บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. พืชที่ใช้ทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้ต้นพุทธรักษา (Canna hybrida) สี่พันธุ์ โดยใช้รหัสดังนี้ รหัส A ใช้กับพันธุ์ดอกสีแดงกำมะหยี่ (Crimson) รหัส B ใช้กับพันธุ์ดอกสีชมพู (Clear pink) รหัส C ใช้กับพันธุ์ดอกสีเหลืองเข้ม (Buttercup yellow) รหัส D ใช้กับพันธุ์ดอกสีเหลือง (Canary) พุทธรักษาทั้งสี่พันธุ์นี้มีลักษณะดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะของต้นพุทธรักษาที่ใช้ในการทดลอง จำนวน 4 พันธุ์

ลักษณะ	พันธุ์ A	พันธุ์ B	พันธุ์ C	พันธุ์ D
1. ลำต้น				
1.1 ความสูง (ซ.ม.)	88 - 116	80 - 148	71 - 115	95 - 150
1.2 สี	สีเขียวแก่ขอบสีแดง	สีเขียวข้อสีเขียว	สีเขียวข้อสีเขียว	สีเขียวข้อสีเขียว
2. ใบ				
2.1 สี	สีเขียวมีนวลขาว	สีเขียวมีนวลขาว	สีเขียวมีนวลขาว	สีเขียวมีนวลขาว
2.2 ความกว้าง (ซ.ม.)	16 - 20	15.5 - 19	14.5 -15.5	10 - 12.5
2.3 ความยาว (ซ.ม.)	47 - 54	55 - 68	43 - 50	41 - 53

000262

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ลักษณะ	พันธุ์ A	พันธุ์ B	พันธุ์ C	พันธุ์ D
3. ช่อดอก	Panicle	Panicle	Panicle	Panicle
3.1 จำนวนดอกต่อช่อ	15 - 50	16 - 60	23 - 40	20 - 35
3.2 การตั้งของช่อดอก	ช่อตั้ง	ช่อตั้ง	ช่อโค้ง	ช่อตั้ง
4. ดอก				
4.1 สีของกลีบเลี้ยง	แดงคล้ำ	เขียวอมชมพู	เขียวอมเหลือง	เขียวอมเหลือง
4.2 สีของกลีบดอก	แดงกำมะหยี่	ชมพูเข้ม	เหลืองเข้ม	เหลือง
4.3 สีของเพตอลลอยด์สตามิโนด	แดงกำมะหยี่เส้นขอบนอกเหลือง	ชมพู	เหลืองเข้ม	เหลือง
4.4 ลักษณะกระ	เหลืองเล็กน้อยที่โคนลาเบลล่ัม	โคนกลีบสีเข้ม	แดงเล็กน้อยที่โคนลาเบลล่ัม	แดงเล็กน้อยที่โคนลาเบลล่ัม
4.5 ขนาดเพตอลลอยด์สตามิโนด (กว้าง × ยาว)	(4.7 - 5.4) × (7.6 - 8.5)	(3.4 - 4) × (6.2 - 6.5)	(2 - 2.5) × (6 - 7)	(1.2-1.5) × (6 - 7.5)
4.6 รูปร่างของเพตอลลอยด์สตามิโนด	กลมมนส่วนปลายของลาเบลล่ัมเว้า	กลมส่วนปลายของลาเบลล่ัมเว้า	คอนข้างรีปลายเว้าส่วนปลายลาเบลล่ัมเว้า	รีปลายแหลมปลายลาเบลล่ัมเว้า

