บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเก็บรวบรวมลำไยพันธุ์ดอจากสวนลำไยการค้า สวนหลังบ้านของเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน และจากแปลงรวบรวมพันธุ์ของศูนย์วิจัยเกษตรหลวง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 20 สายพันธุ์ ได้แก่ ดอยอดขาว (DYK) ดอยอดแดง (DYD) ดอก้านแข็ง (DKK) ดอก้านอ่อน (DKO) ดอใบหยก (DBY) ดอคำลาง (DKL) ดอหอม (DHM) ดอใบหด (DBH) ดอพวงทอง (DPT) ดอน้ำผึ้ง (DNP) ดอหลวง (DLG) ดอสุขุม (DSK) ดอสร้อย (DSY) ดอลุ่มน้ำปิง (DLP) ดอดอนไชย (DDC) ดอแจ้ (DJE) ดอทาน้อย (DTN) ดอหนานซาว (DNS) ดอบ้านโฮ่ง 60 (DBA) และดอหนองช้างคืน (DNK) นำตัวอย่างลำไยมาจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เซลล์พันธุศาสตร์ และอิเล็กโทรโฟรีซิส และใช้ลักษณะจากข้อมูลที่ได้หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลำไยพันธุ์ดอทั้ง 20 สายพันธุ์

1. การจำแนกพันธุ์โดยวิธีสัณฐานวิทยา

1.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

ตัวอย่างพืช ใบ ดอก ผล ของลำไยพันธุ์ดอ 20 สายพันธุ์

อุปกรณ์ ไม้บรรทัด เวอร์เนียแคลิปเปอร์ เครื่องชั่ง เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (hand refractometer) กระบอกตวง

1.2 วิธีการ

1.2.1 การสุ่มตัวอย่างพืช

สุ่มตัวอย่างพืชแต่ละสายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 5 ต้น จากแหล่งปลูก 5 แหล่ง

1.2.2 การบันทึกข้อมูล

ศึกษาตัวอย่างแต่ละสายพันธุ์ ด้วยลักษณะใบ ดอก ผล โดยใช้ใบประกอบ 5 ใบต่อต้น ใบย่อย 15 ใบต่อต้น ช่อดอก 5 ช่อต่อต้น ดอกเพศผู้และดอกเพศเมียอย่างละ 5 ดอกต่อต้น ผล 10 ผลต่อต้น และเมล็ด 10 เมล็ดต่อต้น โดยทำการบันทึกข้อมูลตามวิธีของ IBPGR Secretariat (1980) อ้างโดย Ramingwong and Chiewsilp (1994) ข้อมูลมีดังต่อไปนี้

ใบ ได้แก่ ขนาดใบประกอบ จำนวนคู่ของใบย่อย สีก้านใบด้านบน สีก้านใบด้านล่าง ความหนาก้านใบ สีเส้นกลางใบ สีเส้นใบ สีใบย่อย ขนาดใบย่อยรูปร่างใบ ขอบใบ ปลายใบ โคนใบ ผิวใบ ความหนาใบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดอก ได้แก่ ขนาดช่อดอก ขนาดดอกเพศผู้ ขนาดดอกเพศเมีย สีดอก

ผล ได้แก่ ขนาดผล รูปร่างผล น้ำหนักผล สีเปลือก สีกระ น้ำหนักเปลือก ความหนาเปลือก สีเนื้อ น้ำหนักเนื้อ ปริมาณความชื้น ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้

เมล็ด ได้แก่ ขนาดเมล็ด รูปร่างเมล็ด น้ำหนักเมล็ด

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำตารางเปรียบเทียบ เขียนคำบรรยายรายละเอียดของแต่ละสายพันธุ์ และทำรูปวิธานจำแนกพันธุ์ลำไย

1.2.3 การวิเคราะห์กลุ่มพืช

นำลักษณะของใบ ดอก ผล และเมล็ด มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ตามวิธีการของ Sneath and Sokal (1973) ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ โดยใช้โปรแกรม SPSS release 6.0 ซึ่งแทนค่าลักษณะต่างๆ ในการวิเคราะห์ดังนี้

สีใบแก่
0 สีเขียวอ่อน (pale green)
1 สีเขียว (green)
2 สีเขียวเข้ม (dark green)

รูปร่างใบ
0 รูปรี (elliptic)
1 รูปรีค่อนข้างแคบ (narrowlly elliptic)
2 รูปรีค่อนข้างกว้าง (broadly elliptic)
3 รูปรีขอบขนาน (elliptic-oblong)
4 รูปไข่ (ovate)
5 รูปไข่ค่อนข้างกว้าง (broadly ovate)
6 รูปใบหอก (lanceolate)

ปลายใบ
0 เรียวแหลม (acuminate)
1 แหลม (acute)
2 มน (obtuse)
3 เป็นติ่งแหลม (cuspidate)

สีดอก
0 สีครีมปนเหลือง (yellowish cream)
1 สีครีม (cream)
2 สีเหลือง (yellow)

รูปร่างผล
0 กลมเบี้ยว (globose-oblique)
1 กลมแป้น (oblate)
2 กลมแป้นเบี้ยว (oblate-oblique)
3 กลม (globose)

รูปร่างเมล็ด
0 กลม (globose)
1 กลมแป้น (oblate)
2 กลมเบี้ยว (globose-oblique)
3 กลมแป้นเบี้ยว (oblate-oblique)
4 เบี้ยว (oblique)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โคนใบ

0 รูปลิ่ม (cuneate)

1 รูปเฉียง (oblique)

2 รูปมน (obtuse)

2. การจำแนกพันธุ์โดยวิธีเซลล์พันธุศาสตร์

2.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

ตัวอย่างพืช ปลายรากจากกิ่งตอนหรือกิ่งชำ ของลำไยพันธุ์ดอ 20 สายพันธุ์

อุปกรณ์และสารเคมี ขวดแก้ว คีมคีบ เข็มเขี่ย แผ่นกระจกและแผ่นกระจกปิด กล้องจุลทรรศน์ กล้องถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์และฟิล์ม เอทธิลแอลกอฮอล์ กรดแอซิติกเข้มข้น กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล พาราไดคลอโรเบนซิน และสีย้อม (การเตรียมสารเคมีแสดงไว้ในภาคผนวก)

2.2 วิธีการ

2.2.1 การนับจำนวนโครโมโซม

2.2.1.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

1. การเก็บตัวอย่างรากโดยการตัดปลายรากที่งอกใหม่สีขาว ยาว 0.5-1.0 เซนติเมตร ในช่วงเวลา 10.00-10.30 นาฬิกา

2. การหยุดวงชีพเซลล์ โดยการแช่ปลายรากในสารละลายพาราไดคลอโรเบนซิน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น

3. การรักษาสภาพเซลล์ นำรากไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ นาน 5 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น

4. การย่อยแยกเซลล์ นำรากไปแช่ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น

5. การย้อมสีโครโมโซม นำรากที่ได้มาแช่ในสีย้อม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

6. การขยี้เนื้อเยื่อ นำตัวอย่างปลายรากที่ย้อมสีแล้วมาวางบนแผ่นกระจก โดยตัดเอาเฉพาะส่วนปลายสุดของราก ยาว 1-2 มิลลิเมตร หยดสีย้อมตรงบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ ใช้เข็มเขี่ยขยี้ปลายรากให้แยกออกจากกัน ปิดแผ่นกระจกด้วยแผ่นกระจกปิด ใช้กระดาษซับวางบนแผ่นกระจก แล้วใช้ปลายดินสอที่เรียบหรือจุกยางเคาะเบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจายแยกออกจากกัน และซับสีส่วนเกินออกไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.1.2 การบันทึกข้อมูล นำแผ่นกระจกไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมทาเฟส และมีโครโมโซมกระจายไม่ทับกัน นับจำนวนโครโมโซม และบันทึกภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.2.2 การทำอิดิโอแกรม

2.2.2.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

1. นำภาพถ่ายไปขยายด้วยเครื่องถ่ายเอกสาร โดยขยายที่ 200 เปอร์เซ็นต์ ให้หมายเลขโครโมโซมแต่ละแท่ง กำหนดตำแหน่งเซนโทรเมียร์และวัดโครโมโซมจากภาพถ่าย วัดความยาวโครโมโซมทั้งแท่ง (LT) วัดความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (Ll) และความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Ls) โดยใช้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์เป็นหลัก ตัดรูปโครโมโซมแล้วจัดคู่โครโมโซม

2. นำค่า Ll, Ls และ ΣLT มาคำนวณหาค่า Relative Length (RL) และค่า centromeric index (CI) โดยคำนวณจากสูตรของ Shiotani (1994) ดังนี้

$$\text{Relative Length (RL)} = \frac{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT=Ll+Ls)}}{\text{ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมทุกคู่ (ΣLT)}}$$

$$\text{Centromeric Index (CI)} = \frac{\text{ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (Ll)}}{\text{ความยาวของแขนโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT)}}$$

3. นำค่า CI มาใช้ในการกำหนดชนิดของโครโมโซมดังนี้ คือ

โครโมโซมที่มีค่า CI ระหว่าง 0.500-0.625 จัดเป็น metacentric chromosome

โครโมโซมที่มีค่า CI ระหว่าง 0.626-0.750 จัดเป็น submetacentric chromosome

โครโมโซมที่มีค่า CI ระหว่าง 0.751-0.875 จัดเป็น acrocentric chromosome

โครโมโซมที่มีค่า CI ระหว่าง 0.876-1.000 จัดเป็น telocentric chromosome

4. จัดขนาดของโครโมโซม โดยกำหนดโครโมโซมเป็น 3 ขนาด คือ ขนาดใหญ่ (large=L) ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 1 ซึ่งเป็นคู่ที่ยาวที่สุด โครโมโซมขนาดกลาง (medium=M) ได้แก่ โครโมโซมที่มีค่าความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมที่ยาวที่สุดรวมกับโครโมโซมที่สั้นที่สุด ส่วนโครโมโซมขนาดเล็ก (small=S) ได้แก่ โครโมโซมที่ความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยโครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. จัดเรียงโครโมโซมตามขนาดของโครโมโซมคู่ใหญ่ที่สุดไปหาคู่เล็กที่สุด และจัดตำแหน่งเซนโทรเมียร์ให้อยู่ในแนวเดียวกัน

2.2.2.2 การบันทึกข้อมูล บันทึกภาพถ่ายโครโมโซมที่ได้จัดเรียงไว้แล้ว

2.2.2.3 การวิเคราะห์กลุ่มพืช

นำข้อมูลที่ได้จากการทำอิดิโอแกรม โดยนำลักษณะของ ขนาดโครโมโซม และชนิดของโครโมโซมมาวิเคราะห์ หาความสัมพันธ์ตามวิธีการของ Sneath and Sokal (1973) ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ โดยใช้โปรแกรม SPSS release 6.0 ซึ่งแทนค่าลักษณะต่างๆ ในการวิเคราะห์ดังนี้

ขนาดโครโมโซม (เล็ก กลาง ใหญ่)
0 พบ 2 ขนาด
1 พบ 3 ขนาด

ความยาวโครโมโซมทั้งหมด
0 ยาว 0-50 ไมครอน
1 ยาว 51-100 ไมครอน

โครโมโซมชนิด metacentric chromosome
0 ไม่พบ
1 พบ

โครโมโซมชนิด submetacentric chromosome
0 ไม่พบ
1 พบ

โครโมโซมชนิด acrocentric chromosome
0 ไม่พบ
1 พบ

3. การจำแนกพันธุ์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

ตัวอย่างพืช ใบที่เจริญเติบโตเต็มที่ของลำไยพันธุ์ดอ 20 สายพันธุ์

อุปกรณ์และสารเคมี กระติกน้ำแข็ง ถุงพลาสติก ยางรัด ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิต่ำที่ –20 องศาเซลเซียส เครื่องชั่งอย่างละเอียด โกร่งบด เครื่องหมุนเหวี่ยงตัวอย่างชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ Eppendrof tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เครื่องแก้วต่างๆ ถุงมือ กระดาษกรอง ช้อนตักสาร เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง หลอดใส่สารปรับปริมาตรได้ขนาด 100 ไมโครลิตร หลอดหยด micropipette พร้อม yellow tips ชุดสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแผ่น เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ไนโตรเจนเหลว polyvinyl-polypyrolidone (PVPP), Tris (hydroxymethyl) aminomethane, NaCl,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

cysteine, ascorbic acid, $CaCl_2$, Na_2EDTA, nicotine, polyacrylamide, N,N-methylene bisacrylamide, ammonium persulphate (APS), glycine, HCl, H_2O_2, monobasic sodium phosphate, dibasic sodium phosphate, β-napthol, acetone, $MgCl_2$, fast blue-B salt, acetate buffer 0.5 M pH 4.8, α- napthyl acid phosphate, phosphate buffer 0.1 M pH 6.0, α- napthyl acetate, acetic acid, L-malic acid, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), nitro blue tetrazolium (NBT), phenazine meso sulphate (PMS), sodium acetate, 3 amino-9 ethylcarbazole, bromophenol blue, glycerol

3.2 วิธีการ

3.2.1 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

1.การเตรียมตัวอย่างพืช

เตรียมตัวอย่างตามวิธีของ Hiratsuka *et al.* (1986) อ้างโดยปนัดดา (2541) คือ เก็บตัวอย่างใบที่เจริญเต็มที่ของลำไยแต่ละสายพันธุ์ ล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด เช็ดใบให้แห้ง ตัดใบให้เป็นชิ้นเล็ก นำไปชั่งตัวอย่างละ 1 กรัม (ตัวอย่างสำหรับการย้อมสี malate dehydrogenase และ acid phosphatase ชั่ง 2 กรัม ใส่ PVPP 0.2 กรัม) เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อให้ใบแข็งตัวเป็นผลึกน้ำแข็ง บดตัวอย่างใบในโกร่งพร้อมกับเติมไนโตรเจนเหลว เพื่อให้การบดง่ายขึ้น ใส่ extraction buffer 3 มิลลิลิตร และ PVPP 0.1 กรัม บดให้ละเอียด นำไปปั่นให้ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที รินเอาเฉพาะส่วนใส (supernatant) เก็บไว้ในหลอด Eppendrof สำหรับใช้ทดสอบในลำดับต่อไป เมื่อจะทำการวิเคราะห์จึงผสม supernatant 90 เปอร์เซ็นต์ กับ marker 10 เปอร์เซ็นต์ เขย่าให้เข้ากัน

2.การเตรียม slab gel

ทำความสะอาดแผ่นกระจกโดยการเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ประกอบชุดแผ่นแก้วสำหรับทำ slab gel ดูดสารละลาย separating gel ลงระหว่างแผ่นแก้วทั้งสองด้านอย่างช้าๆ เพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศ สอดหวีเสียบลงในเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวดึงหวีเสียบออกจากเจล

3.การประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส

ประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสเข้าด้วยกัน เติม electrode buffer ลงใน chamber

4.การหยอดตัวอย่าง

ใช้หลอดใส่สารปรับปริมาตรดูดตัวอย่างพืชลงบนเจลแต่ละช่อง ช่องละ 75 ไมโครลิตร โดยใส่ 1 ช่องต่อ 1 ตัวอย่าง ระวังอย่าให้ฟุ้งกระจาย และเกิดฟองอากาศ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.การผ่านกระแสไฟฟ้า

ต่อขั้วบวกและขั้วลบเข้ากับ chamber ด้านซ้ายและขวา เปิดสวิตช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า กำหนดกระแสไฟฟ้าเป็น 60 มิลลิแอมแปร์ ใช้เวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง หรือสังเกตจากสีของ bromophenol blue เมื่อห่างจากขอบกระจกด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดสวิตช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า นำแผ่นกระจกออกจาก chamber ทำเครื่องหมายโดยตัดขอบเจลด้านล่างเพื่อเป็นสัญลักษณ์ให้ทราบตำแหน่งเริ่มต้นของตัวอย่างเอนไซม์

6.การย้อมสี

แกะเจลออกจากแผ่นกระจก นำเจลมาวางบนกล่องพลาสติกที่มีสีย้อมเอนไซม์แต่ละชนิดอยู่ (การเตรียมสีย้อมแสดงไว้ในภาคผนวก)

3.2.2 การบันทึกข้อมูล

บันทึกภาพถ่ายของแถบสีที่ปรากฏบนเจล ศึกษารูปแบบของไอโซไซม์จากตำแหน่ง จำนวน และความหนาแถบสีที่เกิดขึ้น เขียนไซโมแกรมโดยใช้ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rm) ตามสูตรของอาภัสสรา (2537)

$$\text{ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rm)} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสี}}{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของ bromophenol blue}}$$

3.2.3 การวิเคราะห์กลุ่มพืช

นำค่าการมีแถบสี และไม่มีแถบสีของแต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์กลุ่มพืช (cluster analysis) โดยกำหนดให้ตัวอย่างพืชเป็น operational taxonomic unit (OTU) และแถบสีเป็นลักษณะ (character) (Sneath and Sokal, 1973) นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ความแตกต่างของสายพันธุ์ลำไย ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ โดยใช้โปรแกรม SPSS release 6.0

4. การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลำไยพันธุ์ดอ 20 สายพันธุ์ ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เซลล์พันธุศาสตร์ และอิเล็กโทรโฟรีซิสร่วมกัน ลักษณะสัณฐานวิทยา ได้แก่ สีใบแก่ รูปร่างใบ ปลายใบ โคนใบ สีดอก รูปร่างผล และรูปร่างเมล็ด เซลล์พันธุศาสตร์ ได้แก่ ขนาดโครโมโซม และชนิดโครโมโซม และอิเล็กโทรโฟรีซิส ได้แก่ ค่าการมีแถบสี และไม่มีแถบสีที่ปรากฏบนเจล นำข้อมูลทั้ง 3 วิธีการมาวิเคราะห์ร่วมกัน โดยการวิเคราะห์กลุ่มพืชตามวิธีการของ (Sneath and Sokal, 1973) ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ โปรแกรม SPSS release 6.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. สวนลำไยการค้า และสวนหลังบ้านของเกษตรกร จังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดลำพูน
3. แปลงรวบรวมพันธุ์ของศูนย์วิจัยเกษตรหลวง จังหวัดเชียงใหม่

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ระหว่างเดือนธันวาคม 2544 ถึง เดือนธันวาคม 2546

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved