บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการศึกษา

อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

1. พืชที่ใช้ในการศึกษา

ได้รวบรวมพันธุ์ไม้ดอกในบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาศึกษาจำนวนโครโมโซม ทั้งหมด 8 วงศ์ 26 สกุล 43 ชนิด 49 ตัวอย่าง เป็นพืชสมุนไพร 24 ชนิด ซึ่งมีทั้งไม้ดอกขนาดเล็ก (herb) ไม้พุ่ม (shrub) ไม้ยืนต้นขนาดกลาง (shrubby tree) และไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ (tree) ดังตารางที่ 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 พันธุ์ไม้ดอกในบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่นำมาศึกษา 8 วงศ์ 26 สกุล 43 ชนิด 49 ตัวอย่าง

วงศ์ ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อพื้นเมือง	ลักษณะนิสัย	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ระยะเวลามีดอก
AMARYLLIDACEAE				
* Crinum amabile Donn.	พลับพลึงแดง	ไม้ล้มลุก	สถาบันวิทยบริการ	ก.ย.-ต.ค.
* C. asiaticum Linn.	พลับพลึง	ไม้ล้มลุก	สถาบันวิทยบริการ	ตลอดปี
Haemanthus multiflorus (Tratt) Martyn	ว่านแสงอาทิตย์	ไม้ล้มลุก	ภาควิชาพฤกษ์ฯ	มี.ค.-พ.ค.
* Hippeastrum reticulatum Herb.	ว่านรางเงิน	ไม้ล้มลุก	ภาควิชาพฤกษ์ฯ	ตลอดปี
* Hymenocallis littorallis Salisb.	พลับพลึงดีนเป็ด	ไม้ล้มลุก	คณะเภสัชศาสตร์	ตลอดปี
* Pancratium zeylanicum Linn.	ว่านเศรษฐี	ไม้ล้มลุก	ภาควิชาพฤกษ์ฯ	พ.ค.-มิ.ย.
BIGNONIACEAE				
* Crescentia alata H.B.K.	ดีนเป็ดฝรั่ง	ไม้ต้น	หน้าตึกเคมี	ตลอดปี
Jacaranda filicifolia Don	ศรีตรัง	ไม้ต้น	ภาควิชาพฤกษ์ฯ	ตลอดปี
Radermachera ignea (Kurz) Steenis	ปีบทอง	ไม้ต้น	คณะเภสัชศาสตร์	ม.ค.-เม.ย.
* Spathodea campanulata Beauv.	แคแสด	ไม้ต้น	คณะพาณิชยศาสตร์	ตลอดปี
Tabebuia pallida (Lindl.) Miers	แดรชมพู	ไม้ต้น	คณะพาณิชยศาสตร์	ตลอดปี
T. rosea (Bertol.) DC.	ชมพูพันธุ์ทิพย์	ไม้ต้น	ขอบสระน้ำประตูใหญ่	ม.ค.-เม.ย.
Tecoma stans (Linn.) H.B.K.	ทองอุไร	ไม้พุ่ม	หน้าตึกชีวะ 1	ตลอดปี

* พืชสมุนไพร

ตารางที่ 1 (ต่อ)

วงศ์ ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อพื้นเมือง	ลักษณะนิสัย	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ระยะเวลามีดอก
CAESALPINIACEAE				
* Bauhinia acuminata Linn.	กาหลง	ไม้พุ่ม	ภาควิชาพฤกษ์ฯ	ตลอดปี
* B. purpurea Linn.	ชงโคสีชมพู	ไม้ต้น	หน้าตึกเคมี 2	ก.ย.-มี.ค.
* B. tomentosa Linn.	โยทะกา	ไม้พุ่ม	คณะเภสัชศาสตร์	ตลอดปี
* B. variegata Linn.	ชงโค	ไม้ต้น	คณะอักษรศาสตร์	ตลอดปี
* Caesalpinia coriaria (Jacq.) Willd.	ต้นหยง	ไม้ต้น	คณะเภสัชศาสตร์	ก.ค.-ส.ค.
* C. pulcherrima (Linn.) Swartz (yellow form orange form and pink form)	หางนกยูงไทย (สีเหลือง สีส้ม และสีชมพู)	ไม้พุ่ม	หน้าตึกเคมี1 และ คณะเภสัชศาสตร์	ตลอดปี
* Cassia alata Linn.	ชุมเห็ดเทศ	ไม้พุ่ม	คณะเภสัชศาสตร์	ม.ค.-มี.ค.
C. bakeriana Craib	กัลปพฤกษ์	ไม้ต้น	สถาบันวิทยบริการ	ก.พ.-เม.ย.
C. biflora Linn.	เหลืองออสเตรเลีย	ไม้พุ่ม	คณะเภสัชศาสตร์	ตลอดปี
* C. fistula Linn.	คูน	ไม้ต้น	หน้าตึกชีวะ 1	ก.พ.-พ.ค.
* C. garrettiana Craib	แสมสาร	ไม้ต้น	คณะเภสัชศาสตร์	ก.พ.-เม.ย.
* C. grandis Linn. f.	กาฬิพฤกษ์	ไม้ต้น	คณะพาณิชยศาสตร์	ก.พ.-มี.ค.
* C. siamea Lamk.	ขี้เหล็ก	ไม้ต้น	คณะเภสัชศาสตร์	ตลอดปี
* C. sophera Linn.	ผักเค็ด	ไม้พุ่ม	คณะเภสัชศาสตร	ตลอดปี
C. spectabilis DC.	ขี้เหล็กอเมริกา	ไม้ต้น	คณะศิลปกรรมฯ	ตลอดปี
* C. surattensis Burm. f.	ทรงบาดาล	ไม้พุ่ม	คณะรัฐศาสตร์	ตลอดปี
* Delonix regia Rafin (yellow form orange form and red form)	หางนกยูงฝรั่ง สีเหลือง สีส้ม และสีแดง	ไม้ต้น	คณะรัฐศาสตร์ และคณะวิศวกรรมฯ	เม.ย.-มิ.ย.
Parkinsonia aculeata Linn.	รัตมา	ไม้ต้น	สถาบันวิทยบริการ	ส.ค.-ก.ย.

* พืชสมุนไพร

ตารางที่ 1 (ต่อ)

วงศ์ ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อพื้นเมือง	ลักษณะนิสัย	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ระยะเวลามีดอก
CONVOLVULACEAE				
Jacquaemontia pentantha (Jacq.) Don	แส	ไม้เลื้อย	หอพักนิสิตหญิง	ตลอดปี
LILIACEAE				
Chlorophytum elatum R.Br. var. variegatum	เศรษฐีเรือนนอก	ไม้ล้มลุก	ภาควิชาพฤกษ์ฯ	ตลอดปี
C. elatum R.Br. var. vitatum	เศรษฐีเรือนใน	ไม้ล้มลุก	ภาควิชาพฤกษ์ฯ	ตลอดปี
Gasteria batesiana Rowly	ลิ้นละไบ	ไม้ล้มลุก	ภาควิชาพฤกษ์ฯ	ตลอดปี
Haworthia fasciata (Willd.) Haw.	ม้าลาย	ไม้ล้มลุก	ภาควิชาพฤกษ์ฯ	ตลอดปี
H. limifolia Marl.	ม้าเวียน	ไม้ล้มลุก	ภาควิชาพฤกษ์ฯ	ตลอดปี
H. obtusa Haw.	กุหลาบเจียรนัย	ไม้ล้มลุก	ภาควิชาพฤกษ์ฯ	ตลอดปี
MALPIGHIACEAE				
Malpighia coccigera Linn.	ชาปัดตาเวีย	ไม้พุ่ม	คณะเภสัชศาสตร์	ตลอดปี
Thryallis glauca Ktze.	พวงทองต้น	ไม้พุ่ม	คณะทันตแพทยศาสตร์	ตลอดปี
Tristellateia australasiae A. Rich	พวงทองเถา	ไม้เลื้อย	ภาควิชาพฤกษ์ฯ	ตลอดปี

ตารางที่ 1 (ต่อ)

วงศ์ ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อพื้นเมือง	ลักษณะนิสัย	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ระยะเวลามีดอก
MORINGACEAE				
* Moringa oleifera Lamk.	มะรุม	ไม้ต้น	คณะเภสัชศาสตร์	ธ.ค.-ม.ค.
FABACEAE				
* Erythrina variegata Linn.	ทองหลางลาย	ไม้ต้น	คณะครุศาสตร์	ธ.ค.-ม.ค.
* Sesbania grandiflora Desv. (white form & red form)	แคบ้าน (สีขาวและสีแดง)	ไม้ต้น	คณะเภสัชศาสตร์	ตลอดปี

* พืชสมุนไพร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. สารเคมี

2.1 Carnoy's solution

2.2 ferric chloride

2.3 ethyl alcohol 70 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์

2.4 acetic acid 45 และ 90 เปอร์เซ็นต์

2.5 1 normal hydrochloric acid

2.6 propionocarmine 2 เปอร์เซ็นต์

2.7 Schiff's reagent

2.8 xylene

2.9 euparol

2.10 oil emulsion

2.11 สารละลายอิ่มตัวของ alphabromonaphthalene

2.12 ยาทาเล็บ

3. อุปกรณ์สำหรับศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์

3.1 ขวดสำหรับใช้เก็บตัวอย่างขนาด 0.5x2.5 นิ้ว และ 1x2.5 นิ้ว พร้อมฝาปิด

3.2 เทอร์โมมิเตอร์และหลอดแก้วกันตัด (vial tube) ขนาด 0.75x2.5 นิ้ว

3.3 แผ่นกระจกสไลด์ แผ่นแก้วปิด กรรไกร และใบมีดโกน

3.4 เครื่องมือเตรียมสไลด์ เช่น ปากคีบ เข็มเขี่ย แท่งเคาะสไลด์ ตะเกียงแอลกอฮอล์ จานเพาะเชื้อ (Petri dish) ขนาด 3x0.5 นิ้ว และจานแก้วสำหรับทำสไลด์ถาวร (ridged jars) ขนาด 3x4x4 นิ้ว

3.5 อ่างควบคุมอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส

3.6 กล้องสองตา (disecting microscope)

3.7 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope)

4. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ

4.1 กล้องจุลทรรศน์ Olympus vanox-T AH-2 สำหรับถ่ายภาพ

4.2 กล้องถ่ายรูป

4.3 ฟิล์ม Panatomic-X Ektakrome-64 และ Kodak Gold 100

5. อุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกต้นไม้

5.1 ทรายสำหรับเพาะเมล็ด ดินธรรมดา และปุ๋ยอินทรีย์กทม.-1

5.2 กระถางดินเผาเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว

5.3 เครื่องมือการเกษตร

5.4 ป้ายสำหรับบันทึกชื่อต้นไม้และ วัน เดือน ปี ที่ปลูก

วิธีดำเนินการศึกษา

ในการศึกษาโครโมโซมครั้งนี้ใช้ตัวอย่างพืชหลายชนิดเท่าที่หาได้ในบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งมีทั้งไม้ดอกขนาดเล็ก ไม้พุ่ม ไม้ยืนต้นขนาดกลาง และไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ ความแตกต่างทางลักษณะนิสัยนี้มีความสัมพันธ์กับ ขนาด ลักษณะ และคุณสมบัติในการติดสีย้อมของโครโมโซม จึงนำวิธีการทั่ว ๆ ไปในการเตรียมโครโมโซมของพืชดอกมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่ได้ผลดี ฉะนั้นสำหรับพืชบางชนิด จึงต้องผ่านการทดลองหลาย ๆ รูปแบบในการเตรียมโครโมโซม จนได้ผลดีที่สุด รายละเอียดการศึกษาโครโมโซมของพืชแต่ละชนิดกล่าวไว้ในผลการทดลอง

ก่อนเริ่มศึกษาโครโมโซมได้สำรวจพันธุ์ไม้ ในบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แล้วจัดแบ่งเป็นวงศ์ เลือกวงศ์ที่มีตัวแทนของพันธุ์ไม้หลายชนิดก่อน ขั้นต่อไปจึงเลือกอวัยวะต่าง ๆ ของพืชแต่ละชนิด อาจจะเป็น ราก ดอกอ่อน ใบอ่อน ใบประดับ กลีบเลี้ยง หรือกลีบดอก อย่างใดอย่างหนึ่งนำมาศึกษาจำนวนโครโมโซม โดยแยกเตรียมเซลล์และวิธีการศึกษาดังนี้

1. การเตรียมโครโมโซมจากเซลล์ร่างกาย

เซลล์ร่างกายที่นำมาศึกษาจำนวนโครโมโซม ได้มาจากอวัยวะต่าง ๆ ของพืช เช่น ราก ใบอ่อน ใบประดับ กลีบเลี้ยงและกลีบดอกเป็นต้น โดยนำอวัยวะเหล่านี้มาเตรียมสไลด์แบบ Feulgen squash (กันยารัตน์ ไชยสุต, 2532 ดัดแปลงจาก Darlington and La Cour, 1966) ถ้าใช้รากจะเริ่มต้นจากการนำเมล็ด หรือต้นอ่อน มาเพาะ หรือปลูกในกระถางที่บรรจุทราย หรือดินผสม เมื่อเมล็ดงอกเป็นต้นกล้ามีรากยาวประมาณ 2-4 เซนติเมตร ตัดรากยาวประมาณ 1 เซนติเมตรแช่ในสารละลายอิ่มตัวของ alphabromonaphthalene เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส นาน 16-28 ชั่วโมง ขั้นตอนนี้เป็นการหยุดวงชีพเซลล์ (pretreatment) สารละลายอิ่มตัวของ alphabromonaphthalene มีคุณสมบัติหยุดการแบ่งนิวเคลียสให้อยู่ในระยะเมทาเฟส ช่วยให้โครโมโซมหดตัวได้ดี และทำให้ไซโตพลาซึมใส สะดวกในการนับจำนวนโครโมโซม หลังจากหยุดวงศ์ชีพเซลล์ตามต้องการแล้ว ใช้กรดแอซีติก 90 เปอร์เซ็นต์ ไปหยุดการทำงานของเซลล์ (fixative) โดยแช่รากอยู่ในกรดแอซีติกประมาณ 30 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง กรดแอซีติก 90 เปอร์เซ็นต์จะหยุดปฏิกริยาเมแทบอลิสซึม (metabolism) ของเซลล์ทำให้เซลล์ตาย แต่ยังคงรูปร่างและส่วนประกอบของเซลล์ให้คงรูปเดิมอยู่ได้ หรือมีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด แล้วล้างรากด้วยเอทีลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง ๆ ละประมาณ 3-5 นาที เก็บรากไว้ในเอทีลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ โดยเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส เป็นการเก็บรักษาเนื้อเยื่อ (storage) โดยไม่ทำให้เซลล์เหี่ยวหรือเสียน้ำ และ เก็บได้นานประมาณ 6-12 เดือน เมื่อจะศึกษาโครโมโซมจึงนำรากที่เก็บไว้มาล้างน้ำให้สะอาดปราศจากแอลกอฮอล์ แล้วนำรากไปไฮโดรไลส์ (hydrolyse) ด้วยกรดเกลือ 1 นอร์มล (1 normal hydrochloric acid) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

