หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ ๒

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

๑. พริก (Capsicum spp.) ที่ใช้ศึกษาได้รับมาจากแผนกวิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในรูปของเมล็ด ซึ่งมี ๒ ชนิด (species) คือ Capsicum annuum L. และ Capsicum chinense Jacq. Hort. ทั้งหมด ๖ พันธุ์ และลูกผสมระหว่างชนิดทั้งสองอีกหนึ่งพันธุ์ คือ

Capsicum annuum var. CA# 1

Capsicum annuum var. CA# 2

Capsicum annuum var. CA# 3

Capsicum annuum var. CA# 4

Capsicum chinense var CC# 1

Capsicum chinense var CC# 2

และลูกผสม (interspecific hybrid) ระหว่าง Capsicum annuum var. CA # 2 กับ Capsicum chinense var. CC # 1

๒. กระถางสำหรับปลูกขนาด ๖ นิ้ว และวัสดุที่ใช้ปลูกมี ดิน ปุ๋ยคอก และปุ๋ยอินทรีย์เทศบาล

๓. สารเคมีสำหรับใช้กำจัดแมลงและรา ได้แก่ เซฟวิน ๘๕ เบนเลท และออ กาไซด์

๔. สารเคมีสำหรับใช้ในการศึกษาเซลและโครโมโซม ได้แก่

๔.๑ สารละลายอิ่มตัวของ α-bromonapthalene

๔.๒ น้ำยา fixative alcohol-acetic (เอทธิล อัลกอฮอล์ : เกเซียล

อะซิติค แอซิด ๓ :๑) และมีสารละลายอิ่มตัวของ ferric acetate ๒-๓ หยด ซึ่งใช้เป็นตัวช่วยให้โครโมโซมติดสีดีขึ้น

๔.๓ กรดอะซิติค ๔๐ เปอร์เซนต์ และ ๔๕ เปอร์เซนต์

๔.๔ เอทธิล อัลกอฮอล์ ๔๐ เปอร์เซนต์ และ ๗๐ เปอร์เซนต์

๔.๕ กรดเกลือเข้มข้น ๑ นอร์มัล

๔.๖ โปรปีโอโนคาร์มีน (propiono-carmine) ๐.๕ เปอร์เซนต์

๔.๗ alcoholic hydrochloric acid-carmine เตรียมตามวิธีของ Snow R. (1963)

๔.๘ Schiff's reagent เตรียมตามวิธีของ Darlington and La Cour (1962)

๕. อุปกรณ์สำหรับใช้ศึกษาเซลและโครโมโซม

๕.๑ สไลด์และแผ่นแก้วปิด

๕.๒ ขวดสำหรับเก็บตัวอย่าง

๕.๓ ปากคีบ

๕.๔ เข็มเขี่ย

๕.๕ ตะเกียงแอลกอฮอล์

๕.๖ กระดาษซับ

๖. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับทำสไลด์ถาวร

๖.๑ Ridged jars

๖.๒ กรดอะซิติค ๔๕ เปอร์เซนต์

๖.๓ Butanol

๖.๔ Euparol

๖.๕ Hoyers' mounting medium เตรียมตามวิธีของ Cunningham (1962)

<u>วิธีดำเนินการทดลอง</u> ดำเนินการทดลองเป็น ๓ ขั้นคือ

๑. การปลูกและการดูแลรักษา เริ่มจากการเพาะเมล็ดในกะบะเพาะ วัสดุที่ใช้ในการเพาะประกอบด้วยดินตากแห้ง ๒ ส่วน ขี้เถ้าแกลบ ๒ ส่วน และปุ๋ยอินทรีย์เทศบาล

๑ ส่วน ผสมกันแล้วใส่กะบะเพาะไว้ในที่ร่มรำไรประมาณ ๖-๑๐ วัน เมล็ดพริกจะงอก แล้วย้ายกะบะเพาะไปตั้งให้ถูกแดดบ้าง แต่ระวังอย่าให้แดดจัดในระยะนี้ ต้นกล้าอาจตายได้ เมื่อต้นกล้ามีใบ ๓-๔ คู่ จึงย้ายลงปลูกในกระถาง ๖ นิ้ว ส่วนลูกผสมระหว่าง Capsicum annuum var. CA # 2 กับ Capsicum chinense var. CC # 1 ได้รับมาในรูปของต้นกล้า จึงย้ายลงปลูกในกระถางได้ทันที เมื่อต้นกล้าตั้งตัวได้แล้ว หลังจากการย้ายปลูกลงกระถาง ๒ สัปดาห์ จะมีการให้ปุ๋ยเพื่อเร่งการเจริญเติบโต โดยใช้ปุ๋ยเกล็ดเซลล์สูตร ๑๕ :๓๐ :๑๕ ละลายน้ำตามอัตราที่ระบุข้างซองรดทุก ๒ สัปดาห์ เนื่องจากพริกมีศัตรูมาก ทั้งไวรัส ราและแมลง จึงต้องฉีดพ่นยากำจัดราและแมลง ยาที่ใช้ฉีดพ่นกำจัดราคือ เบนเลท และออ กาไซด์ ส่วนยาที่ใช้กำจัดแมลงใช้ เคลเทน และเซฟวิน ๘๕ อัตราการใช้ตามที่ระบุในฉลากยา ส่วนยาที่ใช้ฉีดฆ่าและป้องกันไวรัสยังไม่มี การใช้ยาฉีดฆ่าแมลงมีส่วนทำให้การระบาดของไวรัสลดลงได้บ้าง เพราะแมลงเป็นพาหะของไวรัส

