บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาลักษณะและการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้เอื้องใบไผ่ แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ **การทดลองที่ 1** ศึกษาการเจริญเติบโตของตะเกียงในสภาพธรรมชาติ และการเจริญเติบโตของต้นกล้าในสภาพปลอดเชื้อ **การทดลองที่ 2** ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา กายวิภาควิทยา และจำนวนโครโมโซม **การทดลองที่ 3** ศึกษาวิธีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมด้วยสารละลายโคลชิซินในสภาพปลอดเชื้อ

อุปกรณ์และวิธีการทดลองมีดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาการเจริญเติบโตของตะเกียงในสภาพธรรมชาติและการเจริญเติบโตของต้นกล้าในสภาพปลอดเชื้อ

การศึกษาการเจริญเติบโตของพืชทดลองแบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อย โดยมีอุปกรณ์และวิธีการดังนี้ คือ

1.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของตะเกียงในสภาพธรรมชาติ

1.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1 ต้นเอื้องใบไผ่ที่ได้จากสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ โดยเก็บข้อมูลจากตัวอย่างของพืชทดลองจำนวน 20 ตะเกียง

1.1.2 อุปกรณ์ในการบันทึกการเจริญเติบโต ได้แก่ สมุดบันทึก ไม้บรรทัด ดินสอ ยางลบ กล้องถ่ายภาพดิจิตอล ป้ายชื่อ และกล้องจุลทรรศน์

1.1.2 วิธีการทดลอง

1.1.1 ติดตามการเจริญเติบโตของพืชทดลอง โดยบันทึกการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะแรกของการเกิดตะเกียงบนต้นจนถึงระยะที่ตะเกียงออกดอก

1.1.2 บันทึกการเจริญของต้นและใบในลักษณะความสูงต้น จำนวนใบต่อต้น ความยาวและความกว้างใบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นกล้าในสภาพปลอดเชื้อ

1.2.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.2.1.1 ฝักของเอื้องใบไผ่ที่ได้จากการผสมตัวเองมีอายุประมาณ 4 สัปดาห์

1.2.1.2 ตู้กรองอากาศ (Air flow cabinet)

1.2.1.3 ชั้นสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.2.1.4 เครื่องเขย่า

1.2.1.5 เครื่องชั่งชนิดละเอียด (analytical balance)

1.2.1.6 เครื่องชั่งไฟฟ้า (electrical balance)

1.2.1.7 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

1.2.1.8 หม้อนึ่งความดันไอ

1.2.1.9 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 25 50 125 และ 250 มิลลิลิตร

1.2.1.10 ขวดปากกว้างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.5 ซม สูง 12.5 เซนติเมตร

1.2.1.11 ปิเปต

1.2.1.12 บีกเกอร์

1.2.1.13 กระบอกวัดปริมาตร

1.2.1.14 กรวยแก้ว

1.2.1.15 จานเพาะเชื้อ

1.2.1.16 ช้อนตักสาร

1.2.1.17 ขวดใส่สารละลายเข้มข้น

1.2.1.18 วัสดุที่ใช้ในตู้กรองอากาศ ได้แก่ ด้ามมีดผ่าตัด เบอร์ 3 ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 11 ปากคีบ (forceps) ตะเกียงแอลกอฮอล์ แผ่นพลาสติก หลอดทดลอง

1.2.1.19 วัสดุอื่นๆ เช่น ยางรัด ไม้ขีดไฟ แผ่นป้ายเขียนกรรมวิธีและวันที่ทดลอง

1.2.2 สารเคมี

1.2.2.1 สารที่ใช้ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ

1.2.2.1.1 เอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์

1.2.2.2 สารที่ใช้สำหรับเตรียมอาหาร

1.2.2.2.1 เกลือให้ธาตุอาหารหลักต่างๆตามสูตร CMU 1 (ตารางภาคผนวกที่ 1)

1.2.2.2.2 เกลือให้ธาตุอาหารรองต่างๆตามสูตร CMU 1 (ตารางภาพปนวกที่ 2)

1.2.2.2.3 สารอินทรีย์ต่างๆตามสูตร CMU 1 (ตารางภาคผนวกที่ 3)

1.2.2.2.4 Ferrous sulphate

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.2.2.5 สารควบคุมการเจริญของพืช ได้แก่ napthalene acetic acid (NAA) และ 6-benzyl amino purine (BAP)

1.2.2.2.6 potassium hydroxide 1นอร์มอล

1.2.2.2.7 hydrochloric acid 1 นอร์มอล

1.2.2.2.8 น้ำกลั่น

1.2.2.2.9 น้ำมะพร้าว

1.2.2.2.10 ผงวุ้น

1.2.2.2.11 น้ำตาลซูโครส

1.2.3 การเตรียมสารละลายเข้มข้น (Stock solution)

1.2.3.1 เตรียมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักที่ใช้ในสูตร CMU 1 ดัดแปลงจากสูตร Vacin and Went (1949) โดยเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นรวมของสารให้สูงกว่าสูตรมาตรฐาน 20 เท่า และเตรียมให้มีปริมาตรสุดท้าย 1000 มิลลิลิตร (ตารางภาคผนวกที่ 1)

1.2.3.2 เตรียมธาตุอาหารรองสูตร CMU 1 ดัดแปลงจากสูตรMurashige and Skoog (1962) โดยเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นรวมของสารให้สูงกว่าสูตรมาตรฐาน 100 เท่า และเตรียมให้มีปริมาตรสุดท้าย 1000 มิลลิลิตร (ตารางภาคผนวกที่ 2)

1.2.3.3 เตรียมอินทรีย์สารสูตร CMU 1 เตรียมวิตามิน glycine และ myo-inositol โดยเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นรวมของสารให้สูงกว่าสูตรมาตรฐาน 100 เท่า และเตรียมให้มีปริมาตรสุดท้าย 1000 มิลลิลิตร (ตารางภาคผนวกที่ 3)

1.2.3.4 การเตรียมสารละลายเหล็กสูตร ในรูป $FeNa_2EDTA$ เตรียม $FeNa_2EDTA$ ในสูตรMS (1962) ซึ่งประกอบด้วย $FeSO_4.7H_2O$ และ $Na_2EDTA.2H_2O$ โดยเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นรวมของสารให้สูงกว่าสูตรมาตรฐาน 100 เท่า และปรับปริมาตรสุดท้ายของแต่ละส่วนเป็น 500 มิลลิลิตร แล้วนำมาผสมในขวดเดียวกันเทลงในขวดสีชาหรือหุ้มขวดด้วยกระดาษอะลูมิเนียมฟอยล์ให้มิดชิดเพื่อป้องกันแสง (ตารางภาคผนวกที่ 4)

1.2.3.5 การเตรียมสารกระตุ้นการเจริญเติบโต

1.2.3.5.1 การเตรียม NAA โดยการชั่ง NAA 10 มิลลิกรัม ละลายด้วย absolute ethanol เล็กน้อย แล้วปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.3.5.2 hgjhgjhgjghjการเตรียม BAP โดยการชั่ง BAP 22.5 มิลลิกรัม ละลายด้วย 1 นอร์มอล KOH เล็กน้อย แล้วปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.2.4 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง

1.2.4.1 ใช้ปิเปตดูดสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร VW (1949) 250 มิลลิลิตร ธาตุอาหารรองสูตร MS (1962) 50 มิลลิลิตร วิตามินสูตร MS (1962) 50 มิลลิลิตร สารละลายเหล็กเข้มข้น 50 มิลลิลิตร และสารกระตุ้นการเจริญเติบโต NAA 2.5 มิลลิลิตร BA 1.25 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากันในขวดลูกชมพู่ขนาด 1000 มิลลิลิตร

1.2.4.2 ละลายน้ำตาล 100 กรัมด้วยน้ำกลั่น ผสมกับ น้ำมะพร้าว 500 มิลลิลิตร เทลงในขวดผสมรวมกับสารละลายในข้อ 1.2.4.1 และเติมน้ำให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

1.2.4.3 เทอาหารลงในหม้อต้มอาหาร นำไปวัดความเป็นกรดเป็นด่างและปรับให้ได้ 5.7

1.2.4.4 เติมวุ้นลงในอาหาร40 กรัมใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน ให้วุ้นละลายจนหมด

1.2.4.5 นำไปต้นบนเตาแก๊สจนอาหารมีสีใส และวุ้นละลายจนหมด ประมาณ 5 – 10 นาที

1.2.4.6 บรรจุอาหารลงในขวดปากกว้าง ขวดละ 25 มิลลิลิตร ต่อขวด

1.2.4.7 ปิดปากขวดด้วยพลาสติกใสและกระดาษสีขาวที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า แล้วรัดยางให้แน่น 1 ครั้ง เขียนชื่อสูตรอาหารบนฝาปิด

1.2.4.8 นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ 120 ปอนด์ นาน 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปจัดเรียงบนชั้นวาง

1.2.5 วิธีการทดลอง

1.2.5.1 นำฝักพืชทดลองที่มีอายุฝักหลังผสมประมาณ 4 สัปดาห์ มาทำความสะอาดเบื้องต้นด้วยน้ำยาล้างจาน และล้างน้ำให้สะอาด ตัดแต่งก้าน ปลายฝัก และสันฝักออกแล้วทำความสะอาดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นใส่ฝักแช่ลงในขวดลูกชมพู่ที่มีสารฆ่าเชื้อคือ คลอร็อกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับทวิน 20 เขย่า นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 – 3 ครั้ง

1.2.5.2 นำฝักที่ทำการฟอกฆ่าเชื้อแล้วย้ายลงในตู้กรองอากาศ คีบฝักวางลงบนจานเพาะเชื้อที่มีแผ่นพลาสติกฆ่าเชื้อรองอยู่ ใช้มีดผ่าตัดผ่าฝักออกตามแนวยาว โดยกรีด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ระหว่างแนวตะเข็บของฝัก ใช้ปากคีบเหล็กคีบฝักให้อยู่เหนือปากขวดและใช้ปลายมีดเขี่ยเมล็ดลงบนอาหารสังเคราะห์ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

1.2.5.3 นำขวดที่เพาะไปวางในสภาพมืดหรือคลุมด้วยผ้าสีดำจนกว่าเมล็ดเริ่มงอกเป็นโปรโตคอร์มใช้เวลานาน 45 วัน

1.2.5.4 เมื่อเมล็ดเจริญเป็นโปรโตคอร์ม นำขวดออกมาไว้ในสภาพให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 ±1 องศาเซลเซียส

1.2.5.5 หลังจากโปรโตคอร์มเจริญเป็นต้นอ่อนมีใบจริง 1 – 2 ใบ จึงย้ายลงในอาหารใหม่สูตรเดียวกัน โดยเติมสารกระตุ้นการเจริญเติบโต ได้แก่ สารกระตุ้นการเกิดราก คือ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรและสารกระตุ้นการเกิดยอด คือ BAP ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารสังเคราะห์ สังเกตและบันทึกผลข้อมูลการเจริญเติบโตทุกเดือน

การทดลองที่ 2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา กายวิภาควิทยา และจำนวนโครโมโซม

การศึกษาลักษณะของพืชทดลอง แบ่งออกเป็น 3 การทดลองย่อย โดยมีอุปกรณ์และวิธีการดังนี้

การทดลองที่ 2.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของต้นเอื้องใบไผ่ ได้แก่ ต้น ใบ ดอก ราก และฝัก โดยบันทึกข้อมูลดังกล่าวจากต้นพืชทดลองที่ได้จากแหล่งเดียวกันจำนวน 10 ต้น ในระยะที่ส่วนต่างๆของต้นเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว

2.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1.1 ต้นเอื้องไผ่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 10 ต้น

2.1.1.2 อุปกรณ์ ได้แก่ ไม้บรรทัด สมุด ดินสอ มีดผ่าตัด และปากคีบ

2.1.1.3 อุปกรณ์บันทึกภาพ กล้องดิจิตอล

2.1.1.4 กล้องส่องชิ้นส่วนพืชแบบหยาบ

2.1.2 วิธีการทดลอง

2.1.2.1 บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของเอื้องใบไผ่ ได้แก่ ลำต้น ใบ ดอก ราก และฝัก ในระยะที่ส่วนต่างๆของพืชเจริญเติบโตเต็มที่ โดยบันทึกลักษณะกรรมวิธีละ 10 ต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.2.2 บันทึกจำนวนและขนาดของส่วนประกอบของเอื้องไผ่ ดังนี้

2.1.2.2.1 วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของต้นและหัว นับจำนวนปล้องของหัว

2.1.2.2.2 ใบ นับจำนวนใบต่อต้น ความกว้างและความยาวใบ

2.1.2.2.3 ช่อดอก วัดขนาดของช่อดอกและนับจำนวนดอกต่อช่อ

2.1.2.2.4 ดอก วัดขนาดความกว้างและความยาวดอก บันทึกสีดอก

2.1.2.2.5 ฝัก วัดขนาดความกว้างและความยาวของฝัก

การทดลองที่ 2.2 การศึกษาลักษณะกายวิภาควิทยา

ศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาจากเนื้อเยื่อของเอื้องใบไผ่ ได้แก่ ยอด ลำต้น ใบ ดอก ราก และฝัก โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อที่ตัดตามขวางและตามยาวของอวัยวะดังกล่าว และศึกษากายวิภาควิทยาการแทงช่อดอกของตะเกียงที่มีจำนวนใบ 6 7 8 9 และ 10 ใบ ตามวิธีการศึกษาเนื้อเยื่อแบบ paraffin embedding ตามวิธีการของ Johansen (1940)

2.2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.2.1.1 ชิ้นส่วนของเอื้องไผ่ ได้แก่ ยอด ลำต้น ใบ ดอก ราก และฝัก

2.2.1.2 ชิ้นส่วนตะเกียงที่มีจำนวนใบ 6 7 8 9 และ 10 ใบ

2.2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.2.2.1 เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome)

2.2.2.2 กล้องจุลทรรศน์แบบ dissecting microscope และ stereo microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

2.2.2.3 ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิเป็น 56 ± 2 องศาเซลเซียส

2.2.2.4 แผ่นให้ความร้อน (hot plate)

2.2.2.5 เครื่องอุ่นสไลด์ที่ปรับอุณหภูมิเป็น 40 องศาเซลเซียส

2.2.2.6 แท่งไม้สี่เหลี่ยมขนาด 1.5 × 1.5 × 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่ต้มให้อิ่มตัวในพาราฟิน

2.2.2.7 แผ่นกระจกสไลด์ (slide) และแผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover slip)

2.2.2.8 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดใส่ชิ้นส่วนพืช บีกเกอร์ และขวดย้อมสี

2.2.2.9 อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ ป้ายติดกาว พู่กันขนอ่อน มีดผ่าตัด และปากคีบ

2.2.3 สารเคมี

2.2.3.1 น้ำยารักษาสภาพเซลล์ (fixative) (ตารางภาคผนวกที่ 5)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.3.2 น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) (ตารางภาคผนวกที่ 6)

2.2.3.3 สารตัวกลางที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) ได้แก่ paraplast

2.2.3.4 น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive) (ตารางภาคผนวกที่ 7)

2.2.3.5 สีย้อมเนื้อเยื่อใช้สี Delafield's hematoxylin

2.2.3.6 น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อสะอาด (clearing reagent) คือ ไซลีน (xyline)

2.2.3.7 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นกระจกสไลด์ (mounting media) คือ Canada balsam โดยใช้ไซลีนเป็นตัวทำละลายเพื่อให้เกิดความเหลวมากยิ่งขึ้น

2.2.4 วิธีการทดลอง

การเตรียมสไลด์ถาวรของชิ้นส่วนพืชมีขั้นตอนของวิธีการดังนี้

2.2.4.1 เก็บตัวอย่างของใบ ลำต้น ดอก รากและฝัก มาแช่ในสารละลาย FAA ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้วขนาด 15 มิลลิลิตร เขียนป้ายชื่อและวันที่เก็บตัวอย่าง แล้วนำขวดดังกล่าวไปใส่ในเครื่องดูดอากาศเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 7 วัน ก่อนนำไปผ่านขั้นตอนต่อไป

2.2.4.2 นำเนื้อเยื่อมาผ่านขั้นตอนของการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยให้ผ่านขั้นตอนของน้ำยา จากระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำยา 50 70 85 95 ไปจนถึงระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ละขั้นตอนใช้เวลา 1 วัน ยกเว้นแอลกอฮอล์ใช้เวลานาน 3 วัน จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปผ่านขั้นตอน 100 เปอร์เซ็นต์ ของ TBA นาน 1 วัน ตามด้วยน้ำยาที่ประกอบด้วยส่วนผสมของ TBA และพาราฟินเหลวในอัตราส่วน 1:1 นาน 1 วัน เทสารที่มีส่วนผสมของ TBA และพาราฟินออกจนหมด จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปผ่านขั้นตอนของการแทรกพาราฟินเข้าไปในเนื้อเยื่อ (infiltration)

2.2.4.3 เทพาราฟินเหลวที่อบไว้ในตู้ที่ตั้งอุณหภูมิเป็น 56 ± 2 องศาเซลเซียส ลงในขวดแก้วที่มีชิ้นส่วนพืชจากขั้นตอนที่ 2.2.4.2 นำขวดแก้วที่บรรจุชิ้นส่วนพืชในพาราฟินเหลวไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ นาน ประมาณ 1 สัปดาห์ หรือมากกว่านั้นจนกระทั่งพาราฟินแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อได้เต็มที่

2.2.4.4 นำเนื้อเยื่อมาฝังด้วยพาราฟินที่บรรจุในกระดาษพับเป็นรูปกระบะสี่เหลี่ยม แล้วจัดเนื้อเยื่อให้อยู่ในตำแหน่งและระนาบที่ต้องการ โดยไล่ฟองอากาศภายในกระบะออกให้หมด รอจนกระทั่งพาราฟินแห้งและแข็งตัวดี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.4.5 นำแท่งพาราฟินที่ได้ไปตัดแต่งให้เป็นรูสี่เหลี่ยมตามขนาดความยาวของเนื้อเยื่อ ให้มีชิ้นส่วนพืชอยู่ตรงกลาง แล้วนำมาติดกับแท่งไม้ จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน โดยตัดเนื้อเยื่อตามยาวหรือตามขวางหนาประมาณ 13-15 ไมครอน

2.2.4.6 นำแถบชิ้นส่วนพืช (paraffin ribbon) มาติดลงแผ่นกระจกสไลด์ด้วยน้ำยายึดเนื้อเยื่อ วางแผ่นสไลด์บนเครื่องอุ่นสไลด์ และซับน้ำยายึดเนื้อเยื่อออกให้หมดจนแถบชิ้นส่วนพืชแห้งและติดกับแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้นาน 3 วัน

2.2.4.7 นำแผ่นกระจกสไลด์ที่มีแถบชิ้นส่วนพืชติดอยู่มาผ่านขั้นตอนการล้าง ละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อด้วยน้ำยาที่มีส่วนผสมของไซลีน และแอลกอฮอล์ตามระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์จาก 50 เปอร์เซ็นต์ ไปจนถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในแต่ละขั้นตอนใช้เวลา 3-5 นาที พร้อมกับผ่านขั้นตอนการย้อมด้วยสี Delafield's hematoxylin เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนของการล้างทำความสะอาดแผ่นกระจกสไลด์อีกครั้งเพื่อให้เนื้อเยื่อสะอาดมากขึ้น ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งและเก็บในกล่องที่แห้งสนิทและใส่สารดูดความชื้นป้องกันการขึ้นราเก็บไว้นานไม่เกิน 3 เดือน

2.2.4.8 นำแผ่นกระจกสไลด์ที่ย้อมสีแล้ว มาตรวจสอบสภาพเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อให้ได้เนื้อเยื่อที่มีความชัดเจนทุกส่วน ก่อนนำมาทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 70 % ร่วมกับการเช็ดด้วยไซลีนและปิดกระจกสไลด์ด้วย Canada balsam 1-2 หยด ลงบนแผ่นกระจกสไลด์ เพื่อยึดแผ่นกระจกปิดสไลด์ทำ เป็นสไลด์ถาวร ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งวางบนพื้นที่ราบป้องกันการไหลเลื่อนของแผ่นปิดกระจกสไลด์

2.2.4.9 เมื่อแผ่นกระจกสไลด์แห้งสนิท นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพดิจิตอลยี่ห้อ Olympus ใช้กำลังขยาย 4 10 และ 100 เท่า

การทดลองที่ 2.3 การศึกษาจำนวนโครโมโซม

ศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อปลายรากของเอื้องใบไผ่ด้วยวิธี Feulgen's squash ที่ดัดแปลงโดยดวงทิพย์ (2539) และ ประภัสสร (2543)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.3.1.1 ปลายรากของเอื้องใบไผ่ยาว 3-5 มิลลิเมตร

2.3.1.2 ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับเก็บตัวอย่างปลายราก

2.3.1.3 แผ่นกระจกสไลด์และแผ่นกระจกปิดสไลด์

2.3.1.4 ปรอทวัดความร้อน

2.3.1.5 อ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ

2.3.1.6 อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ เข็มเขี่ย กระบอกตวงสารเคมี น้ำยาเคลือบเล็บ กระดาษซับสี นาฬิกาจับเวลา

2.3.1.7 กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และ photomicroscope

2.3.2 สารเคมี

2.3.2.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับหยุดวงชีพเซลล์ (pre-treatment) ได้แก่สารละลายอิ่มตัวของ (PDB) คือ PDB 500 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร วางบนเครื่องทำความร้อนจนเกิดการหลอมเหลว

2.3.2.2 สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาในการรักษาสภาพเซลล์ (fixative) คือ 95 เปอร์เซ็นต์ เอทธิลแอลกอฮอล์ และกรดอะซีติกเข้มข้นในอัตราส่วน 3:1

2.3.2.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับย่อยแยกเซลล์ (hydrolytic solution) คือ กรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 1 นอร์มอล

2.3.2.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับการเก็บปลายรากที่ผ่านขั้นตอนการหยุดวงชีพเซลล์แต่ยังไม่ผ่านกรรมวิธีการย่อยแยกเซลล์ คือ เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

2.3.2.5 สีที่ใช้ย้อมโครโมโซม คือ carbon fuchsin ที่เตรียมเป็นสารละลายแล้วบรรจุในขวดสีชาและเก็บไว้ในตู้เย็น

2.3.2 วิธีการทดลอง

2.3.2.1 เตรียมปลายราก โดยเลือกรากที่กำลังเจริญเติบโตซึ่งบริเวณปลายมีสีขาวขุ่น ใช้ปลายรากที่งอกใหม่และมีความยาว 0.5 เซนติเมตร ตัดเฉพาะส่วนปลาย 1 - 2 มิลลิเมตร เก็บตัวอย่างปลายรากในเวลา 7.00 8.00 9.00 10.00 11.00 และ12.00 น.

2.3.2.2 นำปลายรากมาหยุดวงชีพเซลล์ โดยแช่ปลายรากในสารละลาย PDB เป็นเวลานาน 1 3 5 และ 7 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

2.3.2.3 นำปลายรากออกมาจากสารละลาย PDB ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.2.4 ย่อยเซลล์ให้แยกจากกันโดยการแช่รากในกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 1 นอร์มอล นาน 3 - 5 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น

2.3.2.5 ย้อมเนื้อเยื่อปลายรากในสีย้อม carbol fucshin แช่ไว้นาน 30 นาที 1 และ 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นคีบเนื้อเยื่อวางลงบนแผ่นกระจกสไลด์แล้วใช้มีดผ่าตัดตัดเอาเฉพาะส่วนปลายรากให้ยาว 1 มิลลิเมตร เขี่ยส่วนเกินทิ้งไป หยดสี 1 หยดตรงบริเวณปลายราก ใช้เข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อเบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจาย คีบเนื้อเยื่อส่วนเกินทิ้งไปแล้วปิดกระจกปิดสไลด์บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ วางกระดาษซับบนแผ่นกระจกสไลด์และ กดนิ้วหัวแม่มือลงเพื่อให้เซลล์กระจายซับสีส่วนเกินออก และเคาะด้วยปลายด้ามดินสอเบาๆเพื่อไล่ฟองอากาศออกจนหมด

2.3.2.6 นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟตและมีการกระจายตัวของโครโมโซมดีมากกว่า 10 เซลล์ สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้แม่นยำ เมื่อได้เซลล์ที่ต้องการแล้วกดแผ่นกระจกปิดสไลด์เบาๆ เพื่อให้เซลล์แบนราบ และอยู่ในระนาบเดียวกัน ผึ่งลมทิ้งไว้ระวังอย่าให้อากาศเข้า ใช้น้ำยาเคลือบเล็บทาบนแผ่นกระจกปิดสไลด์เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์แห้ง นำแผ่นกระจกสไลด์ไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อนับจำนวนโครโมโซมและบันทึกภาพ

การทดลองที่ 3 ศึกษาวิธีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมด้วยสารละลายโคลชิซินในสภาพปลอดเชื้อ

ศึกษาเทคนิคและวิธีการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของพืชทดลองด้วยสารละลายโคลชิซินในสภาพปลอดเชื้อ

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 พืชทดลอง คือ โปรโตคอร์มของกล้วยไม้เอื้องใบไผ่ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.2

3.1.2 ขวดแก้วลูกชมพู่ขนาด 25 50 125 และ 250 มิลลิลิตร

3.1.3 กระบอกตวงขนาด 10 50 100 และ 250 มิลลิลิตร

3.1.4 อาหารสังเคราะห์สูตร CMU 1 เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.2

3.1.5 แผ่นกระดาษปิดขวดแก้ว แผ่นพลาสติกใส ยางรัด

3.1.6 เครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.7 ปากคีบเหล็ก เข็มเขี่ย ใบมีดผ่าตัด ด้ามมีดผ่าตัด จานแก้ว หลอดทดลอง หลอดหยด ตะเกียงแอลกอฮอล์ ไม้ขีดไฟ ช้อนเหล็กด้ามยาว และแผ่นป้ายเขียนกรรมวิธีและวันที่ทดลอง

3.1.8 น้ำกลั่น

3.1.9 หม้อนึ่งความดันไอสำหรับฆ่าเชื้ออาหาร

3.1.10 ผ้าขาวบางที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารโคลชิซิน 0.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมสารละลายเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

3.2.2 สารเคมีในธาตุอาหารหลักจากสูตร Vacin and Went (1949) ธาตุอาหารรองและวิตามินจากสูตร Murashige and Skoog (1962)

3.2.3 น้ำมะพร้าวน้ำหอมที่ผ่านการกรองด้วยแผ่นกรอง

3.2.4 คลอร็อกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์

3.2.5 ทวีน 20

3.3 การเตรียมกรรมวิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมโปรโตคอร์ม โดยนำฝักกล้วยไม้เอื้องใบไผ่ที่มีอายุประมาณ 30วันหลังผสมมาเพาะลงในอาหารที่เตรียมในข้อ 1.2.4 หลังเพาะเมล็ดนานประมาณ 2 เดือน เมล็ดเริ่มเปลี่ยนแปลงเป็นโปรโตคอร์มที่มีสีเขียวขนาดความยาว 2 - 3 มิลลิเมตร ทั้งหมดมี 5 กรรมวิธีๆละ 300 โปรโตคอร์ม ใช้โปรโตคอร์มทั้งหมด 1500 โปรโต-คอร์ม

3.3.2 การเตรียมปริมาตรของอาหารทั้งหมด โดยใช้ขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 50 มิลลิลิตร บรรจุอาหารสังเคราะห์ร่วมกับสารละลายโคลชิซิน 10 มิลลิลิตร ทั้งหมดมี 5 กรรมวิธีๆ ละ 20 ซ้ำใช้อาหารทั้งหมด 1000 มิลลิลิตร

3.3.3 การเตรียมสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยการชั่งสารโคลชิซินชนิดผง 0.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 25 มิลลิลิตร

3.3.4 การเตรียมอาหารสังเคราะห์ร่วมกับสารละลายโคลชิซิน โดยการใส่อาหารสังเคราะห์ร่วมกับปริมาตรของสารละลายโคลชิซิน 0 1 2 3 6 และ 12 มิลลิลิตร และปรับ ปริมาตรด้วยอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง CMU 1 ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 10 มิลลิลิตร ในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 50 มิลลิลิตร และปิดด้วยแผ่นพลาสติก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รัดยางให้แน่น นำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนเย็นก่อนนำไปใช้

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 ใช้ช้อนด้ามยาวตักโปรโตคอร์มที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมโปรโตคอร์มออกจากขวดภายใต้ตู้กรองอากาศ และซับให้แห้งด้วยผ้าขาวบางที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นย้ายลงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตรดัดแปลง CMU 1 ที่เติมสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0 0.01 0.025 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปิดฝาขวดด้วยแผ่นพลาสติกใส รัดยางให้แน่น นำไปวางบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน

3.4.2 เมื่อครบ 10 วัน ทำการเปลี่ยนย้ายโปรโตคอร์มลงในอาหารใหม่ที่ไม่เติมโคลชิซิน โดยใช้ช้อนด้ามยาวตักโปรโตคอร์มใส่ลงในขวดที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และล้างให้สะอาด 3 ครั้ง และซับด้วยผ้าขาวบางจนแห้ง ใช้ปากคีบด้ามยาวคีบโปรโตคอร์มลงในขวดปากกว้างที่บรรจุอาหารแข็งสังเคราะห์สูตรดัดแปลง CMU 1 และปิดปากขวดด้วยแผ่นพลาสติกใส รัดยางให้แน่น นำไปวางในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส

3.4.3 เปลี่ยนอาหารทุกๆ 1 เดือน พร้อมกับการบันทึก ความสูงต้น จำนวนใบ ความยาวใบ จำนวนราก ความยาวราก และอัตราการรอดของโปรโตคอร์ม

3.4.4 ย้ายโปรโตคอร์มที่เจริญเป็นลักษณะต้นอ่อนที่มีสีเขียวลงในสูตรอาหารชักนำให้เกิดรากและยอด ด้วยการเติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิลกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหาร

3.4.5 หลังจากต้นอ่อนมีใบจริง 3 - 4 ใบแล้ว จึงย้ายออกปลูก เมื่อต้นเจริญเติบโตสมบูรณ์ เต็มที่และออกหน่อใหม่ นำปลายรากของหน่อใหม่มาหาจำนวนโครโมโซมตามวิธีการเหมือนกับการทดลองที่ 2.3 เพื่อเปรียบเทียบจำนวนโครโมโซมของต้นปกติและต้นที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved