หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

อุปกรณ์

1. พืชทดลอง

   เมล็ดแตงโม พันธุ์ชูการ์เบบี้

2. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

   2.1 อุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น หม้อนึ่งความดัน ตู้อบ ตู้ transfer ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 50 ml. และ ฯลฯ

   2.2 สารเคมีในการเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) หรือ MS (ภาคผนวก 1)

   2.3 Hormone ในกลุ่ม auxin

      2.3.1 Napthalene Acetic Acid (NAA)

      2.3.2 Indole Acetic Acid (IAA)

   2.4 Hormone ในกลุ่ม Cytokinin คือ 6-Benzyl Amino Purine (BAP)

   2.5 สารเคมีสำหรับฆ่าเชื้อ

3. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการศึกษาโครโมโซม

   3.1 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) แผ่นสไลด์ และแผ่นแก้วปิด

   3.2 อ่างควบคุมอุณหภูมิ ประมาณ 60 องศาเซลเซียส

   3.3 micrometer

   3.4 สารเคมีในการตรวจจำนวนโครโมโซมของพืช ได้แก่

      3.4.1 สาร pretreatment คือ α-Bromonapthalene

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.2 สาร fixative

3.4.2.1 acetic acid 90 เปอร์เซนต์

3.4.2.2 Carnoy's solution

3.4.3 สาร hydrolyze ได้แก่ 1 normal hydrocloric acid (1N HCl)

3.4.4 สีย้อม

3.4.4.1 Shiff's Reagent

3.4.4.2 propionocarmine 2 เปอร์เซนต์

3.4.4.3 aceto-carmine

3.4.4.4 aceto-orcein

4. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์

4.1 millipore holder

4.2 filter membrane ขนาด 0.45 μM

4.3 สารโคลชิซีน

5. อุปกรณ์สำหรับการบันทึกภาพ

5.1 กล้องถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์ (Olympus vanox-T AH-2)

5.2 กล้องถ่ายรูปและเลนส์สำหรับถ่ายภาพวัตถุในระยะใกล้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการศึกษา

1. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแตงโม

1.1 นำเมล็ดแตงโมจากผลสด มากะเทาะเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออก จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อ ด้วยน้ำยาคลอรอกซ์เข้มข้น 15 เปอร์เซนต์ หยด tween 20 ประมาณ 1- 2 หยด เพื่อลดแรงตึงผิวที่เมล็ด ทำให้น้ำยาคลอรอกซ์เปียกทั่วทุกส่วน เขย่าเป็นเวลานาน 15 นาที แล้วนำมาล้างเอาน้ำยาคลอรอกซ์ออกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นทำการย้ายเมล็ดที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ความเข้มข้นครึ่งส่วนหรือ 1/2 MS เป็นเวลาประมาณนาน 3 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิประมาณ 25°C ความเข้มแสงประมาณ 1000 ลักซ์ โดยให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน จนกระทั่งต้นอ่อนงอกมีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร และใบเลี้ยงเริ่มมีสีเขียว

1.2 นำต้นอ่อนที่ได้จากข้อ 1.1 มาทำการตัดแยกส่วนhypocotyl ใบเลี้ยงและปลายยอด นำไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ดัดแปลง ประกอบด้วย ฮอร์โมน auxin (IAA หรือ NAA) ความเข้มข้น 0 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ cytokinin (BAP) 0 0.5 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรรวม 20 สูตร (ตารางที่ 1) เลี้ยงในที่ที่มีอุณหภูมิประมาณ 25°C ความเข้มแสงประมาณ 1000 ลักซ์โดยให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันทำการทดลองทั้งหมด 7 ซ้ำ

1.3 สังเกตและบันทึกผลการเจริญเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อทั้ง 3 ส่วนในอาหารแต่ละสูตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์และบันทึกผลเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ได้แก่ ปริมาณแคลลัส จำนวนราก จำนวนยอด ความสูงของปลายยอด

1.4 ทำการย้ายเนื้อเยื่อทั้ง 3 ส่วนลงในอาหารสูตรเดิมที่เตรียมใหม่ เมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์

1.5 รวบรวมข้อมูลได้แก่ ปริมาณการเกิดแคลลัส จำนวนยอด ความสูงของปลายยอดการเกิดราก จำนวนรากที่เกิด ในอาหารสูตรต่าง ๆ นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Varaince) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's New Multiple range test) ตามวิธีของจรัญ จันทลักขณา (2534) เพื่อสรุปหาส่วนของพืชที่มีความเหมาะสมในการเลี้ยงเพื่อที่จะใช้เพิ่มจำนวนยอด การชักนำให้เกิดรากและสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับในแต่ละขั้นตอน เพื่อนำมาใช้ใน การทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 1 สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแดงโม

สูตรที่	ส่วนประกอบ
1	MS (control)
2	MS + IAA 1 mg/l
3	MS + IAA 2 mg/l
4	MS + NAA 1 mg/l
5	MS + NAA 2 mg/l
6	MS + BAP 0.5 mg/l
7	MS + IAA 1 mg/l + BAP 0.5 mg/l
8	MS + IAA 2 mg/l + BAP 0.5 mg/l
9	MS + NAA 1 mg/l + BAP 0.5 mg/l
10	MS + NAA 2 mg/l + BAP 0.5 mg/l
11	MS + BAP 1 mg/l
12	MS + IAA 1 mg/l + BAP 1 mg/l
13	MS + IAA 2 mg/l + BAP 1 mg/l
14	MS + NAA 1 mg/l + BAP 1 mg/l
15	MS + NAA 2 mg/l + BAP 1 mg/l
16	MS + BAP 10 mg/l
17	MS + IAA 1 mg/l + BAP 10 mg/l
18	MS + IAA 2 mg/l + BAP 10 mg/l
19	MS + NAA 1 mg/l + BAP 10 mg/l
20	MS + NAA 2 mg/l + BAP 10 mg/l

2. การเพิ่มจำนวนปลายยอดแตงโมเพื่อศึกษาการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์

2.1 นำปลายยอดแตงโมในสภาพปลอดเชื้อ มาเลี้ยงในสูตรอาหาร ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญปลายยอด (จากการทดลองตอนที่ 1) โดยนำมาตัดออกเป็นชิ้น ๆ ให้ 1 ชิ้นมีข้ออยู่ประมาณ 1 - 2 ข้อ เพื่อให้ตาข้างสามารถเจริญขึ้นเป็นยอดใหม่

2.2 ตัดแยกยอดอ่อนในลักษณะเดียวกันกับข้อ 2.1 เพื่อย้ายลงในอาหารสูตรเดิมที่เตรียมใหม่ ทุก 3 สัปดาห์ ทำเช่นนี้ไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งได้จำนวนต้นมากเพียงพอที่จะนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3. การทดสอบหาความเข้มข้นของสารโคลชิซีนและระยะเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์

3.1 นำปลายยอดแตงโมที่ได้จากการเพิ่มจำนวน ในขั้นตอนที่ 2 มาตัดให้มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร นำมาแช่ลงในสารละลายโคลชิซีน ความเข้มข้น 0.5 0.1 0.05 และ 0.01 เปอร์เซนต์ และอาหารเหลวสูตร MS ที่มีโคลชิซีนละลายอยู่ 0.5 0.1 0.05 และ 0.01 เปอร์เซนต์โดยในแต่ละความเข้มข้นจะแช่ปลายยอดเป็นเวลานาน 12 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งผ่านการกรองจุลินทรีย์ด้วย Millipore ที่ใช้ filter membrane ขนาด 0.45 μM รวมเป็น 24 treatment (ตารางที่ 2) ในแต่ละ treatment ทำการทดลอง treatment ละ 10 ซ้ำ

3.2 นำปลายยอดแตงโมที่ผ่านการแช่ในสารโคลชิซีน ทั้ง 24 treatments มาตัดส่วนโคนทิ้ง นำปลายยอดขนาดยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนรากจน กระทั่งปลายยอดที่รอดชีวิต มีการเจริญเติบโตจนกระทั่งมีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร จึงตัดส่วนโคนทิ้งไป ประมาณ 1 เซนติเมตร นำปลายยอดที่ได้มาเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดราก (จากการทดลองตอนที่ 1) เพื่อศึกษาการเกิดพอลิพลอยด์ต่อไป

3.3 เก็บผลอัตราการรอดชีวิตโดยเสนอเป็นเปอร์เซนต์

019731

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของสารโคลชิซีนและระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ปลายยอดแดงโม

treatment	ส่วนประกอบ	ระยะเวลาในการแช่(ชม.)
1	น้ำกลั่น + colchicine 0.5 %	12
2	น้ำกลั่น + colchicine 0.5 %	24
3	น้ำกลั่น + colchicine 0.5 %	48
4	อาหารเหลวสูตร MS + colchicine 0.5 %	12
5	อาหารเหลวสูตร MS + colchicine 0.5 %	24
6	อาหารเหลวสูตร MS + colchicine 0.5 %	48
7	น้ำกลั่น + colchicine 0.1 %	12
8	น้ำกลั่น + colchicine 0.1 %	24
9	น้ำกลั่น + colchicine 0.1 %	48
10	อาหารเหลวสูตร MS + colchicine 0.1 %	12
11	อาหารเหลวสูตร MS + colchicine 0.1 %	24
12	อาหารเหลวสูตร MS + colchicine 0.1 %	48
13	น้ำกลั่น + colchicine 0.05 %	12
14	น้ำกลั่น + colchicine 0.05 %	24
15	น้ำกลั่น + colchicine 0.05 %	48
16	อาหารเหลวสูตร MS + colchicine 0.05 %	12
17	อาหารเหลวสูตร MS + colchicine 0.05 %	24
18	อาหารเหลวสูตร MS + colchicine 0.05 %	48
19	น้ำกลั่น + colchicine 0.01 %	12
20	น้ำกลั่น + colchicine 0.01 %	24
21	น้ำกลั่น + colchicine 0.01 %	48
22	อาหารเหลวสูตร MS + colchicine 0.01 %	12
23	อาหารเหลวสูตร MS + colchicine 0.01 %	24
24	อาหารเหลวสูตร MS + colchicine 0.01 %	48

4. ศึกษาการเกิดพอลิพลอยด์ของแตงโมที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซีน

ตัดปลายยอดแตงโมตามข้อ 3.2 มาเลี้ยงในอาหารที่ชักนำให้เกิดรากจนได้ต้นที่รอดชีวิต และเมื่อมีอายุครบ 8 สัปดาห์นำมาศึกษาการเกิดพอลิพลอยด์ดังนี้

4.1 ขนาดของเซลล์คุม นำใบลำดับที่ 3 นับจากปลายยอด มาลอกผิวใบเพื่อวัดขนาดความกว้าง และความยาวของเซลล์คุม ต้นละ 20 เซลล์โดยใช้ eyepiece micrometer (1 microunit = 0.0025 mm)

4.2 จำนวนคลอโรพลาสต์ นับจำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุม จากข้อ 4.1 ต้นละ 20 เซลล์

4.3 ความยาวราก วัดความยาวของแต่ละรากที่เกิดขึ้นทั้งหมด

นำค่าที่ได้จากข้อ 4.1 4.2 และ 4.3 มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซีน (ต้นควบคุม) และคิดเป็นเปอร์เซนต์ของต้นที่มีความแตกต่างทางสถิติกับต้นควบคุม

4.4 จำนานโครโมโซม

เนื่องจากยังไม่มีรายงานการเตรียมเซลล์ เพื่อนับโครโมโซมของรากแตงโมที่เลี้ยงในหลอดทดลองจึงได้ใช้ เทคนิคในการเตรียมเซลล์เพื่อนับโครโมโซมของรากธัญพืช ที่ได้จากการเลี้ยงในหลอดทดลอง (Karp, 1991) และเทคนิคสำหรับเตรียมเซลล์เพื่อนับโครโมโซมที่ใช้กับรากพืชที่ปลูกในสภาพธรรมชาติทั่วไป (นวงผกา อัมพันธ์จันทร์, 2533)

4.4.1 เทคนิคการเตรียมเซลล์เพื่อนับโครโมโซมจากปลายรากในหลอดทดลอง

ตัดปลายรากที่เลี้ยงในหลอดทดลอง ยาวประมาณ 2 เซนติเมตรมาแช่ในสารละลาย carnoy's ที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส นาน 24 - 48 ชั่วโมงแล้วนำมา

Hydrolyze ด้วย 1N HCl ที่อุณหภูมิ 60 °C ประมาณ 6 - 10 นาที ล้างรากด้วยน้ำกลั่นแล้วแช่ใน propionocarmine (ลนไฟหลอลุ่น) ประมาณ 30 นาที นำรากมาตัดให้ยาวจากปลายประมาณ 0.1 เซนติเมตร แล้วนำปลายรากมาวางบนแผ่นสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิด เคาะเบา ๆ จนกระทั่งเซลล์กระจาย (Karp, 1991)นำสไลด์ที่ได้มาศึกษาและตรวจนับจำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายรากและยังทำการทดลองในลักษณะเดียวกันนี้ โดยเปลี่ยนสีย้อมเป็น aceto carmine และ aceto orcein

4.4.2 เทคนิคการเตรียมเซลล์เพื่อนับโครโมโซมจากปลายรากพืชทั่วไป

ตัดปลายรากที่เลี้ยงในหลอดทดลองที่ยาวประมาณ 2 เซนติเมตรมาแช่ในสารละลายอิ่มตัวของ α-Bromonapthalene เก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส นาน 18 - 22 ชั่วโมงแล้วนำปลายรากมาแช่ใน Acetic Acid 90 เปอร์เซนต์ นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้องเพื่อหยุดการทำงานของเซลล์ (fixative) ล้างด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ 2-3 ครั้ง แล้วเก็บโดยแช่ใน เอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ ในที่มีอุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการศึกษาจึงนำรากมา Hydrolyze ด้วย 1N HCl ที่อุณหภูมิ 60 °C ประมาณ 6 - 10 นาที แล้วล้างด้วย เอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ 2-3 ครั้ง นำรากแช่ใน Shiff's Reagent ประมาณ 10 นาที จนกระทั่งปลายรากติดสีเข้ม นำรากมาตัดให้ยาวจากปลายประมาณ 0.1 เซนติเมตร แล้วนำปลายรากมาวางบนแผ่นสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิด เคาะเบา ๆ จนกระทั่งเซลล์กระจาย หากเซลล์ติดสีย้อมไม่ชัดอาจหยด propiono-carmine 1-2 หยดแล้วนำไปลนไฟหลอลุ่น (พวงผกา อัมพันธ์จันทร์, 2533) นำสไลด์ที่ได้มาศึกษาและตรวจนับจำนวนโครโมโซมของเซลล์ปลายราก

จากการตรวจนับโครโมโซมจากปลายรากของต้นแดงโมทุกต้น ที่ผ่านการแช่ในสารละลายโคลชิซีน ที่ได้จากการทดลองข้อ 4.4 นำมาคิดเปอร์เซนต์ของต้นพอลิพลอยด์ที่เกิดขึ้น