หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง

ใช้พุทธรักษาลูกผสม *(Canna hybrid)* พันธุ์ดอกสีชมพู *(clear pink)* ซึ่งมีลักษณะดังนี้ ลำต้นสูงประมาณ 80 - 148 เซนติเมตร ส่วนของลำต้นและข้อมีสีเขียว ใบรูปร่างยาวรี ปลายใบแหลม *(broadly elliptic)* เรียงตัวแบบสลับ *(alternate)* ช่อดอกเป็นแบบ *panicle* ช่อดอกตั้ง ดอกมีกลีบเลี้ยง 3 กลีบ สีเขียวอมชมพู กลีบดอก 3 กลีบ สีชมพูเข้ม มีเพตอลลอยด์สีตามิโนต จำนวน 5 กลีบ สีชมพูตรงโคนกลีบมีสีเข้ม รูปร่างของเพตอลลอยด์สีตามิโนตค่อนข้างกลมมนปลาย *labellum* เว้า (ดังรูปที่ 2) เมื่อผสมตัวเองให้ผลติดดีกว่าพันธุ์อื่น ๆ คือให้ผลติดประมาณ 60 เปอร์เซนต์ แต่เมื่อผสมข้ามกับพันธุ์อื่นให้ผลติดลดลง (จงจินต์ แปลกประพันธ์, 2520) ผลมีสีเขียว มีเมล็ดประมาณ 4 - 10 เมล็ด ต่อผล

ส่วนของพืชที่ใช้ในการทดลองคือ หน่ออ่อน และต้นกล้า *(seedling)* ที่งอกจากเมล็ดที่ผสมตัวเอง

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูก

- กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 นิ้ว
- ดินลีดา ดินนา และปุ๋ยคอก ในอัตราส่วน 2 : 2 : 1
- ป้ายสำหรับบันทึก

3. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาโครโมโซม

- *alphabromonaphthalene*
- *acetic acid 45%* และ *90%*

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 แสดงลักษณะดอกของพุทธรักษาลูกผสม (Canna hybrid) พันธุ์ดอกสีชมพูที่ใช้ในการทดลอง

- *ethyl alcohol 70%* และ *95%*
- *normal hydrochloric acid*
- *Schiff's reagent*
- *propiono-orcein 1%*
- *euparol*

4. อุปกรณ์เกี่ยวกับการถ่ายภาพ
   - กล้องจุลทรรศน์สำหรับถ่ายภาพ ชนิด *P.M. 7*, กล้อง *Minota*
   - ฟิล์ม *Panatomic X*, ฟิล์ม *Kodakchrome*

5. รังสีที่ใช้ในการทดลอง

   รังสีแกมมาที่ได้จากการสลายตัวของธาตุโคบอลท์ 60 ที่สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ

วิธีดำเนินการทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้แบ่งการทดลองออกเป็นสองตอนคือ ตอนแรกเป็นการศึกษาคารีโอไทพ์ของพุทธรักษาลูกผสมชนิดดอกสีชมพูที่ไม่ได้รับรังสี ส่วนตอนที่สองศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีต่อโครโมโซมและลักษณะภายนอกของลำต้น ใบ และการเจริญเติบโต

1. การศึกษาคารีโอไทพ์

นำรากจากหน่อพุทธรักษาที่ไม่ได้รับรังสีมาศึกษาโครโมโซมโดยวิธี *Feulgen squash* โดยตัดรากที่มีลักษณะขาวใส ยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร แช่ใน *saturated alphabromonaphthalene* ทิ้งไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นานประมาณ 19 ชั่วโมง การแช่นี้จะทำให้การแบ่งนิวเคลียสของเซลหยุดอยู่ในระยะเมตาเฟส และทำให้โครโมโซมหดตัว สะดวกในการศึกษารูปร่างและจำนวนโครโมโซม เท *alphabromonaphthalene* ทิ้ง ซับรากให้แห้ง แช่ใน 90 เปอร์เซ็นต์ *acetic acid* ประมาณ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำรากมาล้างด้วย *ethyl alcohol* 95 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง แล้วเก็บรากไว้ใน *ethyl alcohol 70* เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการเตรียมสไลด์จึงนำราก

ที่แช่ไว้ใน *ethyl alcohol 70* เปอร์เซ็นต์ มาล้างน้ำหลาย ๆ ครั้ง แล้ววางลงในกระจกนาฬิกา หยด *1N HCl* ประมาณ 3-4 หยด นำไปลนไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์พออุ่น ๆ นานประมาณ 3 นาที จึงนำยื่นมาซับรากให้แห้ง แช่ใน *Schiff's reagent* ประมาณ 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำรากมาแช่ในน้ำประปา เตรียมสไลด์โดยตัดเฉพาะปลายรากบริเวณที่ติดสีเข้มกว่าส่วนอื่น ๆ หยดสี *propiono orcien* 1 เปอร์เซ็นต์ ลงบนสไลด์ที่วางปลายราก เอาแผ่นแก้วปิด *(cover glass)* วางบนสไลด์นั้น ใช้ก้านไม้ขีดไฟเคาะบนแผ่นแก้วปิดด้วยน้ำหนักที่พอเหมาะให้สีย้อมเข้มทั่วแผ่นแก้ว เพื่อให้โครโมโซมกระจายออกจากกัน นำสไลด์วางบนกระดาษซับกดด้วยนิ้วหัวแม่มือเพื่อให้โครโมโซมอยู่ในระนาบเดียวกัน นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์วัตถุ *(objective lens)* กำลังขยาย *x 100*

เลือกเซลที่นิวเคลียสกำลังแบ่งตัวในระยะเมตาเฟส โดยให้โครโมโซมกระจายมองเห็น *centromere* และความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่งยังเหลืออยู่มา 10 เซล ถ่ายรูปโดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย *x 100* นำฟิล์มที่ได้มาอัดขยาย กำลังขยายประมาณ 4000 เท่า เพื่อนำไปวัดความยาวของโครโมโซม โดยใช้ตำแหน่ง *centromere* เป็นจุดศูนย์กลาง

Ls = ความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น *(Short arm)*

Ll = ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว *(Long arm)*

วัดความยาวของโครโมโซมเป็นมิลลิเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง *(Longer absolute LT)* ค่า *relative length (RL)* และ *centromeric index (CI)*

ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง = ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว + ความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น

007255

หรือ $LT = Ll + Ls$

$$RL = \frac{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง}}{\text{ความยาวของโครโมโซมทั้งหมดในหนึ่งเซล}}$$

หรือ $$RL = \frac{LT}{\leq LT}$$

$$CI = \frac{\text{ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว}}{\text{ความยาวของโครโมโซมทั้งแท่ง}}$$

หรือ $$CI = \frac{Ll}{LT}$$

นำภาพอัดขยายของโครโมโซมมาให้หมายเลข โดยพิจารณาจากความยาวและตำแหน่ง *centromere* เป็นหลัก โครโมโซมที่เหมือนกัน *(homologous chromosome)* ย่อมมีค่า *relative length* และ *centromeric index* เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน เมื่อนำค่า *relative length* และ *centromeric index* มาเขียนกราฟ โครโมโซมที่เหมือนกันจะอยู่ในตำแหน่งใกล้เคียงกันหรือทับกัน

เมื่อจับคู่ของโครโมโซมแต่ละคู่ได้แล้ว นำโครโมโซมทั้งหมดมาจัด *karyogram* โดยเรียงลำดับคู่ของโครโมโซมจากคู่ที่ยาวที่สุดไปหาคู่ที่สั้นที่สุด และเรียงให้อยู่ในแนวเดียวกัน โดยใช้ *centromere* เป็นหลัก

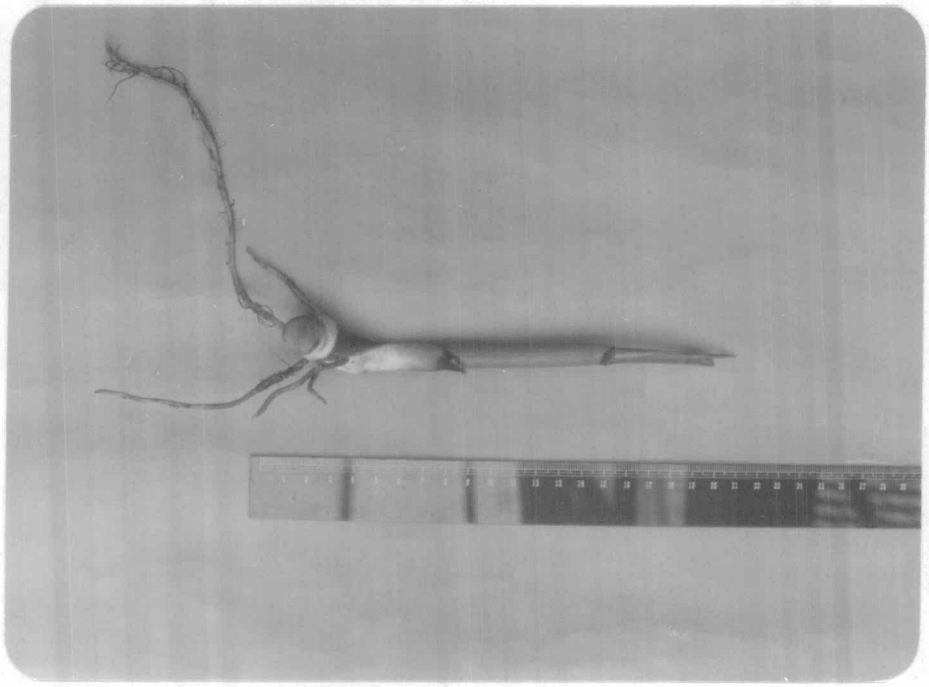
นำค่า *relative length* และ *centromeric index* ของโครโมโซมแต่ละคู่ทั้ง 10 เซล มาคำนวณค่า *mean standard deviation* และ *standard error* ของ *mean* เพื่อเขียนกราฟ กราฟที่ได้จะบอกความสัมพันธ์ของโครโมโซมแต่ละคู่ว่าแตกต่างกันหรือเหมือนกัน

2. ศึกษาผลของรังสีแกมมาที่มีต่อหน่ออ่อนและต้นกล้า *(Seedling)* พุทธรักษา

2.1 ผลของรังสีแกมมาที่มีต่อการรอดชีวิตของหน่ออ่อนและต้นกล้า

2.1.1 ผลของรังสีแกมมาที่มีต่อการรอดชีวิตของหน่ออ่อน

นำหน่ออ่อนขนาดประมาณ 15 - 20 เซนติเมตร โดยเป็นหน่อที่แตกจากเหง้า



รูปที่ 3 แสดงลักษณะของหน่ออ่อนพุทธรักษา (Canna hybrid) ที่นำมาใช้ในการทดลอง

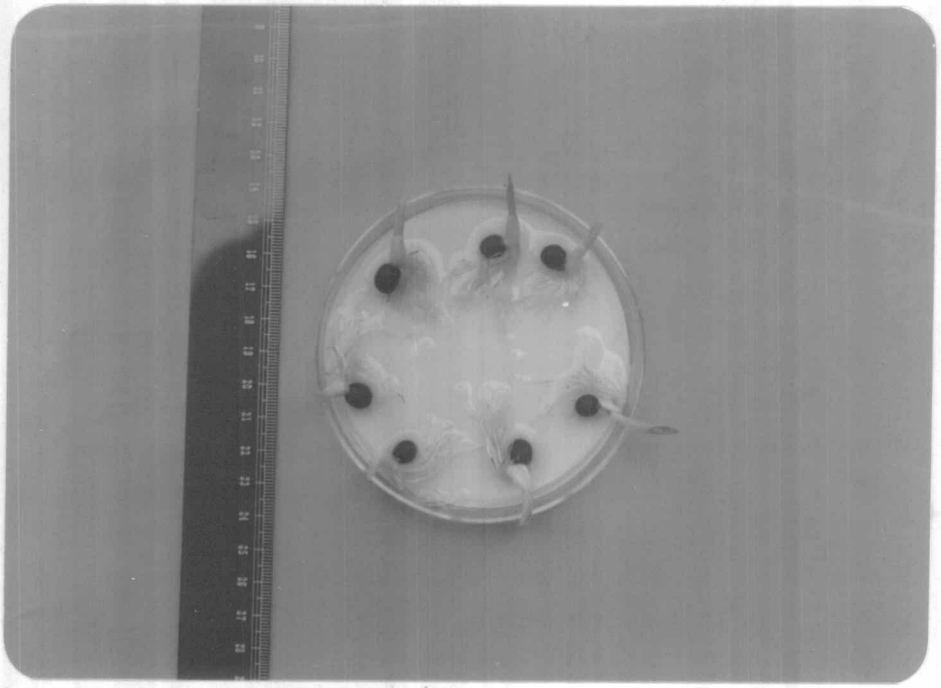
ตั้งตรงขึ้นมา เลือกเฉพาะหน่อที่มีรากแล้ว ไปฉายรังสีแกมมาที่ได้จากโคบอลัท 60 โดยใช้ปริมาณรังสี 0 500 1000 1500 และ 2000 *rads* ตามลำดับ มีอัตราความเข้มของรังสีประมาณ 4160 *rads* ต่อนาที ในแต่ละปริมาณรังสีใช้หน่อ 15 หน่อ นำหน่อไปปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 นิ้ว โดยปลูกกระถางละ 1 ต้น นับจำนวนหน่อที่รอดชีวิตหลังจากปลูกนานประมาณ *90* วัน คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตโดยเทียบอัตราส่วนระหว่างจำนวนต้นที่รอดชีวิตกับจำนวนหน่อที่ฉายรังสีในแต่ละปริมาณรังสี

