บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

วิธีปลูกข้าว

แช่เมล็ดข้าวพันธุ์ปิ่นแก้ว 56 พันธุ์ T 442–57 และพันธุ์ ก ข.1 แยกกัน แต่ละพันธุ์ในน้ำในที่มีแสงเป็นเวลา 2 วัน แล้วเอาขึ้นจากน้ำ หุ้มเมล็ดข้าวที่แช่ทั้งหมดด้วยผ้าบาง ๆ ชุ่มน้ำอีก 1 วันในที่ไม่มีแสง เมล็ดข้าวจะงอก นำไปปลูกลงในแปลงซึ่งเป็นดินเหนียวชุ่มน้ำ ขนาดแปลงละ 12 x 6 ตารางเมตร จำนวน 3 แปลง ใส่ปุ๋ยสูตร N–P–K อัตรา 6–6–6 ในปริมาณ 3.75 กรัมต่อตารางเมตร ปลูกต้นข้าวเป็นแถวห่างกัน 25 เซนติเมตร และแต่ละต้นในแถวห่างกันต้นละ 25 เซนติเมตรด้วย แยกต้นข้าว 3 พันธุ์ดังกล่าวในแต่ละแปลง แปลงละ 46 แถว แถวละ 22 ต้น

การปลูกข้าวทำที่สถานีทดลองข้าวคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี

เมื่อต้นข้าวโตถึงระยะที่ทำการทดลองได้ นำมาตามจำนวนที่ต้องการเพื่อใช้ทดลองในห้องปฏิบัติการ ที่ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีศึกษาผลของกรดจิบเบอเรลลิกต่อการยืดตัวของลำต้นข้าวขึ้นน้ำและข้าวนาสวน

แบ่งการทดลองออกเป็นขั้นตอนดังนี้

1. วิธีหาปล้องที่เหมาะสมของข้าว

ใช้ข้าวในการทดลองขั้นนี้เพียง 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ปิ่นแก้ว 56 และพันธุ์ T 442–57 โดยวัดความยาวปล้องของต้นข้าวที่ปลูก โดยเริ่มวัดเมื่อข้าวอายุ 5 สัปดาห์จนถึง 16 สัปดาห์ ในแต่ละสัปดาห์ถอนต้นข้าวขึ้นมาทั้งราก 30 กอ ใส่ถุงพลาสติกแล้วนำมาวัดความยาวปล้องในห้องปฏิบัติการ ก่อนที่จะทำการวัดล้างดินออกจากรากให้สะอาด ตัดรากทิ้งเหลือเฉพาะลำต้นเหนือดิน วิธีวัดเริ่มวัดตั้งแต่ใต้ข้อล่างไปจนถึงใต้ข้อบนเป็น

ความยาวของ 1 ปล้อง ปล้องแรกที่อยู่ปลายล่างสุดของเหง้าเป็นปล้องที่ 1 และปล้องถัดขึ้นมาเป็นปล้องที่ 2 ตามลำดับ วัดความยาวของทุกปล้องที่เห็นทั้ง 30 ต้นในแต่ละสัปดาห์ โดยใช้กล้องจุลทัศน์ 2 ตา (binocular microscope) ใช้หน่วยความยาวเป็นเซนติเมตร

สำหรับต้นแรกที่เกิดจากเมล็ด (main stem) นั้นวัดความยาวปล้องของทั้งเหง้าและลำต้นเหนือดิน เพื่อดูการเจริญของทุกปล้องในแต่ละสัปดาห์ สำหรับหน่อที่ 1 และหน่อที่ 2 (first primary tiller และ second primary tiller) นั้นวัดเฉพาะปล้องของลำต้นเหนือดินเปรียบเทียบกับความยาวปล้องเหนือดินของต้นแรกที่เกิดจากเมล็ด

ปล้องที่เหมาะสมของต้นข้าวพันธุ์ ก ข.1 ได้จากรายงานของรัชนี (2519)

ทุกการทดลองต่อไปนี้ใช้ต้นข้าวในรูปของท่อนลำต้น (stem segment) และแต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ

2. <u>วิธีทำท่อนลำต้นที่เหมาะสมของลำต้นข้าว และการเตรียมสารละลายกรดจิบเบอเรลลิค (GA_3)</u>

จากข้อ 1 พบว่าปล้องที่มีอัตราการเจริญดีในระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นของข้าวแต่ละพันธุ์เป็นดังนี้ พันธุ์ปิ่นแก้ว 56 ปล้องที่ 10, 11 และ 12 พันธุ์ T 442–57 ปล้องที่ 10 และ 11 และพันธุ์ ก ข.1 ปล้องที่ 10 และ 11 และจากการวัดความยาวปล้องของหน่อที่ 1 และหน่อที่ 2 พบว่าปล้องที่อยู่เหนือดินมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกับต้นแรกที่เกิดจากเมล็ด ดังนั้นปล้องที่นำมาใช้ทดลองจึงเป็นทั้งปล้องของต้นแรก หน่อที่ 1 และหน่อที่ 2 ในขณะที่ปล้องเหล่านี้กำลังเจริญมีขนาด 1.5 – 2 เซนติเมตร ซึ่งระยะนี้ข้าวพันธุ์ปิ่นแก้ว 56 และ T 442–57 มีอายุ 9 – 10 สัปดาห์ และข้าว ก.ข. 1 มีอายุ 10 – 11 สัปดาห์

<u>การเตรียมท่อนลำต้นของลำต้นข้าว</u>

เมื่อต้นข้าวโตขนาดดังกล่าวแล้ว คัดต้นข้าวทั้ง 3 พันธุ์ให้มีจำนวนมากพอที่จะ

ใช้โดยตัดตำแหน่งที่ต่ำกว่าปล้องที่ 10 หนึ่งปล้อง ตัดใบทิ้งแล้วเอาต้นข้าวใส่ถุงพลาสติก นำไปตัดเป็นท่อนลำต้นในห้องปฏิบัติการ โดยล้างผิวของต้นข้าวเหล่านี้ให้สะอาดด้วยน้ำยาล้างผัก (ยี่ห้อไลบอนเอฟ) อย่างรวดเร็ว แล้วล้างด้วยน้ำประปาอีก 2 – 3 ครั้งจนหมดฟองสบู่ ล้างต้นข้าวเหล่านี้อีกทีหนึ่งด้วยคลอร็อกซ์ (sodium hypochlorite) 10% นาน 2 นาที เพื่อลดปริมาณของจุลินทรีย์บางชนิดที่อาจมีอยู่ตามผิวของต้นข้าว แล้วเทคลอร็อกซ์ทิ้งล้างต่อทันทีด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วครั้งละ 2 – 3 นาที เปลี่ยนน้ำ 3 ครั้ง รินน้ำทิ้ง แล้วใส่น้ำกลั่นใหม่ลงไปให้ท่วมต้นข้าวเหล่านั้นเพื่อรอการตัดเป็นท่อนลำต้น

การตัดต้นข้าวให้เป็นท่อนลำต้นเพื่อนำมาทดลองกับ GA$_3$ ทำในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้ปากคีบ คีบเอาต้นข้าวที่เตรียมไว้นั้นขึ้นมาวางบนกระดาษที่อยู่ใน petridish แล้วใช้ใบมีดโกนตัดให้เป็นท่อนลำต้นตรงส่วนและขนาดที่ต้องการดังนี้

ก. ตัดเนื้อยื่อปล้องที่เหมาะสมตั้งแต่ใต้ข้อบนลงมายาว 0.5 เซนติเมตร เอากาบใบทิ้ง

ข. ตัดเนื้อเยื่อปล้องที่เหมาะสมตั้งแต่เหนือข้อล่างขึ้นไปยาว 1 เซนติเมตร เอากาบใบทิ้ง

ค. ตัดเนื้อเยื่อปล้องที่เหมาะสมตั้งแต่ใต้ข้อล่างขึ้นไปยาว 1 เซนติเมตร เอากาบใบทิ้ง

ง. ตัดส่วนของปล้องที่เหมาะสมตั้งแต่ใต้ข้อล่างขึ้นไปยาว 1 เซนติเมตร ให้ส่วนของกาบใบติดอยู่ด้วย

จ. เลือกปล้องที่เหมาะสมในระยะที่มีความยาว 1 เซนติเมตร ตัดส่วนตั้งแต่ใต้ข้อล่างขึ้นไปจนถึงเหนือข้อบนให้ส่วนของกาบใบติดอยู่ด้วย ความยาวท่อนลำต้น 1 เซนติเมตร

การเตรียมสารละลาย gibberellic acid (GA_3)

เตรียม stock solution ของ GA_3 เข้มข้น 10^{-1} M ใช้ GA_3 ของ Sigma Chemical Company, St. Louis, USA. มีน้ำหนักโมเลกุล 346.4 โดยใช้ GA_3 หนัก 0.1732 กรัม ละลายใน absolute ethanol 5 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง เมื่อ GA_3 ละลายหมดเก็บสารละลาย GA_3 ไว้ที่อุณหภูมิ 10 – 15 °C. เมื่อจะใช้ทดลองก็นำมาทำให้เจือจางตามความเข้มข้นที่ต้องการ

การให้ GA_3 ต่อท่อนลำต้น

นำท่อนลำต้นข้าวพันธุ์ปิ่นแก้ว 56 และ ก ข.1 ที่เตรียมไว้ตามข้อ ก, ข, ก, ง และ จ นั้นใส่ลงในภาชนะแก้วรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 7 เซนติเมตร มีฝาปิด ส่วนล่างของภาชนะมีกระดาษกรองวางอยู่ ใช้ปิเปต (pipette) ดูดสารละลาย GA_3 เข้มข้น 10^{-5} M ในน้ำตาล sucrose 0.1 M จำนวน 8 มิลลิลิตรใส่ลงในภาชนะโดยระวังไม่ให้มีฟองอากาศอยู่ภายใต้กระดาษกรอง แล้ววางแผ่นพลาสติคใสลักษณะเป็นแผ่นกลมหนา 1 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร มีขาตั้งสูง 0.5 เซนติเมตร บนแผ่นพลาสติคเจาะรู 15 รู ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรู 8 มิลลิเมตร ลงบนกระดาษกรอง แล้ววางท่อนลำต้นข้าวเหล่านั้นลงตามรูบนแผ่นพลาสติคให้ด้านโคนของลำต้นอยู่ด้านล่าง ได้รับ GA_3 ทางส่วนล่างใช้ท่อนลำต้นข้าวจำนวนภาชนะละ 15 ต้น นำไปไว้ในที่ไม่มีแสงโดยวางภาชนะที่บรรจุข้าวลงในตะแกรงพลาสติกที่ปิดด้วยกระดาษสีดำ และมีผ้าดำคลุมทับอีกทีหนึ่ง ตั้งบนเครื่องเขย่าที่มีอัตราความเร็ว 60 ครั้งต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง แล้วนำท่อนลำต้นข้าวที่ผ่านมาวัดความยาวสุดท้ายหน่วยเป็นเซนติเมตร เปรียบเทียบการเจริญของท่อนลำต้น 5 แบบ ในสารละลาย GA_3

3. วิธีหาชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของท่อนลำต้นข้าวเมื่อได้รับ GA_3

ลำต้นข้าวพันธุ์ปิ่นแก้ว 56 ตัดเป็นท่อนตามวิธีในข้อ 2 ง. แล้วนำมาใส่ลงในภาชนะเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2 แต่ภายในบรรจุสารละลาย GA_3 ความเข้มข้น 10^{-5} M

ในอาหารที่ต่างชนิดกันชนิดละ 8 มิลลิลิตร โดยการทำ GA_3 เข้มข้น 10^{-1} M ใน stock solution ให้เจือจางเป็น 10^{-4} M ด้วยการใช้ปิเปตดูด GA_3 เข้มข้น 10^{-1} M ปริมาณ 0.01 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน แล้วผสม GA_3 เข้มข้น 10^{-4} M ลงในอาหารชนิดต่าง ๆ ดังนี้

ก. น้ำกลั่น 7.2 มิลลิลิตร + GA_3 เข้มข้น 10^{-4} M 0.8 มิลลิลิตร

ข. น้ำตาล sucrose 0.1 M 7.2 มิลลิลิตร + GA_3 เข้มข้น 10^{-4} M 0.8 มิลลิลิตร

ค. สารละลาย Hoagland 7.2 มิลลิลิตร + GA_3 เข้มข้น 10^{-4} M 0.8 มิลลิลิตร

ง. สารละลาย Hoagland และน้ำตาล sucrose 0.1 M 7.2 มิลลิลิตร + GA_3 เข้มข้น 10^{-4} M 0.8 มิลลิลิตร

จ. สารละลาย Hoagland และน้ำตาล sucrose 0.1 M 7.2 มิลลิลิตร + GA_3 เข้มข้น 10^{-4} M 0.8 มิลลิลิตร + Chloramphenical 80 ug (10 µg/ml)

ในอาหารแต่ละชนิดใช้ท่อนลำต้นข้าว 15 ท่อน incubate เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง แล้วนำท่อนลำต้นมาวัดความยาวเปรียบเทียบการเจริญในอาหารแต่ละชนิด

4. <u>วิธีหาการเจริญของท่อนลำต้นข้าวในช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อได้รับ GA_3</u>

ลำต้นข้าวพันธุ์ปิ่นแก้ว 56 พันธุ์ T 442–57 และพันธุ์ ก ข.1 ตัดเป็นท่อนตามวิธีในข้อ 2 ง. ให้ท่อนลำต้นได้รับ GA_3 ตามวิธีในข้อ 2 ใส่ท่อนลำต้นในภาชนะ 5 ใบ ๆ ละ 15 ท่อน incubate เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2 โดยใช้ช่วงเวลาต่าง ๆ กันคือ 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง แล้วนำท่อนลำต้นเหล่านั้นมาวัดความยาวเปรียบเทียบการเจริญในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน

5. วิธีหาวิธีการที่เหมาะสมในการให้ GA_3 ต่อท่อนลำต้นข้าว

นำลำต้นข้าวพันธุ์ปิ่นแก้ว 56 พันธุ์ T 442–57 และพันธุ์ ก ข.1 มาตัดเป็นท่อนตามวิธีในข้อ 2 ง. วางท่อนลำต้นลงในภาชนะที่บรรจุสารละลายดังในข้อ 3 ข. ให้ท่อนลำต้นได้รับ GA_3 2 วิธีต่างกันคือ

ก. ให้ท่อนลำต้นได้รับ GA_3 ทางข้อล่าง โดยใช้ปิเปตดูดสารละลาย GA_3 เข้มข้น 10^{-5} M ในน้ำตาล sucrose 0.1 M 8 มิลลิลิตร ใส่ลงในภาชนะแก้วที่มีกระดาษกรองและมีแผ่นพลาสติคเจาะรูวางอยู่ ใส่ท่อนลำต้นลงตามรูบนแผ่นพลาสติกให้ด้านที่เป็นข้ออยู่ล่างเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2

ข. ให้ท่อนลำต้นได้รับ GA_3 ทุกส่วน โดยใช้ปิเปตดูดสารละลาย GA_3 เข้มข้น 10^{-5} M ในน้ำตาล sucrose 0.1 M 30 มิลลิลิตร ใส่ลงในภาชนะแก้ว แล้วใส่ท่อนลำต้นลงในสารละลายนั้น

แต่ละวิธีใช้ท่อนลำต้นข้าว 15 ท่อน นำไป incubate เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำท่อนลำต้นเหล่านั้นมาวัดความยาวเปรียบเทียบการเจริญเมื่อได้รับ GA_3 ใน 2 ลักษณะที่ต่างกันนี้

6. ศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการเจริญของท่อนลำต้นข้าวเมื่อได้รับGA_3

ลำต้นข้าวพันธุ์ปิ่นแก้ว 56 พันธุ์ T 442–57 และพันธุ์ ก ข.1 ตัดเป็นท่อนตามวิธีในข้อ 2 ง. วางท่อนลำต้น 15 ท่อนลงในภาชนะแก้วให้ได้รับ GA_3 ตามวิธีในข้อ 5 ก. ภาชนะหนึ่ง incubate ในที่มีแสง 3,000 lux อีกภาชนะหนึ่ง incubate ในที่ไม่มีแสง วางบนเครื่องเขย่าอัตราความเร็ว 60 ครั้งต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำท่อนลำต้นเหล่านี้มาวัดความยาวเปรียบเทียบการเจริญเมื่อได้รับ GA_3 ในที่มีแสงและไม่มีแสง

7. วิธีหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ GA_3

ลำต้นข้าวพันธุ์ปิ่นแก้ว 56 พันธุ์ T 442-57 และพันธุ์ ก ข.1 ตัดเป็นท่อน ตามวิธีในข้อ 2 ง. ใส่ท่อนลำต้นลงในภาชนะ 10 ใบ ๆ ละ 15 ท่อน ในภาชนะแต่ละใบใส่สารละลายน้ำตาล sucrose 0.1 M และ GA_3 ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0, 10^{-11}, 10^{-10}, 10^{-9}, 10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4} และ 10^{-3} M อย่างละ 8 มิลลิลิตร ให้ท่อนลำต้นข้าวได้รับ GA_3 ตามวิธีข้อ 5 ก. incubate เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2 ที่อุณหภูมิ 27 °ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำท่อนลำต้นเหล่านี้มาวัดความยาวเปรียบเทียบการเจริญใน GA_3 ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

8. วิธีหาความแตกต่างของการให้ GA_3 ต่อท่อนลำต้นข้าวครั้งเดียวและให้ซ้ำกัน 3 ครั้ง

ลำต้นข้าวพันธุ์ปิ่นแก้ว 56 และพันธุ์ ก ข.1 ตัดเป็นท่อนตามวิธีในข้อ 2 ง. วางลงในภาชนะแก้วที่มีสารละลาย sucrose 0.1 M และ GA_3 ความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 0, 10^{-10}, 10^{-9}, 10^{-8}, 10^{-7} และ 10^{-6} M โดยให้ท่อนลำต้นได้รับตามวิธีในข้อ 5 ก. เตรียมท่อนลำต้นดังกล่าวนี้ 2 ชุด ชุดหนึ่งให้ GA_3 ตอนเริ่มแรกที่ 0 ชั่วโมงเท่านั้น incubate ตามวิธีในข้อ 2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง อีกชุดหนึ่งให้ GA_3 3 ครั้ง คือที่ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้ปิเปตดูดเอาสารละลายเก่าออกและดูดสารละลายใหม่ใส่ลงในภาชนะเดิมที่เวลาดังกล่าวตามลำดับ incubate ตามวิธีในข้อ 2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นับตั้งแต่เริ่มให้ครั้งแรกที่ 0 ชั่วโมง แล้วนำท่อนลำต้นเหล่านั้นมาวัดความยาวเปรียบเทียบการเจริญเมื่อได้รับ GA_3 ความเข้มข้นต่าง ๆ กันเมื่อเริ่มแรกครั้งเดียว และซ้ำกัน 3 ครั้งที่ช่วงเวลาดังกล่าว

9. วิธีวัดความยาว เซลล์ในระยะของปล้อง โดยการลอกเนื้อเยื่อ

ท่อนลำต้นข้าวพันธุ์ปิ่นแก้ว 56 และพันธุ์ ก ข.1 ที่ได้จากการทดลองในข้อ 4 เมื่อได้รับ GA_3 และไม่ได้รับ GA_3 หลังจากการเจริญที่ระยะเวลาทดลอง 0, 24,

48 และ 72 ชั่วโมง นำมาวัดความยาว เซลผิวนอกของปล้อง ตรงส่วนปล้อง (internode) ที่ตำแหน่ง 0.5 เซนติเมตร เหนือข้อ ลอกเนื้อเยื่อผิวของปล้อง โดยใช้ใบมีดโกนสะกิดผิวปล้อง แล้วใช้ปากคีบดึงเนื้อเยื่อผิวของปล้อง เป็นแผ่นออกมาย้อมด้วยสี safranin-o วางบนแผ่นสไลด์แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์ วัดความยาว epidermal cell ด้วย micrometer หน่วยเป็นไมครอน (μ) วัดจำนวน 100 เซลในแต่ละการทดลอง เปรียบเทียบความยาว เซลผิวนอกของปล้อง ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน

10 วิธีวัดความยาว เซลในชั้นคอร์เท็กซ์ของปล้อง โดยการตัด long section

ท่อนลำต้นข้าวพันธุ์ปิ่นแก้ว 56 และพันธุ์ ก ข.1 ที่ได้จากการทดลองในข้อ 4 เมื่อได้รับ GA_3 และไม่ได้รับ GA_3 หลังจากการเจริญที่ระยะเวลาทดลอง 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำปล้องส่วน 0 – 0.5 เซนติเมตร เหนือข้อ มา fix ด้วย fixative FAA (Formalin-Aceto-Alcohol)70% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้ว dehydrate ด้วย ethyl butyl alcohol series ล้าง dehydrant ออกด้วยพาราฟินเหลว แล้วฝังท่อนปล้องลงในพาราฟิน นำชิ้นส่วนมาตัด long secton ด้วย microtome ติด serial section บนแผ่นสไลด์ด้วย Haupt's adhesive และ Formalin 3% ที่อุณหภูมิ 47 °ซ. แล้วนำ section ไปย้อมสี safranin-o และ fast green mount ด้วย Balsam นำสไลด์ส่องดูด้วยกล้องจุลทัศน์ วัดความยาว เซลในชั้นคอร์เท็กซ์ของปล้อง ที่อยู่นอก vascular bundle จำนวน 100 เซล ในแต่ละการทดลองโดยใช้ micrometer หน่วยเป็นไมครอน (μ) เปรียบเทียบความยาวของ เซลในชั้นคอร์เท็กซ์ของปล้อง ที่ได้รับ GA_3 และไม่ได้รับ GA_3 ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน