บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมของข้าบาร์เลย์โดยการฉายรังสีแกมมานี้แบ่งเป็น 4 การทดลองคือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาอิทธิพลของรังสีแกมมาที่มีต่อข้าวบาร์เลย์ 5 พันธุ์ในห้องควบคุมสภาวะแวดล้อม

การทดลองที่ 2 ศึกษาอิทธิพลของรังสีแกมมาที่มีต่อข้าวบาร์เลย์ 5 พันธุ์ในเรือนกระจก

การทดลองที่ 3 ศึกษาอิทธิพลของรังสีแกมมาที่มีต่อข้าวบาร์เลย์ 3 พันธุ์ในห้องควบคุมสภาวะแวดล้อม อย่างละเอียด ตรวจสอบการมิวเตชันในระดับโครโมโซมและเอ็นไซม์

การทดลองที่ 4 ศึกษาอิทธิพลของรังสีแกมมาที่มีต่อข้าวบาร์เลย์ 3 พันธุ์ใน M_2 generation

วัสดุอุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์ข้าวบาร์เลย์ (Hordeum vulgare L. emend Lam.)

1.1 การทดลองที่ 1 และ 2 ใช้เมล็ดพันธุ์ # 309, FNBL 8102-13, Jyoti, Ratna และ IBON 118 จากกรมวิชาการเกษตร แต่ละพันธุ์แบ่งเป็นที่ฉายรังสี 15, 20, 30 กิโลแรด และไม่ได้ฉายรังสี อย่างละ 100 กรัมต่อหนึ่งการทดลอง

1.2 การทดลองที่ 3 ใช้เมล็ดข้าวบาร์เลย์ 3 พันธุ์คือ บรบ 2 บรบ 5 และ บรบ 6 จากบริษัทบุญรอดบริวเวอรี โดยแบ่งแบบเดียวกับข้อ 1.1

2. ภาชนะและวัสดุอุปกรณ์ในการปลูก

2.1 กระบะพลาสติคขนาด 40x50x17 เซนติเมตร

2.2 ดินขุยไผ่

2.3 ปุ๋ย กทม. ปุ๋ยคอก ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 และปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต

3. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องควบคุมสภาวะแวดล้อม (Phytotron) และเรือนกระจก ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. วัสดุอุปกรณ์ในการดูแลรักษา

4.1 สายยางและบัวรดน้ำ

4.2 กระบอกพ่นสารเคมี และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา เบนโนมิล

5. อุปกรณ์สำหรับเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์และตัวอย่างพืช

5.1 ซองกระดาษเก็บเมล็ดพันธุ์

5.2 ป้ายจดบันทึก

5.3 ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง

6. วัสดุอุปกรณ์สำหรับการตรวจโครโมโซม

6.1 กล้องจุลทรรศน์แบบคอมเพานด์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

6.2 อุปกรณ์สำหรับเตรียมสไลด์ตัวอย่าง

6.2.1 Water bath

6.2.2 Vial

6.2.3 จานแก้ว

6.2.4 สไลด์และแผ่นแก้วปิด

6.2.5 กรรไกร ปากคีบ และเข็มเขี่ย

6.2.7 ยาทาเล็บใช้ยาสไลด์

6.3 สารเคมี (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก ค)

6.3.1 Alphabromonaphthalene

6.3.2 Acetic acid 90 %

6.3.3 Ethyl alchol 70 %

6.3.4 Normal hydrochloric acid

6.3.5 Schiff's reagent

6.3.6 Propiono - carmine 2 %

7. วัสดุอุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการเจริญพันธุ์ (fertility)

7.1 กล้องจุลทรรศน์แบบคอมเพานด์

7.2 Propiono - carmine 2 %

8. วัสดุอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ไอโซไซม์เอสเทอร์เรส

8.1 เครื่องอิเลคโตรโฟริซิสแบบตั้งพร้อมอุปกรณ์

8.2 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับเตรียมสารเคมี

8.2.1 เครื่องชั่งไฟฟ้า

8.2.2 ฟลาสก์ขนาด 50,100,150 และ 200 มิลลิลิตร

8.2.3 บีคเกอร์ขนาด 50,100,150 และ 200 มิลลิลิตร

8.2.4 ขวดเก็บสารเคมีขนาดขนาด 50,100,500 และ 1,000 มิลลิลิตร

8.2.5 กระบอกตวงขนาด 20,50, และ 100 มิลลิลิตร

8.2.6 ขวดสีชาขนาด 25 มิลลิลิตร

8.2.7 ไมโครไปเปทท์ขนาด 1ØØ และ 1ØØØ ไมโครลิตร

8.2.8 หลอด Eppendorf

8.2.9 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง

8.2.1Ø Degaser

8.2.11 Magnetic stirrer

8.3 เครื่องมือและวัสดุสำหรับเตรียมตัวอย่างพืช

8.3.1 โกร่งบด

8.3.2 สารเคมี Polyvynylpolypyroydone (PVP)

8.3.3 สารสกัดเอ็นไซม์สูตร c (ภาคผนวก ข)

8.3.4 Refrigerated centrifuge

8.3.5 เครื่องชั่งไฟฟ้า

8.3.6 ไมโครไปเปทท์ขนาด 1,ØØØ ไมโครลิตร

8.4 สารเคมี

Acrylamide, Amonium Persulphate, Bromo - Phenol - Blue, EDTA-2Na, Ethyl Alcohol, Fast Blue RR Salt, Glycrol, Glycine, α-Naphtyl Acetate, α-Naphtyl Propionate, N,N′- Methylene Bis Acrylamide, N,N,N′,N′ - Tetramethyl Ethylene Diamide, Normal Hydrochloric Acid, Riboflavin, Sodium Dihydrogen Phosphate, Tris - Base, Tris - HCl และ Tween 8Ø

ดูวิธีการเตรียมสารเคมีได้แก่สารสกัดเอ็นไซม์ stock solution สำหรับเตรียม Polyacrylamide gel, electrode buffer, dye marker และสีย้อมเอ็นไซม์เอสเทอร์เรสในภาคผนวก ข

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1

1. นำเมล็ดพันธุ์ข้าวบาร์เลย์ทั้ง 5 พันธุ์ ไปฉายรังสีแกมมาที่มีแหล่งกำเนิดจากโคบอลท์ 6Ø (CO_{6O}) ปริมาณ 15,2Ø และ 3Ø กิโลแรด (Kilorad) พันธุ์ละ 1ØØ กรัมต่อปริมาณรังสี ที่สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ บางเขน กทม. จากนั้นนำเมล็ดที่ฉายรังสีแล้วแต่ละพันธุ์แต่ละปริมาณมาแยกเป็น 4 ซ้ำ ๆ ละ 5ØØ เมล็ด รวมทั้งที่ไม่ได้ฉายรังสีด้วย

2. เตรียมวัสดุปลูก โดยผสมดินขุยไผ่กับปุ๋ย กทม.ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 และปูนขาวในอัตราส่วน 300:50:0.3:0.2 กิโลกรัมตามลำดับ แล้วบรรจุลงกระบะละ 15 กิโลกรัม

3. ทำการทดลองในห้องควบคุมสภาวะแวดล้อม 2 ห้อง วางแผนการทดลองแบบ Factorial in Randomized Complete Block Design โดยให้ปริมาณรังสีเป็นปัจจัยที่หนึ่งและพันธุ์ข้าวบาร์เลย์เป็นปัจจัยที่สอง ทำการทดลองห้องละ 2 ซ้ำ

4. แช่เมล็ดข้าวบาร์เลย์ในน้ำไหล 12 ชั่วโมง แล้วนำไปปลูกโรยเป็นแถว ๆ ละ 100 เมล็ด กระบะละ 5 แถวแล้ววางตามแผนการทดลอง

5. ให้น้ำทุก ๆ 2 วันต่อครั้ง ใส่ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟตทุก ๆ เดือนอัตรา 30 กิโลกรัมต่อไร่

6. ควบคุมสภาวะแวดล้อมในห้องให้มีอุณหภูมิ 24 $\pm$ 2 องศาเซลเซียสตั้งแต่เริ่มปลูกจนกระทั่งออกรวง และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 40 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ช่วงออกดอกและเก็บเกี่ยว ช่วงแสง 13 ชั่วโมงต่อวัน ความชื้นสัมพัทธ์ 70 เปอร์เซ็นต์

7. ศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีต่อข้าวบาร์เลย์และบันทึกผลการทดลอง วิเคราะห์ความแปรปรวน เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในพันธุ์เดียวกันด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) และเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ .05

ทำการทดลองระหว่างเดือนมิถุนายน ถึงตุลาคม 2531

การทดลองที่ 2

การทดลองนี้เหมือนกับการทดลองที่ 1 แต่แตกต่างกันที่สถานที่ในการทดลองคือ การทดลองที่ 1 ทดลองในห้องควบคุมสภาวะแวดล้อม การทดลองที่ 2 ทำการทดลองในเรือนกระจก ทำการทดลองระหว่างเดือนธันวาคม 2531 ถึงเมษายน 2532

การทดลองที่ 3 ทำการทดลองระหว่างเดือนสิงหาคม ถึงธันวาคม 2532 แบ่งเป็น 4 การทดลองย่อยคือ

1. ศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีต่อข้าวบาร์เลย์

1.1 นำเมล็ดข้าวบาร์เลย์ 3 พันธุ์ ไปฉายรังสีแกมมาเหมือนกับการทดลองที่หนึ่งแล้วนำเมล็ดแต่ละพันธุ์แต่ละปริมาณรังสีที่ฉายมาแยกเป็น 6 ซ้ำ ๆ ละ 330 เมล็ด รวมทั้งที่ไม่ได้ฉายรังสีด้วย

การเตรียมวัสดุปลูก การวางแผนการทดลอง และการดูแลรักษาเหมือนกับการทดลองที่หนึ่งและสอง แต่แตกต่างกันที่การปลูกโดยการทดลองนี้ปลูก 110 เมล็ดต่อ

แถว กระบะละ 3 แถว ทำการทดลองในห้องควบคุมสภาวะแวดล้อม 2 ห้อง ๆ ละ 3 ซ้ำ

1.2 การควบคุมสภาวะแวดล้อม ห้องทดลองแรกซ้ำที่ 1-3 ห้องทดลองที่สองซ้ำที่ 4-6 ทั้งสองห้องให้อุณหภูมิ 24 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ช่วงแสง 13 ชั่วโมงต่อวัน ความชื้นสัมพัทธ์ 7Ø เปอร์เซ็นต์

1.3 ศึกษาผลของรังสีที่มีต่อข้าวบาร์เลย์

1.3.1 เปอร์เซ็นต์ความงอก

1.3.2 เปอร์เซ็นต์ต้นผิดปกติ

1.3.3 ลักษณะต้นผิดปกติและอัตราความผิดปกติ

1.3.4 เปอร์เซ็นต์การตายเมื่ออายุ 6Ø วัน

1.3.5 ความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูง

1.3.6 เปอร์เซ็นต์การเจริญพันธุ์ (fertility)

ตรวจสอบโดยวิธีการย้อมสีละอองเกสร (pollen) ด้วย Propiono-carmine 2 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบจาก 3Ø ต้น ๆ ละ 5 อับเรณู โดยทำให้อับเรณูแตกบนสไลด์จากนั้นหยด Propiono-carmine 1 หยด ปิดด้วยแผ่นแก้วปิด นับละอองเกสรที่มีชีวิตคือย้อมสีแดงและไม่มีชีวิตคือย้อมไม่ติดสี จนครบ 3ØØ ละอองเกสรต่อหนึ่งต้น

1.3.7 ความสูงที่ระยะสุกแก่

1.3.8 ปริมาณผลผลิต

1.3.9 เก็บรวบรวมเมล็ดไว้ศึกษาใน M_2 generation

2. วิเคราะห์ไอโซไซม์เอสเทอร์เรสด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟริซิส

ใช้ใบข้าวบาร์เลย์อายุ 1ØØ วัน เปรียบเทียบรูปแบบไอโซไซม์ของข้าวบาร์เลย์ที่ผ่านการฉายรังสีปริมาณต่าง ๆ กับที่ไม่ได้ฉายในแต่ละพันธุ์เพื่อศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรม โดยวิเคราะห์ 1Ø ตัวอย่าง ๆ ละ 1 ใบ

วิธีการศึกษาไอโซไซม์

2.1 การเตรียมแผ่น Polyacrylamide gel

2.1.1 Set กระจกสำหรับเตรียมแผ่นเจลโดยให้กระจก 2 แผ่นประกบกันให้มีช่องว่างระหว่างกระจกประมาณ 2 มิลลิเมตร

2.1.2 ค่อย ๆ บีบ running gel ลงในช่องระหว่างกระจกให้อยู่ในระดับที่กำหนด คือสูงประมาณ 1Ø เซนติเมตร

2.1.3 เติมน้ำกลั่นหล่อขอบบนของแผ่นเจลให้สูงประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง

2.1.4 ดูดน้ำกลั่นที่หล่อขอบบนของแผ่นเจลออกแล้วเติมสารละลาย spacing gel ให้สูงประมาณ 2.5 เซนติเมตร แล้วเสียบ wel comb ลงในช่องระหว่างกระจกและกดให้ซี่ของ comb จมลงใน spacing gel

2.1.5 นำแผ่นเจลที่เตรียมจากข้อ 2.1.4 วางในที่มีแสงประมาณ 1Ø นาที เพื่อให้ spacing gel เกิดกระบวนการ polymerization จากนั้นดึง comb ออก จะทำให้ได้แผ่นเจลที่มีส่วนบนเป็นช่อง ๆ สำหรับใส่ตัวอย่าง

2.1.6 ล้างส่วนบนของแผ่นเจลที่เป็นช่อง ๆ ด้วย diluted reservoir buffer 2 ครั้ง

2.2 การเตรียมตัวอย่างพืช

2.2.1 นำตัวอย่างใบข้าวบาร์เลย์ตัวอย่างละ 5Ø มิลลิกรัม PVP 2Ø มิลลิกรัมและสารละลาย extract enzyme solution สูตร c Ø.6 มิลลิลิตร ผสมรวมกันในโกร่งบดที่แช่เย็นแล้วบดจนกระทั่งส่วนผสมละเอียดที่สุด

2.2.2 ถ่ายส่วนผสมที่บดแล้วลงในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตรแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,ØØØ รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ Ø องศาเซลเซียสนาน 3Ø นาที

2.2.3 ถ่ายส่วนที่เป็นของเหลวลงในหลอดใหม่เพื่อนำไปใส่ในแผ่นเจลต่อไป

2.3 การวิเคราะห์ไอโซไซม์ด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟริซิส

2.3.1 นำแผ่นเจลที่เตรียมแล้วจากข้อ 1 ประกบกับ colding core ที่อยู่ใน buffer chamber

2.3.2 เติม reservoir buffer ลงใน buffer chamber เปิดสวิทช์ให้ระบบหล่อเย็นทำงานก่อนที่จะใส่ตัวอย่าง 3Ø นาที อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส

2.3.3 ใส่ตัวอย่าง ๆ ละ 45 ไมโครลิตร ลงในช่องที่อยู่ส่วนบนของแผ่นเจล 1-3 ช่องแรกเป็นตัวอย่างจากใบที่ไม่ได้ฉายรังสี ช่องที่ 4-8, 9-13 และ 14-18 เป็นตัวอย่างที่ผ่านการใช้รังสี 15, 2Ø และ 3Ø กิโลแรดตามลำดับ

2.3.4 หยด dye marker ลงบน upper buffer chamber 1ØØ ไมโครลิตร

2.3.5 เปิดเครื่อง power supply ซึ่งเป็นไฟฟ้ากระแสตรงที่ 9Ø มิลลิแอมป์ต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.4 การย้อมสีไอโซไซม์เอสเทอร์เรส

2.4.1 นำแผ่นเจลจากข้อ 2.3 ออกจากแผ่นกระจกประกบแล้วแช่ลงใน staining solution สูตร B 5Ø มิลลิลิตร นาน 1Ø-15 นาทีที่ 37 องศาเซลเซียส

2.4.2 เติม staining solution สูตร A 5Ø มิลลิลิตรลงไปอีก แล้วทิ้งไว้ 2Ø-3Ø นาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2.4.3 ล้างแผ่นเจลในน้ำไหลและล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งแล้ว fix ด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 5Ø เปอร์เซ็นต์ 1 คืน

2.4.4 ทำให้แผ่นเจลแห้งโดยประกบด้วยแผ่น cellophane ที่ชุ่มน้ำบนกระจก แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน จากนั้นถ่ายภาพและนำไปวิเคราะห์ผล

3. หา $LD_{50/60}$ (lethal dose)

หมายถึงปริมาณรังสีที่ทำให้ข้าวบาร์เลย์ตายหรือมีชีวิตรอด 5Ø เปอร์เซ็นต์ที่อายุ 6Ø วันหลังจากงอก

3.1 นำเมล็ดข้าวบาร์เลย์ 3 พันธุ์ไปฉายรังสีแกมมาที่มีแหล่งกำเนิดจากโคบอลท์ 6Ø ปริมาณต่าง ๆ กันคือ 2Ø,4Ø,6Ø,8Ø และ 1ØØ กิโลแรด พันธุ์ละ 2Ø กรัมต่อปริมาณรังสี รวมทั้งที่ไม่ได้ฉายรังสีด้วย ที่สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ

3.2 ปลูกเมล็ดที่ฉายรังสีแล้ว 2 ซ้ำ ๆ ละ 1ØØ เมล็ด ในแต่ละปริมาณรังสีแต่ละพันธุ์

3.3 บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายที่อายุ 6Ø วัน หลังจากงอก

3.4 หา $LD_{50/60}$ ด้วยวิธีการถดถอย (regression) และสร้าง regression lines แล้วลากเส้นจากการตายที่ 5Ø เปอร์เซ็นต์ ไปยังแกนของปริมาณรังสีเพื่อหาว่าข้าวบาร์เลย์แต่ละพันธุ์ที่ปริมาณรังสีใดที่ทำให้เกิดการตาย 5Ø เปอร์เซ็นต์ (แผนภูมิที่ 1 และดูวิธีการในภาคผนวก ง)

4. การศึกษาผลของรังสีที่มีต่อความผิดปกติของโครโมโซมในโซมาติกเซลล์ปลายรากของข้าวบาร์เลย์ที่ถูกฉายรังสีปริมาณต่าง ๆ

4.1 นำเมล็ดข้าวบาร์เลย์ทั้ง 3 พันธุ์ ที่ผ่านการฉายรังสี 2Ø,4Ø กิโลแรด และที่ไม่ได้ฉายรังสีมาปลูก 2Ø เมล็ดต่อปริมาณรังสีต่อพันธุ์

4.2 เตรียมสไลด์แบบ Feulgen squash

4.2.1 Pretreatment นำปลายรากหลังจากงอก 1 วันมาตัดให้ยาวประมาณ 1 เซนติเมตรแล้วแช่ในสารละลายอิ่มตัว Alphabromonaphthalene นาน 27 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 1Ø องศาเซลเซียส

4.2.2 Fixation เทสารที่ใช้พรีทรีททิ้งแล้วเติมกรดอซิติก 9Ø เปอร์เซ็นต์ลงไปแทนที่จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3Ø นาที

4.2.3 Storage material ล้างรากจากข้อ 4.2.2 ด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 7Ø เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง ๆ ละ 1 นาที จากนั้นเก็บรากไว้ในเอทธิล

แอลกอฮอล์ ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ที่อุณหภูมิ 1Ø องศาเซลเซียส

4.2.4 Feulgen technique นำรากจากข้อ 4.2.3 ล้างน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วไฮโดรไลซ์ด้วยกรดเกลือ (N.HCl) ที่ 6Ø องศาเซลเซียสนาน 25 นาที จากนั้นเทกรดเกลือทิ้งแล้วเติม Schiff's reagent ประมาณ 3 มิลิลิตรแล้วทิ้งไว้ 1Ø-3Ø นาทีที่อุณหภูมิห้อง

4.2.5 การเตรียมสไลด์ นำรากจากข้อ 4.2.4 แช่ลงในน้ำแล้วตัดเอาเฉพาะปลายรากส่วนที่ติดสีม่วงแดงวางบนสไลด์แล้วหยด Propiono - carmine 2 % หนึ่งหยดแล้วปิดด้วยแผ่นแก้วปิดจากนั้นใช้ด้ามเข็มเขี่ยเคาะให้เนื้อเยื่อกระจายดีแล้วใช้หัวแม่มือกดบนกระดาษซับที่วางบนสไลด์อีกครั้ง

4.2.6 ตรวจดูเซลล์ที่โครโมโซมอยู่ในระยะเมตตาเฟส เปรียบเทียบระหว่างที่ฉายรังสีกับที่ไม่ได้ฉายด้วยกล้องจุลทรรศน์

การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของรังสีที่มีต่อข้าวบาร์เลย์ใน M_2 generation ทำการทดลองระหว่างเดือนธันวาคม 2532 ถึงเมษายน 2533

นำเมล็ดจาก M_1 ของแต่ละพันธุ์ในแต่ละปริมาณรังสีมารวมกันแล้วปลูกศึกษาดังต่อไปนี้

1. เปอร์เซ็นต์ความงอก
2. เปอร์เซ็นต์ต้นผิดปกติ
3. ลักษณะผิดปกติและอัตราความผิดปกติ
4. การถ่ายทอดลักษณะผิดปกติ
5. เปอร์เซ็นต์ต้นตาย
6. เปอร์เซ็นต์การเจริญพันธุ์
7. ความสูงที่ระยะเก็บเกี่ยว
8. คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะดีบางประการ
9. วิเคราะห์ไอโซไซม์เอสเทอร์เรส (วิธีการเดียวกับการทดลองที่ 3)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย