บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง

   1.1 ต้นบัวจีนดอกชมพูเล็ก (*Zephyranthes rosea* Lindl.)

   1.2 ต้นบัวจีนดอกชมพูใหญ่ (*Z. grandiflora* Lindl.)

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกและผสมเกสร

   2.2 กระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15.20 เซนติเมตร

   2.3 ดินธรรมดา ปุ๋ยอินทรีย์ กทม.-1 ปุ๋ยเคมีสูตร 16-16-16

   2.4 เครื่องมือการเกษตร

   2.5 ถุงกระดาษฟางขนาด 4.00 × 5.00 เซนติเมตร และ 6.50 × 7.50 เซนติเมตร

   2.6 ที่เย็บกระดาษ

   2.7 ป้ายสำหรับบันทึก

   2.8 ปากคีบ กรรไกร พู่กัน

3. สารเคมี

   3.1 สารละลายอิ่มตัวของ alphabromonaphthalene

   3.2 acetic acid 90 เปอร์เซ็นต์

   3.3 ethyl alcohol 70 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์

   3.5 1 normal hydrochloric acid

   3.6 Schiff's reagent

   3.7 propiono carmine 2 เปอร์เซ็นต์

   3.8 น้ำแข็งแห้ง

   3.9 xylene

   3.10 euparol

4. อุปกรณ์สำหรับศึกษาวิทยาเซลล์และเซลล์พันธุศาสตร์

4.1 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope)

4.2 stage micrometer และ ocular micrometer

4.3 แผ่นกระจกสไลด์ แผ่นแก้วปิด ใบมีดโกน กรรไกร

4.4 เครื่องมือเตรียมสไลด์ เช่น ปากคีบ เข็มเขี่ย แท่งเคาะสไลด์

5. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ

5.1 กล้องจุลทรรศน์สำหรับถ่ายภาพชนิด Olympus P.M. 7

5.2 กล้องถ่ายรูป

5.3 ฟิล์ม Kodak Panatomic-X , Ektachrome-100 และ Kodak Gold 100

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็นห้าขั้นตอน ขั้นตอนแรกศึกษาสัณฐานวิทยาของต้นบัวจีนดอกชมพูเล็กและต้นบัวจีนดอกชมพูใหญ่ ขั้นตอนที่สอง ศึกษาคาริโอไทป์ของบัวจีนทั้งสองชนิด ขั้นตอนที่สาม ศึกษาการเจริญพันธุ์ของบัวจีนทั้งสองชนิด ขั้นตอนที่สี่ สร้างและศึกษาลูกผสมที่ได้จากการผสมสลับ (reciprocal cross) ระหว่างบัวจีนทั้งสองชนิดและขั้นตอนที่ห้า เปรียบเทียบสัณฐานวิทยาและคาริโอไทป์ระหว่างบัวจีนดอกชมพูเล็ก บัวจีนดอกชมพูใหญ่และลูกผสมที่ได้จากการผสมสลับระหว่างบัวจีนทั้งสองชนิด

1. ศึกษาสัณฐานวิทยาของต้นบัวจีนดอกชมพูเล็กและต้นบัวจีนดอกชมพูใหญ่

1.1 การปลูกต้นบัวจีน

นำต้นบัวจีนดอกชมพูเล็กและต้นบัวจีนดอกชมพูใหญ่ ซึ่งรองศาสตราจารย์ ดร. กันยารัตน์ ไชยสุต ได้เก็บรวบรวมพันธุ์จากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย มาชนิดละ 80 ต้น ปลูกในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15.20 เซนติเมตร กระถางละ 1 ต้น ภายในกระถางบรรจุดินธรรมดา : ปุ๋ยอินทรีย์ กทม-1 อัตราส่วน 1 : 1 ให้หมายเลขประจำต้นบัวจีนทุกต้น เมื่อปลูกได้ 1 เดือนแล้ว ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 16-16-16 ซึ่งบัวจีนที่นำมาศึกษานี้ปลูกไว้ในสภาพแวดล้อมเดียวกันตลอดการทดลองนี้

1.2 ศึกษาลักษณะราก ลำต้น ใบและดอก

เมื่อปลูกต้นบัวจีนได้ประมาณ 2 เดือน บัวจีนจะเริ่มมีดอก ทำการสุ่มตัวอย่างเลือกต้นบัวจีนเหล่านี้มาชนิดละ 10 ต้น ศึกษาลักษณะราก ลำต้น ใบ โดยเปรียบเทียบขนาดราก การแตกแขนงของราก ขนาดของหัว (bulb) จำนวนใบต่อต้น ขนาดของใบ ขนาดของดอกและส่วนต่าง ๆ ของดอกคือ tepal เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย สีของ tepal และสีของยอดเกสรตัวเมีย แล้วทำการวัดขนาดของส่วนต่าง ๆ ของต้นบัวจีน หน่วยเป็นเซนติเมตร ได้แก่ เส้นผ่าศูนย์กลางและความสูงของหัว ความกว้างและความยาวของใบที่ยาวที่สุด ความยาวของก้านช่อดอก ก้านดอกย่อยและกาบหุ้มช่อดอก ความกว้างและความยาวของ tepal ความยาวของอับเรณู ความยาวของก้านเกสรตัวผู้ ความยาวของยอดเกสรตัวเมีย ก้านเกสรตัวเมียและรังไข่ สังเกตจำนวนเกสรตัวผู้ จำนวนแฉกของยอดเกสรตัวเมีย จำนวนพูของรังไข่และการติดของอับเรณูกับก้านเกสรตัวผู้

2. ศึกษาคาริโอไทป์ของบัวจีนดอกชมพูเล็กและบัวจีนดอกชมพูใหญ่

ศึกษาโครโมโซมใน somatic cell ของปลายราก โดยเตรียมสไลด์แบบ Feulgen Squash ซึ่งมีหลักการดังนี้ นำรากที่มีลักษณะขาวใส ปลายรากขุ่นเล็กน้อยยาวประมาณ 1.00-2.00 เซนติเมตร แช่ในสารละลายอิ่มตัวของ alphabromonaphthalene ที่อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง แล้วเท alphabromonaphthalene ทิ้ง ใส่ acetic acid 90 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วล้างรากด้วย ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง เก็บรากไว้ใน ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ โดยใส่ไว้ในตู้เย็น เมื่อจะศึกษาโครโมโซมจึงนำรากที่เก็บไว้มาล้างน้ำให้สะอาด นำรากไปไฮโดรไลส์ด้วย 1 normal hydrochloric acid ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วย้ายรากไปแช่ใน Schiff's reagent 2 ชั่วโมง เท Schiff's reagent ทิ้ง ใส่น้ำ นำปลายรากเฉพาะบริเวณที่ติดสีม่วงแดงซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญวางบนแผ่นกระจกสไลด์ หยด propiono carmine 1 หยด ปิดด้วยแผ่นแก้วปิด ใช้แท่งเคาะสไลด์เคาะบนแผ่นแก้วปิดบริเวณที่มีปลายรากเพื่อให้เซลล์แยกออกจากกันและโครโมโซมกระจายตัว แล้วใช้นิ้วหัวแม่มือทั้งสองข้างกดบนกระดาษซับที่วางบนแผ่นแก้วปิด เพื่อให้โครโมโซมอยู่ในระนาบเดียวกัน นำสไลด์มาตรวจดูโครโมโซมด้วยกล้อง

จุลทรรศน์ ใช้เลนส์วัตถุ (objective lens) กำลังขยาย ×40 แล้วนำสไลด์ที่มีโครโมโซมกระจายดีมาทำสไลด์ถาวร โดยวางสไลด์บนแผ่นน้ำแข็งแห้ง รอจนแผ่นแก้วปิดเริ่มมีฝ้าน้ำแข็งเกาะ แล้วใช้ใบมีดโกนแซะแผ่นแก้วปิดขึ้นวางหงายบนแผ่นน้ำแข็งแห้ง แล้วผ่านสไลด์และแผ่นแก้วปิดไปใน ethyl alcohol 100 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง และ xylene 1 ครั้ง เมื่อนำสไลด์ออกจาก xylene แล้ว หยด euparol 1 หยด ลงตรงบริเวณที่มีเซลล์รากแล้วปิดแผ่นแก้วปิด อบสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

นำสไลด์ถาวรที่อบแห้งแล้วมาเลือกเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟสและมีโครโมโซมกระจายไม่ซ้อนกันหรือซ้อนกันโดยไม่ทับเซนโทรเมียร์ นับจำนวนโครโมโซมโดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า แล้วนำเซลล์ที่เลือกได้ไปถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 1,000 เท่า ถ่ายภาพเซลล์ทั้งหมด 20 เซลล์ สำหรับบัวจีนแต่ละชนิด นำฟิล์มไปล้างแล้วอัดขยายภาพขนาด 7.50×12.50 เซนติเมตร ด้วยเครื่องอัดขยายภาพ แล้วนำฟิล์มมาวาดโครโมโซมลงบนกระดาษ ใช้กำลังขยายประมาณ 12,000 เท่า เท่ากันทุกเซลล์ แล้วเริ่มจัดคู่ของโครโมโซมด้วยตาเปล่า โดยให้หมายเลขโครโมโซมเรียงจากคู่ยาวที่สุดเป็น $^{1}_{1}{}^{1}_{2}$, $^{2}_{1}{}^{2}_{2}$,... เรื่อยไปจนถึงคู่ที่สั้นที่สุด แล้ววัดความยาวของโครโมโซมเป็นเซนติเมตร* โดยใช้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์เป็นหลัก ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT) ประกอบด้วยความยาวของแขนข้างสั้น (Ls) และความยาวของแขนข้างยาว (Ll) ของโครโมโซมแท่งนั้น นำค่าความยาวต่าง ๆ ของโครโมโซมที่ได้มาคำนวณหาค่า relative length (RL) และ centromeric index (CI) ตามวิธีของ Turpin และ Lejeune (1965) ดังสูตรต่อไปนี้

$$\text{relative length} = \frac{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT)}}{\text{ความยาวของโครโมโซมทั้งหมดในเซลล์นั้น } (\Sigma LT)}$$

$$\text{centromeric index} = \frac{\text{ความยาวของแขนข้างยาวของโครโมโซม (Ll)}}{\text{ความยาวของโครโมโซมแท่งนั้น (LT)}}$$

นำค่า relative length และ centromeric index มาเขียนกราฟ โดยให้ค่า relative lenght อยู่ในแกนตั้ง (ordinate) และค่า centromeric index อยู่ในแกนระดับ (abscissa) จากกราฟสามารถตรวจสอบตำแหน่งที่อยู่ของโครโมโซมที่เป็นคู่

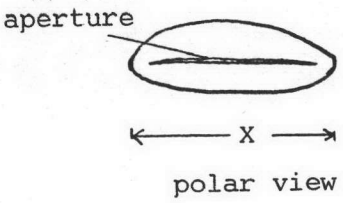
*1 ไมครอน = 0.383 เซนติเมตร คำนวณจากภาพถ่าย stage micrometer

กันที่จัดไว้ตั้งแต่แรกได้ถูกต้องยิ่งขึ้น เพราะโครโมโซมที่เป็นคู่กันย่อมมีค่า relative length และ centromeric index เท่ากัน หรือใกล้เคียงกัน แล้วนำค่า relative length และ centromeric index ทั้ง 20 เซลล์ มารวมกันเพื่อคำนวณหา mean ($\bar{X}$) standard deviation (S.D.) และ standard error ($S_{\bar{X}}$) ของ relative length และ centromeric index นำค่าทางสถิติที่ได้ในภายหลังนี้ไปเขียนกราฟ โดยให้ค่าต่าง ๆ ของ relative length อยู่ในแกนตั้งและค่าต่าง ๆ ของ centromeric index อยู่ในแกนระดับ กราฟที่ได้จะช่วยให้สามารถจัดกลุ่มของโครโมโซม และหาความสัมพันธ์ระหว่างโครโมโซมแต่ละคู่ได้ว่าแตกต่างกันหรือเหมือนกันอย่างไร เมื่อจัดคู่ของโครโมโซมได้แล้ว เลือกฟิล์มที่มีโครโมโซมกระจายดีที่สุด 1 เซลล์ ของบัวจีนแต่ละชนิด นำฟิล์มมาอัดขยายใช้กำลังขยายประมาณ 5,000 เท่า เพื่อนำมาจัดคาริโอแกรม (karyogram) โดยตัดโครโมโซมแต่ละแท่งมาเรียงคู่จากโครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุดไปถึงคู่ที่สั้นที่สุด โดยให้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมแต่ละแท่งอยู่ในแนวเส้นตรงเดียวกัน

3. ศึกษาการเจริญพันธุ์ของบัวจีนดอกชมพูเล็กและบัวจีนดอกชมพูใหญ่

3.1 วัดขนาดและศึกษาการเจริญพันธุ์ของละอองเรณู

ในการศึกษาการเจริญพันธุ์และวัดขนาดของละอองเรณูทำในบัวจีนชนิดละ 10 ต้น ใช้ 5 ดอก ต่อต้น โดยก่อนดอกบาน 1 วัน นำถุงกระดาษฟางมาครอบดอกไว้ เช้าวันรุ่งขึ้นดึงถุงที่ครอบออก เขี่ยละอองเรณูใส่แผ่นกระจกสไลด์ หยดสี propiono carmine 1 หยด ใช้เข็มเขี่ยให้ละอองเรณูกระจายแล้วปิดแผ่นกระจกสไลด์ด้วยแผ่นแก้วปิด นำมาตรวจดูลักษณะของละอองเรณูด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 40 เท่า ละอองเรณูที่ไซโทพลาสซึมและนิวเคลียสไม่ติดสีแดงของ propiono carmine จัดเป็นละอองเรณูที่ไม่ สามารถเจริญพันธุ์ได้ ส่วนละอองเรณูที่ไซโทพลาสซึมและนิวเคลียสติดสีแดงถือว่าเป็นละอองเรณูที่เจริญพันธุ์ได้ วัดขนาดของละอองเรณูที่เจริญพันธุ์ได้ โดยใช้ ocular micrometer วัดเส้นผ่าศูนย์กลางที่กว้างที่สุดของละอองเรณู โดยปรับภาพให้เป็น optical plane ของ polar area โดยจัดให้ช่วงเปิด (aperture) ขนานกับแนวเส้นผ่าศูนย์กลาง ดังภาพต่อไปนี้



X = เส้นผ่าศูนย์กลางที่กว้างที่สุดของละอองเรณู วัดจาก optical plane

= ขนาดของละอองเรณู

3.2 ศึกษาการติดเมล็ดของบัวจีนที่ผสมตัวเอง

ทำการผสมตัวเองบัวจีนดอกที่ศึกษาการเจริญพันธุ์และวัดขนาดละอองเรณูเสร็จแล้ว โดยนำละอองเรณูที่เหลือมาป้ายบนยอดเกสรตัวเมียของดอกเดียวกัน แล้วครอบถุงกระดาษฟางไว้ 24 ชั่วโมง จึงดึงเอาถุงที่ครอบออกเมื่อดอกที่ผสมเกสรไว้ติดผลและผลแก่จัดแล้วนำมานับจำนวนเมล็ดในแต่ละผล ดอกที่มีการเจริญพันธุ์สูงจะติดเมล็ดมากและได้เมล็ดใหญ่

4. ศึกษาลูกผสมที่ได้จากการผสมสลับ (reciprocal cross) ระหว่างบัวจีนดอกชมพูเล็กและบัวจีนดอกชมพูใหญ่

4.1 การสร้างลูกผสม

ทำการผสมเกสรโดยใช้บัวจีนดอกชมพูเล็กเป็นแม่ บัวจีนดอกชมพูใหญ่เป็นพ่อ และผสมสลับใช้บัวจีนดอกชมพูใหญ่เป็นแม่ บัวจีนดอกชมพูเล็กเป็นพ่อ ในการผสมแต่ละครั้งใช้บัวจีนชนิดละ 10 ต้น ผสมเกสรต้นละ 5 ดอก วิธีการผสมเกสรทำได้ดังนี้คือ ก่อนดอกบัวจีนบาน 1 วัน ดึงเกสรตัวผู้ (emasculation) ออกจากดอกที่ใช้เป็นแม่แล้วครอบถุงกระดาษฟางไว้ ขณะเดียวกันก็ใช้ถุงกระดาษฟางครอบดอกที่จะใช้เป็นพ่อด้วย เช้าวันรุ่งขึ้นนำถุงที่ครอบดอกพ่อแม่ออก แล้วใช้ละอองเรณูจากดอกพ่อมาป้ายบนยอดเกสรตัวเมียของดอกแม่แล้วครอบถุงดอกแม่ไว้ 24 ชั่วโมง แล้วจึงถอดถุงที่ครอบออก ภายใน 7 วันหลังจากผสมเกสรแล้วจะสังเกตเห็นว่า ดอกที่ผสมเกสรไม่สำเร็จนั้นส่วนต่าง ๆ ของดอกรวมทั้งรังไข่จะเหี่ยวแห้งไป ส่วนดอกที่ผสมติดจะมีส่วนประกอบอื่นของดอกเหี่ยวแห้งไป แต่รังไข่จะยังคงมีสีเขียว และจะพองออกมาเรื่อย ๆ จนกลายเป็นผล และเมื่อผลแก่ก็จะเปลี่ยนสีจากเขียว เป็นสีเหลืองและสีน้ำตาลตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าขณะนี้เมล็ดแก่จัดเต็มที่แล้ว ใช้เวลาหลังจากผสมเกสรแล้วประมาณ 20 วัน ผลจะมีรอยแตกตามกลางพู นำผลมานับจำนวนเมล็ดในแต่ละผล

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 ศึกษาคาริโอไทป์ของลูกผสม

นำเมล็ดลูกผสมจากข้อ 4.1 เพาะในทรายที่บรรจุในกระถางขนาด 15.20 เซนติเมตร กระถางละ 1 ผล รดน้ำให้เปียกชุ่มอยู่เสมอ เมื่อเมล็ดงอกได้ 3 สัปดาห์ แล้วย้ายต้นลูกผสมไปปลูกในดินธรรมดา : ปุ๋ยอินทรีย์ กทม-1 อัตราส่วน 1 : 1 ที่บรรจุในกระถางขนาด 15.20 เซนติเมตร กระถางละ 1 ต้น ให้หมายเลขประจำทุกต้น เมื่อต้นลูกผสมอายุ 6 เดือน ขึ้นไปแล้วจึงนำรากมาศึกษาคาริโอไทป์โดยเลือกเซลล์ปลายรากของลูกผสมมาชนิดละ 10 เซลล์ ทำตามวิธีในขั้นตอนที่ 2

4.3 ศึกษาสัณฐานวิทยาของลูกผสม

เมื่อต้นลูกผสมเริ่มมีดอก นำแต่ละต้นที่มีดอกมาศึกษาลักษณะของหัว ใบ ช่อดอก และลักษณะของส่วนต่าง ๆ ของช่อดอก ศึกษาเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 1.2

5. เปรียบเทียบสัณฐานวิทยาและคาริโอไทป์ระหว่างบัวจีนดอกชมพูเล็ก บัวจีนดอกชมพูใหญ่ และลูกผสมที่ได้จากการผสมสลับระหว่างบัวจีนทั้งสองชนิด

5.1 เปรียบเทียบสัณฐานวิทยาของบัวจีนลูกผสมกับพ่อแม่

โดยศึกษาความคล้ายคลึงกันและความแตกต่างกันของราก ลำต้น ใบและดอก โดยศึกษาเช่นเดียวกับหัวข้อ 1.2 สังเกตว่าลูกผสมแต่ละชนิดมีลักษณะใดคล้ายพ่อหรือแม่ข้างใดข้างหนึ่งมากกว่าพ่อหรือแม่อีกข้างหนึ่ง

5.2 เปรียบเทียบคาริโอไทป์ของบัวจีนลูกผสมกับพ่อแม่

โดยศึกษาว่าบัวจีนลูกผสมที่เกิดจากการผสมสลับระหว่างบัวจีนดอกชมพูเล็กและบัวจีนดอกชมพูใหญ่นี้ มีคาริโอไทป์ประกอบด้วย metacentric chromosome sub-metacentric chromosome และ acrocentric chromosome ขนาดต่าง ๆ ที่คล้ายกับคาริโอไทป์ของพ่อแม่หรือแตกต่างจากพ่อแม่อย่างไร