บทที่ 6

ผลของรังสีแกมมาและสารโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม

6.1 บทนำ

โครโมโซมเป็นแหล่งรวมของยีนที่อยู่ภายในนิวเคลียส ประกอบด้วยสารพันธุกรรม (DNA) ที่พันโดยรอบโมเลกุลของโปรตีนประเภทฮีสโทน และขดม้วนตัวหลายชั้นให้กระชับแน่นจนมีขนาดใหญ่ และมีรูปร่างชัดเจน ในระยะ metaphase เป็นช่วงที่โครโมโซมขดม้วนแน่นที่สุด จึงนิยมใช้โครโมโซมในระยะนี้ในการวิเคราะห์รูปร่างและศึกษาจำนวนโครโมโซมเพราะสะดวกและชัดเจน (วิสุทธิ์, 2536) ในสภาพปกติสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีจำนวนชนิดและโครงสร้างของโครโมโซมคงที่ ในเซลล์ร่างกายทั่ว ๆ ไปมีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด เรียกว่า ดิพลอยด์ (diploid) และในเซลล์สืบพันธุ์มีจำนวนโครโมโซมหนึ่งชุด เรียกว่า แฮพลอยด์ (haploid) ชุดของโครโมโซมเรียกว่า จีโนม (genome) ในกรณีที่โครโมโซมได้รับสารกระตุ้นจากธรรมชาติ หรือมนุษย์เป็นผู้กระทำ อาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม (chromosome change) บางส่วน บางแท่ง หรือทั้งจีโนมได้ (คณาจารย์ภาควิชาพันธุศาสตร์, 2544)

การนับจำนวนโครโมโซมด้วยวิธี cell squash พืชแต่ละชนิดมีขั้นตอนการปฏิบัติต่างกัน ได้แก่ ช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่าง ระยะเวลาในการแช่ชิ้นส่วนตัวอย่างในสารชนิดต่าง ๆ ตลอดจนระยะเวลาในการย้อมสีโครโมโซม ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเป็นการหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการตัดปลายราก ระยะเวลาในการแช่รากในน้ำยารักษาสภาพ ระยะเวลาในการแช่รากในน้ำยาย่อยสลายเซลล์ ระยะเวลาในการแช่สีย้อม และการนับจำนวนโครโมโซมจากปลายรากที่เพาะจากเมล็ดของต้นงา เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาด้านเซลล์วิทยาต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.2 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

6.2.1 วัสดุ

1. วัสดุพันธุ์พืช เมล็ดพันธุ์งา สายพันธุ์อำเภอปาย (n5) และมข.3 (n7) ที่ได้รับรังสีแกมมา 0, 30 และ 60 Gy สายพันธุ์อำเภอพร้าว (n6) ที่ได้รังสีแกมมา 0, 30, 60 และ 90 Gy. สายพันธุ์อำเภอปายและอำเภอพร้าวที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 0, 0.25 และ 0.50 % และสายพันธุ์มข. 3 ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 0 และ 0.25 %

6.2.2 สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้สำหรับหยุดการสร้างเส้นใย spindle (pre-treatment solution) สารละลายอิ่มตัว para dichlorobenzene (PDB)

2. สารเคมีสำหรับหยุดทำงานของเซลล์และรักษาสภาพเซลล์ (fixative solution) ประกอบด้วย absolute alcohol และ glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3 : 1 โดยปริมาตร

3. สารเคมีสำหรับทำให้เซลล์แยกออกจากกัน (hydrolytic solution) คือ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล (1N HCl)

4. สารเคมีที่ใช้ย้อมสีโครโมโซม คือ carbol fuchsin

6.2.3 อุปกรณ์

6.2.3.1 อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างพืช

2.1 จานแก้วเพาะเมล็ด (petri-dish)

