2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

พืชทดลอง

Anubias barteri var.*nana* สั่งซื้อจากบริษัท Aquatic Plant Center Co., LTD นำมาอนุบาลไว้ในกะละมังโดยใช้ทรายเป็นวัสดุในการยึดเกาะของพืช ใส่น้ำให้ท่วมเหนือพืชประมาณ 1 คืบ วางเลี้ยงไว้ในที่มีแสงสลัว

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสังเคราะห์ MS (ภาคผนวกที่ 1)
2. สารควบคุมการเจริญเติบโตหรือฮอร์โมนพืช คือ BA, 2iP, KN และ TDZ
3. สารเคมีสำหรับฟอกฆ่าเชื้อ คือ เอธิลแอลกอฮอล์, คลอร็อกซ์, เมอร์คิวริกคลอไรด์ และสารเปียกใบ (Tween 20)
4. สารเคมีที่ใช้ปรับความเป็นกรด – ด่าง ของอาหาร คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล และ กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล
5. วุ้นตรานางเงือก™

วัสดุอื่น ๆ

1. เครื่องแก้วและพลาสติกชนิดต่าง ๆ เช่น ปิเปต จานเพาะเลี้ยง ฟลาสก์ บีกเกอร์
2. ขวดเพาะเลี้ยงขนาด 2 ออนซ์ 4 ออนซ์ และ 8 ออนซ์
3. เครื่องมือผ่าตัด ปากคีบ มีด

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร
   1.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler รุ่น PJ400
   1.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler รุ่น AJ 200
   1.3 เตากวนแม่เหล็กไฟฟ้า (stirring heating plate) ยี่ห้อ Heidoiph รุ่น MR 3001
   1.4 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Horiba รุ่น F – 13

1.5 เตาอบไมโครเวฟ ยี่ห้อ Sharp รุ่น R – 245

1.6 หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ยี่ห้อ Eyela รุ่น MAC – 601

2. ตู้ย้ายเนื้อเยื่อปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet) ยี่ห้อ Dwyer รุ่น HS 124

3. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ มีชั้นสำหรับวางขวดเพาะเลี้ยงที่ติดหลอดไฟ ยี่ห้อ Philip TDL 36 W/54 ให้แสง 0.0387 m mole/m^2/s อุณหภูมิห้อง 25 ± 2 องศาเซลเซียส

4. เครื่องฉายรังสีแกมมายี่ห้อ Theratron รุ่น 780 (Cobalt 60)

วิธีการ

แบ่งการทดลองเป็น 2 ตอนคือ

1. การขยายพันธุ์ *Anubias barteri* var. *nana* โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.1 การเตรียมยอดที่ปลอดเชื้อ

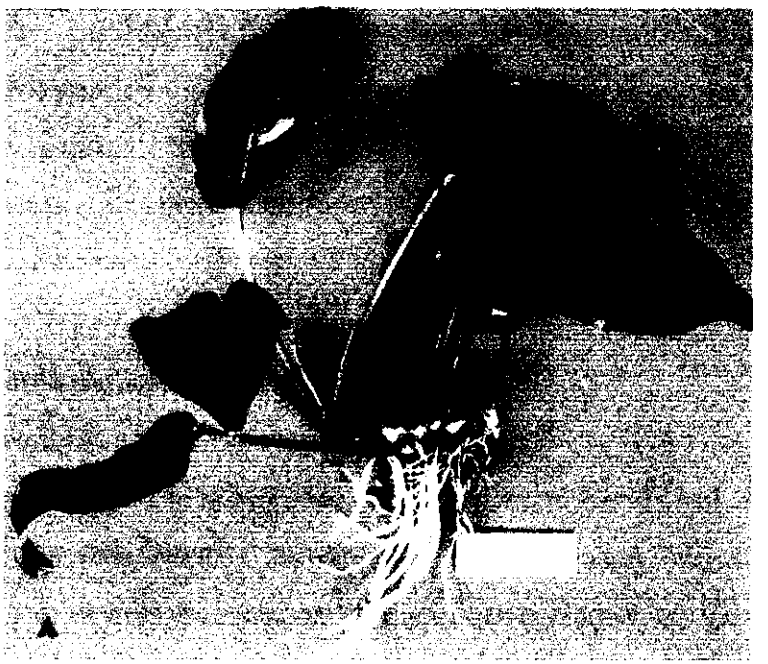
นำต้น *Anubias barteri* var. *nana* (รูปที่ 1A) มาตัดส่วนของใบและรากทิ้ง (รูปที่ 1B) ล้างด้วยน้ำยาทำความสะอาดยี่ห้อ Tepol และล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น ตัดเอาเฉพาะส่วนของปลายยอดแล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อตามวิธีการดังนี้

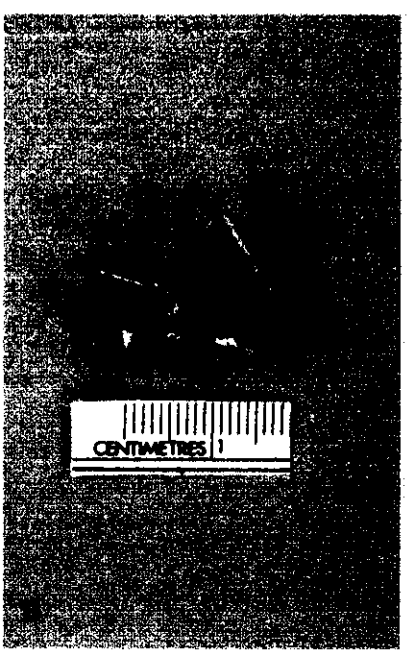
แช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที แล้วย้ายชิ้นส่วนพืชลงแช่ในสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์เข้มข้น 0. 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมสารเปียกใบ 2 หยด ต่อ 100 มิลลิลิตร นาน 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที และลอกหรือแซะเอากาบใบที่หุ้มอยู่รอบนอกออก หลังจากนั้นแช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลายคลอร็อกซ์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมสารเปียกใบ 2 หยด ต่อ 100 มิลลิลิตร นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที แล้วแช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลายคลอร็อกซ์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมสารเปียกใบ 2 หยดต่อ 100 มิลลิลิตร นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที

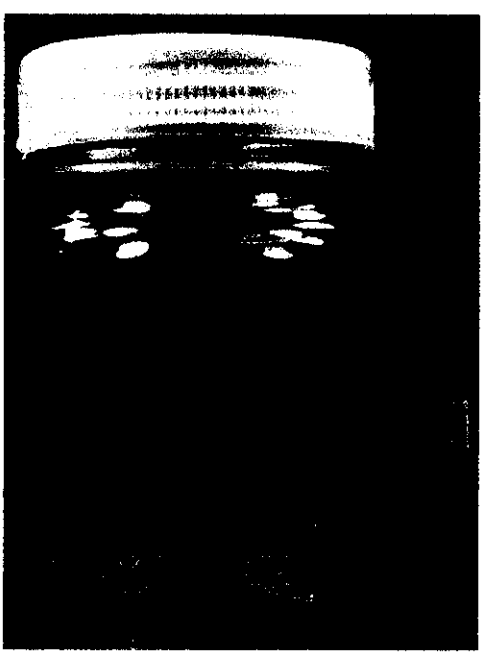
ตัดแต่งชิ้นส่วนพืชโดยตัดส่วนที่สัมผัสกับน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อจนมีสีซีดออกไป จะได้ส่วนของปลายยอดมีขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 1 C) นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้รับแสงสว่างเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากนั้นตัดแยกและย้ายเลี้ยงทุก 6 สัปดาห์

1.2 การศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของไซโทไคนินที่เหมาะสมในการชักนำยอด

นำส่วนของยอดแบบยอดขนาดเล็กอายุประมาณ 12 สัปดาห์ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามข้อ 1.1 โดยให้แต่ละยอดมีใบเหลืออยู่หลังจากตัดแต่ง 1 คู่ (รูปที่ 2) เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต (ชุดควบคุม) และที่มี BA ความเข้มข้น 1 (4.4 μM), 3 (13.2 μM) และ 5 (22.0 μM) มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 2iP ความเข้มข้น 1 (4.9 μM), 3 (14.7 μM) และ 5 (24.5 μM) มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ KN ความเข้มข้น 1 (4.6 μM), 3 (13.8 μM) และ 5 (23.0 μM)มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.01 (0.045 μM), 0.1 (0.45 μM) และ 1.0 (4.5 μM) มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงในขวดขนาด 2 ออนซ์ ที่มีอาหารดังกล่าวปริมาตร 8







รูปที่ 1 ต้น *Anubias barteri* var. *nana* (A) ที่นำมาตัดใบและรากออก (B) แล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อ และตัดชิ้นส่วนปลายยอดมาเพาะ เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (C)

มิลลิลิตร ใส่ชิ้นส่วนพืชขวดละ 1 ยอด วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) แต่ละชุดการทดลอง(treatment) ทำการทดลอง 10 ขวด โดยทำการทดลอง 2 ครั้ง นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้รับแสงสว่างเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการทดลองที่ 9 สัปดาห์หลังการเพาะเลี้ยง โดยบันทึกจำนวนยอดที่สามารถนับได้ทั้งหมด จำนวนใบทุกใบที่สามารถนับได้ จำนวนใบต่อยอดโดยนำจำนวนใบมาหารด้วยจำนวนยอด เปอร์เซ็นต์การเกิดรากโดยเปรียบเทียบจำนวนขวดที่เกิดรากกับจำนวนขวดทั้งหมด และจำนวนรากต่อชิ้นส่วนพืช

2. ผลของรังสีแกมมาต่อ *Anubias barteri* var. *nana*

2.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืชสำหรับฉายรังสี

นำส่วนยอดแบบยอดขนาดใหญ่หลังจากเพาะเลี้ยงประมาณ 6 สัปดาห์ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามข้อ 1.1 โดยตัดเอาใบออก ให้เหลือเฉพาะส่วนของปลายยอด ให้มีขนาดประมาณ 0.6 เซนติเมตร (รูป 3 A) เพาะเลี้ยงในขวดขนาด 2 ออนซ์ที่มีอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 8 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงขวดละ 1 ยอด นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้รับแสงสว่างเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (รูปที่ 3 B) จึงนำไปฉายรังสี

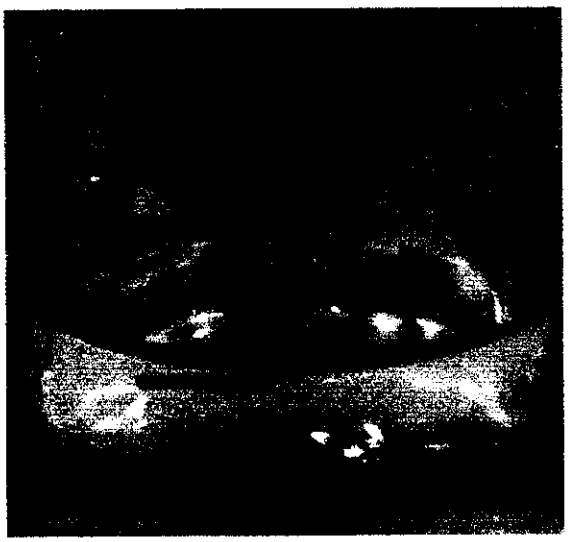
2.2 การฉายรังสีส่วนของปลายยอด

นำชิ้นส่วนปลายยอดที่เลี้ยงไว้ดังกล่าวไปฉายรังสีด้วยเครื่องฉายรังสีแกมมายี่ห้อ Theratron รุ่น 780 (รูปที่ 4 A) ที่หน่วยรังสีรักษา ภาควิชารังสีวิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ใช้รังสีแกมมา 6 ระดับ คือ 4.5, 9, 18, 27, 36, และ 45 เกรย์ อัตราการให้รังสี (dose rate) 1.5 เกรย์ต่อนาที แต่ละระดับฉาย 15 ขวด ฉายทั้งขวด โดยวางซ้อนกันในแนวตั้ง 3 แถว แถวละ 5 ขวด (รูปที่ 4 B) ฉายรังสีทางด้านข้าง สลับซ้าย – ขวา (parallel opposing field) คือฉายทางด้านซ้ายที่ระดับรังสีครึ่งหนึ่งและทางด้านขวาที่ระดับรังสีอีกครึ่งหนึ่ง (รูปที่ 4 C) และมีชุดควบคุมคือยอดที่ไม่ต้องฉายรังสี โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) หลังจากฉายรังสีย้ายชิ้นส่วนพืชลงในอาหารขวดใหม่เพื่อหลีกเลี่ยงผลของรังสีที่อาจสะสมในอาหาร หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้รับแสงสว่างเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ย้ายลงอาหารขวดใหม่ขนาด 4 ออนซ์ ที่มีอาหารสูตรเดิมปริมาตร 15 มิลลิลิตร บันทึกผลการทดลองดังนี้

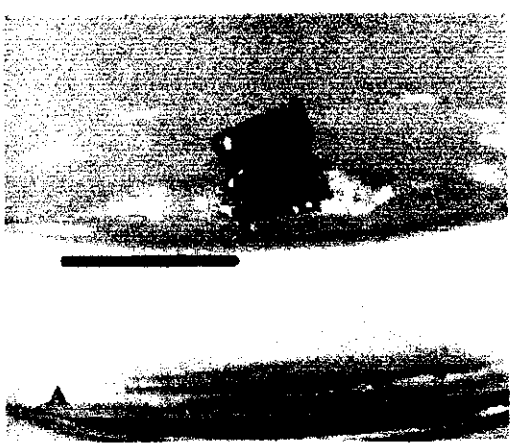
2.3 การเก็บข้อมูล

บันทึกน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นของยอด (ใช้เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง) โดยหาได้จากค่าความแตกต่างของน้ำหนักสดที่เวลา 6 สัปดาห์หลังจากฉายรังสี กับน้ำหนักสดก่อนฉายรังสี ซึ่งหาน้ำหนักสด

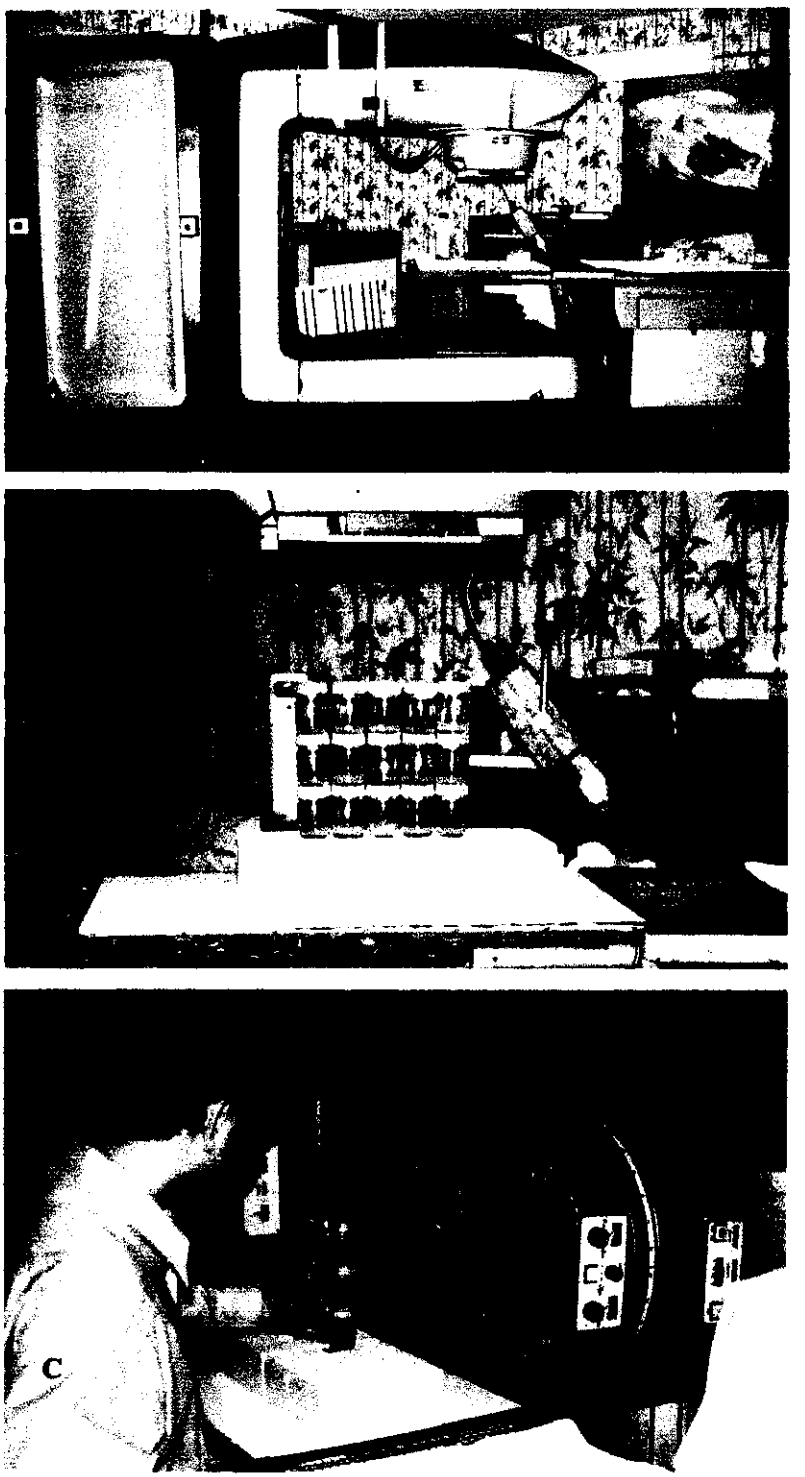
Central Library
Prince of Songkla University



รูปที่ 2 ลักษณะยอดหลังการตัดแต่งให้เหลือใบเพียง 1 คู่ เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีไซโทไคนิน ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ (bar = 1ซม.)



รูปที่ 3 ยอดที่ตัดใบออก เหลือเฉพาะส่วนของปลายยอดที่มีขนาดประมาณ 0.6 เซนติเมตร (A) แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน (B) ก่อนนำไปฉายรังสี (bar = 1 ซม.)



รูปที่ 4 ลักษณะเครื่องฉายรังสีแกมมายี่ห้อ Theratron รุ่น 780 (A) โดยมีการจัดวางขวดในแนวตั้ง (B) แล้วฉายรังสีทางด้านข้างสลับ ซ้าย – ขวา (C)

ได้โดยชั่งน้ำหนักของขวดที่มีอาหาร แล้วนำยอดมาวางบนอาหาร ชั่งน้ำหนักของขวดที่มีอาหารและยอด แล้วนำค่าทั้งสองมาลบกัน นำค่าน้ำหนักสดไปคำนวณหาค่า GR_{50} ซึ่งเป็นปริมาณรังสีที่ทำให้การเจริญเติบโตลดลงครึ่งหนึ่งจากชุดควบคุม โดยเปรียบเทียบค่าน้ำหนักสดของยอดที่ได้รับรังสีที่ระดับต่าง ๆ กับค่าน้ำหนักสดของชุดควบคุม ให้น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นของชุดควบคุมเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ บันทึกจำนวนยอด โดยนับจำนวนยอดที่สามารถนับได้ทั้งหมด จำนวนใบ โดยนับจำนวนใบทุกใบ จำนวนใบต่อยอด โดยนำจำนวนใบมาหารด้วยจำนวนยอด บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดรากโดยเปรียบเทียบจำนวนขวดที่เกิดรากกับจำนวนขวดทั้งหมดในแต่ละระดับรังสี และจำนวนราก ตลอดจนบันทึกลักษณะผิดปกติที่อาจเกิดขึ้น

3. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลของจำนวนยอด จำนวนใบ จำนวนใบต่อยอด และ จำนวนราก ที่ได้จากการทดลองที่ 1.2 และ 2.2 และข้อมูลของน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นจากการทดลองที่ 2.2 ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธีของ Scheffe ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชั่น 10 (กัลยา, 2544)