บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. พืชที่ใช้ทดลอง

ถั่วฝักยาว (Vigna sesquipedalis) 4 พันธุ์ (ภาพที่ 1) ได้แก่

1) พันธุ์เจียไต๋ สัญญลักษณ์ A เมล็ดสีน้ำตาลแดง

2) พันธุ์เฮ่งง่วนกี่ " B เมล็ดสีน้ำตาลแดงหัวด่าง

3) พันธุ์กรมวิชาการ " C เมล็ดสีขาว (เรียกตามภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรฯ)

4) พันธุ์ไต้หวัน " D เมล็ดสีดำ

ถั่วนั่ง (Vigna sinensis) 2 พันธุ์ (ภาพที่ 2)ได้แก่

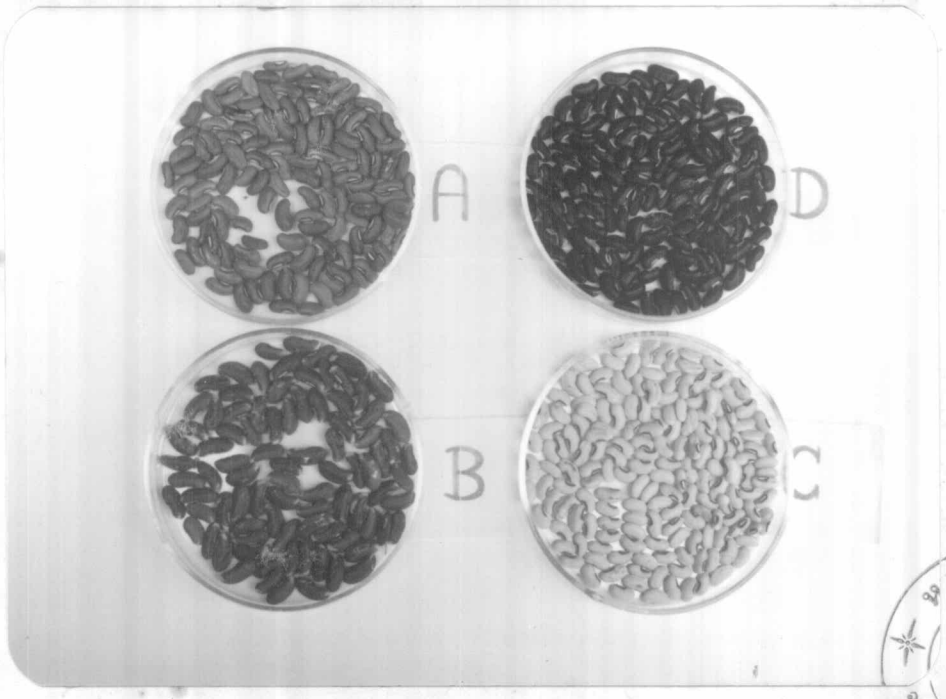
1) พันธุ์ Lagranja สัญญลักษณ์ L เมล็ดสีขาว

2) พันธุ์ VCS - 14 " V เมล็ดสีขาว

เมล็ดพันธุ์เหล่านี้ได้จากภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

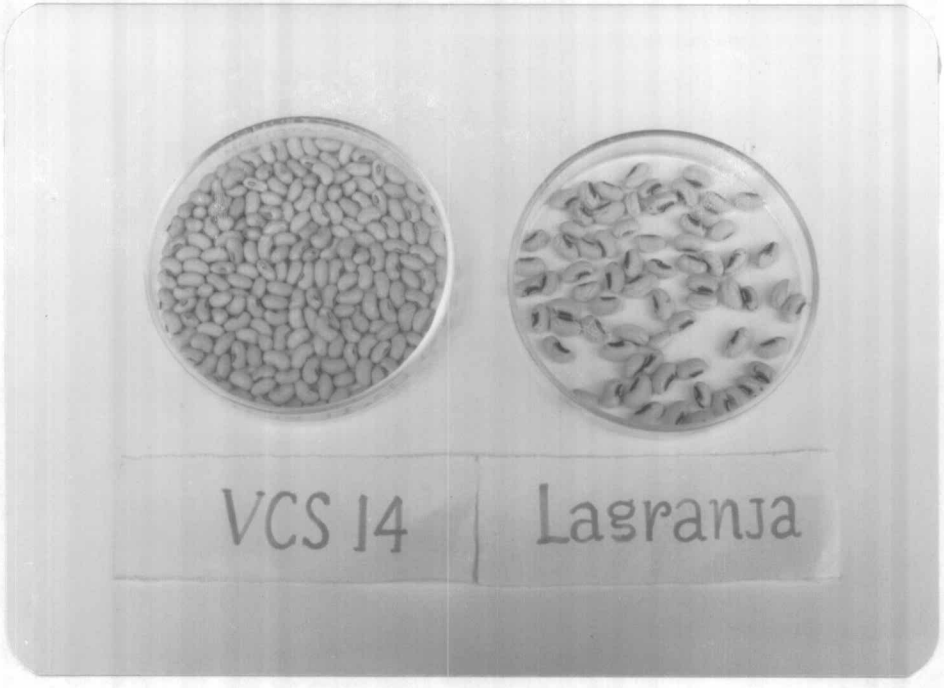
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการผสมพันธุ์

- ถุงพลาสติค
- ถุงคลุมดอก
- กรรไกรปลายแหลม
- คลิปหนีบกระดาษ
- เชือกและป้าย



หอสมุดกลาง
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 1 เมล็ดถั่วฝักยาว (Vigna sesquipedalis) ทั้ง 4 พันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง



ภาพที่ 2 เมล็ดถั่วนั่ง (Vigna sinensis)2พันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง

3. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาทางไซโตเจเนติค

- กรรไกรปลายแหลม
- ปากคีบ
- ยาหาเล็บ
- Acetic acid 90 % และ 45 %
- Ethyl alcohol 90% และ 70 %
- 8-Hydroxyquinoline (C_9H_7NO) ในน้ำเข้มข้น 0.002 M
- Carnoy's fluid
- Schiff's reagent
- 1N HCl
- n- Butyl alcohol
- Euparal
- Propiono-carmine

วิธีดำเนินการทดลอง

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

1. การศึกษาทางด้านไซโตเจเนติค

- การนับโครโมโซมจากปลายราก

เพาะเมล็ดถั่วฝักยาว (Vigna sesquipedalis)4 พันธุ์ คือA,B,C และ D เมล็ดถั่วนั่ง (Vigna sinensis) 2 พันธุ์ คือ L และ V และลูกผสมทั้ง 16 คู่ ที่ได้จากการผสมถั่วทั้งสองชนิด เพาะในทรายอย่างละ 5 เมล็ด หลังจากนั้น 3-4 วัน พอใบจริงคู่แรกโผล่ออกมา จึงตัดปลายรากของแต่ละต้นไว้ แล้วเก็บรากเวลา 8, 10, 12 และ 14 น. พบว่าเวลา 14 น. เป็นเวลาที่ดีที่สุด โดยเก็บรากใน 8-Hydroxyquinoline ที่อุณหภูมิ 10° ซ. เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนเป็น 90 % acetic acid ครึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างด้วย 70 % ethyl alcohol 2-3 ครั้ง แล้วเก็บไว้ใน 70 % ethyl alcohol ที่ 10° ซ ก่อนนับจำนวนโครโม-

โซมก็นำปลายรากนั้นมาล้างเอา 70 % ethyl alcohol ออกด้วยน้ำประปา 2-3 ครั้ง แล้ว hydrolyse ด้วย 1 N HCl ที่ 60° ซ เป็นเวลา 10 นาที แล้วย้ายรากใส่ใน Schiff's reagent ครึ่งชั่วโมง ขณะนี้บริเวณปลายสุดของรากติดสีแดง เขี่ยเฉพาะส่วนนั้นลงบนสไลด์ที่สะอาดที่มี propiono-carmine 1-2 หยด ปิดด้วยแผ่นแก้วปิด ทุบเบา ๆ ด้วยปลายดินสอด้านที่เป็นยางลบ ส่องกล้องจุลทรรศน์ หาเซล ที่อยู่ในระยะ metaphase ที่โครโมโซมกระจายดี นับจำนวนโครโมโซมจากเซลประมาณ 25 เซล บันทึกและถ่ายรูปไว้ด้วยกำลังขยาย 2500 เท่า

- ศึกษาการจับคู่ของโครโมโซมใน microsporocyte

เก็บดอกตูมของถั่วฝักยาวทั้ง 4 พันธุ์ ถั่วนั่ง 2 พันธุ์ และลูกผสม ทั้ง 16 คู่ เลือกดอกขนาดต่าง ๆ กัน และเก็บเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าที่เวลา 11 น. ดอกตูมขนาดยาว 2-3 มม. ให้ผลดี เก็บดอกของแต่ละต้น แช่ใน Carnoy's fluid ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 90 % ethyl alcohol ประมาณ 5 นาที แล้วล้างด้วย 70 % ethyl alcohol 2-3 ครั้ง แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 10° ซ เมื่อจะศึกษาก็นำดอกวางบนสไลด์ ใช้เข็มเขี่ยเอาเกสรตัวผู้ออกมา แล้วใช้เข็มเขี่ยเอาผนังอับเกสรตัวผู้ออกเพื่อเอา microsporocyte ออกมา หยด propiono-carmine ลงไป 1-2 หยด ปิดด้วยแผ่นแก้วปิด แล้วลนไฟพออุ่น ซับด้วยกระดาษเยื่อไม้ ค่อย ๆ กดกระจกเบา ๆ แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดูเซลที่โครโมโซมอยู่ในระยะ prophase I ถึง telophase I ว่ามีการจับคู่ของโครโมโซมที่เหมือนกันเป็นแบบใด และมีกี่คู่ มีการแยกของโครโมโซมปกติหรือไม่ บันทึกจากเซลประมาณ 25 เซลและถ่ายรูปไว้ด้วยกำลังขยาย 2500 เท่า

- การทำสไลด์ถาวร

การศึกษาโครโมโซมได้ศึกษาจากสไลด์ชั่วคราว แต่เมื่อต้องการจะเก็บให้ได้นาน หลังจากทิ้งไว้ 2-3 วัน นำสไลด์มาแช่ใน 45 % acetic acid ให้แผ่นแก้วปิดหลุดออกมา แล้วย้ายสไลด์พร้อมทั้งแผ่นแก้วปิดลงใน n-Butyl alcohol 3 ครั้ง ครั้งหนึ่งนานประมาณ 5 นาที เพื่อดูดเอาน้ำออก เมื่อเอาขึ้นจากขั้นสุดท้ายก็หยด Euparal ลงบนสไลด์ ปิดด้วยแผ่นแก้วปิด แล้ววางสไลด์บนที่ราบทิ้งไว้ให้แห้ง

2. <u>เทคนิคการผสมพันธุ์</u>

– การเอาเกสรตัวผู้ออกจากดอกที่ต้องการให้เป็นต้นแม่ (emasculation) ในเวลาเย็นเวลา 16 ถึง 18 น. เลือกดอกที่จะบานวันรุ่งขึ้น ใช้กรรไกรตัดกลีบดอกตรงปลายครึ่งหนึ่ง แล้วใช้มือค่อย ๆ ดึงเอากลีบดอกตรงปลายให้ขาดออกจากกัน โดยไม่ให้ถูกเกสรตัวเมียและเกสรตัวผู้ จากนั้นใช้กรรไกรตัดเอาเกสรตัวผู้ออก เอาถุงคลุมดอกไว้ ใช้คลิปหนีบกันไม่ให้เกสรตัวผู้จากที่อื่นเข้าไป

– การผสม (pollination) ทำในวันรุ่งขึ้นตอนเช้า เวลา 7-9 น. โดยนำละอองเรณูจากต้นพ่อป้ายบนยอดเกสรตัวเมียของต้นแม่ แล้วเอาถุงคลุมไว้อย่างเดิม ผูกป้ายประจำคู่ไว้ประมาณ 3 สัปดาห์ ฝักจะแก่ สังเกตจากการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เก็บเมล็ดลูกผสม (F_1 seed) ของแต่ละฝักเอาไว้

เมื่อได้เมล็ดลูกผสม ก็นำไปเพาะเพื่อศึกษาโครโมโซมจากปลายราก และจากดอก ปล่อยให้ F_1 ผสมตัวเองแล้วเก็บเมล็ด F_2 เอาไว้ศึกษาต่อ