พริก Capsicum annuum L. เมื่อมีอายุประมาณ ๗๐ วัน จะเริ่มออกดอก ส่วน Capsicum chinense Jacq. Hort. ใช้เวลานานกว่า บางต้นอาจมากกว่า ๑๐๐ วัน จึงเริ่มออกดอก เนื่องจากพริกมีปัญหาในเรื่องโรคและศัตรูมาก ประกอบกับพื้นที่ที่ใช้ในการปลูกทดลองมีจำกัด จึงเลือกพันธุ์ละ ๖ ต้น เป็นตัวแทนที่ใช้ในการศึกษาและวิจัยนี้

๒. การศึกษาทางสัณฐานวิทยา โดยทำการศึกษาลักษณะและวัดขนาดของส่วนต่าง ๆ เช่น ลำต้น ใบ ดอก ผล และเมล็ดของพริกพันธุ์ต่าง ๆ และลูกผสม ค่าที่วัดได้แสดงในรูปของค่าเฉลี่ย แล้วทำการบันทึกภาพของพริกแต่ละพันธุ์

๓. การศึกษาทางไซโตเจเนติคส์ เซลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้มาจาก

๓.๑ microsporocyte จากดอกอ่อนของพริกทุกพันธุ์ เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซม meiotic figure ในระยะ first metaphase และลักษณะของ microspore quartet เตรียมเซล microsporocyte ทำโดยเลือกดอกอ่อนที่ชั้นกลีบเลี้ยงเพิ่งเริ่มแย้มเพียงเล็กน้อย (ปกติดอกอ่อนมาก ๆ ชั้นกลีบเลี้ยงจะหุ้มทุกส่วนไว้หมด) ซึ่งพบว่ามีเซลที่กำลังแบ่งตัวอยู่มาก นำมาแช่ในน้ำยา fixative อะซิติค :แอลกอฮอล์ ช่วงเวลาที่เก็บดอกอยู่ระหว่าง ๑๐.๐๐-๑๒.๐๐ น. แช่ดอกอ่อนไว้ประมาณ ๑๒-๑๘ ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเท fixative ทิ้งไป ล้างด้วยแอลกอฮอล์ ๙๕ เปอร์เซนต์ ๒ ครั้ง ๆ ละ ๑๐

นาที แล้วใส่ไว้ในแอลกอฮอล์ ๗๐ เปอร์เซนต์ เก็บตัวอย่างไว้ในตู้เย็นเพื่อการศึกษาต่อไป

การเตรียมสไลด์เพื่อการศึกษา หยด propiono-carmine ๑ หยดลงบนสไลด์ เอาเข็มเขี่ยอับเรณูมา smear บนสไลด์ปิดแผ่นแก้วปิด ลนไฟด้วยตะเกียงแอลกอฮอล์พอร้อน แต่อย่าให้เดือด ใช้ด้ามของเข็มเขี่ยเคาะบนแผ่นแก้วปิดแล้วกดด้วยนิ้วหัวแม่มือเพื่อให้โครโมโซมกระจายดี และอยู่ในระนาบเดียวกัน การกดหรือเคาะควรรองด้วยกระดาษซับทุกครั้ง เพื่อมิให้แผ่นแก้วแตก และยังช่วยซับสีย้อมส่วนเกินอีกด้วย นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อเลือกหาระยะที่ต้องการศึกษาต่อไป

004242

๓.๒ ละอองเรณู (pollen grain) จากดอกที่เริ่มบานของพริกทุกพันธุ์ เพื่อศึกษาความสามารถเจริญพันธุ์ และความเป็นหมันของละอองเรณูโดยดูจากการติดสีของนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม มีวิธีการ fix เช่นเดียวกับ microsporocyte ของดอกอ่อนดังที่ได้กล่าวมาแล้วทุกประการ แต่ใช้สี alcoholic-hydrochloric carmine เพื่อย้อม pollen nuclei โดยนำดอกที่เริ่มบานหลังจากถูก fix แล้วมาแช่ใน alcoholic-hydrochloric carmine ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา ๑-๕ วัน แล้วเอาเข็มเขี่ย anther มา smear บนสไลด์ที่มีกรด อะซิติค ๔๕ เปอร์เซนต์ ๑ หยด ปิดแผ่นแก้วปิดใช้กระดาษซับกรดอะซิติคส่วนเกินออกแล้วกดเพียงเบา ๆ นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะพบว่าละอองเรณูที่สมบูรณ์และสืบพันธุ์ได้ มีนิวเคลียสติดสีชมพูเข้มได้แก่ generative nucleus (ซึ่งเป็นรูปเลนนูนยาว) หรือเห็นเป็น ๒ spermnuclei ส่วน tube nucleus นั้นติดสีจางกว่าเช่นเดียวกับไซโตพลาสซึม ทำให้สามารถหาจำนวนละอองเรณูที่สามารถเจริญพันธุ์และเป็นหมันได้ โดยกำหนดว่า pollen ที่มีทั้งนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมติดสีถือว่าสมบูรณ์ ส่วน pollen ที่มีไซโตพลาสซึมติดสีเพียงเล็กน้อยหรือไม่ติดเลย และผนังของ pollen มีรอยพับย่นถือว่าเป็นหมัน

๓.๓ จากเซลปลายรากของพริก เพื่อดูรูปร่างของโครโมโซม ในระยะ metaphase มีวิธีการเตรียมเซลจากรากที่กำลังแบ่งตัวดังนี้ นำรากที่มีลักษณะขาวใสซึ่งเป็นลักษณะของรากที่มีเซลเจริญเติบโตดี มาแช่ในสารละลายยับยั้งตัวของ α -bromonapthalene ซึ่งเตรียมได้โดยใช้ α -bromonapthalene ๑ หยดต่อน้ำ ๑,๐๐๐ ลูกบาศก์เซนติเมตร α -bromonapthalene จะช่วยให้การแบ่งเซลหยุดอยู่ในระยะ metaphase

และโครโมโซมหดตัว ทำให้สะดวกต่อการศึกษา ระยะเวลาที่แช่รากใน α -bromonapthalene ประมาณ ๑๖-๑๘ ชั่วโมง โดยเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ ๔-๕ ^{o}C ช่วงเวลาที่ตัดรากซึ่งพบว่ามีเซลที่กำลังแบ่งตัวมากคือ ๑๔.๐๐-๑๕.๐๐น. แล้วเท α -bromonapthalene ทิ้งไป fix ด้วยกรดอะซิติค ๔๐ เปอร์เซนต์เป็นเวลา ๓๐ นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยแอลกอฮอล์ ๗๐ เปอร์เซนต์ ๒-๓ ครั้ง ๆ ละ ๕ นาที แล้วเก็บรากไว้ในตู้เย็นที่ ๔-๕^{o}C โดยแช่รากไว้ใน ๗๐ เปอร์เซนต์แอลกอฮอล์

เมื่อจะศึกษานำรากที่แช่ไว้ในอัลกอฮอล์ ๗๐ เปอร์เซนต์ ล้างด้วยน้ำกลั่น ๒-๓ ครั้ง ๆ ละ ๕ นาที จนหมดแอลกอฮอล์เพื่อช่วยให้เซลของรากติดสีดีขึ้น แล้วนำไป hydrolyse ในกรดเกลือ ๑ นอร์มัล ที่อุณหภูมิ ๖๐^{o}C เป็นเวลา ๑๒ นาที เทกรดเหลือทิ้งแล้วใส่ Schiff's reagent ทิ้งไว้ประมาณ ๓๐-๖๐ นาที ใช้เข็มตัดปลายราก ส่วนที่ติดสีเข้มวางบนสไลด์แล้วหยด propiono-carmine ลงไป ๑ หยด เพื่อให้โครโมโซมติดสีมากขึ้น แล้วปิดแผ่นแก้วปิด ใช้ด้ามเข็มเขี่ยเคาะบนแผ่นแก้วปิดที่มีกระดาษซับรองอยู่ ๒-๓ ชั้น เพื่อช่วยให้เซลและโครโมโซมกระจายดีขึ้น นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลที่มีโครโมโซมในระยะ metaphase กระจายดี นำไปถ่ายรูปไว้ศึกษาต่อไป

<u>การเตรียมสไลด์ถาวร</u>

สไลด์ที่ศึกษาโครโมโซม เช่นโครโมโซมในระยะ metaphase ของ mitosis หรือ first metaphase ของ meiosis การเตรียมต้องทำให้ปราศจากน้ำอย่างแท้จริง โดยแช่ใน butyl alcohol ๒-๓ ครั้ง แล้ว mount ด้วย Euparal เก็บไว้ศึกษา ส่วนสไลด์ที่ศึกษานิวเคลียสของเซล เช่น การตรวจเซลในระยะ microspore quartet หรือการดูละอองเรณู ถ้าจะทำให้ปราศจากน้ำโดยแช่ใน butyl alcohol เซลส่วนมากจะหลุดหายไป จึงต้องดัดแปลงโดยใช้ Hoyer's mounting medium แทน Euparal คือหลังจาก smear อับเรณูบนสไลด์ซึ่งมีสีที่ใช้ย้อม แล้วหยด Hoyer's medium ลงไป ลนให้เข้ากัน ปิดแผ่นแก้วปิด เก็บไว้ศึกษาต่อไป