม
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025	กรัม

Stock solution V (100 เท่า) ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.784	กรัม
Na_2EDTA	3.724	กรัม

Stock solution VI (10 เท่า) ปริมาตรที่เตรียม 100 มิลลิลิตร
ประกอบด้วย

Myo inositol	1	กรัม
--------------	---	------

Stock solution VII (1,000 เท่า) ปริมาตรที่เตรียม 100 มิลลิลิตร
ประกอบด้วย

Glycine	0.200	กรัม
Nicotinic acid	0.050	กรัม
Pyridoxin HCl	0.050	กรัม
Thiamine HCl	0.010	กรัม

Stock solution VIII ปริมาตรที่เตรียมอย่างละ 100 มิลลิลิตร

ประกอบด้วย

2,4-D	10	มิลลิกรัม
-------	----	-----------

Stock solution IX ปริมาตรที่เตรียม 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย
BA 10 มิลลิกรัม

Stock solution X ปริมาตรที่เตรียม 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย
Kinetin 10 มิลลิกรัม

1.1 วิธีเตรียม Stock solution

1.1.1 การเตรียม Stock solution I-V

ซึ่งสารแต่ละอย่างละลายให้หมกด้วยน้ำกลั่นที่ละลายอย่างตามลำดับ แล้วจึงผสมกัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร บรรจุไว้ในขวดเก็บ stock นำ stock V ไปเก็บไว้ในตู้เย็น

1.1.2 การเตรียม Stock solution VI และ VII

ซึ่งสารแต่ละอย่างละลายด้วยน้ำกลั่นให้หมกแล้วจึงผสมกัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร บรรจุไว้ในขวดเก็บ stock หลังจากนั้น นำไปเก็บไว้ในช่องแช่แข็งของตู้เย็น

1.1.3 การเตรียม Stock solution VIII

ซึ่งสารแล้วใส่ลงในมิกเกอร์เล็ก ใช้ plasteur pipette ทุกลอกออก 95 % แล้วค่อย ๆ หยดลงที่ละหยด จนสารละลายหมกแล้วจึงใช้ plasteur pipette ทุกลสารละลายในแอลกอฮอล์ค่อย ๆ หยดลงในน้ำกลั่น คนให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดเก็บ stock แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

1.1.4 การเตรียม Stock solution IX และ X

ชั่งสารแล้วใส่ลงในบีกเกอร์เล็ก ใช้ pasteur pipette ดูด NaOH 1 N แล้วค่อย ๆ หยดทีละหยด ละลายสารจนหมดแล้วจึงเทลงในบีกเกอร์ที่บรรจุน้ำกลั่น คนให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดเก็บ stock แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

1.2 การเตรียมอาหาร

1.2.ก การเตรียมอาหารสูตร MS medium แบบความเข้มข้นครึ่งหนึ่ง

(Half strength) โดยลดความเข้มข้นของสารอินทรีย์และสารอินทรีย์เหลือเพียงครึ่งหนึ่ง ยกเว้น น้ำตาล, วน และสารควบคุมการเจริญเติบโต มีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

1.2.1 เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์สแตนเลส (Stainless beaker) ขนาด 2,000 มิลลิลิตร

1.2.2 เติม Stock solution I-V อย่างละ 5 มิลลิลิตร

1.2.3 เติม Stock solution VI 5 มิลลิลิตร

1.2.4 เติม Stock solution VII 0.5 มิลลิลิตร

1.2.5 เติม Stock solution VIII และ IX หรือ X ตามความเข้มข้นที่ต้องการ

1.2.6 เติมน้ำตาลทราย (sucrose) 20 กรัม

1.2.7 คนสารละลายให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เป็น 5.6 โดยใช้

NaOH 1 N หรือ HCl 1 N

1.2.8 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

- 1.2.9 นำบีกเกอร์สแตนเลสที่บรรจุสารไปต้มโดยใช้เตาไฟฟ้า
พอเริ่มเดือดเค็มวุ้น (Difco Bacto Agar) 8 กรัม
คนจนวุ้นละลาย
- 1.2.10 เทสารละลายที่โคลงในขวดเลี้ยงเนื้อเชื้อ (McCartney)
ประมาณขวดละ 10 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ
ด้วยหม้อนึ่ง (autoclave) ด้วยความร้อน 121 °C
ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- 1.2.๑ การเตรียมอาหารสูตร MS medium แบบความเข้มข้นเต็มสูตร
(Full strength) มีขั้นตอนการเตรียมดังนี้
- 1.2.1 ใช้บีกเกอร์สแตนเลส (Stainless beaker) ขนาด
2,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร
- 1.2.2 เติม Stock solution I-V อย่างละ 10 มิลลิลิตร
- 1.2.3 เติม Stock solution VI 10 มิลลิลิตร
- 1.2.4 เติม Stock solution VII 1 มิลลิลิตร
- 1.2.5 เติม Stock solution VIII และ IX หรือ X ตาม
ความเข้มข้นที่ต้องการ
- 1.2.6 เติมน้ำตาลทราย (sucrose) 30 กรัม
- 1.2.7 คนสารละลายให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เป็น 5.6 โดยใช้
NaOH 1 N หรือ HCl 1 N
- 1.2.8 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร
- 1.2.9 นำบีกเกอร์สแตนเลสที่บรรจุสารที่ใส่ลงไป ต้มโดยใช้
เตาไฟฟ้า พอเริ่มเดือดเค็ม Difco Bacto Agar 8
กรัม คนจนวุ้นละลาย

- 1.2.10 เสากระดาษที่โค้งงอในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Mccartney)
 ประมาณขวดละ 10 มิลลิลิตร ปิดฝานำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง
 (autoclave) ด้วยความร้อน 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/
 ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. การฆ่าเชื้อ

2.1 การเตรียมน้ำยาฆ่าเชื้อโรค

- 2.1.1 การเตรียมแอลกอฮอล์ 70 % โดยใช้อัลกอฮอล์ 95 % จำนวน
 70 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร
- 2.1.2 การเตรียมคลอออกซ์ 20 % ใส่ น้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อโรค 80 มิลลิลิตร
 แล้วเติมคลอออกซ์ 20 มิลลิลิตร
- 2.1.3 การเตรียมสารละลายออร์โทไซท์ และสเตรปโทมัยซินซัลเฟต
 ซึ่งออร์โทไซท์ และสเตรปโทมัยซินซัลเฟต อย่างละ 50 มิลลิกรัม
 แล้วเทลงในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อโรค 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน

2.2 การฆ่าเชื้ออุปกรณ์ที่ใช้ในการถ่ายเนื้อเยื่อ

- 2.2.1 ห่ออุปกรณ์ที่ใช้ในการถ่ายเนื้อเยื่อ ได้แก่ ปากคีบ คีมมีดผ่าตัด
 คิวแวน aluminium foil และกระดามโรเนียวสีขาว ขนาด
 6 × 4 นิ้ว ห่อด้วย aluminium foil ห่อละ 20 ชิ้น นำไป
 นึ่งฆ่าเชื้อพร้อมด้วยขวดน้ำกลั่นที่ปิดจุกด้วยสำลี แล้วหุ้มด้วย alu-
 minium foil ที่อุณหภูมิ 120 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว
 เป็นเวลา 20 นาที

2.2.2 การฆ่าเชื้อภายในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ

ใช้สารชุบแอลกอฮอล์ 70 % เช็ดให้ทั่วภายในตู้ Laminar flow โดยการเช็ดไปทางเดียวกัน บริเวณที่เป็นกระจกพลาสติกเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 10 % และเช็ดห่ออุปกรณ์ ตะเกียงแอลกอฮอล์ หรือใส่กระดาษ และชวกใส่อาหารด้วยแอลกอฮอล์ 70 % แล้วเปิดแสงอุลตราไวโอเลต หึ่งไว้ก่อนถ่ายเนื้อเยื่อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และเปิด air flow 15 นาที ก่อนถ่ายเนื้อเยื่อ

2.3 การฆ่าเชื้อที่ผิวเนื้อเยื่อพืช

2.3.1 นำส่วนเนื้อเยื่อพืชล้างด้วยน้ำปะปา

2.3.2 ล้างเนื้อเยื่อพืชด้วย Lipon-f

2.3.3 ล้างเนื้อเยื่อพืชด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

2.3.4 แช่เนื้อเยื่อพืชในสารละลาย orthocide และ streptomycin sulphate ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิ- ลิตร เป็นเวลา 1 คืน โดยแช่ไว้ในตู้เย็น

2.3.5 ล้างเนื้อเยื่อพืชด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

2.3.6 แช่เนื้อเยื่อพืชด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 20 % เป็นเวลา 20 นาที

2.3.7 ล้างเนื้อเยื่อพืชด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

3. การถ่ายเนื้อเยื่อ

3.1 การถ่ายเนื้อเยื่อส่วนปลายของลำต้น และส่วนก้านใบ ใช้มีดผ่าตัดที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตัดส่วนปลายของลำต้น และก้านใบที่ทำความสะอาดเรียบร้อยแล้ว

กระดาษโร เนียวที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ความยาว $\frac{1}{2}$ ซม. แล้วใช้ปากคีบ คีบใส่ลงในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อขวดละ 2 ชิ้น

3.2 การถ่ายเนื้อเยื่อส่วนใบ ใรมีคยาคักที่ฆ่าเชื้อแล้วตัดส่วนใบปลายยอด ที่ทำความสะอาดแล้วบนกระดาษโร เนียวที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วให้มีขนาด 0.5×0.5 ตารางเซนติเมตร ใช้ปากคีบคีบใส่ลงในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดละ 2 ชิ้น

นำขวดที่ไค้จาก 3.1 และ 3.2 ไปเลี้ยงบนชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อ ให้แสง fluorescent (day light) เป็นเวลา 8 ชั่วโมง/วัน ความเข้มของแสง 2,500-3,000 Lux ระยะห่างจากไฟ 1.5 ฟุต อุณหภูมิ 28-30^oC เป็นเวลา 35 วัน

4. แผนการวิจัย

4.1 การศึกษาคักเลือกส่วนของก้นกัญชาที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เตรียมอาหารสังเคราะห์ MS แบบความเข้มข้นเต็มสูตร (Full strength) ด้วยวิธีการข้างต้น คือ 1-3 แมงอาหาร เป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 ไม่เพิ่มสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นกลุ่มควบคุม ชุดที่ 2 เติม 2,4-D และ BA เป็นสัดส่วน 2:2 โดยเติมจาก stock 2,4-D และ BA 10 มก./100 มล. อย่างละ 20 มล./ลิตร แล้วศึกษาการเกิดแคลลัส การ ติดเชื้อ การตายนิ่ง และขนาดของแคลลัสที่ได้จากส่วนใบ ลำต้น และ ก้านใบจากส่วนปลายยอด สังเกตผลทุก 7 วัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์

4.2 การศึกษาความเข้มข้นของสารอาหาร (Media strength) ที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบส่วนยอดของกัญชา

เตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร MS แบบความเข้มข้นเต็มสูตร (Full strength) และความเข้มข้นครึ่งหนึ่ง (Half strength) เติม 2,4-D และ BA จาก stock 10 มก./100 มล. อย่างละ 20 มล./ลิตร แล้วศึกษาผลของความเข้มข้นอาหาร (Media strength) ที่มีต่อการเกิดแคลลัส การตายนิ่ง และขนาดแคลลัส สังเกตผลทุก 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

4.3 การศึกษาผลของความเข้มข้น 2,4-D, BA และ kinetin ต่อการเกิดแคลลัส

4.3.1 การศึกษาผลของความเข้มข้น 2,4-D : BA ต่อการเกิดแคลลัส

เตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร MS แบบความเข้มข้นครึ่งหนึ่ง (Half strength) แล้วศึกษาผลของ 2,4-D และ BA ที่ความเข้มข้น 0.5, 2 และ 5 มก./ลิตร โดยการเติม 2,4-D 5, 20 และ 50 มล./ลิตร ตามลำดับจาก stock VIII และเติม BA 5, 20 และ 50 มล./ลิตร ตามลำดับจาก stock IX สัดส่วนความเข้มข้นระหว่าง 2,4-D : BA มี 9 combinations ทั้งตารางที่ 1 สังเกตผลทุก 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

4.3.2 ศึกษาผลของ 2,4-D : kinetin ต่อการเกิดแคลลัส

เตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร MS แบบความเข้มข้นครึ่งหนึ่ง (Half strength) แล้วศึกษาผลของ 2,4-D และ kinetin ที่ความเข้มข้น 0.5, 2 และ 5 มก./ลิตร โดยเติม stock 2,4-D 5, 20 และ 50 มล./ลิตร จาก

stock VIII และเติม kinetin 5, 20 และ 50 มก./ลิตร จาก stock X โดยจะได้อัตราส่วน 2,4-D : kinetin 9 combinations ทั้งตารางที่ 2 สังเกตผลทุก 7 วัน เป็นเวลา 35 วัน

ตารางที่ 1 แสดง combinations ต่าง ๆ ของสารควบคุมการเจริญ 2,4-D และ BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบส่วนยอดของกัญชา

ความเข้มข้น 2,4-D (มก./ลิตร)	ความเข้มข้น BA (มก./ลิตร)		
	0.5	2	5
0.5	0.5 : 0.5	0.5 : 2	0.5 : 5
2	2 : 0.5	2 : 2	2 : 5
5	5 : 0.5	5 : 2	5 : 5

ตารางที่ 2 แสดง combinations ต่าง ๆ ของสารควบคุมการเจริญ 2,4-D และ kinetin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบส่วนยอดกัญชา

ความเข้มข้น 2,4-D (มก./ลิตร)	ความเข้มข้น kinetin (มก./ลิตร)		
	0.5	2	5
0.5	0.5 : 0.5	0.5 : 2	0.5 : 5
2	2 : 0.5	2 : 2	2 : 5
5	5 : 0.5	5 : 2	5 : 5

4.4 ศึกษาอัตราการเคลื่อนย้ายคลอโรฟิลล์ลงในอาหารใหม่ต่อการเติบโตของคลอโรฟิลล์ในกัญชา

นำคลอโรฟิลล์ที่เลี้ยงจากใบกัญชาอายุ 35 วัน 3 กลุ่มคือ คลอโรฟิลล์ขนาดใหญ่มากมีน้ำหนักเฉลี่ย 632.5 มิลลิกรัม คลอโรฟิลล์ขนาดปานกลางมีน้ำหนักเฉลี่ย 190.3 มิลลิกรัม และคลอโรฟิลล์ที่ตายนิ่ง ตักให้มีขนาด 0.5 ลบ.ซม. เลี้ยงลงในอาหารใหม่ MS (Half strength) ควบคุมส่วนความเข้มข้นของ 2,4-D : BA เหมือนกับอาหารที่ใช้ชักนำคลอโรฟิลล์ และในอาหารเก่า ในแต่ละ treatment เลี้ยงในอาหารใหม่ 30 ชวค และเลี้ยงในอาหารเก่า 10 ชวค สังเกตการเติบโตทุก ๆ สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตอนที่ 2 การศึกษาทดสอบสารที่มีฤทธิ์เป็น antimicrobial ที่ได้จากเนื้อเยื่อ แคลลัสจากใบส่วนยอดของกัญชา โดยนำแคลลัสที่ได้มาทำ bioassay กับเชื้อแบคทีเรีย และราบางชนิดโดยการสังเกต clear zone

เชื้อ microbial ที่ใช้ทดสอบ

Bacillus megaterium

Escherichia coli

Pseudomonas aeruginosa

Candida albicans

Micrococcus luteus

Proteus vulgaris

Aspergillus niger

Penicillium sp.

วัสดุอุปกรณ์

1. คานั่งอย่างหยวบ
2. ตู้อบอุณหภูมิสูง (hot air oven)
3. ตู้เพาะเชื้อ
4. หม้อนึ่ง
5. หวงถ่ายเชื้อ
6. spreader
7. ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาด 250 และ 1,000 มล.
8. จานเลี้ยงเชื้อ (petridish)

9. can
10. ชวก McCartney
11. โกร่งบคยา
12. ตะเกียงแอลกอฮอล์
13. กระจกทรงตัดเป็นวงกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม.
14. อาหารเลี้ยงเชื้อ (Nutrient broth) ของบริษัท Difco
Laboratory Detroit Michigan U.S.A.
15. วัคซีนเสลิกอปเตอร์ ของทางหุ้นส่วนจำกัดศรีอิสรา ประเทศไทย

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมเนื้อเยื่อเซลล์ที่ไซโททอกซิม

- 1.1 นำเนื้อเยื่อเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจากไข่มเยื่อของกัญชา อายุ 60 วัน ในปริมาณที่มากพอมาตัดให้มีขนาด 1 ซม. ซม.
- 1.2 ชั่งเซลล์น้ำหนัก 2 กรัม จากเซลล์ไข่มเยื่อของกัญชา อายุ 60 วัน มาบดโดยใช้โกร่งบคยาที่ฆ่าเชื้อ บดให้ละเอียดบรรจุลงในชวกที่หนึ่งฆ่าเชื้อไว้แล้ว

2. การเตรียมอาหาร

- 2.1 เตรียมอาหารเหลว (Nutrient broth) 100 มล. โดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อรูป (Nutrient broth) 0.8 กรัม (องค์ประกอบของ nutrient broth ดูในภาคผนวก ข) ละลายในน้ำกลั่น 50 มล. แล้ว

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มล. เทใส่ขวด McCartney ขนาด 10 มล. นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.2 เตรียมอาหารแข็ง (Nutrient agar) (อยู่ในภาคนวท ข) 1,000 มล. ซึ่ง Nutrient broth 8 กรัม เติลงในบีกเกอร์สเตนเลส ขนาด 2,000 มล. ที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ 500 มล. คนจนละลาย เติมน้ำให้ครบ 1,000 มล. ซึ่งวุ้น 15 กรัม เติลงในอาหารที่เตรียมไว้ ปล่อยให้เย็นประมาณ 30 นาที จนวุ้นอุ่นนำ นำขึ้นตั้งไฟจนวุ้นละลาย แล้วเทลงในขวดบรรจุอาหาร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้อาหารเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 60 °C แล้วเทอาหารลงในจานเลี้ยงเชื้อ (petridish) ที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณจานละ 20 มล.

3. การเตรียมเชื้อ

นำเชื้อที่ทดสอบมา streak plate บนอาหารแข็ง แล้วนำไปบ่มในตู้เพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 °C 3 วัน แล้วนำมาแยกเชื้อเอาโคโลนีเดี่ยว ๆ เลี้ยงลงในอาหารเหลว แล้วเก็บไว้ในตู้เพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 °C 3 วัน ทุกขั้นตอนใช้วิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อน (aseptic technique)

4. การทดสอบ

นำอาหารเหลว (Nutrient broth) ซึ่งเตรียมเชื้อจากข้อ 3. ใช้ pipette ที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดมา 0.1 มล. ใส่ลงในจานอาหารแข็งแล้ว spread

plate แล้วนำแคลลัสที่เตรียมจากข้อ 1.1 และกระดาษกรองที่มีขนาดเส้นผ่า
ศูนย์กลาง 0.5 ซม. (blank paperdiscs) จุ่มลงในแคลลัสที่บดจากข้อ 1.2
วางลงบนจานอาหาร นำไปไว้ในตู้เพาะเชื้ออุณหภูมิ 28°ซ ประมาณ 3 วัน
สังเกต clear zone ที่เกิดขึ้นรอบ ๆ แคลลัส หรือกระดาษกรอง



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved