บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการศึกษา

วัสดุอุปกรณ์

1. พืชทดลอง

    หัวดองดึงจำนวน 400 หัว

2. อุปกรณ์สำหรับศึกษาการฉายรังสี

    เครื่อง Gamma beam 650 ที่มีโคบอลต์-60 เป็นต้นกำเนิดรังสีแกมมา

3. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกดองดึง

    3.1 ดินผสมสำหรับปลูกพืช

    3.2 ปุ๋ยคอกและปุ๋ยอินทรีย์

    3.3 กระถาง

    3.4 ไม้ไผ่และเชือกเอ็นสำหรับทำค้าง

    3.5 ตลับเทปวัด

    3.6 ป้ายพลาสติก

    3.7 เชือกรัด

4. อุปกรณ์สำหรับศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

    4.1 เชือกวัด

    4.2 ไม้บรรทัด

    4.3 ตารางเทียบสีของบริษัทไทยสกรีนสโตร์ จำกัด

5. อุปกรณ์สำหรับศึกษาความมีชีวิตของเรณู

    5.1 propionocarmine 2 เปอร์เซ็นต์

    5.2 แผ่นสไลด์

    5.3 ปากคีบและเข็มเขี่ย

    5.4 กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope

6. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับศึกษาการงอกของเรณู

    6.1 น้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์

    6.2 แผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์

    6.3 จานแก้ว

    6.4 กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope

7. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับศึกษาโครโมโซม

7.1 Carnoy's solution

7.2 propionocarmine 2 เปอร์เซ็นต์

7.3 ferric choride

7.4 ethanol 95 เปอร์เซ็นต์

7.5 ethanol 70 เปอร์เซ็นต์

7.6 ตะเกียงแอลกอฮอล์และไม้ขีดไฟ

7.7 แผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์

7.8 ดินสอที่มียางลบ

7.9 ปากคีบและเข็มเขี่ย

7.10 กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope

8. อุปกรณ์สำหรับบันทึกภาพ

8.1 กล้องและอุปกรณ์ถ่ายภาพ

8.2 กล้องถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์(Olympus BH-2)

8.3 ฟิล์มสี ฟิล์มขาวดำ และฟิล์มสไลด์

วิธีดำเนินการศึกษา

1. การหาปริมาณรังสีแกมมาที่เหมาะสมต่อการเกิดมิวเตชันของดองดึง

นำหัวของดองดึงที่เริ่มแตกยอด ไปฉายรังสีแกมมาด้วยเครื่อง Gamma beam ที่มี Co-60 (cobalt 60) เป็นแหล่งกำเนิดรังสีแกมมา ณ สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ ให้ได้รับรังสีแกมมาปริมาณต่างๆกัน 9 ระดับๆละ 20 หัว คือ 0 10 20 40 60 80 100 200 และ 400 เกรย์

นำหัวดองดึงที่ฉายรังสีแกมมาแล้ว ปลูกในกระถางๆละ 1 หัว ปักป้ายบอกปริมาณรังสีที่ได้รับทุกกระถางทั้งหมด 9 ทรีตเมนต์ จำนวน 5 ซ้ำ รวม 180 กระถางวางในพื้นที่ทดลองขนาด 8 เมตร x 15 เมตร โดยใช้แผนการทดลองแบบ randomized complete block design ดูแลพืชทดลองโดยรดน้ำให้ชุ่ม ทำค้างไม้ไผ่และผูกเชือกเอ็นเพื่อเป็นที่ยึดเกาะของใบและพยุงลำต้น กำจัดวัชพืชและศัตรูพืชอย่างสม่ำเสมอ สังเกต บันทึกผลการทดลอง วิเคราะห์ผลการทดลองโดยการวิเคราะห์วาเรียนซ์และเปรียบเทียบผลการทดลองด้วยวิธีDuncan's multiple range test ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

1.1 การหาค่าLD $_{50}$(lethal dose - 50) ศึกษาเปอร์เซ็นต์การงอกของหัวดองดึงหลังปลูกแล้วเป็นเวลา 1 2 และ 3 เดือน โดยนับจำนวนต้นทั้งหมดและหาเปอร์เซ็นต์การตายของดองดึงเมื่อปลูกแล้วเป็นเวลา 3 เดือน เพื่อหาค่า LD_{50} ด้วยวิธี Typical sigmoid mortality และคำนวณจากสูตร regression $Y = \bar{y}+b(x_{50}-\bar{x})$เพื่อหาว่าปริมาณรังสีใดที่ทำให้เกิดอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์

1.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดองดึงที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณแตกต่างกัน โดยการสังเกตความผิดปกติของลักษณะต่างๆ ได้แก่

1.2.1 ลำต้นเหนือดินที่งอกจากหัวที่ได้รับการฉายรังสี ศึกษาความสูงของลำต้นโดยวัดจากระดับดินถึงข้อแรกที่ปลายยอดเมื่อต้นดองดึงเจริญเติบโตเต็มที่

1.2.2 ใบ ศึกษาความกว้างของใบ ความยาวของใบ โดยหาค่าเฉลี่ยจำนวน 6 ใบ ตั้งแต่ใบที่ 2 จากยอดถึงใบที่ 7 และนับจำนวนใบจากโคนถึงยอดเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่

1.2.3 ดอก ศึกษาลักษณะสีของดอกหลังดอกบาน 1 วัน โดยใช้วิธีบันทึกเทียบกับตารางเทียบสีของบริษัทไทยสกรีนสโตร์จำกัด

1.2.4 ลำต้นใต้ดินที่งอกใหม่ ศึกษาลักษณะของหัวดองดึงที่เกิดขึ้นใหม่ใต้ดินบริเวณโคนต้น

1.3 ศึกษาโครโมโซมใน meiosis ของ pollen mother cell โดยศึกษาจำนวนและลักษณะโครโมโซมจากอับเรณูโดยวิธีการเตรียมเซลล์แบบ propionocarmine smear มีวิธีการดังนี้คือ

1.3.1 fixation เก็บดอกในช่วงเวลา 7.00น.-7.30น. เลือกดอกตูมที่มีความยาว

ประมาณ1.7 เซนติเมตร นำมาแช่ในสารละลาย Carnoy หยด ferric chloride เข้มข้น 2-3 หยด แช่ไว้ประมาณ 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

1.3.2 storage ล้างดอกให้สะอาดด้วย ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เก็บใน ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ซึ่งเก็บได้นาน 6 - 12 เดือน

1.3.3 staining และsmear เมื่อต้องการตรวจสอบจำนวนโครโมโซม ใช้ปากคีบนำดอกที่เก็บไว้ใน ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ออกมาตัดอับเรณู 1 อัน นำมาวางบนแผ่นสไลด์ หยด propionocarmine 2 เปอร์เซ็นต์ลงไป 1-2 หยด ใช้เข็มเขี่ยแบ่งอับเรณูออกเป็น 2 ส่วนและกดผนังอับเรณูเพื่อให้ pollen mother cell หลุดออกจากอับเรณูมาลอยอยู่ในสี propionocarmine คีบเศษเปลือกอับเรณูออก ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ตรงบริเวณที่ย้อม แล้วใช้ปลายดินสอด้านที่มียางลบเรียบๆค่อยๆกดเบาๆเพื่อให้เซลล์กระจาย และทุกเซลล์ถูกกดทับอยู่ในระนาบเดียวกันบนสไลด์ นำกระดาษซับวางบนแผ่นสไลด์บริเวณที่ปิดกระจกซับสีออกแล้วนำสไลด์ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย x 10 หาเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมทาเฟสและอนาเฟส เลือกเซลล์ที่มีโครโมโซมกระจายดีที่สุดมาตรวจนับจำนวนอย่างน้อย 20 เซลล์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย x 100 และถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ Olympus BH 2 ด้วยฟิล์มขาวดำ T-max 100

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดองดึงที่ปลูกในแปลงทดลองก่อนฉายรังสีแกมมา

ปลูกหัวดองดึงจำนวน 200 หัว เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาก่อนฉายรังสีแกมมา ณ แปลงทดลองของภาควิชาพฤกษศาสตร์ โดยเตรียมแปลงปลูกขนาด 1 x 10 เมตร พลิกหน้าดินตากแดดนาน 7 วัน ใส่ดินผสมปุ๋ยคอก และปุ๋ยอินทรีย์ลงในดินแล้วขึ้นแปลงสูงประมาณ 15 เซนติเมตร นำลำต้นดองดึงที่เริ่มแตกยอดลงปลูกโดยให้มีระยะปลูกระหว่างต้น 30 เซนติเมตร ระหว่างแถว 30 เซนติเมตร ลึก 8 เซนติเมตร รดน้ำให้ชุ่ม ทำค้างไม้ไผ่และผูกเชือกเอ็น เพื่อเป็นที่ยึดเกาะของใบและพยุงต้นพร้อมปักป้ายเลขลำดับต้น กำจัดวัชพืชและศัตรูพืชอย่างสม่ำเสมอ

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดองดึง โดยการสังเกตลักษณะและบันทึกผลการทดลองของทุกต้นดังต่อไปนี้

2.1 ความสูงของต้น ศึกษาความสูงของต้น โดยวัดจากระดับดินถึงส่วนของข้อแรกที่ปลายยอด เมื่อดองดึงมีการเจริญเติบโตเต็มที่

2.2 ใบ ศึกษาความกว้าง ความยาว อัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างของใบที่ 7 และจำนวนใบของต้น โดยนับจากโคนของลำต้นเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่

2.3 ดอก ศึกษาความกว้าง ความยาว และสีของกลีบดอกโดยเทียบกับตารางเทียบสีของบริษัทไทยสกรีนสโตร์จำกัด

2.4 ผล ศึกษาความยาวและเส้นผ่าศูนย์กลางผล จำนวนผลต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อผล

2.5 ลำต้นใต้ดินที่เกิดใหม่ ชั่งน้ำหนักหัวใหม่ที่เกิดขึ้นเมื่อต้นดองดึงตาย นำหัวใต้ดินที่พักตัวขึ้นจากดิน ติดสลากเลขลำดับหัว คัดเลือกลำต้นใต้ดินของดองดึงที่มีความสมบูรณ์ กล่าวคือ มาจากต้นที่ไม่เป็นโรค และมีน้ำหนักใกล้เคียงกัน เพื่อเตรียมใช้ในการทดลองที่ 3 ต่อไป

3. การศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยา เรณู และโครโมโซมของดองดึง

นำลำต้นใต้ดินดองดึงจากข้อ 2.5 ซึ่งมีลักษณะเป็นรูปตัว V หรือ L ที่มีความสมบูรณ์โดยมีน้ำหนัก 27.34-27.48 กรัม และเริ่มแตกยอดที่ปลายแล้วจำนวน 120 ลำต้น มาหักนำเพียงข้างเดียวไปฉายรังสี ด้วยเครื่องGamma beam ที่มี Co-60 เป็นแหล่งกำเนิด ที่ สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ โดยให้รังสีแกมมาปริมาณต่างๆกัน 5 ระดับ คือ0 2.5 5.0 7.5 และ 10.0 เกรย์ ระดับละ 24 หัว แล้วนำไปปลูกตามวิธีในข้อ2ในแปลงทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design ที่มี 4 ซ้ำ

3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดองดึงที่ฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆเปรียบเทียบกับต้นควบคุม

ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนต่างๆของต้นดองดึงที่เจริญจากหัวที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ เก็บตัวอย่าง ทรีทเมนต์ละ 20 ต้น โดยนำมาสังเกต วัดขนาดบันทึกลักษณะและวิเคราะห์ผลการทดลองโดยการวิเคราะห์วาเรียนซ์ และเปรียบเทียบผลการทดลองด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

3.1.1 ลำต้นเหนือดิน ศึกษาเปอร์เซ็นต์การงอกของหัวดองดึง ความสูงของลำต้นโดยวัดจากระดับดินถึงข้อแรกที่ปลายยอดเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ เปอร์เซ็นต์การตายของต้นเมื่อปลูกเป็นเวลา 3 เดือน จำนวนต้นที่งอกโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นเมื่ออายุ 1 2 และ3เดือน สังเกตและศึกษาลักษณะของลำต้น

3.1.2 กิ่ง ศึกษาระยะเวลาของการแตกกิ่ง ความยาวกิ่งเมื่อดองดึงเจริญเติบโตเต็มที่โดยสุ่มวัด 1 กิ่งของทุกต้นในแต่ละทรีทเมนต์ สังเกตและศึกษาลักษณะของกิ่ง

3.1.3 ใบ ศึกษาความยาวและความกว้างของใบที่ 7 โดยนับจากโคน อัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างใบ สังเกตและศึกษาลักษณะของใบ

3.1.4 ดอก ศึกษาระยะเวลาการออกดอกโดยนับจากวันปลูกจนกระทั่งดอกแรกบาน ศึกษาลักษณะสีของดอกหลังจากดอกบาน 1 วัน โดยการเทียบสีกับตารางเทียบสีของบริษัทไทยสกรีนสโตร์จำกัด ศึกษาระยะเวลาดอกบานคือเมื่อกลีบดอกกระดกขึ้นมากกว่า 180 องศาจนกระทั่งสีของกลีบ

ดอกเปลี่ยนเป็นสีแดงแต่กลีบยังไม่โรย ความกว้างของกลีบดอก ความยาวของกลีบดอก ศึกษาจำนวนดอกต่อต้น เปอร์เซ็นต์การออกดอก หาความถี่ของลักษณะผิดปกติของดอกโดยนับจำนวนดอกที่ผิดปกติจากดอกทั้งหมดของทุกต้น และศึกษาลักษณะดอก

3.1.5 ผล ศึกษาความยาวของผล เส้นผ่าศูนย์กลางของผล จำนวนผลต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อผล ศึกษาและสังเกตลักษณะของผล

3.1.6 ลำต้นใต้ดินที่เกิดใหม่ ศึกษาลักษณะและชั่งน้ำหนักหัวดองดึงที่เกิดขึ้นใหม่ใต้ดินบริเวณโคนต้น

3.2 การศึกษาเรณูของดองดึงจากต้นที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ

3.2.1 การหาเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของเรณูดองดึง

นำเรณูดองดึงที่แตกใหม่ๆจากทุกทรีทเมนต์ๆละ 10 ต้น โดยเก็บในช่วงเวลา 7.00น.-8.00 น.ทดสอบหาเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของเรณู โดยย้อมสีด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ propionocarmine บนสไลด์ แล้วนำไปตรวจนับใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope ใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย x 10 นับจำนวนเรณู สไลด์ละ 5 ตำแหน่งที่ไม่ซ้ำกัน จำนวนเรณูที่มีความสมบูรณ์จะติดสีแดง และเรณูที่ไม่สมบูรณ์จะลีบเล็กไม่ติดสี (Delourme,1996) แล้วนำค่าที่นับได้มาหาค่าเฉลี่ย และคำนวณเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของเรณู

3.2.2 การหาเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูดองดึง

นำเรณูดองดึงที่แตกใหม่ๆ เช่นเดียวกับข้อ3.2.1 มาทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การงอกโดยเลี้ยงในสารละลายน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ (สุมิตรา คงชื่นสินและพรทิพย์ เศรษฐาวิวัฒน์ 2533) บนสไลด์ในสภาพความชื้นสูงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจนับจำนวนเรณูที่งอกและไม่งอกหลอดเรณู สไลด์ละ 5 ตำแหน่งที่ไม่ซ้ำกัน แล้วนำค่าที่นับได้มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณู

3.3 การศึกษาโครโมโซมใน meiosis ของ pollen mother cell

ศึกษาโครโมโซมของ pollen mother cell จากอับเรณูของดอกดองดึงจากต้นที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ โดยวิธีการเตรียมเซลล์แบบ propionocarmine smear เช่นเดียวกับการศึกษาโครโมโซมดังข้อ 1.3