ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1

สูตร อาหารเอ็มเอส (Murashige and Skoog, 1962)

ธาตุอาหารหลัก	มิลลิกรัม/ลิตร
KNO_3	1,900
NH_4NO_3	1,650
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
$CaCl_2.2H_2O$	440
จุลธาตุ	
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4.4H_2O$	15.6
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
KI	0.83
$FeSO_4.7H_2O$	27.8
Disodium EDTA	37.3
สารอินทรีย์	
น้ำตาลซูโครส	30,000
ไทอะมีนไฮโดรคลอไรด์	0.5
ไพริดอกซินไฮโดรคลอไรด์	0.5
กรดนิโคตินิค	0.5
มายโอ - อิโนซิตอล	100
pH	5.8

ภาคผนวกที่ 2

การนับจำนวนของโครโมโซม

วิธีนับจำนวนโครโมโซมของคาร์เนชัน มีวิธีการดังนี้คือ

1. ตัดปลายยอดของคาร์เนชันที่เลี้ยงในหลอดทดลอง มายาวประมาณ 1 เซนติเมตร
2. นำไปแช่ในสารละลาย 8-ไฮดรอกซีควิโนลีน (8-hydroxyquinoline) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อยับยั้งการสร้างสปินเดิลไฟเบอร์ ของเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟส ทำให้โครโมโซมหดสั้น เห็นโครมาติดเป็น 2 เส้นติดกันชัดเจนยิ่งขึ้น
3. นำเนื้อเยื่อแช่ในกรดเกลือ 1 นอร์มอล เป็นเวลา 30-40 นาที เพื่อทำให้เซลล์อ่อนนุ่ม สามารถกระจายเซลล์ออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆได้ และดึงเบสพิวรีนออกจากดีเอ็นเอ
4. ย้ายเนื้อเยื่อลงแช่ในสารละลายชิฟท์ (Schiffs reagent) ประมาณ 30 – 40 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปาหลายครั้ง จนน้ำประปาใส ไม่มีสีชมพู
5. ตัดเนื้อเยื่อปลายยอดวางลงบนสไลด์ หยดสีอะซีโตคาร์มีนลงบนเนื้อเยื่อ 1 หยด ใช้สไลด์อีกแผ่นกดและกระจายเนื้อเยื่อ แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์
6. นำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ และถ่ายภาพ

การเตรียมสารละลาย

สารละลายที่ใช้ในการศึกษาโครโมโซม ได้แก่

1. **การเตรียมสีอะซีโตคาร์มีน**

สารที่ใช้	คาร์มีน	1	กรัม
	กรดอะซิติก 45 เปอร์เซ็นต์	100	มิลลิกรัม
	เฟอร์ริคอะซิเตท ที่ละลายน้ำอิ่มตัว	2	หยด

วิธีทำ

ละลายสีคาร์มีน 1 กรัม ลงในกรดอะซิติก 45 เปอร์เซ็นต์ ที่กำลังเดือด ต้มประมาณ 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมเฟอร์ริคอะซิเตทที่ละลายน้ำอิ่มตัวลงไป 2 หยด ถ้าไม่มีเฟอร์ริคอะซิเตท ให้ใช้ผงตะไบเหล็กแช่ในกรดอะซิติกเข้มข้นแทน ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง แล้วกรองเอากากทิ้งไป เติมกรดอะซิติก 45 เปอร์เซ็นต์ ให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น เมื่อต้องการใช้ ให้แบ่งใส่ขวด นำออกมาใช้ได้

2. **สารละลายชิฟท์** (Schiff's reagent)

สารที่ใช้	เบสิคฟุชิน (basic fuchsin)	0.5 กรัม
	กรดเกลือ 1 *N*	10.0 มิลลิลิตร
	โพแทสเซียมเมทาไบซัลไฟต์	0.5 กรัม
	ผงถ่าน	0.5 กรัม
	น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

วิธีทำ

ละลายเบสิคฟุชิน 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ที่กำลังเดือด ทำให้เย็น 58 เซลเซียส กรอง ทำให้เย็นถึง 26 เซลเซียส ผสม กรดเกลือ 1 *N* 10 มิลลิลิตร และโพแทสเซียมเมทาไบซัลไฟต์ 0.5 กรัม ปิดปากภาชนะด้วย พาราฟิน ห่อด้วยกระดาษสีดำ นำมาเก็บในตู้เย็น ถ้าสารละลายที่ได้ไม่มีสี สามารถนำมาใช้ได้ แต่ถ้ามีสี ให้ใส่ผงถ่าน 0.5 กรัม ลงไป เขย่า ทิ้งไว้ 1 คืน ที่ 4 เซลเซียส แล้วกรอง สารที่ได้จะใส

3. **สารละลาย 8-ไฮดรอกซีควิโนลีน**

วิธีเตรียม ใช้สาร 8-ไฮดรอกซีควิโนลีน จำนวน 1/2 ช้อนชา ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปั่นให้สารละลายโดยใช้แท่งแก้วคน สารที่ได้จะมีสีเหลือง