บทที่ 2

วิธีการวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บรวบรวมพรรณพืชวงศ์ขิง

1. อุปกรณ์เก็บรวบรวมพืชตัวอย่าง ได้แก่ กรรไกรตัดกิ่ง มีด เสียม ถุงพลาสติก ยางรัด
2. อุปกรณ์ถ่ายภาพ ได้แก่ กล้องถ่ายรูป และฟิล์ม
3. อุปกรณ์สำหรับอัด อบ และเก็บรักษาพืชตัวอย่าง ได้แก่ ตู้อบพืช แผงอัด เชือกมัดแผง กระดาษหนังสือพิมพ์ กระดาษลูกฟูก กระดาษบันทึก กระดาษติดพืชและปกหุ้ม เข็ม ด้าย กาว เนฟธาลีน (napthalene) ขวดดอง และน้ำยาดองพืช (เอธานอล 70%)
4. อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์สามมิติ (stereo microscope) จานรอง เข็มเขี่ย ใบมีดโกน ปากคีบ และเอกสาร รูปวิธานที่เกี่ยวข้อง

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาจำนวนโครโมโซม

1. พืชวงศ์ขิงที่เก็บรวบรวมได้
2. อุปกรณ์สำหรับปลูกพืช ได้แก่ กระถาง ดินผสม ซ้อนปลูก บัวรดน้ำ แผ่นป้ายพลาสติกสำหรับบันทึกชื่อพืช วันเดือนปี สถานที่เก็บ
3. อุปกรณ์สำหรับตัดรากพืช ได้แก่ ปากคีบ กรรไกรตัดราก จาน ขวดมีฝา และถังพลาสติกขนาดเล็ก
4. อุปกรณ์ สำหรับศึกษาโครโมโซมพืช ได้แก่
   - 4.1 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (compound microscope) (Olympus CH30)
   - 4.2 แผ่นสไลด์ กระจกปิดสไลด์ ใบมีดโกน กระดาษทิชชู
   - 4.3 เข็มเขี่ย ดินสอ ปากคีบ
   - 4.4 หลอดหยด กระบอกตวง บีกเกอร์ และ เทอร์มอมิเตอร์
   - 4.5 กล้องจุลทรรศน์ พร้อมกล้องถ่ายภาพ (Nikon FX, UFX-DX 2 และ Olympus PX51, PM-C35DX)
   - 4.6 ฟิล์มถ่ายรูปขาวดำ

5. สารเคมี สำหรับศึกษาโครโมโซมพืช ได้แก่

5.1 พาราไดคลอโรเบนซีน (PDB)

5.2 เอธานอล 3 : เกลเชียล อะซิติก แอสิด 1

5.3 เอธานอล 70, 95 และ 100%

5.4 1N ไฮโดรคลอริก แอสิด

5.5 สี คาร์บอล ฟุชซิน (Carbol fuchsin)

5.6 ไซลีน (xylene)

5.7 คานาดา บาลซัม (canada balsum)

5.8 ออยล์ อิมเมอร์ชัน (oil immersion)

2. วิธีการ

การเก็บรวบรวมพรรณพืชวงศ์ขิง

1. รวบรวมตัวอย่างพืชเพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซม โดยออกเก็บตัวอย่างพืชวงศ์ขิงที่ขึ้นอยู่ในป่าของประเทศไทย เดือนละ 1-2 ครั้ง ป่าที่เก็บตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นป่าดงดิบที่ยังอุดมสมบูรณ์ (Primary evergreen forest)ในพื้นที่ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัด ชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี พังงา กระบี่ นครศรีธรรมราช พัทลุง ตรัง สงขลา ยะลา และนราธิวาส และรวบรวมพืชวงศ์ขิงบางชนิด จากภาคอื่นๆ ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จันทบุรี ขอนแก่น สกลนคร และอุบลราชธานี แล้วนำมาปลูกไว้ในเรือนเพาะชำของภาควิชาชีววิทยา พืชตัวอย่างที่เก็บได้ควรประกอบด้วย ราก ลำต้นใต้ดิน (เหง้า) ใบ ดอก หรือ ผล แล้วบันทึกภาพถ่าย บันทึกรายละเอียดที่เกี่ยวข้องกับพืชตัวอย่างนั้น ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืช สีของต้น ใบ ดอก ผล โดยเฉพาะดอกของพืชที่เก็บได้ นำไปดองโดยใช้ เอธานอล 70% เพื่อรักษาสภาพไว้ เนื่องจากบอบบางและเหี่ยวง่าย ส่วนอื่นๆ ของพืชนำไปอัด และอบทำตัวอย่างแห้ง และเก็บสะสมไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ต่อไป

2. ตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชตัวอย่างจากเอกสาร หนังสือรูปวิธานแยกชนิด หรือหนังสือต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง

3. บรรยายลักษณะทั่วไปของพืชแต่ละชนิด นิเวศวิทยา แหล่งที่เก็บ และระยะเวลาออกดอกผล

การศึกษาจำนวนโครโมโซม

1. ปลูกพืชตัวอย่างที่รวบรวมได้ในดินร่วนผสมทราย ลงกระถางเลี้ยงไว้ในเรือนเพาะชำของภาควิชาชีววิทยามหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อนำรากมาศึกษาจำนวนโครโมโซม

2. ศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืชวงศ์ขิงบางชนิด จากเซลล์ปลายรากในระยะเมทาเฟส ด้วยวิธี Feulgen squash ซึ่งมีวิธีการดังนี้

2.1 การเตรียมราก (pretreatment)

นำพืชที่จะศึกษาจำนวนโครโมโซมมาเลือกราก ที่กำลังแบ่งเซลล์ โดยสังเกตจากรากที่มีลักษณะขาวใส ปลายขุ่นเล็กน้อย ตัดปลายรากยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร นำไปแช่ในสารละลายอิ่มตัว พาราไดคลอโรเบนซีน (PDB) ที่อุณหภูมิ ตู้เย็น ประมาณ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยระยะที่เหมาะสมในการตัดรากคือ เวลา 9.00-10.00 น. และพืชที่จะนำมาตัดราก ควรมีความสมบูรณ์และแข็งแรงจะทำให้ได้รากที่เหมาะสม

2.2 การฟิกส์ราก (fixative)

นำรากที่แช่สารละลายอิ่มตัว PDB ครบ 4 ชั่วโมงแล้วมาเทสารละลาย PDB ทิ้งแล้วใส่น้ำยาฟิกส์ราก ซึ่งมีส่วนผสมของ เอธานอล 3 : เกลเซียล อะซิติก แอสิด 1 เก็บไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3 การเก็บราก (storage)

นำรากที่เก็บไว้ในข้อ 2.2 มาล้างด้วย เอธานอล 95% 2 ครั้ง แล้วนำไปเก็บในเอธานอล 70% ที่อุณหภูมิตู้เย็น และเมื่อต้องการจะศึกษาจำนวนโครโมโซม จึงนำรากมาทดลองต่อไป

2.4 ไฮโดรไลซิส (hydrolysis)

นำรากจากข้อ 2.3 มาล้างน้ำ 1-2 ครั้ง แล้วนำไป ไฮโดรไลซิส ด้วย กรดไฮโดร-คลอริก เข้มข้น 1 N เป็นเวลา 4-10 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

2.5 การย้อมสี

เมื่อไฮโดรไลซิสแล้ว นำรากมาล้างน้ำ 2 ครั้งซับด้วยกระดาษทิชชูนำไปย้อมด้วยสี คาร์บอล ฟุชซิน นานประมาณ 4 ชั่วโมง เมื่อปลายรากติดสีม่วงแดงดีแล้ว จึงตัดเอาเฉพาะปลายรากที่ติดสีม่วงแดง ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญมาวางบนสไลด์ หยดสี คาร์บอล ฟุชซิน 1-2 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ พยายามไม่ให้มีฟองอากาศอยู่ แล้วซับสีส่วนเกินออกด้วยกระดาษทิชชู ใช้ดินสอเคาะปลายรากเพื่อให้เซลล์กระจายดี แล้วใช้นิ้วหัวแม่มือกดทับบนกระจกปิดสไลด์ เพื่อให้เซลล์อยู่ในระนาบเดียวกัน นำไปตรวจดูจำนวนโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์ ใช้เลนส์ใกล้วัตถุ (objective lens) กำลังขยาย 10 เท่า และ 40 เท่า ตามลำดับ เพื่อหาเซลล์ระยะเมทาเฟส ที่มี

โครโมโซมกระจายไม่ซ้อนกัน นับจำนวนโครโมโซมโดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า แล้วนำเซลล์ที่พบว่าโครโมโซมกระจายดี และนับจำนวนได้ไปถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ 100 เท่า เพื่อบันทึกภาพโครโมโซมของพืช กรณีที่ภาพถ่ายของโครโมโซมขาดความคมชัดเนื่องจากเซลล์ไม่อยู่ในระนาบเดียวกัน วาดภาพประกอบเพื่อเป็นหลักฐานยืนยันจำนวนโครโมโซม สไลด์ที่ถ่ายภาพโครโมโซมแล้ว ยาขอบด้วยยาทาเล็บสามารถเก็บไว้ในตู้เย็นช่องแช่แข็งนานประมาณ 1 เดือน และนำมาทำเป็นสไลด์ถาวร โดยนำสไลด์มาแซะกระจกปิดสไลด์ขึ้นแล้วผ่านสไลด์ และกระจกปิดสไลด์ในเอธานอล 100% 2 ครั้ง และไซลีน 1 ครั้ง เมื่อนำสไลด์ออกจากไซลีนแล้ว หยดคานาดา บาลซัม 1 หยด ลงบริเวณที่มีเซลล์ราก แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์อันเดิม ทิ้งไว้ให้แห้งก็จะได้สไลด์ถาวร