นาน 8-12 นาที (แล้วแต่ชนิดของพืช) แล้วย้ายรากไปแช่ใน Schiff's reagent เป็นเวลาประมาณ 30-120 นาที บริเวณปลายรากจะติดสีม่วงแดง นำรากมาใส่ในน้ำ ตัดปลายรากเฉพาะส่วนที่ติดสีแดงเข้มซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเจริญ วางบนแผ่นกระจกสไลด์ หยดสี propionocarmine 1 หยด ปิดด้วยแผ่นแก้วปิดทับลงตรงบริเวณที่มีราก แล้วใช้ปลายดินสอเรียบ ๆ ค่อย ๆ เคาะบนแผ่นแก้วปิดตรงบริเวณที่มีเนื้อเยื่อแดง ๆ ทำให้เซลล์แยกออกจากกัน และช่วยให้โครโมโซมกระจายได้ดี นำไปตรวจดูโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย x10 เลือกหาเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสระยะเมทาเฟส ถ้าโครโมโซมยังไม่กระจาย เคาะบนแผ่นแก้วปิดตรงบริเวณเซลล์เป้าหมายอีก จนโครโมโซมกระจายตัว (ระวังอย่าเคาะแรงเกินไป โดยเฉพาะถ้าแช่รากไว้ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เพียง 1-2 วัน เพราะเซลล์ยังอ่อนนุ่ม ทำให้โครโมโซมกระจายออกนอกเซลล์ได้ง่าย) เอากระดาษซับวางบนแผ่นแก้วปิดกดบริเวณที่มีเซลล์ ด้วยนิ้วหัวแม่มือทั้งสองข้าง เพื่อทำให้โครโมโซมที่กระจายแล้วอยู่บนระนาบเดียวกัน ยาสไลด์ด้วยยาทาเล็บ นำสไลด์มาเลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสระยะเมทาเฟส และมีโครโมโซมกระจายสามารถนับจำนวนได้ชัดเจนมา 10 เซลล์ วาดรูปตรวจนับเปรียบเทียบจากกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย x100 แล้วเลือกเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมครบกระจายสวยที่สุดไปถ่ายภาพ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Olympus vanox-T AH-2 ใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย x100

สไลด์ที่ศึกษาโครโมโซมแล้วนี้สามารถเก็บไว้ได้นานประมาณ 1 สัปดาห์ โดยเก็บไว้ในตู้เย็นช่องแช่แข็ง หรือนำไปทำสไลด์ถาวรเพื่อเก็บไว้ศึกษาต่อไป

การไฮโดรไลส์รากด้วยกรดเกลือ 1 นอร์แมล เพื่อต้องการให้เซลล์แยกออกจากกันได้ง่ายขณะเตรียมสไลด์ และทำให้ไซโตพลาซึมใส (Sharma and Sharma, 1980) และทำให้เบส purine (adenine และ guanine) แยกจาก deoxyribose glucosidic bond ของดีเอนเอ ทำให้เกิดหมู่ aldehyde อิสระไปทำปฏิกริยากับ Schiff's reagent (Leuco basic fuchsin) เกิดสีม่วงแดง ถ้าไฮโดรไลส์นานเกินไปโครโมโซมจะไม่ติดสี เนื่องจากเบส pyrimidine (thymine และ cytosine) จะถูกแยกจากดีเอนเอด้วย คือเกิดการสลายตัวของดีเอนเอ ฉะนั้นในการเตรียมเซลล์ นอกจากจะต้องเลือกรากที่เนื้อเยื่อกำลังแบ่งเซลล์ (ลักษณะปลายรากขาวใส) แล้ว เวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลส์รากก็มีความสำคัญต่อการศึกษาโครโมโซม หลังจากนับจำนวนโครโมโซมและถ่ายรูปสำหรับพืชแต่ละชนิดแล้ว บันทึกผลที่ได้เวลาที่ใช้ในการหยุดวงชีพเซลล์ เวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลส์ และรายละเอียดอื่น ๆ ที่พบว่าช่วยทำให้การเตรียมเซลล์ได้ผลดีกว่าวิธีการทั่ว ๆ ไป

2. การเตรียมโครโมโซมจากไมโครสปอโรไซต์และไมโครสปอร์

อวัยวะที่นำมาใช้เตรียมโครโมโซม ได้แก่ ดอก ซึ่งเตรียมได้จากวิธี propionocarmine smear (กันยารัตน์ ไชยสุต, 2532 ดัดแปลงจาก Darlington and La Cour, 1966) ดังต่อไปนี้

นำดอกอ่อนแช่ใน Carnoy's solution เพื่อหยุดชบวนการเมแทบอลิสซึมของเซลล์ (fixative) น้ำยานี้ประกอบด้วย กรดแอซีติกเข้มข้น: คลอโรฟอร์ม: เอทีลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 1: 3: 6 (glacial acetic acid: chloroform: absolute ethylalcohol 1: 3: 6) ส่วนผสมแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติในการทำปฏิกริยาร่วมกันอย่างมีประสิทธิภาพ กรดแอซีติคมีคุณสมบัติในการซึมผ่านเนื้อเยื่อ และเข้าทำปฏิกริยาในการหยุดการทำงานของเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว โดยละลายโปรตีนแต่ไม่ละลาย นิวคลีโอโปรตีน และยังทำให้โครโมโซมพองตัว คลอโรฟอร์มมีคุณสมบัติในการละลายไขมัน และแวกซ์ (wax) ที่อยู่บนผิวของเนื้อเยื่อทำให้น้ำยาฟิกซ์ซึมผ่านเข้าทำปฏิกริยาได้อย่างรวดเร็วแต่ถ้าแช่เนื้อเยื่อไว้นานเกินไป จะทำให้โครโมโซมเปราะและแตกง่าย เอทีลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์มีคุณสมบัติในการซึมผ่านเนื้อเยื่ออย่างรวดเร็ว และดึงน้ำออกจากเซลล์ทำให้โปรตีนที่เสียสภาพไปไม่เปลี่ยนกลับมาสู่สภาพเดิม ทำให้เนื้อเยื่อแข็งและโครโมโซมหดตัว ซึ่งคุณสมบัตินี้จะไปควบคุมผลการทำปฏิกริยาของกรดแอซีติคและคลอโรฟอร์มอีกชั้นหนึ่ง Carnoy's solution ที่ใช้ฟิกซ์นี้มีคุณสมบัติไม่ติดสี เพื่อให้โครโมโซมติดสีดีขึ้นต้องใช้สารช่วยติดสี (mordant) ในที่นี้ใช้ ferric chloride เติมลงไป 1-3 หยดพอให้น้ำยาฟิกซ์เป็นสีเหลือง การแช่ดอกอ่อนถ้าเป็นดอกช่อที่มีความยาวของช่อพอเหมาะกับขวดฟิกซ์ จะแช่ทั้งช่อ (เพื่อสะดวกในการหาขนาดดอกที่มีการแบ่งนิวเคลียสและนับโครโมโซมได้ง่ายขึ้น) แต่ถ้าช่อดอกมีความยาวมาก จะตัดเป็นช่วงสั้นลงก่อนใส่ขวดฟิกซ์ ส่วนดอกที่มีกลีบดอก และกลีบเลี้ยงหนามาก หรือมีสารที่ไปทำปฏิกริยากับน้ำยาฟิกซ์ โดยเปลี่ยนน้ำยาฟิกซ์เป็นสีดำและบางครั้งเกิดตะกอน ในกรณีนี้ต้องแกะกลีบเลี้ยงและกลีบดอกออก เหลือไว้เฉพาะเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่บนฐานรองดอก (เพื่อสะดวกในการเลือกขนาดอับเรณูมาศึกษา) แช่ส่วนที่เหลือของดอกในน้ำยาฟิกซ์ ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง เทน้ำยาฟิกซ์ทิ้ง ล้างดอกให้หมดกรดด้วยเอทีลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แช่ดอกไว้ในเอทีลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียสได้นาน 6-12 เดือน โดยไม่ทำให้เซลล์เหี่ยวหรือสูญเสียน้ำ เมื่อต้องการศึกษาโครโมโซม นำดอกที่เก็บไว้ในแอลกอฮอล์มาย้อมสีโครโมโซม โดยแกะเอาเฉพาะอับเรณูจำนวนหนึ่งอันหรือมากกว่า (แล้วแต่ขนาดของอับเรณูซึ่งขึ้นกับชนิดของพืช) วางบนสไลด์ หยดสี propionocarmine 1 หยด ถ้าอับเรณูมีขนาดใหญ่ ใช้เข็มเขี่ยแบ่งอับเรณูแต่ละอันออกเป็นสองส่วน แล้วใช้เข็มเขี่ยกดบนผนังของอับเรณู เพื่อไล่ไมโครสปอโรไซต์ให้หลุดออกจากอับเรณูมาลอยอยู่ในสี propionocarmine เขี่ยผนังของอับเรณูทิ้ง แต่ถ้าอับเรณูมีขนาดเล็กใช้ปากคีบขยี้อับเรณูเพื่อไล่ไมโครสปอโรไซต์ แล้วคีบชิ้นส่วนของผนังอับเรณูทิ้ง นำสไลด์ไปลนไฟให้ร้อนพอที่หลังมือทนได้เพื่อให้เซลล์พองตัว โครโมโซมกระจายและติดสีดี ปิดด้วยแผ่นแก้วปิด นำสไลด์ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย x10 และ x40 ตามลำดับ เลือกหาเซลล์ไมโครสปอโรไซต์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสระยะเมทาเฟสแรก (first metaphase) หรือไมโครสปอร์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสระยะเมทาเฟส ถ้า

โครโมโซมติดสีดีแต่ไม่กระจาย หยดกรดแอซีติก 45 เปอร์เซ็นต์ลงข้าง ๆ ขอบแผ่นแก้วปิด นำสไลด์ไปลนไฟแล้วใช้กระดาษซับกรดแอซีติกที่มีมากเกินพอออก โดยซับตามขอบของแผ่นแก้วปิดในทิศทางตรงข้ามกับที่หยดกรดลงไป กรดที่หยดลงไปและความร้อนขณะที่ลนสไลด์ช่วยให้โครโมโซมกระจายได้ดีขึ้น แต่ถ้าลนไฟนานเกินไปจะทำให้น้ำยาเดือดและสีของโครโมโซมจางหายไป (ไม่ควรใช้กรดแอซีติกถ้าโครโมโซมติดสีไม่ดี) เอากระดาษซับวางบนแผ่นแก้วปิด ใช้นิ้วรีดลงบนกระดาษซับบริเวณแผ่นแก้วปิด เพื่อให้โครโมโซมกระจายแล้วอยู่ในระนาบเดียวกัน ยาสไลด์ด้วยยาทาเล็บ แล้วนำไปศึกษาจำนวนโครโมโซมต่อไป สำหรับพืชที่มีผนังไมโครสปอโรไซต์หนาต้องใช้แท่งเคาะสไลด์ เคาะโครโมโซมกระจายก่อนแล้วจึงทำให้โครโมโซมอยู่บนระนาบเดียวกันตามวิธีข้างต้น เซลล์ที่จะนับจำนวนโครโมโซมได้ต้องมีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมทาเฟสแรก ซึ่งจะเห็นโครโมโซมที่เหมือนกันจับคู่กัน (synapsis of homologous chromosome) เป็น bivalent หรือ multivalent (trivalent หรือ quadrivalent เป็นต้น) แต่มีโครโมโซมบางแท่งไม่จับคู่กันจึงเห็นเป็น univalent ที่มีลักษณะค่อนข้างกลมจำนวนโครโมโซมที่นับได้เป็น 2N ส่วนในดอกอ่อนบางดอกจะพบไมโครสปอร์ ที่มีการแบ่งนิวเคลียสระยะเมทาเฟส (mitotic metaphase) โครโมโซมในระยะนี้กระจายได้ง่ายและสามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ชัดเจน จำนวนโครโมโซมที่นับได้เป็น gametic number (N) การนับจำนวนโครโมโซมในไมโครสปอโรไซต์ (2N) หรือในไมโครสปอร์ (N) จะต้องเลือกเซลล์ 10 เซลล์วาดรูปตรวจนับเปรียบเทียบจากกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย x100 นำเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมครบ กระจายอยู่บนระนาบเดียวกันไปถ่ายภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ Olympus vanox-T AH-2 เลนส์วัตถุกำลังขยาย x100

การนับจำนวนโครโมโซมที่ได้จากดอกอ่อน นอกจากใช้การแบ่งนิวเคลียสระยะเมทาเฟสแรกของไมโครสปอโรไซต์แล้ว ยังใช้ระยะไดแอไคเนซีส (diakinesis) หรือระยะแอนาเฟสแรก (first anaphase) ช่วยในการวินิจฉัยจำนวนโครโมโซมในกรณีที่มีปัญหาเกี่ยวกับรูปร่างของ bivalent และ multivalent สไลด์ที่ศึกษาโครโมโซมแล้วนี้ สามารถเก็บไว้ศึกษาได้อีกประมาณ 1 สัปดาห์ โดยเก็บไว้ในตู้เย็นช่องแช่แข็ง หรือถ้าต้องการเก็บรักษาไว้นานกว่านั้น ต้องนำสไลด์ไปทำสไลด์ถาวร เช่นเดียวกับสไลด์ที่เตรียมได้จากเซลล์ร่างกายบันทึกจำนวนโครโมโซม (2N) จำนวนและลักษณะการจับคู่ของโครโมโซม (ถ้าศึกษาจำนวนโครโมโซมจากการแบ่งนิวเคลียสระยะเมทาเฟสแรกของไมโครสปอโรไซต์) ขนาดดอกอ่อนหรือขนาดอับเรณู และรายละเอียดอื่น ๆ ที่ทำให้การศึกษาได้ผลดี

3. วิธีทำสไลด์ถาวร

นำสไลด์ที่แช่ไว้ในช่องแช่แข็งของตู้เย็นประมาณ 3-7 วัน (ถ้าเร็วกว่านี้เซลล์จะไม่ติดสไลด์ และถ้านานเกินไปเซลล์จะแห้ง) มาลอกยาทาเล็บออกแล้วแช่สไลด์ในกรดแอซีติก 45 เปอร์เซ็นต์ จนแผ่นแก้วปิดหลุด (ใช้เวลาประมาณ 15 นาที) ผ่านแผ่นแก้วปิดและสไลด์จากกรดแอซีติกในเอทีลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ เพื่อดึงน้ำออก 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที (ถ้ายังมีน้ำเหลืออยู่ใน

เซลล์ เมื่อผ่านลง xylene สไลด์จะขาวขุ่นทำให้เห็นโครโมโซมไม่ชัด) จากนั้นผ่านทั้งสไลด์และแผ่นแก้วปิดลงใน xylene หยด euparol 1 หยดบนสไลด์ ใช้แผ่นแก้วปิด ๆ ทับลงบริเวณเดิมเอากระดาษซับวางทับบนแผ่นแก้วปิดแล้วใช้นิ้วมือรีดบนกระดาษซับเบา ๆ เพื่อให้ euparol ที่มีมากเกินพอออกจากแผ่นแก้วปิด ทิ้งสไลด์ไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิประมาณ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 7 วัน สไลด์ถาวรที่ได้นี้เก็บไว้ศึกษาได้เป็นเวลานาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย