หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

<u>อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง

เมล็ดแพงพวยฝรั่งสีขาวและสีชมพู (<u>Catharanthus roseus</u> G.Don)

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูก

- กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร
- ดินสีดา, ปุ๋ยคอก, ทราย
- เครื่องมือการเกษตร
- แปลงทดลองขนาด 50 ตารางเมตร 2 แปลง โดยแต่ละแปลงแบ่งเป็นแปลงทดลองย่อยขนาด 1.62 ตารางเมตร จำนวน 30 แปลง

3. สารเคมี

- สารละลายโคลชิซีนความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซนต์, 0.6 เปอร์เซนต์ และ 1.0 เปอร์เซนต์
- saturated alphabromonaphthalene
- acetic acid 45% และ 90%
- ethyl alcohol 70% และ 95%
- euparol
- saturated ferric chloride
- 1 normal hydrochloric acid
- propionocarmine 0.5%
- Schiff's reagent
- Carnoy's solution
- ยาทาเล็บ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. อุปกรณ์สำหรับศึกษาเซลล์วิทยา
   - กล้องจุลทรรศน์
   - ตะเกียงแอลกอฮอล์
   - แผ่นสไลด์และแผ่นแก้วปิด
   - เครื่องมือเตรียมสไลด์ เช่น ปากคีบ, เข็มเขี่ย
5. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
   - กล้องจุลทรรศน์สำหรับถ่ายภาพชนิด Olympus P.M. 7
   - กล้องถ่ายรูป
   - ฟิล์ม Kodak Tri-x pan, Kodacolor II

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ตอนคือ ตอนแรกเป็นการให้สารละลายโคลชิซีนกับต้นกล้าแพงพวยฝรั่งทั้งสีขาวและสีชมพู แล้วนับเปอร์เซนต์ของต้นกล้าที่มีชีวิตอยู่หลังจากได้รับโคลชิซีน ตอนที่สองศึกษาเซลล์วิทยาของ C_0 generation ตอนที่สามศึกษาเซลล์วิทยาของ C_1 generation และตอนที่สี่ศึกษาสัณฐานวิทยาของ C_1 generation

1. การให้สารละลายโคลชิซีนและเปอร์เซนต์ของต้นกล้าที่มีชีวิตอยู่หลังจากได้รับโคลชิซีน

1.1 การให้สารละลายโคลชิซีนกับต้นกล้า

นำเมล็ดแพงพวยฝรั่งสีขาวและสีชมพูอย่างละ 1,500 เมล็ด แช่น้ำประมาณ 24 ชั่วโมง แยกแต่ละสีเพาะลงในทรายซึ่งอยู่ในจานรอง กระถางดินเผาเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว รดน้ำให้ชุ่มอยู่เสมอ ย้ายต้นกล้าที่มีใบเลี้ยง 1 คู่ ยังไม่มีใบแท้ (อายุประมาณ 7 วัน) ไปปลูกในกระถางที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว ซึ่งใส่ทราย : ดินสีดา : ปุ๋ยคอก อัตราส่วน 2:2:1 แต่ละกระถางปลูกต้นกล้า 6 ต้น รวมทั้งหมด 200 กระถาง โดยแยกเป็นสีขาว 100 กระถาง และสีชมพู 100 กระถาง แบ่งต้นกล้าแต่ละสีออกเป็น 9 การทดลอง แต่ละการทดลองใช้ต้นกล้า 60 ต้น (10 กระถาง) และ control สีละ 60 ต้น เมื่อต้นกล้าเริ่มเกิดใบแท้ (อายุประมาณ 12 วัน) หยดสารละลายโคลชิซีนลงบน apical meristem (โดยพยายามให้หยดโคลชิซีนค้างอยู่)ครั้งละ 1 หยดวันละ 3 ครั้ง เวลา 9.00 น., 13.00 น. และ 17.00 น. ในแต่ละการทดลองให้สารละลายโคลชิซีนที่มีความเข้มข้นและปริมาณต่างกันดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงความเข้มข้น จำนวนหยดและจำนวนวันที่ต้นกล้าได้รับสารละลายโคลชิซีน

ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซีน (เปอร์เซนต์)	จำนวนหยดของสารละลายโคลชิซีน	จำนวนวันที่ต้นกล้าได้รับสารละลายโคลชิซีน
0.2	6	2
0.2	12	4
0.2	18	6
0.6	6	2
0.6	12	4
0.6	18	6
1.0	6	2
1.0	12	4
1.0	18	6

1.2 เปอร์เซนต์ของต้นกล้าที่มีชีวิตอยู่หลังจากได้รับสารละลายโคลชิซีน

หลังจากหยดสารละลายโคลชิซีนที่มีความเข้มข้นและปริมาณต่าง ๆ กันแล้ว คอยดูแลรดน้ำให้ต้นกล้าเจริญเติบโตจนอายุ 3 เดือน นับเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของต้นกล้า C_0 generation แล้วย้ายต้นที่รอดตายไปปลูกลงแปลงทดลองโดยวิธีสุ่มตัวอย่าง ในแต่ละการทดลองเลือกต้นที่มีลักษณะผิดปกติเช่น ใบหงิกงอหนา มา 24 ต้น การปลูกแบ่งเป็น 3 ซ้ำ ซ้ำละ 8 ต้น ระยะห่างระหว่างต้นประมาณ 30 เซนติเมตร คูณ 30 เซนติเมตร (ดูแผนภาพแปลงทดลอง) หลังจากย้ายลงแปลงทดลองแล้วคอยบำรุงรักษาให้เจริญเติบโตจนออกดอกเพื่อนำมาศึกษาเซลล์วิทยาต่อไปและเก็บเมล็ดที่ได้จากการผสมตัวเองไปปลูกเป็น C_1 generation ต่อไป

2. ศึกษาเซลล์วิทยาของ C_0 generation

2.1 การจับคู่และจำนวนโครโมโซมใน microsporocyte

จากการทดลองคาดว่าต้น C_0 อาจเป็น polyploid, mixoploid และ diploid จึงพยายามหาลักษณะที่จะใช้คัดเลือกต้น C_0 ที่จะให้เมล็ดที่เป็น polyploid โดยศึกษาเซลล์วิทยาของดอกที่เจริญจากต้น C_0 คือศึกษาการจับคู่ของโครโมโซมที่เหมือนกัน (homologous chromosome) และนับจำนวนโครโมโซมของ microsporocyte

แผนภาพแปลงทดลอง

ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
1.0% 6	1.0% 18	0.6% 12
0.6% 12	control	0.2% 12
1.0% 12	1.0% 6	0.6% 6
1.0% 18	0.2% 6	0.6% 18
0.6% 18	1.0% 12	0.2% 18
0.6% 6	0.6% 12	0.2% 6
control	0.2% 18	1.0% 18
0.2% 12	0.6% 18	1.0% 12
0.2% 18	0.6% 6	control
0.2% 6	0.2% 12	1.0% 6

สีขาว

0.2% 12	0.6% 12	0.6% 6
0.2% 18	0.2% 12	1.0% 18
1.0% 12	1.0% 12	1.0% 6
0.2% 6	control	0.2% 18
1.0% 6	0.6% 6	0.6% 18
0.6% 12	0.6%18	0.6% 12
1.0% 18	0.2% 6	1.0% 12
0.6% 6	1.0% 6	0.2% 12
0.6% 18	0.2% 18	control
control	1.0% 18	0.2% 6