2.2 กรรไกร

2.3 ปากคีบ

2.4 ขวดแก้วขนาดเล็กมีจุกปิดสำหรับใส่เนื้อเยื่อ

6.2.3.2 วัสดุอุปกรณ์สำหรับศึกษาทางเซลล์พันธุศาสตร์

3.1 เข็มเขี่ย

3.2 ปากคีบ

3.3 หลอดหยด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 สไลด์และแผ่นปิดสไลด์

3.5 กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์การถ่ายภาพ

3.6 ฟิล์มสี

3.7 ดินสอที่มีปลายยางลบ สำหรับใช้เคาะแผ่นสไลด์

3.8 กระดาษทิชชู

3.9 หลอดทดลอง

3.10 immersion oil

3.11 กระดาษซับสำหรับเช็ด immersion oil ออกจากเลนส์

3.12 น้ำยาทาเล็บชนิดใส สำหรับทาขอบแผ่นปิดสไลด์

3.13 แผ่นป้าย (label), ปากกา

3.14 water bath

3.15 เทอร์โมมิเตอร์

6.2.4 วิธีการทดลอง

นำเมล็ดพันธุ์งา มาเพาะเมล็ดใน petri-dish โดยใช้กระดาษซับ มาตัดเป็นวงกลม วางบนจานเพาะ พรมน้ำให้ชุ่ม วางเมล็ดลงบนจานเพาะ จากนั้นเอากระดาษซับที่ตัดไว้แล้วมาปิดทับข้างบนเมล็ด พรมน้ำอีกครั้ง ปิดฝา เมล็ดงาใช้เวลาประมาณ 36 ชั่วโมงในการงอก แล้วจึงเก็บปลายราก

1. การเตรียมตัวอย่างปลายรากงา

1.1 เก็บปลายรากพืชระหว่างเวลา 07:00-07:30, 07:30-08.00, 08:00-08:30, 08:30-09:00, 09:00-09:30 และ 09:30-10:00 น. ยาวประมาณ 0.5 ซม รากมีลักษณะอวบ ปลายรากไม่เสียหาย

1.2 นำปลายรากที่เลือกได้แต่ละเวลา ใส่ในขวดแก้วขนาดเล็กที่มีฝาปิด พร้อมทั้งปิดป้ายไว้ให้ชัดเจน

1.3 ใส่สารละลายอิ่มตัวของ para dichlorobenzene ในแต่ละการทดลองให้ท่วมรากเล็กน้อย แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15-18 องศาเซลเซียส นาน 1.00, 1.50 และ 2.00 ชม.

1.4 นำรากของแต่ละการทดลองออกมาล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปแช่ด้วยน้ำยาตรึงเซลล์ (fixative) ประมาณ 5 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.5 นำรากออกจากน้ำยาตรึงเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วแช่ใน 1 N HCl ใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นานประมาณ 5 นาที

1.6 นำรากออกจาก 1N HCl ล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด แล้วนำไปย้อมสี carbol fuchsion ที่อุณหภูมิ 15-18 องศาเซลเซียส นาน 1, 4 และ 24 ชม.

2. การเตรียมสไลด์เพื่อศึกษาโครโมโซม

2.1 นำรากที่ได้จากขั้นตอน 1.6 มาวางบนสไลด์โดยระวังอย่าให้รากแห้งทุกขั้นตอน

2.2 ใช้เข็มเขี่ยตัดเอาเฉพาะส่วนของปลายรากยาวประมาณ 1 มม. แล้วหยดสีย้อมหยดเล็ก ๆ ลงไปที่ปลายราก

2.3 ใช้เข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อปลายรากให้แยกออกจากกันเป็นชิ้นเล็ก ๆ

2.4 ค่อย ๆ วางแผ่นปิดสไลด์ปิดทับ ใช้ด้ามเข็มเขี่ยค่อย ๆ เคาะด้านบนของแผ่นปิดสไลด์หลาย ๆ ครั้ง เพื่อให้เซลล์กระจายตัวดี และเป็นการไล่ฟองอากาศออก

2.5 ทำการ squash โดยใช้กระดาษซับพับซ้อนหลาย ๆ ชั้น วางทับบนแผ่นปิดสไลด์ ใช้หัวแม่มือกดลงไปตรง ๆ โดยไม่ให้แผ่นปิดสไลด์เคลื่อน ทั้งนี้เพื่อให้เซลล์แบนเป็นระนาบเดียว ในกรณีที่มีสีล้นออกมานอกแผ่นปิดสไลด์ให้ซับออก

2.6 นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 4x, 10x, 40x และ 100x ตามลำดับ เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะmetaphase และโครโมโซมกระจายไม่ทับกันและผนังเซลล์ไม่แตก บันทึกจำนวนโครโมโซมและบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีอุปกรณ์สำหรับติดตั้งกล้องถ่ายรูป โดยบันทึกภาพที่กำลังขยาย 100 เท่า

2.7 ในกรณีที่ต้องการเก็บแผ่นสไลด์เอาไว้ศึกษามากกว่า 1 วัน ให้ผนึกขอบแผ่นปิดสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บชนิดใสทับประมาณ 1-3 รอบ

6.2.5 การบันทึกผลการทดลอง

นับจำนวนโครโมโซมจากปลายรากงาแล้วบันทึกภาพ

6.2.6 สถานที่ใช้ในการดำเนินการทดลองและรวบรวมข้อมูล

ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.3 ผลการทดลอง

6.3.1 เทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการนับจำนวนโครโมโซมจากปลายรากงา

การนับจำนวนโครโมโซมด้วยวิธี cell squash จากปลายรากเมล็ดงา (ตาราง 6.1) พบว่า

1. ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการตัดปลายราก คือ 08:30-09:30 นาฬิกา
2. ระยะเวลาในการแช่ปลายรากที่ได้ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ที่เหมาะสม คือ แช่นาน 1.50 ชั่วโมง
3. ระยะเวลาในการแช่ปลายรากในน้ำยาตรึงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส คือ 5 นาที
4. ระยะเวลาในการแช่ปลายรากในน้ำยาย่อยสลายเซลล์ คือ 5 นาที
5. ระยะเวลาในการแช่ปลายรากในสีย้อม carbol fuchsion คือ 24 ชั่วโมง

ตาราง 6.1 ลักษณะโครโมโซมที่มองเห็นได้ในแต่ละกลุ่มทดลอง

กลุ่มทดลอง	ลักษณะโครโมโซม
1. เวลาเก็บปลายราก	
- 07:00-07:30 น.	พบเซลล์ว่าง ๆ ไม่พบโครโมโซม
- 07:30-08:00 น.	พบเซลล์ว่าง ๆ ไม่พบโครโมโซม
- 08:00-08:30 น.	พบเซลล์ว่าง ๆ ไม่พบโครโมโซม
- 08:30-09:00 น.	พบโครโมโซมอยู่ในระยะ metaphase
- 09:00-09:30 น.	พบโครโมโซมอยู่ในระยะ metaphase
- 09:30-10:00 น.	พบโครโมโซมเลยระยะ metaphase ไม่สามารถนับจำนวนได้
2. เวลาที่แช่ใน PDB	
- 1.00 ชม.	โครโมโซมเป็นเส้นยาวไม่สามารถนับจำนวนได้
- 1.50 ชม.	โครโมโซมหดตัวสั้น เป็นแท่ง นับจำนวนได้
- 2.00 ชม.	โครโมโซมหดตัวสั้น มองไม่เห็นเป็นแท่ง
3. เวลาที่แช่ในสี carbol fuchsin	
- 1 ชม.	โครโมโซมไม่ติดสี
- 4 ชม.	โครโมโซมติดสีจาง ๆ เห็นไม่ชัดเจน
- 24 ชม.	โครโมโซมติดสีสม่ำเสมอทุกแท่ง เห็นได้ชัดเจน

