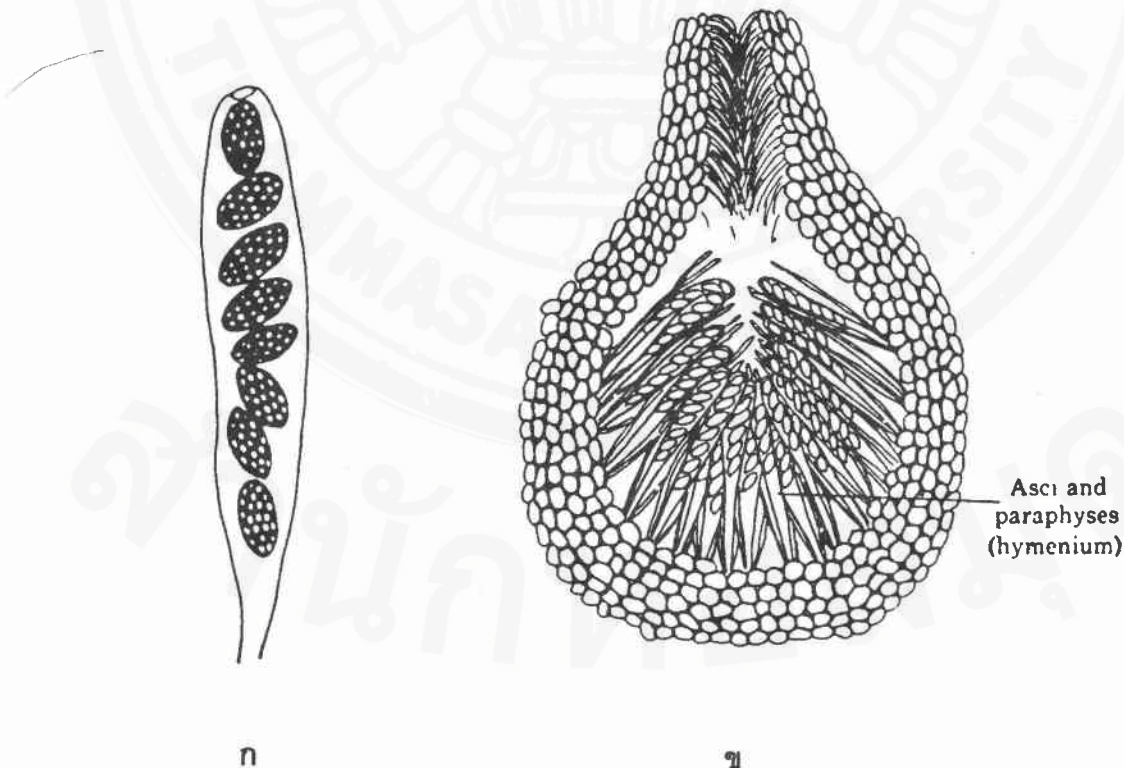


บทที่ 6

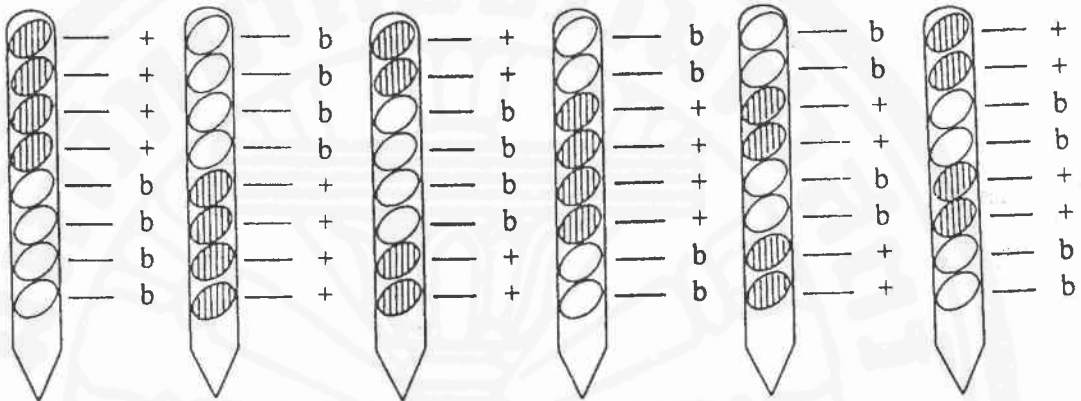
การตรวจสอบครอสซิงโอเวอร์ในซอร์ดาเรีย

ซอร์ดาเรีย (*Sordaria fimicola*) เป็นราชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในวงศ์ (Family) Sordariaceae [Order : Sordariales, Subclass : Pyrenomycetes (Ascomycetes with Perithecia), Class : Filamentous Ascomycetes, Phylum : Ascomycota, Kingdom : Fungi] ซึ่งนิยมนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์เพื่อศึกษาการแยกตัวของแอสโคสปอร์ (ascospore) ที่ต่าง ๆ อันเป็นผลมาจากการเกิดครอสซิงโอเวอร์ (crossing over) ในขณะที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) ในชีวิตส่วนใหญ่ของซอร์ดาเรียจะมีเซลล์เป็นแบบแฮพลอยด์ (haploid cell) และส่วนมากมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ แต่ก็อาจสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศได้ โดยสายใย (hyphae) ที่เจริญมาจากสายพันธุ์เดียวกันหรือต่างสายพันธุ์เมื่อเจริญมาอยู่ใกล้กันจะมาเชื่อมกัน และนิวเคลียสจากทั้ง 2 สายจะมารวมอยู่ภายในเซลล์เดียวกันเรียกว่า "heterokaryon" ต่อมานิวเคลียสทั้ง 2 จะรวมกันได้เป็นไซโกต (zygote) ซึ่งเป็นเซลล์ที่เป็นดิพลอยด์ (diploid) ชนิดเดี่ยวตลอดทั้งช่วงชีวิตของซอร์ดาเรีย ไซโกตจะแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสและตามด้วยการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) ได้แอสโคสปอร์ 8 อันอยู่ภายในถุงหุ้มที่เรียกว่าแอสคัส (ascus) และรวมกันอยู่ภายในเพอริทีเซียม (perithecium) (รูปที่ 6-1)



รูปที่ 6-1 ลักษณะของแอสคัส (ก) และลักษณะของเพอริทีเซียม (ข)

เนื่องจากแอสคัสของซอร์ดาเรียมีลักษณะเป็นถุงยาว แอสโคสปอร์ที่อยู่ภายในจึงเรียงกันอยู่อย่างเป็นระเบียบตามตำแหน่งของโครมาติด (chromatid) ดังนั้นถ้าแอสคัสที่ได้เกิดจากการผสมระหว่างซอร์ดาเรีย 2 สายพันธุ์ที่ให้สีแอสโคสปอร์แตกต่างกัน ก็จะพบว่ามีการเรียงตัวของแอสโคสปอร์ทั้ง 2 สีภายในแอสคัสเป็นรูปแบบต่าง ๆ (รูปที่ 6-2)



รูปที่ 6-2 รูปแบบการเรียงตัวของแอสโคสปอร์ในแอสคัส

ปกติแอสโคสปอร์จะมีสีดำและกำหนดให้แทนยีนที่ควบคุมเป็น + (wild type) ส่วนยีนที่ควบคุมสีแอสโคสปอร์สีน้ำตาลเป็น b ซึ่งเกิดจากการกลาย (mutation) เมื่อนำซอร์ดาเรีย 2 สายพันธุ์มาเลี้ยงรวมกันจะมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ได้เกิดแอสโคสปอร์ซึ่งมีการจัดเรียงตัวเป็นสีดำและสีน้ำตาลรูปแบบต่าง ๆ อยู่ภายในแอสคัส (รูปที่ 6-2) การจัดเรียงตัวของแอสโคสปอร์แบบ $4+ : 4b$ หรือ $4b : 4+$ จะเกิดจากการแยกตัวของโครโมโซมอย่างปกติในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสโดยไม่เกิดการครอสซิงโอเวอร์ ส่วนการจัดเรียงตัวของแอสโคสปอร์แบบ $2+ : 4b : 2+$, $2b : 4+ : 2b$, $2b : 2+ : 2b : 2+$ และ $2+ : 2b : 2+ : 2b$ ซึ่งเกิดจากการครอสซิงโอเวอร์ระหว่างโครมาติดคู่ต่างกัน (non-sister chromatid) ในขั้นตอนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส

การเกิดครอสซิงโอเวอร์นั้น เกิดขึ้นระหว่างโครมาติด 2 แท่งในระหว่างที่มีโครมาติด 4 แท่ง แอสโคสปอร์ที่เกิดจากโครมาติดที่เกิดครอสซิงโอเวอร์จะเรียกว่า "รีคอมบิแนนต์แอสโคสปอร์" (recombinant ascospore) ส่วนแอสโคสปอร์ที่เกิดจากโครมาติดที่ไม่เกิดครอสซิงโอเวอร์จะเรียกว่า "พาเร็นทอลแอสโคสปอร์" (parental ascospore) ดังนั้นแอสคัสที่เกิดครอสซิงโอเวอร์จะให้แอสโคสปอร์ที่เป็นรีคอมบิแนนต์และพาเร็นทอลอย่างละครึ่ง ส่วนแอสคัสที่ไม่เกิดครอสซิงโอเวอร์จะให้แอสโคสปอร์แบบพาเร็นทอลทั้งหมด

การคำนวณระยะทางระหว่างยีนที่ควบคุมสีของแอสโครสปอร์และเซ็นโทรเมียร์ (centromere) นั้น คำนวณได้จากเปอร์เซ็นต์รีคอมบิแนนต์ที่เกิดขึ้น ยิ่งเกิดรีคอมบิแนนต์มากแสดงว่ายีนนั้นอยู่ห่างจากเซ็นโทรเมียร์มาก ในกรณีของซอร์ดดาเรียรีคอมบิแนนต์แอสโครสปอร์จะพบในแอสคัสที่เกิดครอสซิงโอเวอร์เท่านั้นและพบเพียงครั้งเดียวของจำนวนแอสโครสปอร์ทั้งหมด ดังนั้นจึงหาเปอร์เซ็นต์รีคอมบิแนนต์ได้จากสูตร ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์รีคอมบิแนนต์} = \frac{1/2 \text{ จำนวนแอสคัสที่เกิดครอสซิงโอเวอร์}}{\text{จำนวนแอสคัสทั้งหมด}} \times 100$$

เปอร์เซ็นต์รีคอมบิแนนต์ที่ได้ คือ ระยะทางระหว่างยีนถึงเซ็นโทรเมียร์ มีหน่วยเป็นหน่วยแผนที่ (map unit)

อาหารที่ใช้เลี้ยงซอร์ดดาเรีย

ในการเลี้ยงซอร์ดดาเรียเพื่อเก็บรักษาสายพันธุ์ (culture media) และการผสมพันธุ์ (crossing media) นิยมใช้อาหารต่างชนิดกัน อาหารที่ใช้เลี้ยงเพื่อเก็บรักษาสายพันธุ์ซอร์ดดาเรียประกอบด้วยส่วนประกอบ ดังนี้

corn meal agar	17.0 กรัม
กลูโคส (glucose)	2.0 กรัม
ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ (yeast extracts)	1.0 กรัม
น้ำกลั่น	1.0 ลิตร

เตรียมโดยใส่ corn meal agar, กลูโคส และยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ลงในน้ำ ช้อนให้ร้อน แล้วคนจนละลายหมด เสร็จแล้วเทใส่หลอดทดสอบ (test tube) ประมาณ $\frac{1}{3}$ ของหลอด นิ่งมาเชื้อที่ความดัน 110 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นวางให้เย็นโดยวางหลอดทำมุมเอียงกับพื้นเพื่อให้เกิดผิวเอียง (slant) บนผิวหน้าอาหาร เมื่ออาหารแข็งตัวจึงสามารถนำไปใช้เลี้ยงซอร์ดดาเรียได้หรือเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C

ส่วนอาหารที่ใช้เลี้ยงเพื่อกระตุ้นให้เกิดการผสมประกอบด้วยส่วนประกอบ ดังนี้

corn meal agar	17.0 กรัม
ซูโครส (sucrose)	10.0 กรัม

กลูโคส	7.0 กรัม
KH_2PO_4	0.1 กรัม
ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์	1.0 กรัม
น้ำกลั่น	1.0 ลิตร

เตรียมโดยใส่ corn meal agar, ซูโครส, กลูโคส, KH_2PO_4 และยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ลงในน้ำอุ่นให้ร้อน แล้วคนจนละลายหมด หนึ่งชั่วโมงที่ความดัน 110 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นลงจนอุณหภูมิประมาณ 50°C แล้วจึงเทอาหารลงในจานเลี้ยงเชื้อ (petri-dish) ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจานละประมาณ 20 มิลลิลิตร เมื่ออาหารแข็งตัวจึงสามารถนำไปใช้เลี้ยงซอร์ดาเรียได้หรือเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C

การทดลอง

การตรวจสอบครอสซิงโอเวอร์ในซอร์ดาเรีย

วัตถุประสงค์

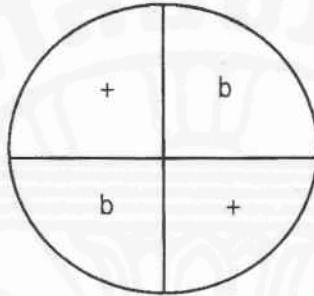
1. เพื่อให้ให้นักศึกษาเข้าใจการเกิดครอสซิงโอเวอร์ในซอร์ดาเรีย
2. เพื่อให้ให้นักศึกษาเข้าใจวิธีการและสามารถหาระยะทางระหว่างยีนกับเซ็นโทรเมอร์ได้

อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์
2. สไลด์ (slide) และกระจกปิดสไลด์ (cover glass หรือ cover slip)
3. เข็มเขี่ยเชื้อ (inoculating needle)
4. ลูปเขี่ยเชื้อ (inoculating loop)
5. ตะเกียงเบนสัน
6. ปากกาเขียนแก้ว
7. ขวดบรรจุแอลกอฮอล์ 95%
8. จานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารปลอดเชื้อ
9. ซอร์ดาเรีย 2 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ที่ให้แอสโคสปอร์สีดำ (+) และสีน้ำตาล (b) ซึ่งเจริญอยู่บนอาหารที่ใช้เลี้ยง

วิธีการ

1. นำจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารปลอดเชื้อมา ใช้ปากกาเขียนแก้วขีดเส้นแบ่งอาหารออกเป็น 4 ส่วนเท่า ๆ กันที่บริเวณก้นจานเลี้ยงเชื้อด้านนอก และเขียนเครื่องหมาย “+” และ “b” สลับกันไว้ ดังรูปที่ 6-3



รูปที่ 6-3 วิธีการเขียนเครื่องหมาย + และ b ที่บริเวณก้นจานเลี้ยงเชื้อด้านนอก

2. นำลูปไปจุ่มลงในขวดแอลกอฮอล์ 95% แล้วนำไปปลดเปลื้องไฟจากตะเกียงเบนซีนจนหลอดร้อนแดง (รูปที่ 6-4) รอให้เย็นสักครู่จึงใช้ลูปนี้ตัดวัฒนธรรมที่มีชอร์ดาเรียที่ให้แอสโคสปอร์สีดำ (+) ซึ่งเจริญอยู่บนอาหารที่ใช้เลี้ยงมา 1 ลูป ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อให้อยู่บริเวณตรงกลางช่องที่เขียนเครื่องหมาย “+” แล้วนำลูปไปเผาไฟเพื่อฆ่าเชื้อ



รูปที่ 6-4 วิธีการเผาลูปจนหลอดร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อ

3. ตัดรุ่นที่มีชอร์ดาเรียที่ให้แอสโคสปอร์สีน้ำตาล (b) ซึ่งเจริญอยู่บนอาหารที่ใช้เลี้ยงมา 1 รูป ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อให้อยู่บริเวณตรงกลางช่องที่เขียนเครื่องหมาย "b"
4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7-12 วัน และคอยตรวจดูการเจริญเติบโตของชอร์ดาเรีย ทั้ง 2 สายพันธุ์ บริเวณที่ชอร์ดาเรียเจริญเติบโตมาพบกันนั้นจะมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ซึ่งจะมองเห็นเพอริทีเทียมเป็นจุดดำ ๆ อยู่ตรงบริเวณรอยต่อของชอร์ดาเรียทั้ง 2 สายพันธุ์
5. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อลงบนเปลวไฟจากตะเกียงเบนเส้นจนลวดร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็นสักครู่ แล้วเขี่ยเอาเพอริทีเทียมตรงบริเวณที่ชอร์ดาเรียทั้ง 2 สายพันธุ์เจริญมาพบกัน มาสเมียร์ (smear) บนสไลด์ที่สะอาดซึ่งหยดน้ำกลั่นไว้ 1 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์
6. ใช้ด้ามเข็มเขี่ยกดบนกระจกปิดสไลด์ เพื่อให้เพอริทีเทียมแตกออก นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นแอสคัสที่มีรูปร่างเป็นถุงยาว ๆ หลุดออกมา ซึ่งหากใช้แรงกดไม่มากนักจะเห็นแอสคัสเป็นลักษณะ rosette form (รูปที่ 6-5)
7. นับจำนวนแอสคัสที่เกิดครอสซิงโอเวอร์และไม่เกิดครอสซิงโอเวอร์จำนวนอย่างน้อย 100 แอสคัส แล้วบันทึกผล



รูปที่ 6-5 ลักษณะ rosette form ของแอสคัสเมื่อเพอริทีเทียมแตกออก

ผลการทดลอง

ชนิดของแอสคัส	จำนวนที่พบ
ก. รีคอมบิแนนต์แอสคัส	
ข. พาเร็นทอลแอสคัส	
รวม	

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้นระยะทางระหว่างยีนกับเซ็นโทรเมียร์} &= \frac{1/2 \times (ก)}{(ก) + (ข)} \times 100 \\ &= \text{_____ หน่วยแผนที่} \end{aligned}$$

วิจารณ์ผลการทดลอง

.....

.....

.....

สรุป

.....

.....

.....

คำถาม

1. ระหว่างอัลลีล + และ b ลักษณะใดเป็นลักษณะข่ม ? เพราะเหตุใด ?
2. เพอริทีเซียมที่ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์นั้น มีแบบที่แอสโคสปอร์มีสีเดียวกันทั้ง 8 อันหรือไม่ ? เพอริทีเซียมดังกล่าวเกิดขึ้นได้อย่างไร ?
3. ถ้าในแอสคัส 100 อันที่ตรวจดูมีพาเร็นทอลแอสคัส 40 อัน อยากทราบว่ายีนที่ควบคุมสีของแอสโคสปอร์อยู่ห่างจากเซ็นโทรเมียร์กี่หน่วยแผนที่ ?