บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองทางอนุกรมวิธาน

   1.1 เครื่องใช้

      1.1.1) ขวดหรือโหลดองตัวอย่างพันธุ์ไม้

      1.1.2) แผงเก็บตัวอย่างพันธุ์ไม้

      1.1.3) ถุงพลาสติค

      1.1.4) กล้องสองตา (binocular)

      1.1.5) เข็มเขี่ย

      1.1.6) ไม้บรรทัดและเวอร์เนีย

      1.1.7) อ่างและบ่อสำหรับปลูกพันธุ์ไม้

   1.2 สารเคมี

      1.2.1) formalin 10 %

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองทางเซลวิทยา

   2.1 เครื่องใช้

      2.1.1) กล้องจุลทรรศน์

      2.1.2) สไลด์และแผ่นแก้วปิด (slide และ cover glass)

      2.1.3) เข็มเขี่ย

      2.1.4) ขวดสำหรับใช้เก็บรากและดอก ขนาด $1" \times 2\frac{1}{2}"$ และ $\frac{1}{2}" \times 1\frac{1}{2}"$

      2.1.5) กรรไกรสำหรับตัดรากและมีดโกน

      2.1.6) กระดาษซับ

      2.1.7) ยาทาเล็บ

2.1.8) ไมโครมิเตอร์ (micrometer)

2.1.9) กล้องจุลทรรศน์ Olympus P.M.7 สำหรับถ่ายรูปโครโมโซม

2.2 สารเคมี

2.2.1) alpha-bromonapthalene

2.2.2) ethyl alcohol 70 %

2.2.3) acetic acid 45 % และ 90 %

2.2.4) normal hydrochloric acid

2.2.5) Schiffs' reagent

2.2.6) Carnoys fluid

2.2.7) aceto-carmine 2%

2.2.8) euparol

2.2.9) n-butyl alcohol

วิธีดำเนินการวิจัย

ก. อนุกรมวิธาน

1. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา มีขั้นตอนดังนี้

1.1 ศึกษาลักษณะทั่วไปของพันธุ์ไม้ Family Alismaceae, Family Butomaceae และFamily Hydrocharitaceae จากเอกสารต่างๆ และแหล่งหรือสถานที่ที่เคยพบมาก่อนในประเทศไทย

1.2 เก็บพันธุ์ไม้ในวงศ์ทั้ง 3 จากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย แล้วนำมาตรวจสอบกับรูปวิธานและลักษณะต่างๆ จากเอกสาร เพื่อทราบสกุลและชนิด

1.3 ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของส่วนต่างๆ จากพันธุ์ไม้ที่เก็บได้ เช่น ลักษณะของต้น ใบ ดอก ผล และราก โดยใช้กล้องสองตาและใช้เวอร์เนีย หรือไม้บรรทัดวัดขนาดและรูปร่างของพันธุ์ไม้แต่ละชนิด

1.4 นำลักษณะที่ศึกษาได้ไปตรวจสอบกับรูปวิธาน และลักษณะของแต่ละชนิดจากเอกสารต่างๆ และเทียบกับตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้งที่หอพรรณไม้ กองบำรุง

กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และหอพรรณไม้ ตึกพืชพรรณ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง

2. จัดรูปวิธาน (Key) จากลักษณะที่แตกต่างกันอย่างเด่นชัดของแต่ละสกุลหรือชนิด ที่ศึกษาในครั้งนี้นำมาจัดทำรูปวิธานของพันธุ์ไม้ใน Family Alismaceae, Family Butomaceae และFamily Hydrocharitaceae ที่พบในประเทศไทย

ข. เซลวิทยา

ศึกษาจำนวนและรูปร่างของโครโมโซม โดยศึกษาจาก somatic cell ของปลายราก โดยวิธี Feulgen squash และ microsporocyteของดอก โดยวิธี smear

1. somatic cell ของปลายราก ตัดส่วนปลายรากที่มีลักษณะที่คาดว่ามีการแบ่งเซลอยู่ในระยะmetaphase ยาวประมาณ 1 เซ็นติเมตร (อาจตัดจากแหล่งธรรมชาติ หรือที่นำมาปลูกใหม่) แช่ในสารละลาย alpha-bromonaphthalene ที่อิ่มตัว (1 หยดในน้ำประปา 1,000 ลูกบาศก์เซ็นติลิตร) ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 19-24 ชั่วโมง แล้วแต่ชนิดของพืช (ตารางที่ 2) เพื่อให้การแบ่งเซลอยู่ในระยะ metaphase เป็นส่วนใหญ่ และยังทำให้โครโมโซมหดตัว ง่ายต่อการศึกษารูปร่างและการนับจำนวนโครโมโซม (อินทิวรา, 2520) แล้วนำปลายรากมาแช่ใน 90 % acetic acidนาน 30 นาที ล้าง 90 % acetic acidออกด้วย 70 % ethyl alcohol 3-5 ครั้ง แล้วแช่ปลายรากใน 70 % ethyl alcohol ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

1.1 การเตรียมสไลด์ นำปลายรากที่แช่ใน ethyl alcohol มาล้างด้วยน้ำ 3-5 ครั้ง ให้alcohol หมด เพื่อให้เซลย้อมติดสีดีขึ้น แล้วนำไปhydrolyse ด้วยnormal hydrochloric acid ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10-12 นาที แล้วแต่ชนิดของพันธุ์ไม้ (ตารางที่ 2) เอาปลายรากแช่ใน Schiffs' reagentนาน 20-30 นาที จะสังเกตเห็นปลายรากติดสีชมพู ใช้เข็มเขี่ยเฉพาะส่วนปลายรากที่ติดสีชมพูเข้ม วางบนสไลด์ที่สะอาด เขี่ยปลายรากให้แยกกระจายเล็กน้อย หยดสีaceto-carmine ปิดแผ่นแก้ว เคาะบนแผ่นแก้วปิดเพื่อให้โครโมโซมกระจายดี ยาด้วยยาทาเล็บ

โดยรอบแผ่นแก้วปิด นำสไลด์ไปแช่ตู้เย็นช่องแช่แข็ง ประมาณ 5-7 วัน เพื่อทำสไลด์ถาวร

ตารางที่ 2 เวลาที่ใช้ในการเตรียมเซล และ hydrolyse ปลายรากของพันธุ์ไม้ใน Family Alismaceae, Family Butomaceae และ Family Hydrocharitaceae

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อพื้นเมือง (common name)	สถานที่เก็บ	เวลา pretreat-ment (ชั่วโมง)	เวลา hydrolyse (นาที)
1. Family Alismaceae				
1.1 Caldesia oligococca (F.V.M.) Buch.	ขี้ไต้	อ.ระโนด จ.สงขลา	21	12
1.2 Echinodorus cordifolius (Linn.) Griseb.	อเมซอน	ตลาดนัดสนามหลวง กทม.	21	12
1.3 Sagittaria platyphylla (Engelm.) Smith	เทปใบพาย	ตลาดนัดสนามหลวง กทม.	20	11
1.4 S. sagittifolia Linn.	หัวหอก, นางกวัก	อ.ยานนาวา. กทม. บางแค กทม.	22	12
2. Family Butomaceae				
2.1 Hydrocleis nymphoides (Willd.) Buch.	ฝิ่นน้ำ	ตลาดนัดสนามหลวง กทม.	20	10
2.2 Limnocharis flava (Linn.) Buch.	ตะละปัดถาษี	ลำพระเพลิง อ.ปักธงชัยจ.นครราชสีมา	21	12
3. Family Hydrocharitaceae				
3.1 Blyxa aubertii Rich.	-	ห้วยสู้ก อ.บางสะพานนอย จ.ประจวบ	23	10
3.2 B.echinosperma (Clarke) Hook.f.	สันตะวาใบขาว, รวย	ทะเลน้อย จ.พัทลุง	23-24	10

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อพื้นเมือง (common name)	สถานที่เก็บ	เวลา pretreatment (ชั่วโมง)	เวลา hydrolyse (นาที)
3.3 B. japonica (Miq.) Maxim. ex Aschers. et Gurke	สันตะวา-หางไก่	สถานีทดลองข้าวเกษตร บางเขน กทม. ห้วยสัก อ.บางสะพานน้อย จ.ประจวบ	22	10
3.4 Enhalus acoroides (Linn.f.) Rich. ex Steud.	เงาใหญ่	ท่านุ่น, ท่าฉัตรชัย จ. พังงา	21	10
3.5 Halophila beccarii Aschers.		อ.ขลุง จ.จันทบุรี	22	10
3.6 H.ovalis (R.Br.) Hook.f.		อ่าวมะขาม จ.ภูเก็ต	22	10
3.7 Hydrilla verticillata (Linn.f.) Royle	สาหร่าย-หางกระรอก	เรือนต้นไม้ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬา ฯ สถานีทดลองข้าวเกษตร บางเขน กทม. ทะเลน้อย จ.พัทลุง	19-20	10

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อพื้นเมือง (common name)	สถานที่เก็บ	เวลา pretreatment (ชั่วโมง)	เวลา hydrolyse (ชั่วโมง)
3.8 Hydrocharis dubia(Bl.) Back.	ตับเต่านา	สถานีทดลองข้าวเกษตร บางเขน กทม. หนองหาร จ.สกล มวกเหล็ก จ.สระบุรี	20	10
3.9 Lagarosiphon roxburghii Benth.	สันตะวา-หางไก่	สถานีทดลองข้าว เกษตร บางเขน กทม. ร่องสวน จ.นครปฐม	21	10
3.10 Ottelia alismoides (Linn.) Pers.	สันตะวา-ใบพาย	เรือนต้นไม้ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬา ฯ จ.นครปฐม	20-22	12
3.11 Boottia lanceolata Gagnep.	รกควาย	บ้านโป่ง จ.ราชบุรี จ.เพชรบุรี	21	12
3.12 Thalassia hemprichii (Ehrenb.) Aschers.	เงาเล็ก	ท่านุน จ.พังงา	21	12
3.13 Vallisneria gigantea Graeb.	อีรวย	หนองหาร จ.สกลนคร	21	10
3.14 V. spiralis Linn.	เทปใบ-เกลียว	ตลาดนัดสนามหลวง กทม. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬา ฯ	21	10

1.2 การศึกษาโครโมโซม เลือกเซลที่มีโครโมโซมแบ่งตัวในระยะ metaphase ที่มีการกระจายและหดตัวดี สังเกตได้จากการติดสีเข้มและความหนาของโครโมโซม (ซึ่งมากกว่าระยะอื่นๆ) บางเซลเห็นเป็นสองโครมาติดชัดเจน ศึกษารูปร่าง จำนวนและขนาดของโครโมโซม ชนิดละ 5 เซล เลือกเซลที่ดีที่สุดไปถ่ายรูปด้วยกล้องจุลทรรศน์ Olympus P.M.7โดยใช้กำลังขยาย 1,000 เท่าด้วยฟิล์ม panatomic- X วัดขนาดของโครโมโซมจากภาพถ่ายที่ขยายเท่าๆ กัน โดยใช้ภาพถ่ายของ micrometer ที่กำลังขยายเท่ากันเป็นสเกลวัด

2. ดอก

เก็บดอกตูมที่มีระยะพอเหมาะในการศึกษาคือ มีการแบ่งเซลในระยะ first metaphase เป็นส่วนใหญ่ (ขนาดของดอกขึ้นกับชนิดของพืช ส่วนใหญ่ขนาดไม่เกิน 2 มิลลิเมตร ถ้าเป็นดอกช่อ ใช้ดอกตูมทั้งช่อ หรือเลือกเฉพาะบางดอก) มาแช่ใน Carnoys fluid นาน 24-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เท Carnoys fluid ทิ้ง ล้างดอกด้วย 70 % ethyl alcohol 3-5 ครั้ง แช่ใน 70 % ethyl alcohol แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

2.1 วิธีเตรียมสไลด์ นำดอกมาเขี่ยเอา anther 2-3 อัน วางบนสไลด์ที่สะอาด หยดสี aceto-carmine เล็กน้อย ใช้เข็มเขี่ยแยกเอา microsporocyte ออกจาก anther เอาผนัง anther ทิ้ง แล้ว smear โดยใช้เข็มเขี่ยให้ microsporocyte กระจาย หยด aceto-carmine 1-2 หยด ปิดด้วยแผ่นแก้วปิด แล้วรนไฟพออุ่นๆ ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เลือกเอาสไลด์ที่ microsporocyte แบ่งตัวในระยะ first metaphase โดยเฉพาะเซลที่มี homologous chromosome นั้นจับคู่เป็น bivalent หรือ multivalent กระจายไม่ซ้อน มาศึกษาแล้วยาสไลด์ด้วยยาทาเล็บรอบแผ่นแก้วปิด นำไปแช่ในตู้เย็นช่องแช่แข็งประมาณ 5-7 วัน เพื่อทำสไลด์ถาวร

2.2 การศึกษาโครโมโซม เพื่อตรวจสอบและสนับสนุนการนับจำนวนโครโมโซมที่นับไว้จากเซลปลายรากและดูความสัมพันธ์ของพันธุ์ไม้ โดยดูลักษณะการจับคู่ของโครโมโซม

ค. นำผลที่ได้จากการศึกษาเกี่ยวกับอนุกรมวิธาน (ข้อ ก) เซลวิทยา (ข้อ ข) มาพิจารณาร่วมกันเพื่อหาความสัมพันธ์และความเกี่ยวข้องที่เป็นไปได้ในการจำแนก Family Alismaceae, Family Butomaceae และ Family Hydrocharitaceae ที่พบในประเทศไทย

003857

17353294