หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เมล็ดยาสูบ 2 พันธุ์คือ

   ยาสูบเบอร์เลย์ 21 Nicotiana tabacum L.

   ยาสูบพันธุ์ป่า Nicotiana plumbaginifolia Viv.

2. กะบะเพาะกล้ายาสูบขนาด กว้าง X ยาว X สูง = 16 X 18 X 3 นิ้ว
3. กระถางสำหรับปลูกยาสูบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 นิ้วและ 12 นิ้ว
4. ดินที่อบฆ่าเชื้อโรคด้วย methyl bromide
5. ปุ๋ย N P K สูตร 4 : 15 : 4
6. Bordeaux mixture
7. Furadan 3 G, Azodrin, Previcur-n, Draconil
8. หลอดกาแฟสำหรับครอบดอกยาสูบที่ผสมพันธุ์แล้ว
9. เส้นด้ายและป้ายสำหรับบันทึกขนาดกว้าง X ยาว = 1.5 X 1.5 ซม.
10. สารเคมีสำหรับใช้ในการศึกษาโครโมโซม
    - alphabromonaphthalene
    - acetic alcohol
    - acetic acid 45 % และ 90 %
    - ethyl alcohol 70 % และ 95 %
    - normal hydrochloric acid
    - Schiff's reagent
    - propionocarmine 0.5 %
11. อุปกรณ์สำหรับใช้ศึกษาโครโมโซม
    - สไลด์และแผ่นแก้วปิด

- ขวดสำหรับเก็บตัวอย่างดอกและรากยาสูบ
- ปากคีบ กรรไกรปลายแหลม
- เข็มเขี่ยเชื้อ
- ตะเกียงอัลกอฮอล์
- กระดาษซับ
- ยาทาเล็บ

12. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับทำสไลด์ถาวร
- ridged jars
- acetic acid 45 %
- butanol
- euparol

13. อุปกรณ์เกี่ยวกับการถ่ายภาพ
- กล้องจุลทรรศน์สำหรับถ่ายภาพชนิด Olympus P.M. 7
- ฟิล์ม Panatomic -X

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองนี้ทำที่สถานีทดลองยาสูบแม่โจ้ เชียงใหม่ ด้วยความเอื้อเฟื้อของโรงงานยาสูบ กระทรวงการคลัง โดยได้เริ่มทดลองตั้งแต่วันที่ 8 พฤษภาคม 2523 ถึงวันที่ 31 สิงหาคม 2524 ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้

1. ปลูกและดูแลรักษาต้นยาสูบ

เริ่มจากการเพาะเมล็ดยาสูบเบอร์เลย์ 21 และเมล็ดยาสูบพันธุ์ป่าในกะบะเพาะ โดยใช้ดินที่อบฆ่าเชื้อโรคด้วย methyl bromide วางกะบะเพาะไว้ในที่ร่มรำไร ประมาณ 6-10 วัน เมล็ดยาสูบจะงอก (ระยะนี้ถ้าต้นกล้ายาสูบถูกแดดจัดจะทำให้ต้นกล้าตายได้) เมื่อต้นกล้าอายุประมาณ 10-15 วัน ใช้ bordeaux mixture พ่นเพื่อป้องกันโรคโคนเน่า เนื่องจากต้นกล้ายาสูบเป็นโรคโคนเน่าได้ง่าย สำหรับยาสูบเบอร์เลย์ 21 ต้องนำกะบะเพาะใส่ไว้ในตู้กระจกเพื่อป้องกันแมลงหวี่ขาว เมื่อต้นกล้าทั้ง

สองพันธุ์ อายุประมาณ 30-45 วัน ย้ายลงปลูกในกระถางโดยใส่ปุ๋ยNPK สูตร 4:15: 4 รองก้นหลุม (สำหรับต้นกล้ายาสูบเบอร์เลย์ 21 ใส่ยา Furadan 3 G รองก้นหลุมด้วยเพื่อป้องกันโรคใบหด) หลังจากการย้ายปลูกในกระถางประมาณ 2 สัปดาห์ ใส่ปุ๋ยโปตัสเซียมไนเตรทเพื่อเร่งการเจริญเติบโต เมื่อต้นกล้าตั้งตัวได้ดีพ่นยา Draconil เพื่อป้องกันโรคโคนเน่าและโรคตากบ การพ่นยาได้พ่นทุกสัปดาห์ และพรวนดินในกระถางทุก 7-10 วัน (ในการเพาะเมล็ดยาสูบทั้งสองพันธุ์ ได้ทำการเพาะเมล็ดยาสูบเบอร์เลย์ 21 ก่อนเพาะเมล็ดยาสูบพันธุ์ป่าประมาณ 2 เดือน เนื่องจากยาสูบเบอร์เลย์21ออกดอกช้ากว่า และมีวงชีวิตที่ยาวกว่ายาสูบพันธุ์ป่า)

2. ผสมพันธุ์ยาสูบเบอร์เลย์ 21 และยาสูบพันธุ์ป่า

ยาสูบเบอร์เลย์ 21 มีอายุประมาณ 4 เดือน ส่วนยาสูบพันธุ์ป่าอายุประมาณ 2 เดือน ทำการผสมแบบสลับพ่อและแม่ (reciprocal cross) โดยใช้ปากคีบปลายแหลมคีบเอาเกสรตัวผู้ออกจากดอกที่จะบานในวันรุ่งขึ้นของต้นที่ใช้เป็นต้นแม่ แล้วนำเอาละอองเรณูจากต้นพ่อมาผสม ครอบดอกด้วยหลอดกาแฟที่พับปลายหลอดไว้เพื่อป้องกันไม่ให้ละอองเรณูจากต้นอื่นมาผสม ผูกป้ายลงวันที่ผสมเอาไว้ หลังจากผสมเกสรประมาณ 20-40 วัน ผลจะแก่ เมล็ดที่ได้จะเป็นลูกผสม F_1

3. ศึกษาสัณฐานวิทยา (Morphology) และเซลพันธุศาสตร์ (Cytogenetics)

3.1 ศึกษาสัณฐานวิทยาของต้นพ่อแม่ และลูกผสมที่ได้จากการทำ reciprocal cross โดยศึกษาลักษณะภายนอก และวัดขนาดของส่วนต่าง ๆ เช่น ลำต้น ใบ ดอก และ ผล ค่าที่วัดได้แสดงในรูปของค่าเฉลี่ย บันทึกภาพเพื่อเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ ดังกล่าวแล้ว

3.2 ศึกษาเซลพันธุศาสตร์ของต้นพ่อแม่ และลูกผสม F_1

วิธีการศึกษาทางเซลพันธุศาสตร์มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.2.1 ศึกษาการจับคู่ของโครโมโซมใน microsporocyte ที่ได้จากอับเรณูในระยะที่ดอกยังอ่อนโดยเลือกดอกอ่อนที่ชั้นกลีบเลี้ยงเพิ่งเริ่มแยมเพียงเล็กน้อย (ปกติดอกอ่อนมาก ๆ ชั้นกลีบเลี้ยงจะหุ้มทุกส่วนไว้หมด) ซึ่งพบว่ามีเซลที่กำลังแบ่งตัวอยู่มาก

ช่วงเวลาที่เก็บดอกอยู่ระหว่าง 10.00-12.00 น. นำดอกมาแช่ใน acetic alcohol ประมาณ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างดอกด้วย ethyl alcohol 95 % 2 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที เก็บดอกไว้ใน ethyl alcohol 70% ที่อุณหภูมิ 10 ° ซ. เมื่อต้องการเตรียมสไลด์หยด propionocarmine 1 หยด เอาเข็มเขี่ยอับเรณูวางลงสไลด์ ขยี้ให้แตก ปิดแผ่นแก้วปิด แล้วนำสไลด์ไปลนไฟให้ร้อน แต่อย่าให้เดือด ใช้ด้ามของเข็มเขี่ยเคาะบนแผ่นแก้วปิดแล้วกดด้วยนิ้วหัวแม่มือเพื่อให้โครโมโซมกระจายดี และอยู่ในระนาบเดียวกัน การกดหรือเคาะควรรองด้วยกระดาษซับทุกครั้ง เพื่อมิให้แผ่นแก้วแตก และยังช่วยซับสีย้อมส่วนเกินอีกด้วย นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อเลือกหาระยะ first metaphase

003855

3.2.2 ศึกษาการเจริญพันธุ์ (fertility) จากละอองเรณู (pollen grain) ในระยะที่ดอกเริ่มบาน โดยดูจากการติดสี alcoholic hydrochloric acid carmine ของนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม มีวิธีการ fix เช่นเดียวกับ microsporocyte ของดอกอ่อน ดังที่ได้กล่าวมาแล้วทุกประการ นำดอกที่ fix ไว้แล้วมาแช่ในalcoholic hydrochloric acid carmine ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-5 วัน ทำสไลด์โดยหยด acetic acid 45 % ลงบนสไลด์ 1 หยด เขี่ยละอองเรณูวางลงไปแล้ว smear ให้กระจาย ปิดแผ่นแก้วปิด ใช้กระดาษซับซับเอา acetic acid ส่วนเกินออกแล้วกดเพียงเบา ๆ นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะพบว่าละอองเรณูที่สมบูรณ์และสืบพันธุ์ได้นั้น generative nucleus จะติดสีชมพู(ซึ่งเป็นรูปเลนซ์นูนยาว) ส่วนtube nucleus และcytoplasm จะติดสีชมพูจางๆ ถ้าละอองเรณูที่เป็นหมัน (sterile)จะไม่ค่อยติดสี หรือไม่ติดสีเลย และผนังเซลเหี่ยวย่นมีรอยพับ

3.2.3 ศึกษารูปร่างและนับจำนวนโครโมโซมจากเซลปลายรากในระยะเมตาเฟส โดยตัดรากยาวประมาณ 1-2 ซม.(เลือกปลายรากที่มีสีขาวใส) ใส่ลงใน saturated alphabromonapthalene (ใช้ alphabromonapthalene 1 หยดต่อน้ำ 1,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร) ทิ้งไว้ประมาณ 19. ชั่วโมงในตู้เย็นอุณหภูมิ 10 ° ซ. สารเคมีนี้จะทำให้การแบ่งนิวเคลียสของเซลหยุดอยู่ในระยะ เมตาเฟส และทำให้โครโมโซมหดตัวสะดวกต่อการศึกษารูปร่างและจำนวนโครโมโซม เท alphabromonapthalene ทิ้งแล้วfix รากด้วย acetic acid 90 % เป็นเวลา 30 นาที นำรากมาล้างด้วยethyl alcohol 95% 2 ครั้ง แล้วเก็บรากไว้ในethyl alcohol 70 % ที่อุณหภูมิ 10 ° ซ.

เมื่อต้องการเตรียมสไลด์ทำได้โดยนำรากที่แช่ใน ethyl alcohol 70 % ล้างด้วยน้ำ 2-3 ครั้ง แล้ว hydrolyse ด้วย 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 60° ซ. ประมาณ 10 นาที แล้วแช่ใน Schiff's reagent ประมาณ 30-60 นาที ใช้เข็มตัดปลายรากบริเวณที่ติดสีเข้มวางบนสไลด์ แล้วหยดสี propionocarmine 1 หยด ปิดด้วยแผ่นแก้วปิด ใช้ปลายดินสอด้านที่ปลายราบเคาะบนแผ่นแก้วปิดที่มีกระดาษซับรองอยู่ 2-3 ชั้น เพื่อช่วยให้เซลและโครโมโซมกระจายออกจากกัน กดด้วยนิ้วหัวแม่มือเพื่อให้โครโมโซมอยู่ในระนาบเดียวกัน นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลที่มีโครโมโซมกระจายดีและอยู่ในระยะเมตาเฟสมานับโครโมโซมและเลือกเซลที่ดีที่สุดนำไปถ่ายรูปโดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย X 100 และเลนส์ตากำลังขยาย X 10

หมายเหตุ สไลด์ที่ศึกษาโครโมโซมเช่น โครโมโซมในระยะ first metaphase หรือ somatic metaphase สามารถเก็บไว้ศึกษาได้โดยการเตรียมสไลด์ถาวร ต้องทำให้ปราศจากน้ำอย่างแท้จริงโดยแช่ใน normal butyl alcohol 2-3 ครั้ง แล้ว mount ด้วย euparol

4. ทดสอบความต้านทานต่อโรคใบหดยาสูบของลูกผสม F_1 โดยใช้แมลงหวี่ขาวที่เป็นพาหะของโรคใบหด เริ่มโดยนำกะบะต้นกล้าที่มีอายุประมาณ 30 วันไปใส่กรงแมลงหวี่ขาวที่เลี้ยงไว้บนต้นยาสูบที่เป็นโรคใบหด ทิ้งไว้ประมาณ 7 วัน จึงนำต้นกล้ามาแยกใส่กระถาง ทิ้งระยะพอให้ต้นกล้าตั้งตัวได้ จึงถ่ายเชื้อโรคใบหดซ้ำอีกครั้งหนึ่ง การทดสอบความต้านทานนี้ ทดสอบลูกผสมเปรียบเทียบกับยาสูบเบอร์เลย์ 21 และยาสูบพันธุ์ป่า การวัดผลถือว่าต้นยาสูบที่แสดงอาการของโรคใบหดทุกต้นไม่มีความต้านทานไม่ว่าจะแสดงอาการเล็กน้อย หรือรุนแรงเพียงใดก็ตาม หาเปอร์เซนต์ความเป็นโรค (disease percentage) และหาระดับความต้านทานโรคใบหดยาสูบซึ่งมี 5 ระดับดังนี้

ระดับ 1 หมายถึง ต้นยาสูบที่มีความต้านทานต่อโรคใบหดสูงมาก (very highly resistance) เปอร์เซนต์ความเป็นโรค 0 %

ระดับ 2 หมายถึง ต้นยาสูบที่มีความต้านทานต่อโรคใบหดสูง (highly resistance) เปอร์เซนต์ความเป็นโรค 1-20 %

ระดับ 3 หมายถึง ต้นยาสูบที่มีความต้านทานต่อโรคใบหดปานกลาง (moderately resistance) เปอร์เซนต์ความเป็นโรค 21-50 %

ระดับ 4 หมายถึง ต้นยาสูบที่มีความต้านทานต่อโรคใบหดต่ำ (moderately susceptible) เปอร์เซนต์ความเป็นโรค 51-70 %

ระดับ 5 หมายถึง ต้นยาสูบที่มีความต้านทานต่อโรคใบหดต่ำมาก หรือไม่มีความต้านทาน (susceptible) เปอร์เซนต์ความเป็นโรค 71-100 %

5. การชักนำให้เกิด polyploid ในลูกผสม นำเมล็ดลูกผสม F_1 (ที่ได้จากการทำ reciprocal cross ระหว่างยาสูบเบอร์เลย์ 21 กับยาสูบพันธุ์ป่า) แช่ในสารละลาย colchicine ความเข้มข้น 0.4 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเมล็ดมาผึ่งลมให้แห้ง นำไปเพาะในกะบะเพาะ นำลูกผสม polyploid ที่ได้กลับไปผสมกับยาสูบเบอร์เลย์ 21 แล้วนำเมล็ดลูกผสม BC_1 ไปปลูกและทดสอบความต้านทานต่อโรคใบหด คัดเลือกลูกผสม BC_1 ที่ต้านทานโรคผสมกลับไปยังยาสูบเบอร์เลย์ 21 ได้เมล็ดลูกผสม BC_2 เพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ต่อไป