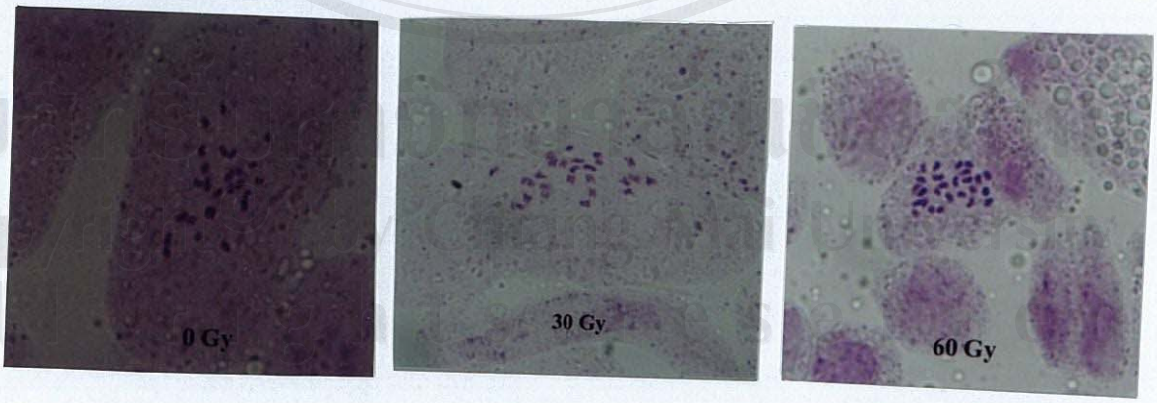
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.3.2 การศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม

การนับจำนวนโครโมโซมที่ปลายรากงา สายพันธุ์อำเภอปาย (n5m1) และ มข.3 (n7m1) ที่ได้รับรังสีแกมมา 0, 30 และ 60 Gy สายพันธุ์อำเภอพร้าว (n6m1) ที่ได้รังสีแกมมา 0, 30, 60 และ 90 Gy ในระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัวแบบไมโตซิสในระยะ metaphase พบว่า จำนวนโครโมโซมจากปลายรากงาเท่ากับ 2n = 26 (ตาราง 6.2) และไม่มีความแตกต่างของจำนวนโครโมโซมของแต่ละสายพันธุ์ (ภาพ 6.1)

ตาราง 6.2 จำนวนโครโมโซมของปลายรากงา 3 สายพันธุ์ที่ได้รับรังสีแกมมา

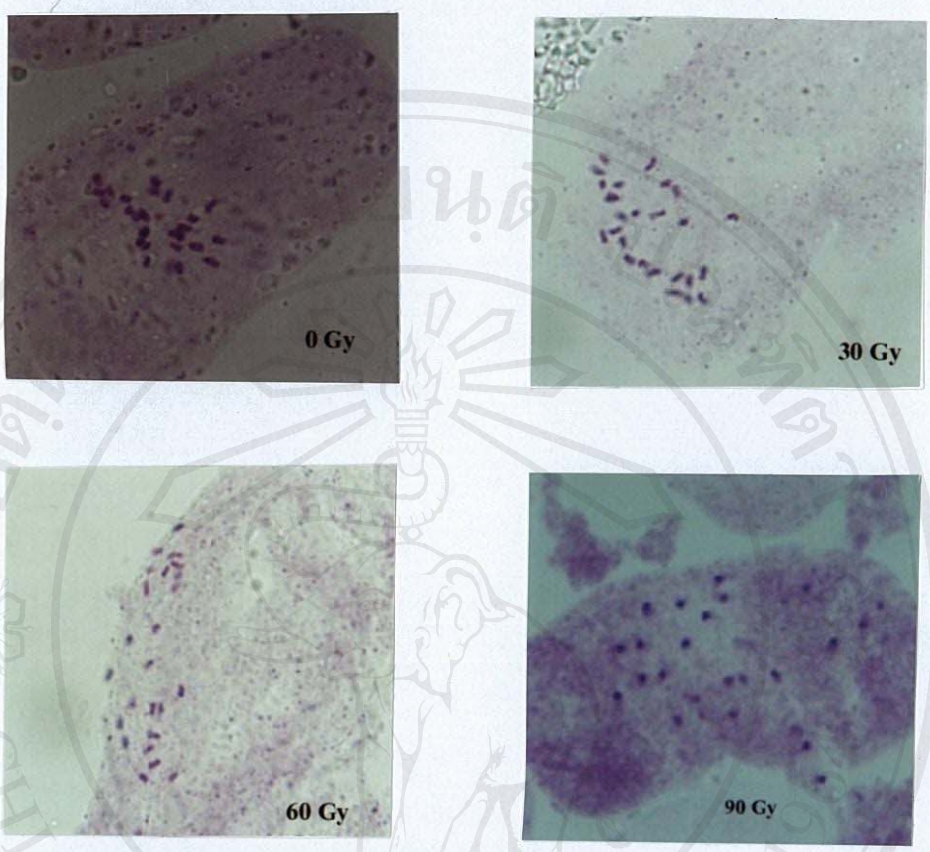
พันธุ์งาและปริมาณรังสี	จำนวนโครโมโซม (2n)
n5m1	26
- 30 Gy	26
- 60 Gy	26
n6m1	26
- 30 Gy	26
- 60 Gy	26
- 90 Gy	26
n7m1	26
- 30 Gy	26
- 60 Gy	26



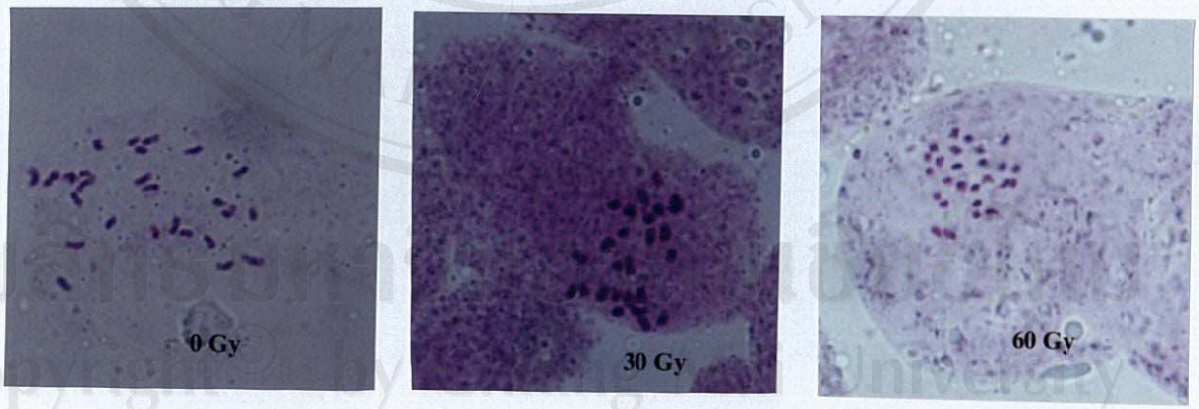
ก.

ภาพ 6.1 จำนวนโครโมโซมของงาจำนวน 3 สายพันธุ์ ที่ได้รับรังสีแกมมา

ก. = n5m1 (1178x), ข. = n6m1 (1178x) และ ค. = n7m1 (1414x)



ข.



ค.

ภาพ 6.1 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.3.3 การศึกษาผลของสารโคลชิซินต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม

จำนวนโครโมโซมจากปลายรากงา สายพันธุ์อำเภอปาย (n5c) และอำเภอพร้าว (n6c) ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 0, 0.25 และ 0.50 % และสายพันธุ์มข. 3 (n7c) ที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 0 และ 0.25 % ในระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัวแบบไมโตซิสในระยะ metaphase พบว่า จำนวนโครโมโซมจากปลายรากงาเท่ากับ 2n = 26 (ตาราง 6.3) ซึ่งไม่มีความแตกต่างของจำนวนโครโมโซมในแต่ละพันธุ์ และระดับความเข้มข้นที่ทดลอง (ภาพ 6.2)

ตาราง 6.3 จำนวนโครโมโซมของปลายรากงา 3 สายพันธุ์ที่ได้รับโคลชิซิน

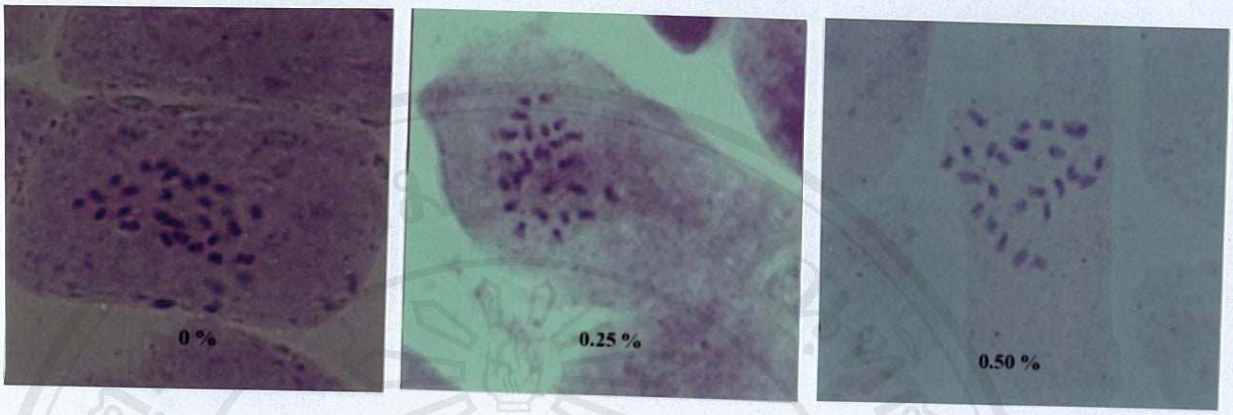
พันธุ์งาและความเข้มข้น	จำนวนโครโมโซม (2n)
n5c	26
- 0.25 %	26
- 0.50 %	26
n6c	26
- 0.25 %	26
- 0.50 %	26
n7c	26
- 0.25 %	26

ก.

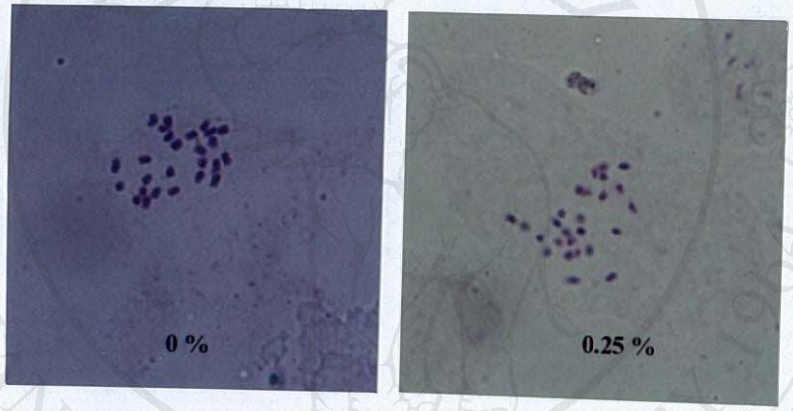
ภาพ 6.2 จำนวนโครโมโซมของงาจำนวน 3 สายพันธุ์ ที่ได้รับโคลชิซิน

ก. = n5c (1178x), ข. = n6c (1178x) และ ค. = n7c (1414x)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ข.



ค.

ภาพ 6.2 (ต่อ)

6.4 วิจารณ์ผลการทดลอง

การตรวจหาจำนวนโครโมโซมจากปลายรากงา ต้องทำในช่วงเวลา 08:30-09:30 น.ซึ่งช่วงเวลาการแบ่งตัวของปลายรากงาแตกต่างจากพืชชนิดอื่นที่ได้มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ กิตติกานต์ (2545) พบว่า ช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างปลายรากของฟุกเซีย คือ 12:00-12:30 น. อาจเป็นเพราะรอบการแบ่งเซลล์ระยะ metaphase ของปลายรากงาเกิดขึ้นในช่วงเวลาดังกล่าว การศึกษาหาจำนวนโครโมโซมจากปลายรากงา 3 สายพันธุ์ คือ n5 และ n7 ที่ปริมาณรังสี 0, 30 และ 60 Gy และ n6 ที่ปริมาณรังสี 0, 30, 60 และ 90 Gy พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม คือ มีจำนวนโครโมโซมเป็นปกติ คือ 2n = 26 ในการทดลองของ Badawai (1978)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พบว่าเมื่อนำเมล็ด pea สายพันธุ์ Little Marvel ที่ได้ผ่านการฉายรังสีแกมมาที่ระดับ 0-150 Gy พบว่าเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของโครโมโซมเพิ่มขึ้นตามระดับปริมาณรังสี แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนโครโมโซม Nerkar (1977) พบว่าเมื่อนำเมล็ดของ *Lathyrus sativa* สายพันธุ์ Rewa 1 ไปฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 50-300 Gy พบว่ารังสีแกมมาชักนำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบบ translocation ที่ให้ลักษณะของโครโมโซมแบบ ring type และยังทำให้เกิดความผิดปกติของการแบ่งเซลล์แบบ meiotic รวมทั้งทำให้โครโมโซมเหนียวขึ้น เกิด lagging และ bridges เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณรังสี และ Savaskan and Toker (1991) พบว่าเมื่อนำเมล็ด rye ฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 50, 100,150 และ 200 Gy จากนั้นนำเมล็ดไปเพาะแล้วศึกษาด้านเซลล์วิทยา พบว่า รังสีแกมมาไม่มีผลต่อการงอกและ mitotic frequency แต่ในการศึกษางาครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาความผิดปกติของแท่งโครโมโซมแต่ละแท่ง ถ้าได้มีการศึกษาอาจพบความผิดปกติของแท่งโครโมโซมเนื่องมาจากการฉายรังสีได้

ส่วนการตรวจจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของเมล็ดงาจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ n5 และ n6 ที่สารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0, 0.25, 0.50 และ 0.75 เปอร์เซ็นต์ และ n7 ที่สารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0, 0.25 และ 0.50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนโครโมโซม คือมีจำนวนโครโมโซมแบบปกติ คือ 2n = 26 ถึงแม้ว่าดอกของงาสายพันธ์ n7 มีขนาดเพิ่มขึ้นก็ตาม ในการทดลองของวิชชุดา (2537) ที่ศึกษาผลของโคลชิซินที่มีต่อการกลายพันธุ์ของหน้าวัวพันธุ์ Double Spathe ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.01, 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าโคลชิซินไม่มีผลต่อจำนวนโครโมโซมเช่นกัน

6.5 สรุปผลการทดลอง

ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่าง เป็นช่วงที่เซลล์อยู่ในระยะแบ่งเซลล์ คือ 08:30-09:30 น. ระยะเวลาในการแช่ชิ้นส่วนตัวอย่างในสารละลายอิ่มตัว para dichlorobenzene เพื่อทำให้โครโมโซมหดตัวได้ดี คือ นานประมาณ 1-2 ชม. และระยะเวลาในการย้อมสีโครโมโซมด้วยสีย้อม carbol fuchsin คือ ประมาณ 24 ชม.

ปริมาณรังสีแกมมาที่ระดับต่าง ๆ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมของงาทั้ง 3 สายพันธุ์ และเช่นกันกับสารละลายโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมของงาทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่างามีจำนวนโครโมโซม 2n = 26

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved