บทที่ 2

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง

ใช้บัวจีนดอกเหลืองเข้ม (Zephyranthes citrina Baker) โดยใช้เมล็ดที่ได้จากการผสมตัวเอง และส่วนหัวกลีบซึ่งเป็นลำต้นใต้ดิน

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกและผสมพันธุ์

-กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว

-ดินสีดา, ปุ๋ยคอก และปุ๋ยเคมีสูตร 16-20-0

-ถุงกระดาษ ขนาดกว้าง x ยาว 2 x 3 นิ้ว

-คลิปหนีบกระดาษ

-ป้ายสำหรับบันทึก

004369

-ปากคีบ, กรรไกร

-พู่กัน

- ethyl alcohol 70 %

3. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาโครโมโซม

- alphabromonaphthalene

- acetic acid 45 % และ 90 %

- ethyl alcohol 70 % และ95 %

- 1 normal hydrochloric acid

- Schiff's reagent

-Propionocarmine 0.5 %

-Euparol

4. อุปกรณ์เกี่ยวกับการถ่ายภาพ

- กล้องจุลทรรศน์สำหรับถ่ายภาพชนิด Olympus P.M. 7
- ฟิล์ม PANATOMIC - X

5. รังสีที่ชักนำให้เกิดมิวเตชั่น

ใช้รังสีแกมมาที่ได้จากการสลายตัวของธาตุโคบอลท์-60 (Co.-60) จากเครื่อง Gammator โดยมีอัตราความเข้มของรังสี 1000 rads ต่อ 1 นาที 8 วินาที ปริมาณรังสีที่ใช้ 2000, 4000, 6000, 8000, 10000 และ 12000 rads

<u>วิธีดำเนินการทดลอง</u>

แบ่งการทดลองออกเป็นสองตอน คือ ตอนแรกเป็นการศึกษาคารีโอไทพ์ของบัวจีนดอกเหลืองเข้ม (<u>Z. citrina</u> Baker) ที่ไม่ได้รับรังสี ตอนที่สอง ศึกษาผลของรังสีที่มีต่อโครโมโซม และลักษณะภายนอกของลำต้น ใบ ดอก และการเจริญพันธุ์

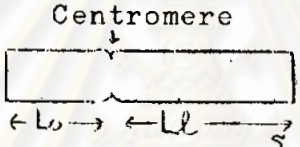
1. การศึกษาคารีโอไทพ์

เริ่มโดยนำเมล็ดที่ได้จากการผสมตัวเองมาเพาะในกะบะทราย จนงอกเป็นต้นกล้า (seedling) ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 สัปดาห์ แล้วย้ายต้นกล้ามาปลูกในกระถาง ให้หมายเลขประจำต้น หลังจากนั้น 16 สัปดาห์ นำรากมาศึกษาโครโมโซมด้วยวิธี Feulgen squash โดยตัดรากยาวประมาณ 1-2 ซม. (โดยเลือกปลายรากที่มีสีขาวใส) ใส่ใน saturated alphabromonaphthalene ทิ้งไว้ประมาณ 22 ชม. ในตู้เย็นอุณหภูมิ 10° ซ สารเคมีนี้จะทำให้การแบ่งนิวเคลียสของเซลหยุดอยู่ในระยะเมตาเฟส และทำให้โครโมโซมหดตัวสะดวกในการศึกษารูปร่างและจำนวนโครโมโซม เท alphabromo - naphthalene ทิ้งแล้ว ตรึงรากด้วย acetic acid 90 % เป็นเวลา 30 นาที

นำรากมาล้างด้วย ethyl alcohol 95 % 2 ครั้ง แล้วเก็บรากไว้ใน ethyl alcohol 70 % ที่อุณหภูมิ 10° ซ เมื่อต้องการเตรียมสไลด์ก็นำรากที่แช่ใน ethyl alcohol 70 % นี้มาล้างน้ำหลาย ๆ ครั้งแล้ว hydrolyse ด้วย 1N HCl ที่อุณหภูมิ 60° ซ ประมาณ 10 นาที แล้วแช่ใน Schiff's reagent ประมาณ 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำรากมาใส่ในน้ำประปาตัดเฉพาะปลายรากบริเวณที่ติดสีม่วงแดงวางบนสไลด์ หยดสี propionocarmine 1 หยด ปิดด้วยแผ่นแก้ว (cover glass) ใช้ปลายดินสอด้านที่ปลายราบ เคาะบนกระดาษ

ซับที่วางบนแผ่นแก้วด้วยน้ำหนักที่พอเหมาะ เพื่อให้โครโมโซมกระจายออกจากกัน กดด้วยนิ้วหัวแม่มือเพื่อให้โครโมโซมอยู่ในระนาบเดียวกัน นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ใช้เลนส์วัตถุ (objective) ที่มีกำลังขยาย 40

เลือกเซลที่นิวเคลียสกำลังแบ่งตัวในระยะเมตาเฟส โดยให้โครโมโซมกระจายมองเห็น centromere และความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่งชัดเจนมา 10 เซล ถ่ายรูปโดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 นำฟิล์มที่ได้มาขยายด้วยเครื่องอัดรูป กำลังขยายประมาณ 4000 เท่า วาดรูปขยายของโครโมโซมลงบนกระดาษเพื่อนำไปวัดความยาวของโครโมโซมทุกแท่ง โดยใช้ตำแหน่ง centromere เป็นจุดศูนย์กลาง ในเซลที่เห็นโครโมโซมเป็นสองโครมาติด ต้องวัดความยาวของโครมาติดทั้งสอง แล้วหาค่าเฉลี่ย



Ls = ความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm)

Ll = ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm)

เมื่อวัดความยาวของแขนโครโมโซมแล้ว นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (longer absolute LT) ค่า relative length (RL) และ centromeric index (CI)

ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง = ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว + ความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น

$$(LT) = (Ll + Ls)$$

$$RL. = \frac{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง}}{\text{ความยาวของโครโมโซมทั้งหมดในหนึ่งเซล}}$$

$$= \frac{LT}{\varepsilon LT}$$

$$C.I. = \frac{\text{ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว}}{\text{ความยาวของโครโมโซมแท่งนั้น}}$$

$$= \frac{Ll.}{LT}$$

การจับคู่ของโครโมโซม นำภาพวาดและรูปถ่ายของโครโมโซมมาให้หมายเลข โดยเริ่มจากโครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุดไปหาคู่ที่สั้นที่สุด โดยอาศัยความยาวและตำแหน่ง centromere เป็นหลัก โครโมโซมที่เหมือนกัน (homologous chromosome) ย่อมมีค่า relative length และ centromeric index เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน เมื่อนำค่า relative length และ centromeric index มาเขียนกราฟโครโมโซมที่เหมือนกันจะอยู่ในตำแหน่งใกล้เคียงกันหรือทับกัน

เมื่อจับคู่ของโครโมโซมแต่ละคู่ได้แล้ว นำโครโมโซมทั้งหมดมาจัด karyogram โดยเรียงลำดับคู่ของโครโมโซมจากคู่ที่ยาวที่สุดไปหาคู่ที่สั้นที่สุด โครโมโซมที่มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของโครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุด จัดเป็นโครโมโซมขนาดเล็ก ส่วนโครโมโซมขนาดกลางคือ โครโมโซมที่มีค่า relative length ระหว่าง 0.030-0.018 ส่วนโครโมโซมขนาดใหญ่ คือโครโมโซมที่มีค่า relative length ตั้งแต่ 0.031 ขึ้นไป (ดูวิธีคิดในภาคผนวก)

นำค่า relative length และ centromeric index ของโครโมโซมแต่ละคู่ทั้ง 10 เซลมาคำนวณหาค่า mean, standard deviation และ standard error ของ mean เพื่อเขียนกราฟ กราฟที่ได้จะบอกความสัมพันธ์ของโครโมโซมแต่ละคู่ว่าแตกต่างกันหรือเหมือนกันอย่างไร

2. <u>ศึกษาผลของรังสีที่มีต่อการงอกของเมล็ด, โครโมโซม ลักษณะภายนอกของลำต้น ใบ ดอก และการเจริญพันธุ์</u>

2.1 ศึกษาผลของรังสีที่มีต่อการงอกของเมล็ด

นำเมล็ดบัวจีนดอกเหลืองเข้ม (<u>Z. citrina</u> Baker) จำนวน

20, 61, 56, 56, 92, 82 และ 55 เมล็ดไปฉายรังสีแกมมาที่ได้จากการสลายตัวของธาตุโคบอลท์-60 ที่ภาควิชารังสีและไอโซโทป มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ใช้รังสีปริมาณต่าง ๆ กันคือ 0, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000 และ 12000 rads ตามลำดับ โดยมีอัตราความเข้มของรังสี 1000 rads ต่อ 1 นาที 8 วินาที แล้วเพาะเมล็ดในกะบะทรายจนงอกเป็นต้นกล้า นับจำนวนต้นกล้าที่งอกจากเมล็ดที่ได้รับรังสีและเมล็ดปกติ คำนวณหาเปอร์เซนต์การงอกของเมล็ดโดยเทียบอัตราส่วนระหว่างจำนวนเมล็ดที่งอกเป็นต้นกล้า กับจำนวนเมล็ดที่ฉายรังสีในแต่ละปริมาณที่ใช้

2.2 ศึกษาผลของรังสีที่มีต่อโครโมโซม

เมื่อเมล็ดที่ได้รับรังสีปริมาณต่าง ๆ กัน ในข้อ 2.1 งอกเป็นต้นกล้าแล้วแยกไปปลูกในกระถาง หลังจากนั้นประมาณ 16 สัปดาห์ ตัดรากที่มีปลายรากขาวใสยาวประมาณ 1-2 ซม. มาศึกษาโครโมโซมโดยวิธี Feulgen squash แล้วศึกษารูปร่างลักษณะของโครโมโซมในระยะเมตาเฟส

ส่วนหัวกลีบ จำนวน 4, 4, 10, 10, 10, 10 และ 10 หัว ฉายรังสีปริมาณ 0, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000 และ 12000 rads ตามลำดับ แล้วนำมาปลูกในกระถาง ประมาณ 8 สัปดาห์ นำรากมาศึกษาโครโมโซม

2.3 ศึกษาลักษณะภายนอกของลำต้น ใบ จากต้นที่งอกจากเมล็ดและจากหัวกลีบที่ได้รับรังสีเปรียบเทียบกับต้นปกติ

2.3.1 หลังจากที่นำต้นกล้ามาปลูกในกระถาง สังเกตลักษณะใบหลังจากนั้น ประมาณ 365 วัน สังเกตลักษณะหัวกลีบของต้นที่ได้รับรังสีปริมาณต่าง ๆ เปรียบเทียบกับหัวกลีบของต้นปกติ

2.3.2 ส่วนหัวกลีบ ที่ได้รับรังสีเมื่อนำไปปลูกในกระถาง สังเกตลักษณะการอยู่รอดของต้นที่ได้รับรังสีเปรียบเทียบกับต้นปกติ ประมาณ 365 วัน สังเกตลักษณะของหัวกลีบที่ได้รับรังสีปริมาณต่าง ๆ เปรียบเทียบกับหัวกลีบปกติ

2.4 ศึกษาลักษณะภายนอกของดอก

เมื่อเมล็ดและหัวกลีบที่ได้รับรังสีปริมาณต่าง ๆ กันมาศึกษา หัวกลีบเจริญเติบโตจนให้ดอก หลังจากได้รับรังสีประมาณ 1-6 สัปดาห์ ขณะที่ต้นที่งอกจากเมล็ด

ที่ได้รับรังสีประมาณ 12 เดือน จึงจะเจริญให้ดอก สังเกตลักษณะภายนอกของดอก เช่น ลักษณะดอกทั้งความกว้าง ยาวและสีของกลีบเลี้ยงกลีบดอก, ความยาวของก้านดอก ระยะเวลาการเจริญให้ดอกแรก

2.5 ศึกษาการเจริญพันธุ์

เมื่อเจริญเติบโตสร้างดอกได้แล้ว ผสมพันธุ์ดอกแบบผสมตัวเอง โดยนำถุงกระดาษ ขนาดกว้าง 2 X 3 นิ้วมาคลุมดอกก่อนที่ดอกจะบาน 1 วัน แล้วจึงผสมโดยใช้พู่กันป้ายเรณูมาแตะบนยอดเกสรตัวเมีย สังเกตลักษณะผล และร้อยละของดอกที่ผสมติดเมล็ด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย