บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับพรรณพืชที่ศึกษา

1.1 พืชวงศ์ผักปลาบที่เก็บรวบรวมได้ จำนวน 33 ชนิด

1.2 การเก็บและถ่ายรูปตัวอย่างพืช ได้แก่ กรรไกรตัดกิ่ง มีด พลั่ว ถุงพลาสติกขวดมีฝา ฉลากเบอร์ สมุดบันทึก ดินสอ กล้องถ่ายรูป ฟิล์มสี เป็นต้น

1.3 การปลูกพืช ได้แก่ กระถาง ดิน ปุ๋ย เป็นต้น

1.4 การทำตัวอย่างพืชแห้งและดอง ได้แก่ ตู้อบ แผงและอุปกรณ์อัดพรรณไม้ เอธิล แอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) เข้มข้น 70% เป็นต้น

1.5การตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope) เอกสารรูปวิธานการแยกชนิด อุปกรณ์ผ่าตัด เป็นต้น

2. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับการศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืช

2.1 การศึกษาโครโมโซม ได้แก่ กรรไกร ขวดน้ำกลั่น ขวดแก้วขนาดเล็ก อ่างทำน้ำอุ่น จานหลุม เข็มเขี่ย ปากคีบ ดินสอปลายเรียบ สไลด์ แผ่นแก้วปิด กระดาษทิชชู สเทจไมโครมิเตอร์ (stage micrometer) เป็นต้น

2.2 การบันทึกข้อมูลและถ่ายรูป ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง คือ Nikon Optiphot-2 และ Olympus BX 51 ชุดอุปกรณ์ควบคุมการถ่ายรูป คือ Nikon รุ่น UFX-DX 2 และ Olympus รุ่น PM-20 ฟิล์มขาวดำ เป็นต้น

2.3สารเคมีสำหรับศึกษาโครโมโซม ได้แก่ แอลฟา-โบรโมแนฟทาลีน (alpha-bromonaphthalene) กรดอะซีติค (glacial acetic acid) เอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 100 %, 95 % และ 75 % กรดไฮโดรคลอริค 1 นอร์มัล (1 N HCl) คาร์บอล ฟุชซิน (carbol fuchsin) ออยล์อิมเมอร์ชั่น (immersion oil) น้ำยาทาเล็บ น้ำยาล้างเล็บ ไซลีน (xylene) เพอร์เมาท์ (permount) เป็นต้น

วิธีการศึกษา

1. การเก็บและรวบรวมตัวอย่างพืช

1.1กำหนดพื้นที่เก็บตัวอย่างพืชวงศ์ผักปลาบ โดยศึกษาข้อมูลจากพิพิธภัณฑ์พืช มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1.2 เก็บตัวอย่างพืชจากภาคใต้ ประมาณเดือนละ 1-2 ครั้ง และรวบรวมพืชที่ได้รับตัวอย่างจากบางจังหวัดในภาคอื่นของประเทศไทย คือ กาญจนบุรี จันทบุรี ลพบุรี เชียงราย และชัยภูมิ ดังแสดงผลในตารางภาคผนวกที่ 1

1.3 บันทึกรูปและรายละเอียดของพืชตัวอย่างสด

1.4 อัดและอบต้นพืชเป็นตัวอย่างแห้ง และดองชิ้นส่วนของพืช เช่น ดอก และ ผล ในเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 % ชนิดละ 3 ซ้ำ เพื่อเก็บรักษาตัวอย่างพืชทั้งหมดไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับอ้างอิง และศึกษาค้นคว้า วิจัยต่อไป

1.5 ตรวจสอบหาชื่อวิทยาศาสตร์ของพืช จากตัวอย่างสด แห้ง หรือดอง โดยใช้เอกสารรูปวิธานการแยกชนิดที่เกี่ยวกับพืชวงศ์ผักปลาบ รวมทั้งเปรียบเทียบตัวอย่างจากพิพิธภัณฑ์พืช มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อความถูกต้องและเขียนคำบรรยายลักษณะพืช

2. การศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืช

2.1 การเก็บราก

นำพืชแต่ละชนิดที่เก็บรวบรวมได้ในแต่ละบริเวณของภาคใต้มาปลูกลงในกระถางชนิดละอย่างน้อย 2 กระถางที่มีดินร่วนผสมทรายในเรือนเพาะชำ ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ หลังจากดูแลรักษาพืชที่ปลูกได้ระยะหนึ่ง จนเจริญเติบโตงอกงามดี เลือกรากที่กำลังแบ่งเซลล์ มีลักษณะขาวใส ปลายขุ่นเล็กน้อย ตัดให้รากยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร ระยะเวลาที่ตัดเก็บรากของแต่ละกระถางห่างกันประมาณ 2-3 สัปดาห์

2.2 การศึกษาจำนวนโครโมโซมและถ่ายรูป

นำรากมาศึกษาจำนวนโครโมโซมในระยะเมทาเฟส (metaphase) ด้วยวิธีเฟอล์เกน สควอช (Feulgen squash) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ (Sharma and Sharma, 1980)

2.2.1 พรีทรีทเมนท์ (pretreatment) โดยนำรากมาแช่ในสารละลายอิ่มตัวแอลฟา-โบรโมแนฟทาลีน ในตู้เย็น เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

2.2.2 การคงสภาพเซลล์ (fixation) ล้างรากด้วยน้ำกลั่น แล้วแช่ในน้ำยา ซึ่งมีส่วนผสมของเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 95 % และกรดอะซีติด อัตราส่วน 3 :1 ในตู้เย็น เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

2.2.3 การเก็บรักษา (storage) นำรากมาล้างด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ เข้มข้น 95 % จำนวน1-2 ครั้ง แล้วเก็บไว้ในเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 % ในตู้เย็น

2.2.4 การไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ล้างรากด้วยน้ำกลั่น แล้วใส่ในกรดไฮโดรคลอริค 1 นอร์มัล ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-6 นาที

2.2.5 การย้อมสี (staining) นำรากมาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วย้อมสีรากด้วยคาร์บอลฟุชชิน เป็นเวลา 8-9 ชั่วโมง

นำเฉพาะส่วนปลายรากที่ติดสีม่วงแดงเข้มมาวางบนสไลด์ แล้วขยี้ด้วยปลายเข็มเขี่ย หยดสีคาร์บอล ฟุชชิน 1-2 หยด ปิดด้วยแผ่นแก้วปิด ใช้แท่งโลหะหรือแท่งดินสอปลายตันเคาะ เพื่อให้เซลล์และโครโมโซมกระจายแยกออกจากกัน นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวในระยะเมทาเฟสที่มีโครโมโซมกระจายดี นับจำนวนโครโมโซมอย่างน้อย 10 เซลล์ ของพืชชนิดเดียวกันจำนวนหลายกระถางและเก็บจากสถานที่ต่าง ๆ หลังจากนั้นทาน้ำยาทาเล็บที่ขอบของแผ่นแก้วปิด ถ่ายรูปเซลล์ที่มีโครโมโซมกระจายดีที่สุด ที่กำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ 100 เท่า

ในการทำสไลด์ถาวร ให้ล้างน้ำยาทาเล็บออกด้วยน้ำยาล้างเล็บ หลังจากนั้นใช้เข็มเขี่ยแซะจนแผ่นแก้วปิดหลุดออกจากสไลด์ นำแผ่นแก้วปิดและสไลด์มาจุ่มลงในกรดอะซีติคเข้มข้น 45 % แล้วรีบนำขึ้นมาผ่านเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 100 % จำนวน 2 ครั้ง (เพื่อดึงน้ำออกจากเซลล์) สุดท้ายจุ่มลงในไซลีน หลังจากนั้นวางแผ่นแก้วปิดและสไลด์บนกระดาษซับ หยดเพอร์เมาท์ 1 หยดบนสไลด์ ปิดด้วยแผ่นแก้วปิดตรงบริเวณรอยเดิมที่แซะออกมา ตั้งสไลด์ทิ้งไว้ในที่แห้งที่อุณหภูมิห้อง นานประมาณ 7 วัน (กันยารัตน์, 2532)