สีชมพู

มาตราส่วน 1.0 เมตร 1.0 เซนติเมตร

ในระยะ first metaphase โดยเลือกเก็บดอกตูมที่กลีบเลี้ยงยังหุ้มกลีบดอกอยู่ (ขนาดดอกกว้างประมาณ 1.5 มิลลิเมตร ยาว 3 มิลลิเมตร) ในช่วงเวลา 10.00 - 12.00 น. จากทุกต้นที่รอดชีวิตหลังจากย้ายลงปลูกในแปลงทดลอง นำดอกที่เลือกมาแช่ในสารละลาย Carnoy ที่ใส่ ferric chloride จนสีของสารละลายเป็นสีเหลืองเข้ม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อุณหภูมิประมาณ 27 องศาเซลเซียส แล้วเทสารละลาย Carnoy ออก ล้างด้วย 95% ethyl alcohol แล้วเก็บดอกตูมไว้ใน 70% ethyl alcohol ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วัน (สามารถเก็บได้นานเป็นปี) แล้วนำดอกตูมที่อยู่ใน 70% ethyl alcohol มาเขี่ยเอาอับเรณู (anther) วางบนสไลด์หยดสี propionocarmine ลงบนอับเรณู ใช้ปากคีบกดให้ microsporocyte หลุดออกจากอับเรณู นำสไลด์ไปลนไฟพออุ่นเพื่อให้โครโมโซมติดสีดีขึ้น แล้วหยด 45% acetic acid ลงไป 1 หยด ใช้ปากคีบคนให้เข้ากันแล้วลนไฟอีกครั้งเพื่อช่วยให้ microsporocyte พองและโครโมโซมกระจายตัวมากขึ้น ปิดด้วยแผ่นแก้วปิด ถ้าเซลล์ยังพองตัวไม่เต็มที่จะลนไฟได้อีกแต่ระวังอย่าให้เดือด วางกระดาษซับบนแผ่นแก้วปิด ซับสีที่มากเกินพอออกและกดเบา ๆ บนกระดาษซับเพื่อให้โครโมโซมอยู่ระนาบเดียวกัน แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย × 100 เลือกดูเซลล์ที่โครโมโซมอยู่ในระยะ first metaphase ศึกษาการจับคู่ของโครโมโซมที่เหมือนกันว่าเป็น multivalent, bivalent และ univalent จำนวนเท่าใดบ้าง และนับจำนวนโครโมโซมทั้งหมด การศึกษาโครโมโซมนี้ทำจาก 10 เซลล์ในแต่ละต้น

2.2 <u>วัดขนาดและศึกษาการมีชีวิตของละอองเรณู</u>

นอกจากการศึกษาโครโมโซม microsporocyte เพื่อใช้เป็นเกณฑ์คัดเลือกต้น C_0 ที่จะให้เมล็ดที่เป็น polyploid แล้ว ยังศึกษาขนาดและการมีชีวิตของละอองเรณูในต้น C_0 ประกอบการคัดเลือกด้วย คือเมื่อต้น C_0 generation เจริญจนดอกบานเต็มที่แล้วนำละอองเรณูมาวัดขนาดและทดสอบการมีชีวิตต้นละ 100 เซลล์ โดยเลือกดอกที่บานเต็มที่มาเขี่ยละอองเรณูลงบนสไลด์ หยดสี propionocarmine ลงบนละอองเรณู ใช้เข็มเขี่ยคนให้ละอองเรณูกระจาย ปิดด้วยแผ่นแก้วปิด ตรวจดูลักษณะของละอองเรณูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย × 10 ละอองเรณูที่ cytoplasm ไม่ติดสีแดงของ propionocarmine จัดเป็นละอองเรณูที่ไม่มีชีวิต ส่วนละอองเรณูที่ cytoplasm ติดสีแดงของ propionocarmine ถือว่าเป็นละอองเรณูที่มีชีวิต จึงวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโดยใช้ micrometer

3. ศึกษาเซลล์วิทยาของ C_1 generation

3.1 นับจำนวนโครโมโซม (somatic number)

นำเมล็ดที่คาดว่าจะเป็น polyploid จากต้น C_0 มาเพาะโดยใช้ผลที่ได้จากการศึกษาการจับคู่ และจำนวนโครโมโซมใน microsporocyte และขนาดละอองเรณูมาคัดเลือกเอาเฉพาะเมล็ดที่ได้จากต้น C_0 ที่มีจำนวนโครโมโซม 32 แท่ง และมีขนาดละอองเรณูใหญ่กว่าขนาดละอองเรณู diploid ที่ใหญ่ที่สุดคือมากกว่า 76.65 ไมครอน ซึ่งเมล็ดเหล่านี้จะมีขนาดใหญ่กว่า diploid นำเมล็ดที่คาดว่าเป็น polyploid และเมล็ดที่ได้จากต้น diploid มาอย่างละ 10 เมล็ด จากทุกการทดลอง นำไปเพาะลงในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว ซึ่งใส่ทราย : ดินสีดา : ปุ๋ยคอก อัตราส่วน 2:2:1 กระถางละ 1 เมล็ด ให้หมายเลขประจำต้นว่ามาจาก C_0 ต้นใด เมื่อเมล็ดงอกและเจริญเติบโตจนมีใบแท้ประมาณ 6-7 คู่ (อายุประมาณ 2 เดือน) นำรากมาศึกษาโครโมโซมด้วยวิธี Feulgen squash โดยเลือกตัดรากที่มีลักษณะขาวใสปลายขุ่นเล็กน้อยยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร แช่ในสารละลาย saturated alphabromonaphthalene 20ชั่วโมง แล้วเท alphabromonaphthalene ทิ้ง ใส่ 90% acetic acid เก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 27 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างรากด้วย 70% ethyl alcohol 2 ครั้ง แล้วเก็บรากไว้ใน 70% ethyl alcohol ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อจะศึกษาจำนวนโครโมโซมนำรากที่เก็บไว้มาล้างน้ำจนหมดแอลกอฮอล์ นำไป hydrolyse ด้วย 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที แล้วนำรากใส่ใน Schiff's reagent ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง แล้วย้ายรากไปใส่ในน้ำ ตัดเฉพาะปลายรากที่ติดสีแดงวางบนสไลด์ หยดสี propionocarmine ปิดด้วยแผ่นแก้วปิด ใช้ดินสอด้านปลายตัดตรงเคาะบริเวณปลายรากให้เซลล์แยกจากกันและโครโมโซมกระจายตัว กดให้โครโมโซมอยู่ในระนาบเดียวกัน นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย × 100 ศึกษาต้นละ 3 เซลล์ นำผลจากการนับจำนวนโครโมโซมคัดเลือกต้นที่เป็น polyploid จากทุกการทดลองไปปลูกในแปลงทดลอง เพื่อศึกษาเซลล์วิทยาและสัณฐานวิทยาของ polyploid เปรียบเทียบกับ diploid ต่อไป

3.2 ศึกษาจำนวนโครโมโซมและการจับคู่ของโครโมโซมที่เหมือนกันใน microsporocyte

เมื่อต้น C_1 generation ที่เป็น polyploid เจริญเติบโตจนมีดอก เลือกเก็บดอกตูมมาศึกษาการจับคู่ของโครโมโซมแบบต่าง ๆ (multivalent,bivalent และ univalent) และจำนวนโครโมโซมใน microsporocyte โดยวิธี smear method เช่นเดียวกับ

ที่ศึกษาใน C_0 generation เพื่อใช้เป็นข้อมูลยืนยันได้ว่า C_1 generation ที่ได้เป็น polyploid อย่างถาวร

3.3 วัดขนาดและศึกษาการมีชีวิตของละอองเรณู

หลังจากศึกษาโครโมโซมของ C_1 generation ที่เป็น polyploid แล้ว เมื่อดอกบานเต็มที่ นำละอองเรณูมาวัดขนาดและทดสอบการมีชีวิตโดยย้อมสี cytoplasm ด้วย propionocarmine เช่นเดียวกับที่ศึกษาใน C_0 generation

4. ศึกษาสัณฐานวิทยาของ C_1 generation

4.1 วัดความสูงของต้น

หลังจากย้ายต้น C_1 generation ที่เป็น polyploid ลงปลูกในแปลงทดลองแล้ว ศึกษาอัตราการเจริญเติบโต โดยวัดความสูงเมื่ออายุ 4,5,6 และ 7 เดือน โดยวัดจากบริเวณข้อที่แตกกิ่งแรกจากระดับพื้นดินไปถึงยอดของกิ่งที่สูงที่สุด

4.2 ศึกษาลักษณะใบ ดอก และราก

เมื่อต้น polyploid มีอายุ 5 เดือน วัดขนาดใบ(กว้างและยาว) โดยใช้ใบคู่ที่ 6 นับจากปลายยอด ต้นละ 5 กิ่ง (10 ใบ) และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางดอกที่บานเต็มที่ ต้นละ 10 ดอก

4.3 ศึกษาจำนวนเมล็ดที่สามารถเจริญพันธุ์ได้

เมื่อดอก polyploid (C_1) บานและผสมตัวเองแล้ว (อายุประมาณ 5 เดือนขึ้นไป) เก็บฝักแก่มาต้นละ 10 ฝัก นับจำนวนเมล็ดในแต่ละฝักเปรียบเทียบกับต้น diploid

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย