หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

การเตรียมเยื่อหุ้มยอดอ่อนข้าวโพด แช่เมล็ดข้าวโพดพันธุ์โบกอร์ 2 (Zea mays L. cultivar Bogor 2) ในน้ำกลั่น 4 ชั่วโมง พร้อมทั้งพ่นอากาศให้ด้วย เรียงเมล็ดที่แช่น้ำแล้วลงบนกระดาษเยื่อใน Petri-dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ซึ่งใส่น้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร โดยเรียงเมล็ดให้ด้านที่มี embryo หงายขึ้น Petri-dish ละ 25 เมล็ด นำ Petri-dish ซึ่งไม่ต้องปิดฝาไปไว้ในกล่องเพาะที่มีความชื้นสูงประมาณ 98% ในห้องมืดที่มีอุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียสจนถึงเวลาที่ต้องการ นำเยื่อหุ้มยอดอ่อนข้าวโพดที่มีอายุ * ตามต้องการออกมาจากกล่องเพาะ ตัดด้วยมีดผ่าตัดให้เป็นท่อน มีความยาวท่อนละ 5 มิลลิเมตร โดยตัดห่างจากปลายยอดลงมา 3 มิลลิเมตร ใช้ 1 ท่อนต่อเยื่อหุ้มยอดอ่อนข้าวโพด 1 ชิ้น แช่ท่อนเยื่อหุ้มยอดอ่อนข้าวโพดที่ตัดแล้วไว้ในน้ำกลั่นจนครบจำนวนที่ต้องการ แล้วนำไปทดลอง ตามที่จะกล่าวต่อไป หลังจากการทดลองแล้ว ก็นำมาวัดความยาว

การเตรียมเยื่อหุ้มยอดอ่อน ทำในห้องมืดทุกครั้ง โดยอาศัยเปิดไฟเขียวช่วย (Sherwin and Furuya, 1973) เมื่อได้เยื่อหุ้มยอดอ่อนข้าวโพดตามวิธีดังกล่าวแล้ว นำมาทดลองโดยแบ่งออกเป็นขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. หาอายุที่เหมาะสมของเยื่อหุ้มยอดอ่อนข้าวโพด

โดยการเพาะเมล็ดข้าวโพดให้มีอายุต่าง ๆ กัน คือ 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130 และ 140 ชั่วโมง ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น เมื่อครบ

---

* อายุ หมายถึง ระยะเวลานับจากเริ่มเพาะ คิดเป็นชั่วโมง

กำหนดเวลาดังกล่าวนั้น ๆ วัดความยาวของเยื่อหุ้มยอดอ่อน แล้วนำมาเขียนกราฟแสดงการเจริญ (growth curve) เพื่อจะได้ทราบถึงช่วงที่เยื่อหุ้มยอดอ่อนข้าวโพดมีอัตราการเจริญสูง (ช่วงที่กำลังอยู่ใน exponential phase) เพื่อจะนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2. หา pH ที่เหมาะสม

เพาะเมล็ดข้าวโพดให้มีอายุ 80 ชั่วโมง ซึ่งเป็นอายุที่มีอัตราการเจริญดีมาก ตัดเยื่อหุ้มยอดอ่อนให้เป็นท่อนตามวิธีที่กล่าวข้างต้น แล้วนำมาเสียบเข้ากับแท่งแก้วเล็ก ๆ แท่งละ 3 ท่อน ใส่แท่งแก้วนี้ลงในหลอดทดลองขนาด 3 X ½ นิ้ว ภายในบรรจุ phosphate buffer 1.5 มิลลิลิตร pH ต่าง ๆ คือ 5.8, 6.0, 6.2, 6.4, 6.6, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8 และ 8.0 หลอดละแท่ง ปิดหลอดทดลองด้วยจุกคอร์ก นำหลอดทดลองไปเรียงใน klinostat ซึ่งหมุนด้วยความเร็ว 1 รอบต่อนาทีในห้องมืด อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Wright, 1966) แล้วนำท่อนเยื่อหุ้มยอดอ่อนออกมาวัดความยาว เปรียบเทียบกันในแต่ละระดับ pH ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3. หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IAA

เตรียม stock solution ของ IAA 10^{-3} M โดยชั่ง IAA หนัก 0.0175 กรัม ละลายด้วย NaOH 0.1 N 1 มิลลิลิตร แล้วเติม phosphate buffer pH 6.5 จนครบ 100 มิลลิลิตร เก็บ stock solution ของ IAA นี้ในตู้เย็น เมื่อต้องการใช้ก็นำ stock solution มาทำให้เจือจางด้วย phosphate buffer ให้ได้ความเข้มข้นตามความต้องการต่อไป

ใส่ท่อนเยื่อหุ้มยอดอ่อนข้าวโพดอายุ 80 ชั่วโมง ในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลาย IAA ที่มีความเข้มข้น 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8} และ 10^{-9} M หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร ปิดหลอดด้วยจุกคอร์ก และนำไปใส่ klinostat เช่นเดียวกับข้อ 2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดความยาวของเยื่อหุ้มยอดอ่อนข้าวโพดเปรียบเทียบกัน ทำการทดลองเช่นนี้ 3 ซ้ำเช่นเดียวกัน

4. หาระยะเวลาทดลองที่เหมาะสม

ใส่เยื่อหุ้มยอดอ่อนข้าวโพดอายุ 80 ชั่วโมง ในสารละลาย IAA ความเข้มข้น 10^{-5} M เช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น เปรียบเทียบกับที่ใส่ใน phosphate buffer pH 6.5 ซึ่งใช้เป็น control โดยทดลองใช้ช่วงเวลา (incubation period) ต่าง ๆ กันคือ 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง ทำการทดลองเช่นนี้ 4 ซ้ำ นำเยื่อหุ้มยอดอ่อนข้าวโพดที่แช่ใน IAA ระยะเวลานานต่าง ๆ กันตามต้องการ มาวัดความยาวเปรียบเทียบกับ control ของแต่ละช่วงเวลาที่ทดลอง

5. วัดความยาวของ epidermal cell

วิธีการที่ใช้ดัดแปลงมาจาก Gawlik และ Shen-Miller (1974) หลังจากวัดความยาวของเยื่อหุ้มยอดอ่อนข้าวโพด ที่ช่วงเวลาทดลองต่าง ๆ กันดังกล่าวแล้ว แบ่งท่อนเยื่อหุ้มยอดอ่อนส่วนหนึ่งมาวัดความยาวของ epidermal cell โดยลอก epidermis ในน้ำ ภายใต้กล้องสองตา (binocular microscope) โดยใช้กำลังขยาย x 40 ย้อมสี epidermis ด้วย haematoxylin ตามวิธีของ Delafield (Johansen, 1940) แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (monocular microscope) โดยใช้กำลังขยาย x 1500 วัดความยาวของ epidermal cell ด้วย micrometer จำนวน 100 เซล ในแต่ละ treatment และวัดความยาวของ epidermal cell ก่อนที่จะเอาไปทดลองโดยถือว่าเป็นระยะเวลา 0 ชั่วโมง

6. วัดความยาวของ parenchyma cell

นำท่อนเยื่อหุ้มยอดอ่อนข้าวโพดที่เหลือจากการทดลองข้อ 5 มา fix ด้วย fixative FAA (Formalin - Aceto - Alcohol) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้ว dehydrate ด้วย ethyl - butyl alcohol series เสร็จแล้วจึงฝังท่อนเยื่อหุ้มยอดอ่อนข้าวโพดลงในพาราฟิน นำชิ้นส่วนนี้มาตัดเป็น section ตามยาวด้วย microtome ติด serial section

ที่ตัดได้บนสไลด์ โดยใช้ Haupt's adhesive แล้วนำ section ไปย้อมสี haematoxylin ตามวิธีของ Delafield (Johansen, 1940) mount ด้วย piccolyte นำสไลด์ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อความถูกต้องในการเปรียบเทียบ เลือกวัดความยาว parenchyma cell จาก section ที่ไม่มี vascular bundle ติดมาด้วย โดยใช้ micrometer วัดจำนวน 100 เซลต่อ 1 section และวัด 3 section ในแต่ละ treatment เพื่อหาค่าเฉลี่ย นอกจากการวัดเซลแล้ว สังเกตดูการแบ่งเซลจาก section เหล่านี้ด้วย