บทที่ 2

วิธีการทดลอง

วัสดุ

พืชทดลอง

บัวหลวงสายพันธุ์บุณฑริก (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) จากสวนบัว อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม โดยเลือกฝักที่เขียวและแก่มีอายุหลังดอกบาน 14 วัน และคัดเฉพาะเมล็ดแก่สีเขียว เต่ง ไม่ลีบ

สารเคมี

1. การฟอกฆ่าเชื้อ

1.1 เอธทานอล 70 เปอร์เซ็นต์

1.2 คลอรอกซ์

1.3 สารจับใบ (tween 20)

2. การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ

2.1 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

(ภาคผนวก ก)

2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ BA และ NAA

2.3 สารเคมีที่ใช้ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหาร คือกรดไฮโดรคลอริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 และ 1 นอร์มอล

2.4 ผงวุ้นตรานางเงือก รุ่น AA

3. การศึกษาโครโมโซมของพืช

3.1 คอลชิซีน ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์

3.2 กรดเกลเชียลอะซิติก (glacial acetic acid)

3.3 เอธทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ และเอธทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

3.4 กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

3.5 สีย้อมโครโมโซม carbol fuchsin

3.6 oil immersion

4. การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอ

4.1 บัฟเฟอร์ (Tris-$MgCl_2$ filtered)

4.2 เอนไซม์ RNAse

4.3 สีย้อมดีเอ็นเอ propidium iodide (PI)

อุปกรณ์

1. เครื่องฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน ยี่ห้อ Mark-I รุ่น 30 Irradiator โดยใช้

ซีเซียม-137 เป็นแหล่งกำเนิดรังสี จากศูนย์บริการรังสี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน (ภาพที่ 2)

ภาพที่ 2 อุปกรณ์ในการฉายรังสีแกมมา

(a) เครื่องฉายรังสีแกมมา (b) survey meter เป็นเครื่องมือเตือนความปลอดภัย ในกรณีที่เกิดการรั่วไหลของรังสี

2. เครื่องชั่งสารเคมีชนิดละเอียด 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler รุ่น PJ 100

3. เครื่องชั่งสารเคมีชนิดละเอียด 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler รุ่น PJ 400

4. เตากวนแม่เหล็กไฟฟ้า (stirring heating plate) ยี่ห้อ Heidolph รุ่น MR 300

5. เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Horiba รุ่น pH – METER F-13

6. หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ยี่ห้อ Eyela รุ่น MAC - 601

7. เตาอบไมโครเวฟ ยี่ห้อ Sharp รุ่น Model R-245

8. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ ได้แก่ กระบอกตวง แท่งแก้วคน บีกเกอร์ ปิเปต ขวดแก้ว

9. ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet) ยี่ห้อ Dwyer รุ่น HS 124

10. อุปกรณ์ที่ใช้ในการย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ จานเลี้ยงเชื้อ

11. อุปกรณ์ในการศึกษาจำนวนโครโมโซม ได้แก่ แผ่นสไลด์ แผ่นปิดสไลด์ เข็ม
เขี่ย ใบมีด ดินสอปลายเรียบ

12. ชั้นสำหรับวางขวดเพาะเลี้ยง ติดหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ยี่ห้อ Philip TDL 36
W/54 แสงเดย์ไลท์ 6200 K ความสว่าง 2600 lm. 72 lm/w ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ และให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

13. กล้องจุลทรรศน์ยี่ห้อ Olympus รุ่น BX 51 พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ ยี่ห้อ Olympus รุ่น DP11

14. เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ FACScalibur Flow Cytometer ยี่ห้อ Beckton
Dickinson (ภาพที่ 3) ณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และโปรแกรมวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ WinMDI

ภาพที่ 3 เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ FACScalibur Flow Cytometer (Beckton Dickinson)

วิธีการทดลอง

แบ่งการทดลองเป็น 4 ตอนดังนี้

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ของต้นกล้าบัวหลวงสายพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ

2. ศึกษาอัตราการอยู่รอดของเอ็มบริโอบัวหลวงสายพันธุ์บุณฑริก หลังจากได้รับรังสีในสภาพปลอดเชื้อ

3. ศึกษาความแปรปรวนของการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ ของต้นกล้าบัวหลวงสายพันธุ์บุณฑริก หลังจากได้รับรังสี

4. ศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อจำนวนโครโมโซม และปริมาณดีเอ็นเอของบัวหลวงสายพันธุ์บุณฑริก หลังจากได้รับรังสี

ตอนที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ของต้นกล้าบัวหลวงสายพันธุ์บุณฑริกในสภาพปลอดเชื้อ

1.1 การเตรียมเมล็ด

เลือกเมล็ดบัวหลวงจากฝักแก่ โดยคัดเมล็ดเต่ง ไม่ลีบ (ภาพที่ 4a) มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำยาทำความสะอาด หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำเปล่าให้สะอาด

1.2 การฟอกฆ่าเชื้อ

นำเมล็ดบัวหลวงมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมสารจับใบ (tween 20) จำนวน 2 หยด นาน 15 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง หลังจากนั้นจุ่มในเอธทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เผาด้วยเปลวไฟโดยตรง ใช้มีดผ่าตัดกรีดส่วนหัวจุกของเมล็ด แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกและผ่าเอาเมล็ดออกทั้งหมดและคีบเฉพาะส่วนเอ็มบริโอ (ภาพที่ 4b) แช่เก็บไว้ในขวดน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วโดยทำในตู้ปลอดเชื้อ

ภาพที่ 4 บัวหลวง

(a) เมล็ด (b) เอ็มบริโอ (ศรชี้)

1.3 นำเอ็มบริโอมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ภายใต้สภาวะต่างๆ ดังนี้

1.3.1 อาหารแข็งสูตร MS (ชุดควบคุม)

1.3.2 อาหารแข็งสูตร MS ที่เททับด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

1.3.3 อาหารแข็งสูตร MS ที่เททับด้วยอาหารเหลวสูตรเดียวกัน

บันทึกผลการทดลอง หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน โดยบันทึกลักษณะการเจริญเติบโต นับจำนวนยอดและรากที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับต้นควบคุม และนำผลการทดลองที่ดีที่สุดจากข้างต้นเพื่อชักนำการเกิดยอดต่อไป ให้คะแนนการเจริญเติบโต ดังนี้

0 = ตาย

1 = เจริญได้น้อยแต่ยังไม่ตาย ความสูง 3 - 5 เซนติเมตร

2 = เจริญได้ ความสูง 6 - 8 เซนติเมตร

3 = เจริญได้ดีปานกลาง ความสูง 9 - 11 เซนติเมตร

4 = เจริญได้ดีมาก ความสูง 12 - 14 เซนติเมตร

5 = เจริญได้ดีที่สุด ความสูง 15 - 17 เซนติเมตร

วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยนำข้อมูลของการเจริญเติบโต จำนวนยอด จำนวนราก ที่ได้จากการทดลอง แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำทำ 10 ขวด ขวดละ 2 เมล็ด วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วยวิธี One-Way Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธีของ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชั่น 11

1.4 การชักนำให้เกิดยอดโดยใช้ BA

เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 1 2 3 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และเททับด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตอีกหนึ่งชั้น เพาะเลี้ยงนาน 30 วัน และบันทึกผลการทดลอง โดยบันทึกลักษณะการเจริญเติบโต จำนวนรากและยอดที่เกิดขึ้นเพื่อหาความเข้มข้นของ BA ที่เอ็มบริโอสามารถเกิดยอดรวมได้มากที่สุด โดยบันทึกผลและวิเคราะห์ผลทางสถิติตามข้อ 1.3

1.5 การชักนำให้เกิดรากโดยใช้ NAA

นำยอดที่ได้จากการชักนำด้วย BA ในข้อ 1.4 เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0 1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเททับด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตอีกหนึ่งชั้น บันทึกผลการทดลอง หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 30 วัน โดยบันทึกลักษณะการเจริญเติบโต จำนวนรากและยอดที่เกิดขึ้น เพื่อหาความเข้มข้นของ NAA ที่ยอดบัวหลวงสามารถเกิดรากได้มากที่สุด บันทึกผลและวิเคราะห์ผลทางสถิติตามข้อ 1.3

ตอนที่ 2 ศึกษาอัตราการอยู่รอดของเอ็มบริโอบัวหลวงสายพันธุ์บุณฑริก หลังจากได้รับรังสี ในสภาพปลอดเชื้อ

2.1 นำเมล็ดบัวหลวงที่แก่ ไม่ลีบ จัดแบ่งใส่ถุงพลาสติกบรรจุถุงละ 60 เมล็ด จำนวน 15 ถุง เข้าเครื่องฉายรังสีแกมมา ให้แต่ละถุงได้รับรังสีปริมาณต่าง ๆ ดังนี้ คือ 0 1 2 3 4 5 6 8 10 20 30 40 50 60 และ 70 กิโลแรด

2.2 ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดที่ผ่านการฉายรังสีตามขั้นตอนข้อ 1.2 และเพาะเลี้ยงเอ็ม-บริโอ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเททับด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตอีกหนึ่งชั้น

2.3 หลังจากเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเป็นเวลา 30 วัน นับจำนวนต้นที่อยู่รอด และหาค่า LD_{50} คือปริมาณรังสีที่ทำให้พืชที่นำมาฉายรังสีตายไป 50 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเปอร์เซ็นต์อัตราการอยู่รอดคำนวณจาก จำนวนต้นกล้าที่รอดตายหารด้วยจำนวนต้นกล้าทั้งหมดและคูณด้วยหนึ่งร้อย (Capella and Conger , 1967)

ตอนที่ 3 ศึกษาความแปรปรวนของการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ ของต้นกล้าบัวหลวงสายพันธุ์บุณฑริก หลังจากได้รับรังสี

3.1 นำเมล็ดบัวหลวงที่แก่ ไม่ลีบ จัดแบ่งใส่ถุงพลาสติกบรรจุถุงละ 60 เมล็ด จำนวน 6 ถุง เข้าเครื่องฉายรังสีแกมมา ให้แต่ละถุงได้รับรังสีปริมาณต่างๆ ดังนี้คือ 0 2 4 6 8 และ 10 กิโลแรด

3.2 ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดที่ผ่านการฉายรังสีตามขั้นตอนข้อ 1.2 และเพาะเลี้ยงเอ็ม-บริโอ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเททับด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตอีกหนึ่งชั้น

3.3 หลังจากเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเป็นเวลา 60 วัน นำยอดที่เกิดขึ้นไปย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมทั้งหมด 4 ครั้ง หลังจากนั้นย้ายเลี้ยงเพื่อชักนำรากบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และเททับด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตอีกหนึ่งชั้น

3.4 บันทึกผลการทดลอง โดยบันทึกคะแนนการเจริญเติบโต จำนวนรากและยอด รวมทั้งลักษณะผิดปกติที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับต้นควบคุม และวิเคราะห์ผลทางสถิติตามข้อ 1.3

ตอนที่ 4 ศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อจำนวนโครโมโซมและปริมาณดีเอ็นเอของบัวหลวงสายพันธุ์บุณฑริกหลังจากได้รับรังสี

4.1 จำนวนโครโมโซม : ศึกษาจำนวนโครโมโซมของบัวหลวงจากเซลล์ปลายรากของต้นควบคุมกับต้นที่ผิดปกติหลังจากที่ได้รับรังสี โดยเก็บรากจากขวดที่เพาะเลี้ยง และศึกษาด้วยวิธี Feulgen squash ดังนี้ (ดัดแปลงจาก Sharma and Sharma, 1980)

4.1.1 การเตรียมราก (pretreatment) : เลือกรากที่มีลักษณะขาวใสปลายขุ่น

เล็กน้อยตัดรากช่วงเวลา 9.00 - 11.00 น. ยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร แช่ในสารละลายคอลชิซีน ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส

4.1.2 การฟิกส์ราก (fixation) :เทน้ำยาคอลชิซีนความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ทิ้ง แล้วใส่น้ำยาฟิกส์ราก ซึ่งมีส่วนผสมของเอธทานอล 95 เปอร์เซ็นต์และกรดเกลเชียลอะซีติก อัตราส่วน 3 : 1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส

4.1.3 การเก็บราก (storage) :ล้างรากที่ฟิกส์ไว้ด้วยเอธทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 2-3 ครั้ง แล้วเก็บรากไว้ในเอธทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการจะศึกษาโครโมโซม ให้ทำตามขั้นตอน ข้อ 4.1.4

4.1.4 ไฮโดรไลซิส (hydrolysis) : นำรากที่เก็บไว้มาล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้งแล้ว นำไปไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 - 5 นาที

4.1.5 การย้อมสีและการเตรียมสไลด์ : หลังจากไฮโดรไลซิสแล้ว นำรากมาล้างน้ำ 2 ครั้ง ซับด้วยกระดาษทิชชู แล้วแช่รากในสีย้อม carbol fuchsin เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อสังเกตว่าปลายรากติดสีม่วงแดงดีแล้ว นำปลายรากเฉพาะบริเวณที่ติดสีม่วงแดง ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญมาวางบนสไลด์ หยดสี carbol fuchsin 1-2 หยด ปิดด้วยแผ่นแก้วปิดแล้วเคาะปลายรากด้วยดินสอปลายเรียบ เพื่อให้เซลล์และโครโมโซมกระจายดี หลังจากนั้นใช้นิ้วหัวแม่มือกดทับบนแผ่นแก้วปิด เพื่อให้โครโมโซมอยู่ในระนาบเดียวกัน นำสไลด์ไปตรวจดูโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 10 เท่า และ 40 เท่า ตามลำดับ เลือกเซลล์ระยะเมทาเฟส ที่มีโครโมโซมกระจายไม่ซ้อนกัน นับจำนวนโครโมโซมอย่างน้อยรากละ 10 เซลล์ และถ่ายภาพเซลล์ที่มีโครโมโซมกระจายดีด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า

4.2 ปริมาณดีเอ็นเอ : ศึกษาปริมาณดีเอ็นเอของบัวหลวงหลังจากได้รับรังสี โดยนำส่วนยอดของต้นที่เกิดลักษณะผิดปกติกับยอดของต้นที่ไม่ได้รับรังสี (ต้นควบคุม) และใช้ใบอ่อนของต้นผักกาดหัว (*Raphanus sativus*) เป็นต้นเปรียบเทียบมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตามวิธีการของ Dolezel และคณะ (1992) ดังนี้

4.2.1 เติมบัฟเฟอร์ (Tris-$MgCl_2$ filtered) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ในจาน
เพาะเลี้ยงขนาดเล็กทั้งหมดจำนวน 3 จาน

4.2.2 แช่ใบอ่อนของผักกาดหัว ซึ่งเป็นต้นเปรียบเทียบมาตรฐาน ในจานเพาะเลี้ยงที่เติมบัฟเฟอร์ทั้ง 3 จาน

4.2.3 แช่ยอดของบัวหลวงจากต้นที่ผิดปกติเนื่องการฉายรังสีปริมาณ 0 2 4 กิโลแรด ในจานเพาะเลี้ยงข้อ 4.2.2 ปริมาณรังสีละ 1 จาน โดยเขียนฉลากติดไว้

4.2.4 นำใบของผักกาดหัวและยอดบัวหลวงที่แช่ในบัฟเฟอร์ สับให้ละเอียดในห้องมืด หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ RNAse ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ในจานเพาะเลี้ยงทั้ง 3 จาน ทันที โดยตั้งทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที

4.2.5 กรองสารละลายบัฟเฟอร์และเอนไซม์ RNAse ออกจากจานเพาะเลี้ยงทั้ง 3 จาน เทสารละลายใส่หลอดแก้วขนาดเล็กจำนวน 3 หลอดโดยใช้กระดาษกรองขนาด 42 ไมโครเมตร และติดฉลากตามปริมาณรังสี

4.2.6 เติมสีย้อมดีเอ็นเอ (PI) ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ในหลอดแก้วขนาดเล็กทั้งหมด และตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (FACScalibur flow cytometer) วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรม WinMDI และวิเคราะห์ผลทางสถิติตามข้อ 1.3