อุปกรณ์และวิธีการ

1. การรวบรวมพันธุ์โหระพาและกะเพรา

ทำการรวบรวมพันธุ์โหระพาและกะเพรา ศึกษาชนิดและความแตกต่างของโหระพาและกะเพราแต่ละชนิดตลอดจนลักษณะประจำพันธุ์และลักษณะทางการเกษตรทั่ว ๆ ไป

โหระพาจำนวน 6 พันธุ์ ที่มีลักษณะช่อดอกแตกต่างกันถูกนำมาปลูกในแปลงทดลองของศูนย์ศึกษาค้นคว้าและพัฒนาเกษตรกรรมภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คณะเกษตรศาสตร์ โดยปลูกแต่ละพันธุ์ในแปลงย่อยที่มีขนาด 5 x 4 ตารางเมตร แล้วบันทึกลักษณะประจำพันธุ์โดยอาศัยลักษณะดอกเป็นเกณฑ์ นอกจากนี้ แล้วยังได้ศึกษาลักษณะทางการเกษตรทั่ว ๆ ไป ตลอดจนผลผลิตของเมล็ดโดยเลือกศึกษาในโหระพา 2 พันธุ์เท่านั้น คือ พันธุ์ที่มีช่อดอกยาว และช่อดอกเป็นพวง โดยการศึกษาเป็นรายต้น จำนวนพันธุ์ละ 8 ต้น

สำหรับกะเพรานั้น ได้รวบรวมพันธุ์มาเฉพาะกะเพราที่มีใบสีเขียว และกะเพราแดง เท่านั้น แล้วทำการบันทึกลักษณะทางการเกษตรทั่ว ๆ ไป ทำนองเดียวกับการศึกษาในโหระพา

2. การศึกษาโครโมโซมของโหระพา

การศึกษาโครโมโซมของโหระพา จะใช้ชิ้นส่วนจากปลายราก โดยมีขั้นตอนในการเตรียมสารเคมีและการเตรียมตัวอย่างต้นกล้าที่จะใช้ในการศึกษา ดังนี้

2.1 การเตรียมสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่จำเป็นต้องใช้ในการศึกษาโครโมโซม

2.1.1 การเตรียม 0.002 M ของ 8-hydroxyquinoline โดยใช้ oxine น้ำหนัก 0.29032 กรัม + น้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือด เมื่อละลายหมดแล้วทิ้งให้เย็นเก็บใส่ขวดสีชาแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น 4 °ซ

2.1.2 การเตรียม Farmar fluid (fixation solution) โดยผสม 99 % acetic acid : 99% Ethanol อัตรา 1 : 3

2.1.3 การเตรียม basic fuchsin โดยใช้สาร basic fuchsin หนัก 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มล. ต้มที่อุณหภูมิ 100 °ซ ปล่อยให้เย็นถึง 50 °ซ เติม 1 มล. ของ conc. HCl เติม sodium hydrogensulfite 3 กรัม (58.5% as SO_2) จะสังเกตเห็นสารละลายเป็นสีแดงได้ ตั้งทิ้งไว้ 24 ชม. จนกระทั่งได้สารละลายที่มีสีใส หรือสีจาง ๆ (ถ้ามีสีแดงแสดงว่าใช้ไม่ได้) เก็บสารละลายนี้ไว้ในตู้เย็น 4 °ซ

2.2 การเตรียมตัวอย่างพืช

นำเมล็ดโหระพามาแช่น้ำให้พอง นานประมาณ 3 ชม. แล้วนำไปวางบนกระดาษเพาะเมล็ดที่ชื้นเก็บไว้ใน petri dish เพาะที่อุณหภูมิ ประมาณ 35 °ซ ประมาณ 5 วัน จะได้ต้นกล้าเล็ก ๆ ที่สามารถตัดปลายรากมาศึกษาโครโมโซมได้

2.3 การตรวจสอบโครโมโซม มีขั้นตอนดังนี้

2.3.1 ตัดปลายรากต้นกล้าโหระพาในระดับต่ำจาก hypocotyl นำไปแช่ใน 0.002 M 8-hydroxyquinoloine ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ นำปลายรากแช่ในสารนี้ แล้วเก็บไว้ในขวดเล็ก ๆ ที่ค่าปิดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 °ซ นาน 3-4 ชม. หรืออาจจะแช่ในถังน้ำแข็ง นาน 15-16 ชม. ก็ได้

2.3.2 Fixation โดยนำปลายรากมาแช่ต่อใน Farmar fluid แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น 4 °ซ นาน 2-3 ชม. หรืออาจจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชม. ก็ได้

2.3.3 Rinsing นำปลายรากไปล้างให้สะอาดในน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

2.3.4 Maceration เป็นขั้นตอนที่ทำให้เซลล์อ่อนนิ่ม โดยนำรากไปใส่ขวดเล็ก ๆ มีฝาปิด เติม 1 N HCl 5 มล. นำไปแช่ในน้ำอุ่น 60 °ซ โดยใช้ shaking waterbath นานประมาณ 8 นาที

2.3.5 Staining โดยแช่รากต่อใน basic fushsin ทิ้งไว้ไม่ต่ำกว่า 1 ชม. จึงนำไปส่องดูโครโมโซมได้

2.3.6 รากที่เหมาะสมในการนำไป ตรวจสอบโครโมโซมควรติดสีม่วงบริเวณปลายราก นำรากมา 1 รากวางบนแผ่นกระจกสไลด์ ใช้เข็มเขี่ยตัดส่วนปลายของรากที่ติดสีม่วงเท่านั้น วางบนสไลด์ หยด aceto orcein 1 หยด ใช้ปลายเข็มเขี่ยชิ้นส่วนรากให้แยกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ปิดด้วย cover slip สวมถุงมือก่อนใช้นิ้วกดแผ่น cover slip แล้วใช้แท่งไม้เล็ก ๆ หรือแท่งดินสอค่อย ๆ บดให้เซลล์กระจายทั่ว ๆ กัน อย่าให้ช้อนกันมิฉะนั้นจะเห็นโครโมโซมไม่ชัด ใช้กระดาษซับสีย้อมส่วนเกิน แล้วใช้ดินสอด้านที่มียางลบกดบนแผ่น cover slip ซีลขอบด้วยขี้ผึ้ง ก่อนนำไปส่องดูโครโมโซมต่อไป