2.1.2 ผลของรังสีแกมมาที่มีต่อการรอดชีวิตของต้นกล้า

นำเมล็ดที่ได้จากการผสมตัวเองของพุทธรักษาลูกผสมชนิดดอกสีชมพู แช่ในกรดกำมะถันเข้มข้นนานประมาณ 15 นาที นำไปล้างน้ำให้หมดกรด กรดกำมะถันจะทำให้เปลือกหุ้มเมล็ดซึ่งแข็งและหนาบางลง จากนั้นนำไปถูด้วยกระดาษทรายชนิดละเอียดตรงมุมใดมุมหนึ่งของเมล็ดอีกเล็กน้อย เพื่อให้เปลือกหุ้มเมล็ดบางจนน้ำซึมผ่านได้สะดวก แช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน จึงนำมาเพาะบนกระดาษกรองที่ชุ่มน้ำประมาณ 7 วัน เลือกเฉพาะต้นกล้าที่งอกและมีรากไปฉายรังสีแกมมาที่ได้จากโคบอลัท 60 โดยใช้ปริมาณรังสีเช่นเดียวกับในหน่ออ่อน ในแต่ละปริมาณรังสีใช้ต้นกล้า 20 ต้น นำต้นกล้าที่ฉายรังสีแล้วปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 นิ้ว พร้อมกับต้นที่ไม่ได้ฉายรังสี โดยปลูกกระถางละ 1 ต้น นับจำนวนต้นกล้าที่รอดชีวิตหลังจากฉายรังสีประมาณ 90 วัน คำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเช่นเดียวกับในหน่ออ่อน

2.2 ผลของรังสีแกมมาที่มีต่อการเจริญเติบโต ลักษณะภายนอกของลำต้น ใบ และดอกของหน่อและต้นกล้า

นำหน่อและต้นกล้าที่ได้รับรังสีปลูกในกระถางพร้อมกับต้นที่ไม่ได้รับรังสี โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด *(Completely randomized design)* หลังจากนั้นประมาณ 30 วัน จึงสังเกตลักษณะของลำต้น ใบ ดอก และการเจริญเติบโตเปรียบเทียบกับต้นปกติโดยทำการวัดความสูงของลำต้นเป็นระยะ ๆ ทุก ๆ 10 วัน จนกระทั่งอายุประมาณ 120 วัน



รูปที่ 4 แสดงลักษณะของต้นกล้า (seedling) พุทธรักษา (Canna hybrid) อายุประมาณ 7 วัน ที่นำมาใช้ในการทดลอง

2.3 ผลของรังสีแกมมาที่มีต่อโครโมโซม

หลังจากฉายรังสีประมาณ 90 วัน ศึกษาโครโมโซมจากเซลที่ปลายรากของหน่อและตันกล้าที่รอดชีวิตเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับรังสี โดยตัดรากที่มีลักษณะยาวใส ยาวประมาณ 1 - 2 เซนติเมตร มาศึกษาโครโมโซมโดยวิธี *Feulgen squash* โดยศึกษาลักษณะโครโมโซมในระยะเอนาเฟส ศึกษาต้นละ 5 ราก รากละ 10 เซล ในแต่ละปริมาณรังสีศึกษาประมาณ 4 - 8 ต้น คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของนิวเคลียสที่แบ่งตัวผิดปกติในแต่ละปริมาณรังสี วิเคราะห์หาสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรังสีกับเปอร์เซ็นต์เซลที่มีโครโมโซมในระยะเอนาเฟสผิดปกติ