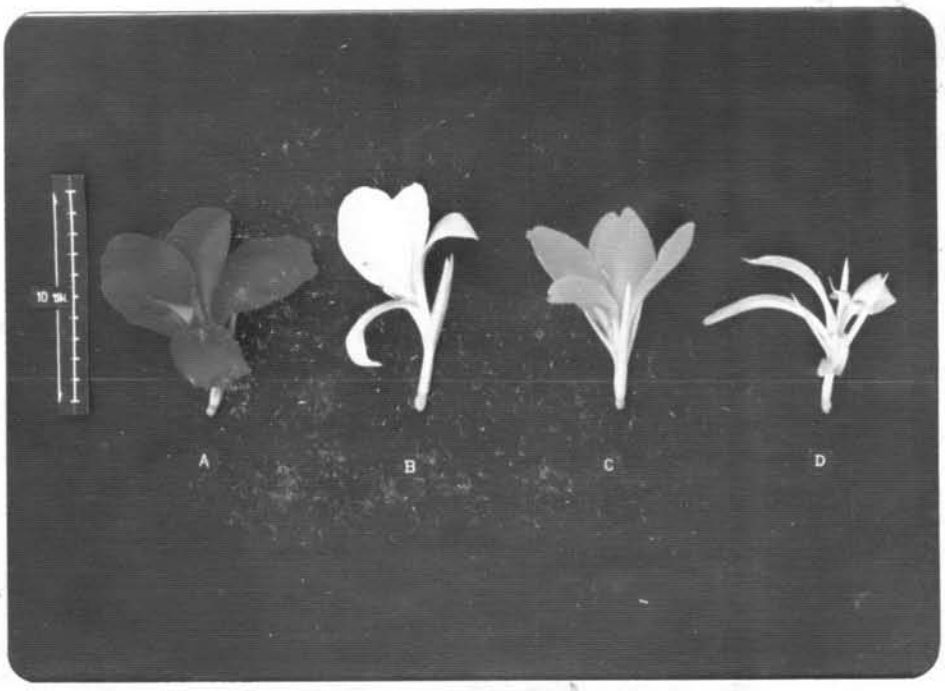
หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ลักษณะ	พันธุ์ A	พันธุ์ B	พันธุ์ C	พันธุ์ D
4.7 จำนวนเพทอลลอยด์สตามิโนด	5	5	5	5
5. ผล	สีแดงคล้ำ	สีเขียว	สีเขียว	สีเขียว
6. เมล็ด				
6.1 จำนวนเฉลี่ยของเมล็ดต่อผล	1 - 2	4 - 5	1 - 2	1 - 2
6.2 ขนาดของเมล็ด (กว้าง × ยาว)	0.7 × 0.9	0.7 × 0.9	0.8 × 1.2	0.7 × 0.9

หมายเหตุ ชื่อสีต่าง ๆ ของดอกได้มาจากตารางเทียบสีของ

Graft B.A. 1963 Exotica 3 Pictorial Cyclopedia of Exotic Plants, Roehrs, Rutherford N.J. U.S.A. p. 1827



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะของดอกพุทธรักษา 4 พันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง

A ดอกพันธุ์ A สีแดงกำมะหยี่ (Crimson)

B ดอกพันธุ์ B สีชมพู (Clear pink)

C ดอกพันธุ์ C สีเหลืองเข้ม (Buttercup yellow)

D ดอกพันธุ์ D สีเหลือง (Canary)

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการผสมพันธุ์

- ใบมีดโกน
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- ปากคีบอันเล็ก
- ถุงกระดาษ
- ภูกัน
- เข็มหมุดหรือคลิปหนีบกระดาษ
- ป้ายสำหรับบันทึก

3. สารเคมีที่ใช้

- Acetic acid 90%
- Aceto orcein 2%
- α-bromonapthalene
- Carnoy's solution
- Chloroform
- Ethyl alcohol 70% และ 95%
- Ferric chloride solution
- Normal hydrochloric acid
- Schiff's reagent

4. อุปกรณ์เกี่ยวกับการถ่ายภาพ

- กล้องจุลทัศน์ Olympus P.M. 7 กล้อง Cannon
- Film Panatomic x, ฟิล์มสีฟูจิ

<u>วิธีดำเนินการทดลอง</u>

ในการทดลองครั้งนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็นสองตอนด้วยกันคือ ในตอนแรกเป็นการทดลองเพื่อศึกษาพันธุกรรมของลักษณะบางลักษณะใช้วิธีผสมพันธุ์โดยทำการผสมทั้ง

แบบผสมตัวเองและผสมข้ามพันธุ์ ตอนที่สองเป็นการทดลองเพื่อดูผลของรังสีที่มีต่อลักษณะภายนอกและต่อโครโมโซม

การทดลองตอนที่หนึ่ง เพื่อที่จะศึกษาถึงพันธุกรรมของลักษณะบางประการของพุทธรักษา เริ่มด้วยการคัดเลือกพุทธรักษา 4 พันธุ์ที่มีความแตกต่างกันมาศึกษาลักษณะทั่วไป เมื่อได้พันธุ์ที่ต้องการเรียบร้อยแล้วจึงนำหน่อพุทธรักษาที่คัดไว้ไปปลูกในแปลงทดลอง เมื่อมีดอกก็เริ่มทำการผสมพันธุ์โดยแบ่งเป็นขั้น ๆ ดังนี้

1. การขจัดเกสรตัวผู้ (emasculation) เป็นวิธีที่แยกเอาอับเรณูออกไปจากดอกที่จะใช้เป็นต้นแม่ เริ่มต้นโดยเลือกเอาดอกตูมที่เพตอลลอยด์สตามิโนดยังไม่เริ่มคลี่ หรือดอกซึ่งจะบานภายใน 1 ถึง 2 วันต่อไป เป็นดอกที่มีความยาวระหว่าง 5.5 ถึง 6.5 ซ.ม. ดอกในระยะนี้อับเรณูจะยังไม่แตก เมื่อเลือกดอกได้แล้วใช้ใบมีดโกนซึ่งทำความสอาดโดยชุบแอลกอฮอล์ฆ่าเชื้อแล้วลนไฟกรีดตามความยาวของดอก โดยกรีดตรงรอยที่เพตอลลอยด์สตามิโนดเริ่มคลี่ออก ในการกรีดต้องระวังไม่ให้แผลลึกเกินไป เพราะจะไปถูกคอเกสรตัวเมียซึ่งจะทำให้ผสมไม่ติด เมื่อผ่าแล้วใช้ปากคีบซึ่งทำความสอาดเช่นเดียวกับใบมีดโกนแหวกเพตอลลอยด์สตามิโนดตรงรอยผ่าให้แยกออกจากกันจนเห็นอับเรณู แล้วเอาปากคีบจับอับเรณูออกปิดรอยแผลไว้ตามเดิม ทำเช่นนี้กับดอกอื่น ๆ ต่อไปไม่ควรเกินช่อละ 7 ดอก เพราะทำหลายดอกเกินไปการติดผลจะไม่สมบูรณ์ เพราะฮอร์โมนที่จะไปช่วยให้ติดผลไม่เพียงพอ ส่วนดอกอื่น ๆที่ไม่ได้แยกเอาเกสรตัวผู้ออกต้องตัดทิ้งไป หลังจากแยกเกสรตัวผู้ออกแล้วใช้ถุงกระดาษสวมช่อดอกไว้ ทั้งนี้เพื่อกันมิให้เรณูจากต้นอื่น ๆ เข้าไปผสมกับดอกที่เตรียมไว้สำหรับทดลอง การที่ใช้ถุงกระดาษเพื่อต้องการให้อากาศถ่ายเทได้โดยสดวก ถ้าหากใช้ถุงพลาสติคอากาศจะเข้าไปไม่ได้ทำให้อุณหภูมิภายในถุงพลาสติคสูงเกินไปเป็นเหตุให้ไม่ติดผล

2. การถ่ายเรณู (Pollination) เมื่อแยกเกสรตัวผู้ออกแล้วและเห็นว่าที่ยอดเกสรตัวเมียมียางเหนียวเยิ้มก็เริ่มทำการถ่ายเรณู โดยนำเรณูจากต้นพ่อพันธุ์มาแตะบนยอดเกสรตัวเมียของต้นแม่พันธุ์ ในการนี้อาจจะทำในวันเดียวกันกับวันที่แยกเกสรตัว

ผู้ ออกหรือจะทำในวันรุ่งขึ้นก็ได้ ในการถ่ายเรณูแต่ละคราวที่ใช้เรณูของแต่ละดอกจะต้องทำความสอาดเพื่อทำลายเรณูที่อาจเหลือตกค้างที่อุปกรณ์ เมื่อถ่ายเรณูให้กับดอกที่เตรียมไว้ทุกดอกหมดแล้วสวมถุงกระดาษไว้ตามเดิมอีกสองหรือสามวัน เพื่อให้แน่ใจว่าเรณูที่ถ่ายไว้บนยอดเกสรตัวเมียจะเริ่มงอกแล้ว

หลังจากถ่ายเรณูแล้วทิ้งไว้ประมาณ 6 - 8 วัน จะสังเกตเห็นได้ว่าดอกไหนผสมติดบ้าง ดอกที่ผสมติดจะเห็นรังไข่พองโตขึ้นเรื่อย ๆ ส่วนดอกที่ผสมไม่ติดก็จะร่วงหลุดไป

ในการผสมพันธุ์พุทธรักษาได้ดำเนินการผสมกันดังนี้

พันธุ์ A ผสมตัวเองและผสมข้ามกับพันธุ์ B และ D
พันธุ์ B ผสมตัวเอง, ผสมข้ามกับพันธุ์ A และพันธุ์ C
พันธุ์ C ผสมตัวเองและผสมข้ามกับพันธุ์ B
พันธุ์ D ผสมตัวเองและผสมข้ามกับพันธุ์ A

ดอกที่ผสมติดแล้วจะให้ผลเป็นเมล็ดแก่สมบูรณ์เต็มที่ภายในเวลาประมาณ 18 ถึง 30 วัน นับจากวันที่ผสมเป็นต้นไป

3. การเพาะเมล็ด นำผลที่แก่จัดมาแกะเอาเมล็ดภายในซึ่งมีจำนวนตั้งแต่ 1-11 เมล็ดมาแช่กรดกำมะถันเข้มข้นเพื่อให้กัดเอาเปลือกหุ้มเมล็ดที่หนาและแข็งออกเสียบ้าง พอที่น้ำจะซึมเข้าเมล็ดได้ เวลาในการแช่กรดกำมะถันจะขึ้นกับความแก่ของเมล็ด ถ้าเมล็ดแก่จัดมากเปลือกจะหนาและแข็งมาก ต้องใช้เวลาแช่กรดกำมะถันนานประมาณ 30 นาที หรือนานกว่านั้น ถ้าเมล็ดที่เปลือกยังไม่แข็งมากอาจใช้เวลาในการแช่ประมาณ 15 นาที หลังจากนั้นนำเมล็ดที่แช่กรดกำมะถันไปล้างน้ำและแช่น้ำไว้ประมาณ 2 - 7 วัน คัพภะจะเริ่มงอก จากนั้นจึงนำไปเพาะในกะบะทรายประมาณ 4 - 5 วัน ต้นอ่อนจะเริ่มงอกและเมื่อต้นอ่อนมีใบประมาณ 3 ถึง 4 ใบ หรือประมาณ 7 วัน จึงนำไปปลูกในแปลงทดลองต่อไป

เมื่อได้รุ่นลูกแล้วสังเกตและบันทึกลักษณะต่าง ๆ ของรุ่นลูก หลังจากนั้นสุ่มรุ่นลูกที่จะใช้ทดลองต่อโดยวิธีผสมตัวเองดังนี้

ต้นลูก $(B \times B)_1$ ชนิดดอกสีชมพู (Clear pink) ผสมตัวเอง
ต้นลูก $(B \times B)_2$ ชนิดดอกสีครีม (Cream) ผสมตัวเอง
ต้นลูก $(B \times A)_1$ ชนิดดอกสีชมพูเข้ม (Carmine) ผสมตัวเอง
ต้นลูก $(B \times A)_2$ ชนิดดอกสีชมพู (Clear pink) ผสมตัวเอง
ต้นลูก $(B \times A)_3$ ชนิดดอกสีเหลืองอ่อน (mimosa) ผสมตัวเอง
ต้นลูก $(B \times C)_1$ ชนิดดอกสีเหลืองเข้ม (Buttercup yellow) กระสีชมพูผสมตัวเอง
ต้นลูก $(B \times C)_2$ ชนิดดอกสีเหลือง (Canary) โคนกลีบสีชมพูผสมตัวเอง
ต้นลูก $(B \times C)_3$ ชนิดดอกสีส้ม (Apricot) ปลายกลีบสีเหลืองผสมตัวเอง

การทดสอบหาความสมบูรณ์ของเรณู ในการผสมพันธุ์ของพุทธรักษาทั้ง 4 พันธุ์ ปรากฏว่าบางพันธุ์ให้ผลติดดี บางพันธุ์ให้ผลติดน้อยจึงได้ทดสอบ ความสามารถในการผสมพันธุ์ของเรณูของพุทธรักษาทั้ง 4 พันธุ์ดังนี้ นำอับเรณูของพุทธรักษาแต่ละพันธุ์วางบนสไลด์ (slide) แล้วหยดอซีโตออซีน (aceto - orcein) ลงบนสไลด์ เอากระจก (coverglass) ปิดกดทับเบา ๆ บนสไลด์ สังเกตการติดสีและลักษณะของนิวเคลียสของละอองเรณูจากกล้องจุลทัศน์ ต่อจากนั้นก็นับจำนวนละอองเรณูทั้งที่มีความสามารถในการผสมพันธุ์และที่เป็นหมัน (sterile) โดยนับดอกละ 100 เซลล์

4. การศึกษาโครโมโซมของพุทธรักษาทั้ง 4 พันธุ์ โดยชุดแรกดูโครโมโซมของเซลล์ในราก ส่วนชุดที่สองเป็นการศึกษาจากไมโครสปอร์โรไซท์ (microsporocytes) ในระยะเมตาเฟสขั้นแรก (first metaphase)

1. ศึกษาโครโมโซมที่ปลายราก ในขณะที่แบ่งเซลล์ระยะเมตาเฟสโดยวิธีเตรียมเซลล์ดังนี้

1.1 Pretreatment นำรากมาแช่ใน α-bromonapthalene ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยแช่ไว้นาน 22 ชั่วโมง ในการเตรียมน้ำยาใช้ α-bromonapthalene 1 หยด ผสมกับน้ำบริสุทธิ์ 1000 ลูกบาศก์เซนติเมตร การแช่นี้จะช่วยทำให้การแบ่งเซลล์หยุดอยู่ในระยะเมตาเฟส และช่วยให้โครโมโซมหดตัวทำให้สดวก

ในการที่จะศึกษารูปร่างและจำนวนของโครโมโซม

1.2 fix รากด้วย 90% acetic acid ประมาณ 30 นาที

1.3 เก็บรากไว้ในแอลกอฮอล์ 70% ที่ 4 องศาเซลเซียส

1.4 การเตรียมสไลด์ นำรากที่แช่ไว้ในแอลกอฮอล์ 70% ไป hydrolyse ใน Normal hydrochloric acid ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยล้างรากให้ปราศจากแอลกอฮอล์ ทั้งนี้เพื่อให้โครโมโซมติดสีดี ในการ hydrolyse ใช้เวลา 8 นาทีแล้วย้อมด้วยสี Schiff' s reagent เตรียมตามวิธีของ Darlington and La Cour (1962) 1 ชั่วโมง แล้วแช่ในน้ำบริสุทธิ์ การทำสไลด์นี้ใช้เฉพาะส่วนปลายรากที่ติดสีเข้มกว่าส่วนอื่น ๆ โดยหยดสีอซีโตออซีนลงบนสไลด์ เอากระจกปิดวางบนสไลด์นั้นกดก่อย ๆ เพื่อให้เซลล์และโครโมโซมกระจาย

นำสไลด์ที่เตรียมได้มาเลือกหาเซลล์ที่นิวเคลียสกำลังแบ่งตัวในระยะเมตาเฟส และโครโมโซมกระจายดี นับจำนวนและดูลักษณะโครโมโซมของพุทธรักษาที่ใช้ทดลองทุกชนิด ชนิดละ 10 เซลล์

2. ศึกษาโครโมโซมในไมโครสปอร์โรไซท์ โดยศึกษาโครโมโซมที่กำลังจับคู่อยู่ในระยะเมตาเฟสชั้นที่หนึ่ง ในการเตรียมเซลล์เพื่อศึกษากระทำดังนี้

2.1 Fixation เลือกดอกที่มีขนาดพอเหมาะซึ่งมีความยาวประมาณ 1.5 ซ.ม. ดอกขนาดนี้จะยังมีใบประดับหุ้มปิดทั้งช่อดอกไว้และยังไม่มี ดอกในช่อดอกบานเลย นำดอกที่ เลือกไว้มาแช่ใน Carnoy' s solution แช่นาน 24 - 48 ชั่วโมง เพื่อให้การแบ่งเซลล์หยุดอยู่ในระยะเมตาเฟส หยดสารละลายเฟอริคคลอไรด์ 1 - 2 หยด เพื่อช่วยให้โครโมโซมติดสีดีขึ้น

2.2 ล้างด้วย ethyl alcohol 95% 2 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

2.3 เก็บดอกไว้ในแอลกอฮอล์ 70% ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4 การเตรียมสไลด์ นำอับเรณูจากดอกสด ๆ หรือจากดอกที่เก็บไว้ในแอลกอฮอล์ 70% (ข้อ 2.3) มาส่วนหนึ่ง วางบนสไลด์ หยดอซีโตออซีนลงบนสไลด์ใช้

เข็มเขี่ยให้ไมโครสปอร์โรไซท์กระจายออกจากถุงเก็บเรณู ปิดกระจกแล้วนำสไลด์ไปลนไฟพออุ่น ๆ เพื่อให้เซลล์ขยายตัวขึ้น แล้วใช้กระดาษซับกดบนสไลด์เพื่อให้โครโมโซมกระจายและอยู่ในระนาบเดียวกัน นำสไลด์ที่เตรียมได้มาเลือกหาเซลล์ที่มีนิวเคลียสกำลังแบ่งตัวในระยะเมตาเฟสและโครโมโซมที่กระจายดี นับและศึกษาโครโมโซมของพุทธรักษาที่ทดลองทุกชนิด ๆ ละ 10 เซลล์ แล้วเลือกเซลล์ที่ดีมาถ่ายรูป

<u>การทดลองตอนที่สอง</u> เป็นการฉายรังสีเพื่อที่จะศึกษาถึงผลของรังสีที่มีต่อลักษณะภายนอกและโครโมโซม นำหน่อพุทธรักษาพันธุ์ B ซึ่งยาว 10 ถึง 25 ซ.ม. ไปฉายรังสีแกมมาจากโคบอลท์ 60 ที่สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ ใช้ปริมาณรังสีต่าง ๆ กันคือ 1000, 1500, 2000, 2500 และ 3000 rads ตามลำดับ โดยมีอัตราความเข้มของรังสี 1110 rad/นาที ใ• แต่ละปริมาณรังสีใช้พุทธรักษา 40 หน่อ นำหน่อพุทธรักษาที่ฉายรังสีแล้วมาชำในกะบะทรายประมาณ 7 วัน เมื่อหน่อพุทธรักษานั้นมีรากแล้วจึงนำไปปลูกในแปลงทดลอง จากนั้นก็บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอก ในขณะเดียวกันก็ศึกษาโครโมโซมในไมโครสปอร์โรไซท์ โดยวิธีเดียวกับการทดลองตอนที่หนึ่ง