

อุปกรณ์และวิธีการ



การฆ่าและรักษาเซลล์ให้คงรูป

Modified Carnoy's fluid (chloroform 3 ส่วน, 95 % ethyl alcohol 2 ส่วน, glacial acetic acid 1 ส่วน) เป็น fixative ที่ดีสำหรับโครโมโซม เพราะซึมเข้าไปใน tissue ได้เร็ว และฆ่าเซลล์ทันที และรักษาสภาพของเซลล์ให้คงอยู่โดยละลายเนื้อเยื่อส่วนเกิน material ที่จะเอาไป fix อาจเป็นของแข็งในน้ำแข็ง acetic acid ที่อยู่ใน carnoy's เป็นตัวป้องกันการหดตัวของเซลล์และการบวมตัวของเซลล์ซึ่งเนื่องมาจาก alcohol. ส่วน chloroform แปรเข้าไปในเซลล์ได้เร็ว และฆ่าเซลล์ทันที ช่วยทำให้การ fix ดีขึ้น เราอาจเก็บราก หรือ ดอกตูมไว้ใน Carnoy's fluid ได้ราว 1 สัปดาห์ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากเดิมไปมาก.

วิธีการ

การนับจำนวนโครโมโซมส่วนใหญ่ได้มาจาก aceto - carmine squash ของ microsporocyte และปลายรากที่กำลังเจริญอย่างรวดเร็ว ส่วนมากทำจากปลายราก เพราะสามารถหาโคคลอซี แต่ก็อาจจะมีเป็นบางเคสและหายากกว่าราก แต่การนับโครโมโซมของดอกง่ายกว่าของราก เพราะมีขนาดเล็กกว่าและจำนวนน้อยกว่าด้วย รากสามารถทำให้งอกได้เร็วโดยแช่ในน้ำ เช่น gaviota ส่วนดอกยังไม่สามารถทำให้งอกได้ตามความต้องการ.

การเก็บตัวอย่าง

เลือกปลายรากที่กำลังเจริญอย่างรวดเร็ว ยาวประมาณครึ่งนิ้ว

ล้างให้สะอาด แล้วเอาไปใส่ใน killing & fixing fluid ที่มี Wimber (1957) พบว่า ถ้าเป็นรากที่เจริญอยู่ที่ดินนิยมใช้ Carnoy's ซึ่งประกอบด้วย 95% ethyl alcohol 3 ส่วน, glacial acetic acid 1 ส่วน ส่วนพวก epiphyte เช่น Cattleya, Phalaenopsis ใช้ 3 : 2 : 1 และพบว่าสามารถเก็บผลายราก ใน 70% alcohol ได้เป็นเวลานานหลังจาก killing และ fixing แล้ว แต่กล้วยไม้บางอย่างโครโมโซมเหนียวติดกันแน่นและมีจำนวนโครโมโซมมาก จึงแก้ในสารละลายของ 8-hydroxy-quinoline ที่มีความเข้มข้น 0.005 Molar ก่อนแล้วจึงไป fix ด้วย carnoy's fluid. ถ้ามีโครโมโซมใน microsporocytes มักจะเลาะออกมา fix ใน 30% acetic acid ที่ 15° เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้โครโมโซมกระจาย แล้วทำ aceto-carmine squash แต่โครโมโซมติดสีไม่ค่อยดีเหมือนหัวผัก.

Hydrolysis.

เอาผลายรากออกจาก Carnoy's fluid มาใส่ใน hydrochloric acid อย่างเจือจาง เพื่อละลาย pectate ซึ่งอยู่ระหว่าง cell wall ทำให้ cell แยกออกจากกันได้ง่าย เมื่อทำ squash. และโครโมโซมจะติดสีได้ดีขึ้นเมื่อใช้ hydrochloric acid กับ stain พร้อมกัน โดยเอาผลายรากใส่ใน watch glass ซึ่งมี 1 N.HCl 1 หยด : aceto-carmine หรือ propiono - orcein ซึ่งมี orcein 2 เปอร์เซ็นต์ 10 หยด อุณหภูมิเกิดควันขาว ๆ เพียงเล็กน้อยตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เวลาทิ้งไว้ของคอบระวัง มีให้ผลายรากแห้ง ระหว่าง maceration.

Squashing

เอาปลายราก 1 - 2 ม.ม. จาก watch glass วางไว้ slide
ที่สะอาด แฉกใส่ carmine หรือ orcein ลงไปครึ่งหยก macerate
root tip ด้วยเข็ม แล้วใส่ slide ด้วย cover glass แล้ว tissue
ด้วย hydrolyse ใน HCl เฝ้ารอ เวลาใช้ cover glass เมื่อ
ลมแห้งเบา ๆ เผลอที่จะกระจายออกไปได้ เอา slide ไปอุ่นเล็กน้อย
ราว 2 วินาที เพื่อช่วยทำให้สีเกาะติดมากขึ้น การดูต้องทำในตู้หมึก
ดูทันที เมื่อถึง slide นี้ 2 - 3 วัน สีของ ครีมี จะละเอียดมากขึ้น
เมื่อมี ครีมี ใสแล้ว ทำ permanent slide เก็บไว้ด้วย alcohol
ด้วย acetie-alcohol-xylene แล้ว mount ด้วย hydrolyse หรือ
balsam.