บทที่ 3
อุปกรณ์ และวิธีการ

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสาคูในประเทศไทย เป็นการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา กายวิภาคศาสตร์ เซลล์วิทยา แบบแผนของ allozyme สรีรวิทยาของการเจริญเติบโต และกายวิภาคศาสตร์ของเม็ดแป้ง รวม 6 การทดลอง โดยใช้ตัวอย่างพืชเหมือนกันทุกการทดลอง คือ เชื้อพันธุกรรมของสาคูที่รวบรวมมาจากพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย และนำไปปลูกในแปลงรวบรวมพันธุ์ของภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ รวม 13 ตัวอย่าง (accession) ได้แก่ สาคูวิลาส 9 ตัวอย่าง สาคูด่าง 1 ตัวอย่าง และสาคูจีน 3 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3) ศึกษาลักษณะ และประเมินค่า รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้ข้อมูลจากการทดลองร่วมกัน

ตารางที่ 3 ตัวอย่างสาคูที่รวบรวมได้ทั้งหมด 13 ตัวอย่าง

หมายเลขตัวอย่าง	ชื่อสามัญ	ตระกูล	สถานที่รวบรวม	หมายเหตุ
1	สาคูวิลาส	Marantaceae	151 หมู่ 12 ต.หนองเหียง อ.พนัสนิคม จ.ชลบุรี	
2	สาคูวิลาส	Marantaceae	สวนสมุนไพรเทพประชุมพร 24/4 หมู่ 2 ต.ป่าเมี่ยง อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	ปลูกส่งโรงงานอุตสาหกรรม
3	สาคูวิลาส	Marantaceae	สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่	
4	สาคูวิลาส	Marantaceae	ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ อ.หางดง จ.เชียงใหม่	
5	สาคูวิลาส	Marantaceae	ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	เหง้ามีขนาดใหญ่
6	สาคูวิลาส	Marantaceae	หมู่ 5 ต.ดงลคร อ.เมือง จ.นครนายก	
7	สาคูวิลาส	Marantaceae	36 หมู่ 14 ต.นายายอาม อ.นายายอาม จ.จันทบุรี	เหง้ามีลักษณะยาว
8	สาคูวิลาส	Marantaceae	10 หมู่ 13 ต.วังน้ำเย็น อ.วังน้ำเย็น จ.สระแก้ว	เรียว
9	สาคูวิลาส	Marantaceae	ต.สระสี่เหลี่ยม อ.พนัสนิคม จ.ชลบุรี	เหง้ามีขนาดใหญ่
10	สาคูด่าง	Marantaceae	สวนสมุนไพรเทพประชุมพร 24/4 หมู่ 2 ต.ป่าเมี่ยง อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	ใบด่าง (เขียว-ขาว)
11	สาคูจีน	Cannaceae	ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	
12	สาคูจีน	Cannaceae	33 หมู่ 14 ต.นายายอาม อ.นายายอาม จ.จันทบุรี	
13	สาคูจีน	Cannaceae	19 หมู่ 14 ต.นายายอาม อ.นายายอาม จ.จันทบุรี	เหง้ามีขนาดใหญ่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 1 สัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาคู เขียนคำบรรยายรายละเอียด (descriptions) สร้างรูปวิธาน (keys) และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

1.1 วัสดุ และอุปกรณ์

พืชตัวอย่าง ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ป้ายชื่อ ไม้บรรทัด ตลับเมตร เวอร์เนียคาลิปเปอร์ มีดกรรไกร เสียม ถุงพลาสติกขนาดต่างๆ เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส กล้องจุลทรรศน์ กระดาษหรือสมุดจดบันทึก ปากกาหรือดินสอสำหรับจดบันทึก กล้องถ่ายรูป และฟิล์มสี

1.2 วิธีการทดลอง

1. การเตรียมพืชทดลอง

นำพืชตัวอย่างที่รวบรวมได้ ไปปลูกในแปลงรวบรวม ขนาดกว้าง 80 เซนติเมตร ยาว 100 เซนติเมตร และบำรุงด้วยปุ๋ยประมาณ 2 สัปดาห์ต่อครั้ง

2. การบันทึกข้อมูล

บันทึกลักษณะ และความเบี่ยงเบนของลักษณะทางคุณภาพ และสุ่มวัดค่าของลักษณะทางปริมาณ โดยใช้ตัวอย่างพืชจากต้นที่ปลูกลงแปลงรวบรวมเป็นเวลานาน 8 เดือนขึ้นไป ตัวอย่างละ 10 ข้อมูล (ยกเว้นบางข้อมูลมีจำนวนไม่ถึง 10) บันทึกข้อมูลของลักษณะทางปริมาณ (ตารางที่ 4) เป็นค่าเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด-สูงสุด)

เขียนคำบรรยายรายละเอียดลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชตัวอย่าง สร้างรูปวิธาน (keys) ของสาคู และนำข้อมูลทางปริมาณที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบ

3. การบันทึกภาพ

ศึกษาลักษณะโครงสร้างภายนอกของต้นพืช ลักษณะโครงสร้างของดอกโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ถ่ายภาพ และบันทึกเป็นโครงสร้างดอกตามยาว แผนผังดอก และสูตรดอก ในลักษณะของภาพวาดลายเส้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การวิเคราะห์กลุ่มพืช

ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สร้าง Descriptor list ของสาดู แล้วใช้วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยวิธีจัดจำแนกด้วยตัวเลข ตามวิธีการที่เสนอโดย Sneath and Sokal (1973) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ non-parametric ด้วยโปรแกรม SPSS for Window version 6.0

ตารางที่ 4 ลักษณะทางคุณภาพ และลักษณะทางปริมาณที่ใช้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะ	คุณภาพ	ปริมาณ
ลำต้น-พุ่มต้น	- การแตกกิ่ง	- ความสูง
	- สี	- ความกว้าง
	- การเรียงใบ	
	- ตำแหน่งใบ	
ใบ (ใบคู่ที่ 3 จากปลายยอด)	- รูปร่าง	- ความยาว
	- ขอบใบ	- ความกว้าง
	- ปลายใบ	- ความหนา
	- ฐานใบ	
	- ผิวใบ	
	- สี	
	- รอยต่อใบ	
	- ก้านใบ	
ช่อดอก และดอก	- การเรียงดอก	- ความยาวช่อดอก
	- การบาน	- เส้นผ่าศูนย์กลางช่อดอก
	- สีกลีบเลี้ยง	- จำนวนดอกต่อช่อ
	- สีกลีบดอก	- ความยาวดอก
	- จำนวนออวุลในรังไข่	
เหง้า	- รูปร่าง	- ความยาว
	- การปรากฏใบเกล็ด	- เส้นผ่าศูนย์กลาง
	- สีผิว	- น้ำหนักสด
	- สีเนื้อ	- น้ำหนักแห้ง
	-การปรากฏกลุ่มเส้นใย	- ความยาวปล้อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 กายวิภาคศาสตร์

ศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อพืช ตามวิธีของ Johansen (1940) and Sass (1966) โดยใช้เทคนิค paraffin embedding เพื่อเตรียมสไลด์ถาวรสำหรับการศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของพืช และใช้เป็นข้อมูลหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

2.1 วัสดุ และอุปกรณ์

เนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ของสาคู มีดผ่าตัดปลายแหลม คีมปลายแหลม ขวดแก้ว อุปกรณ์เครื่องแก้ว กระดาษกรอง โถสุญญากาศติดเครื่องดูดอากาศ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส (hot air oven) เตาไฟฟ้า (hot plate) กระดาษมัน กระดาษกาว เข็มเขี่ย กรรไกรขนาดเล็ก ถุงซิปสำลี เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน (rotary microtome) พร้อมมีด (microtome knife) แท่งไม้ขนาด 1.5x1.5x1.5 เซนติเมตร (ที่ต้มให้อิ่มตัวใน paraffin) ไฟแช็ก ตะเกียงแอลกอฮอล์ พู่กันขนอ่อน 2 อัน ที่รองรับ ribbon section กระดาษทิชชู กระดาษ label แผ่นสไลด์ แผ่นปิดสไลด์ เครื่องให้ความร้อนสำหรับอุ่นแผ่นสไลด์ (slide warmer) กล่องใส่สไลด์ ขวดแก้วย้อมสี กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และ photomicroscope และฟิล์มสี

2.2 สารเคมี

ethyl alcohol 95%, glacial acetic acid, formalin, absolute alcohol, tertiary butyl alcohol (TBA), สี erythrosine, xylene, liquid paraffin, paraffin (paraplast), ไข่ขาว, sodium benzoate, ammonium aluminium sulfate, methyl alcohol, glycerol และ Canada balsam

2.3 วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ

เลือกพืชปกติที่มีสภาพสมบูรณ์ ใช้มีด และกรรไกรตัดเนื้อเยื่อส่วนที่อ่อนเป็นชิ้นเล็กๆ

2. การฆ่า และรักษาสภาพเนื้อเยื่อ

นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชที่ได้ใส่ขวดแก้วบรรจุน้ำยา FAA (วิธีเตรียมดูในภาคผนวก) แช่เนื้อเยื่อให้ท่วมน้ำยา ทิ้งไว้ประมาณ 2 สัปดาห์ เพื่อให้โพรโทพลาซึม (protoplasm) ภายในเซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หยุดกระบวนการต่างๆ โดยที่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นน้อยที่สุด และสามารถเก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ในสภาพที่ใกล้เคียงเซลล์ปกติให้มากที่สุด สำหรับเนื้อเยื่อที่ไม่จมน้ำยา นำขวดบรรจุเนื้อเยื่อไปใส่โถสุญญากาศติดเครื่องดูดอากาศเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากเนื้อเยื่อจนกว่าเนื้อเยื่อจม

3. การดึงน้ำออกจากเซลล์

ใช้ TBA เป็นสารที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ ซึ่ง TBA มีคุณสมบัติตัวกลางระหว่างน้ำและพาราฟิน (paraffin) (ภูวดล, 2528)

นำเนื้อเยื่อที่ผ่านการฆ่า และรักษาสภาพแล้ว แช่ในน้ำยาสำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์ (วิธีเตรียมดูในภาคผนวก) โดยผ่านเนื้อเยื่อลงในน้ำยาจากระดับ 50% ถึงระดับ 95% ใช้ระยะเวลาระดับละ 24 ชั่วโมง และผ่านน้ำยาระดับ 100% และ TBA บริสุทธิ์ ระยะเวลาระดับละ 72 ชั่วโมง

4. การทำให้พาราฟินแทรกซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อ

นำเนื้อเยื่อที่ผ่านการดึงน้ำออกจากเซลล์แล้ว แช่ใน TBA ผสมพาราฟินเหลว (liquid paraffin) (1:1) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงผ่านเนื้อเยื่อลงในพาราฟินบริสุทธิ์ซึ่งหลอมเตรียมไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสก่อนแล้ว 24 ชั่วโมง และเก็บเนื้อเยื่อไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ จนที่ว่างภายในเนื้อเยื่ออิ่มตัวด้วยพาราฟิน

5. การฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน

การเอาเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟิน โดยหล่อเหมือนวัตถุในแม่พิมพ์ (boat) พาราฟินจะแข็งตัว และทำหน้าที่ยึดห่อหุ้มให้เนื้อเยื่อพืชสามารถรับคมมีดได้เต็มที่ และไม่ให้เนื้อเยื่อบางส่วนหลุดออกไปในขณะตัด

เตรียมขวดเนื้อเยื่อ และพาราฟินบริสุทธิ์ที่หลอมไว้ล่วงหน้า และกระดาษมันพับเป็นรูปแม่พิมพ์ บนเตาไฟฟ้าที่ปรับอุณหภูมิไว้ 56 องศาเซลเซียสแล้ว จากนั้นเทพาราฟินลงในแม่พิมพ์โดยให้ระดับพาราฟินต่ำกว่าขอบแม่พิมพ์เล็กน้อย แล้วใช้คีมหนีบเนื้อเยื่อใส่ลงไป จากนั้นใช้เข็มเขี่ยไล่ฟองอากาศที่อยู่บริเวณขอบแม่พิมพ์ และชิ้นส่วนเนื้อเยื่อออกให้หมด เสร็จแล้วนำมาวางบนโต๊ะที่เรียบ โดยก่อนวางแม่พิมพ์ควรใช้กระดาษรองพื้นโต๊ะก่อน ระหว่างรอพาราฟินเย็นตัวต้องจัดตำแหน่งของเนื้อเยื่อให้อยู่ระนาบที่นำไปตัดได้ตามวัตถุประสงค์ (แนวตั้ง และแนวนอน) จึงปล่อยให้พาราฟินแข็งตัว หลังจากพาราฟินแข็งตัวดีแล้วจึงแกะกระดาษออก จะได้รูปพาราฟินเป็นแท่งสี่เหลี่ยมที่ข้างในมีเนื้อเยื่ออยู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. การตัดเนื้อเยื่อ

ตัดแต่งแท่งพาราฟินที่ฝังเนื้อเยื่อไว้เป็นรูปสี่เหลี่ยมให้ตรงกลางเป็นเนื้อเยื่อ โดยมีพาราฟินล้อมรอบหนาเท่าๆ กันทุกด้าน แล้วนำไปติดกับแท่งไม้โดยใช้พาราฟินหลอมเป็นตัวยึด แล้วนำไปใส่เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน ที่ปรับความหนาระหว่าง 12-18 ไมโครเมตร ตัดให้เป็นแผ่น ribbon ออกมาตรงและมีความยาวต่อเนื่องไม่ฉีกขาด นำไปวางบนกระดาษรองรับแผ่น ribbon ที่เตรียมไว้

7. การติด ribbon บนแผ่นสไลด์

เลือก ribbon บริเวณที่ต้องการตามวัตถุประสงค์ของการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ แล้วใช้มีดตัดออกเป็นช่วงสั้นๆ โดยคำนึงถึงกระจกปิดแผ่นสไลด์ นำไปวางบนแผ่นสไลด์ใหม่สะอาดไม่มีคราบไขมันติด หยดน้ำยา adhesive (วิธีเตรียมดูในภาคผนวก) ที่เตรียมไว้ แล้วนำไปวางบนเครื่องให้ความร้อนสำหรับอุ่นแผ่นสไลด์ ที่อุณหภูมิ 40-42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้แผ่น ribbon คลี่ตัว และแผ่ออก และแห้งแนบติดแผ่นสไลด์ไม่หลุดขณะย้อมสี

8. การย้อมสี

โดยผ่านแผ่นสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อพืชติดอยู่ ในน้ำยาต่างๆ 16 ขั้นตอน ใช้เวลาขั้นตอนละ 3-5 นาที ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

- xylene
- xylene + absolute alcohol ในอัตราส่วน 1:1
- xylene + ethyl alcohol 95% ในอัตราส่วน 1:1
- ethyl alcohol 95%
- ethyl alcohol 70%
- ethyl alcohol 50%
- ethyl alcohol 30%
- สี hematoxylin (วิธีเตรียมดูในภาคผนวก)
- น้ำสะอาด
- ethyl alcohol 30%
- ethyl alcohol 50%
- ethyl alcohol 70%
- ethyl alcohol 95%
- ethyl alcohol 100% + xylene ในอัตราส่วน 1:1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- absolute alcohol + xylene ในอัตราส่วน 1:1
- ethyl alcohol 100%

9. การปิดแผ่นสไลด์

หลังย้อมสี นำมาทำความสะอาดอีกครั้งด้วยมีด ขูดคราบสีย้อมออก เช็ดด้วยไม้พันสำลีชุบ xylene แล้วใช้ Canada balsam ผสม xylene เข้มข้นพอดีหยดลงบนแผ่นสไลด์ แล้วปิดทับด้วยแผ่นปิดสไลด์ ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เก็บไว้ในกล่องใส่สไลด์ แล้วทิ้งแผ่นสไลด์ไว้ให้แห้งสนิท

10. การบันทึกข้อมูล

นำแผ่นสไลด์ที่ได้ไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ และถ่ายภาพที่กำลังขยายต่างๆ ศึกษาความแตกต่างของลักษณะปรากฏของเนื้อเยื่อ

11. การวิเคราะห์กลุ่มพืช

ใช้ลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ สร้าง Descriptor list ของสาดู แล้วใช้วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยวิธีจัดจำแนกด้วยตัวเลข ตามวิธีการที่เสนอโดย Sneath and Sokal (1973) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ non-parametric ด้วยโปรแกรม SPSS for Window version 6.0

การทดลองที่ 3 เซลล์วิทยา

ศึกษาจำนวน ชนิด และขนาดของโครโมโซม จากเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวในระยะเมทาเฟส ตามวิธีการของ Shiotani (1994) เพื่อใช้ข้อมูลทางแคริโอไทป์ วิเคราะห์ จำแนกโครโมโซม ทำแผนที่โครโมโซม และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

3.1 วัสดุ และอุปกรณ์

พืชตัวอย่าง ขวดแก้ว คีมปลายแหลม เครื่องอุ่น (oven) เทอร์โมมิเตอร์ หลอดหยด ตู้เย็น แผ่นสไลด์ แผ่นปิดสไลด์ เข็มเขี่ย ใบมีดผ่าตัด กระดาษทิชชู ยาทาเล็บสีใส กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และ photomicroscope และฟิล์มสี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 สารเคมี

para-dichlorobenzene, ethyl alcohol 95%, glacial acetic acid, HCl 1 N, basic fuchsin, ethanol 70%, phenol 5% formaldehyde และ sorbitol

3.3 วิธีการทดลอง

1. การเตรียมปลายราก

นำหน่อของพืชตัวอย่างมาเพาะให้ออกราก โดยแช่น้ำสะอาดทิ้งไว้ รอจนออกรากใหม่

2. การหยุดวงชีพของเซลล์

ตัดส่วนของปลายรากที่กำลังเจริญเติบโต โดยให้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ในช่วงเวลาประมาณ 9.00 นาฬิกา ใส่ลงในขวดที่บรรจุ para-dichlorobenzene ที่อิ่มตัวในน้ำ แช่ทิ้งไว้นาน 3-4 ชั่วโมง เพื่อยับยั้งการเกิด spindle fiber ทำให้โครโมโซมซึ่งประกอบด้วย 2 โครมาทิดไม่ถูกดึงไปแต่ละขั้วของเซลล์ และกระจายตัวทั่วภายในเซลล์ ซึ่งโครโมโซมในระยะดังกล่าวจะหดตัวอย่างเต็มที่ ง่ายต่อการศึกษาจำนวน และรูปร่าง ล้างออกด้วยน้ำสะอาด

3. การรักษาสภาพเซลล์

นำส่วนของปลายรากไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ที่มีส่วนประกอบของ glacial acetic acid กับ absolute ethanol ในอัตราส่วน 1:3 ทิ้งไว้นาน 5 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเซลล์ให้เร็วที่สุด และมีสภาพเหมือนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ เนื่องจากน้ำยารักษาสภาพเซลล์ไปมีผลทำให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนสภาพขึ้น ล้างออกด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง

4. การย่อยสลายเนื้อเยื่อ

นำส่วนของปลายรากไปแช่ใน HCl เข้มข้น 1 N ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในเครื่องอุ่นนาน 5 นาที เพื่อที่จะให้เซลล์ที่ปลายรากแยกตัวออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ให้มากที่สุด เพื่อเป็นการลดจำนวนเซลล์ที่อยู่ซ้อนกันหลายๆ ชั้น โดยใช้กรดช่วยทำลายโครงสร้างที่ยึดระหว่างเซลล์ ล้างออกด้วยน้ำสะอาด

5. การย้อมสีโครโมโซม

นำส่วนของปลายรากไปแช่สีย้อม carbol fuchsin (วิธีเตรียมดูในภาคผนวก) เก็บไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 24 ชั่วโมงขึ้นไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. การเตรียมสไลด์

นำส่วนของปลายรากที่ได้ วางบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ใช้ใบมีดตัดส่วนปลายของรากยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร คีบเอาส่วนที่เหลือทิ้งไป หยดสีย้อม carbol fuchsin 1 หยด ใช้ด้ามของเข็มเขี่ยขยี้ให้เซลล์แตกกระจาย วางแผ่นปิดสไลด์ปิดทับลงไป ใช้กระดาษทิชชูซับ และวางทับบนแผ่นสไลด์ แล้วใช้ด้ามเข็มเขี่ยเคาะบนแผ่นปิดสไลด์เบาๆ เพื่อให้เซลล์แบนแนบติดแผ่นสไลด์และทำให้เซลล์กระจายตัวมากยิ่งขึ้น

7. การนับจำนวนโครโมโซม

นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมทาเฟส มีการกระจายตัว ไม่ทับกัน นับจำนวนโครโมโซม และบันทึกภาพ

8. การวัดขนาดโครโมโซม

ขยายขนาดภาพ ศึกษารูปร่าง ลักษณะ กำหนดตำแหน่งเซนโทรเมียร์ วัดความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (LT) วัดความยาวของแขนข้างที่ยาว (Ll) และวัดความยาวของแขนข้างที่สั้น (Ls) โดยใช้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์เป็นหลัก

9. การกำหนดชนิดของโครโมโซม

นำค่า LT, Ll และ Ls มาคำนวณหาค่าความยาวสัมพัทธ์ (relative length ; RL) และดัชนีเซนโทรเมียร์ (centromeric index ; CI) ตามวิธีการของกันยารัตน์ (2532) โดยคำนวณจากสูตร ดังนี้

$$\text{ความยาวสัมพัทธ์ (RL)} = \frac{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (LT=Ll+Ls)}}{\text{ผลบวกความยาวของโครโมโซม } (\Sigma LT)}$$

$$\text{ดัชนีเซนโทรเมียร์ (CI)} = \frac{\text{ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (Ll)}}{\text{ความยาวของแขนโครโมโซมแต่ละคู่ (LT)}}$$

นำค่า CI มาใช้ในการกำหนดชนิดของโครโมโซมได้ดังนี้คือ

- โครโมโซมที่มีค่า CI ระหว่าง 0.500-0.599 จัดเป็น metacentric chromosome
- โครโมโซมที่มีค่า CI ระหว่าง 0.600-0.699 จัดเป็น submetacentric chromosome
- โครโมโซมที่มีค่า CI ระหว่าง 0.700-0.899 จัดเป็น acrocentric chromosome
- โครโมโซมที่มีค่า CI ระหว่าง 0.900-1.000 จัดเป็น telocentric chromosome

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10. การจำแนกขนาดของโครโมโซม

กำหนดให้โครโมโซมเป็น 3 ขนาด คือ

- ขนาดใหญ่ (large = L) คือ โครโมโซมคู่ที่ 1 ซึ่งเป็นคู่ที่ยาวที่สุด

- ขนาดกลาง (medium = M) คือ โครโมโซมที่มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ใหญ่ที่สุดรวมกับคู่เล็กที่สุด (M < (LT เฉลี่ยคู่ที่ 1 + LT เฉลี่ยคู่สุดท้าย) / 2)

- ขนาดเล็ก (small = S) คือ โครโมโซมที่มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ใหญ่ที่สุด (S < LT เฉลี่ยคู่ที่ 1 / 2)

11. การทำแผนที่โครโมโซม

จับคู่โครโมโซมที่มีรูปร่าง และลักษณะเหมือนกัน จัดเรียงโครโมโซมตามขนาดของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่สุดไปหาคู่ที่เล็กสุด โดยให้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์อยู่ในแนวเดียวกัน

12. การวิเคราะห์กลุ่มพืช

ใช้ข้อมูลทางเซลล์วิทยา สร้าง Descriptor list ของสาคู แล้วใช้วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยวิธีจัดจำแนกด้วยตัวเลข ตามวิธีการที่เสนอโดย Sneath and Sokal (1973) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ non-parametric ด้วยโปรแกรม SPSS for Window version 6.0

การทดลองที่ 4 แบบแผนของ allozyme

จำแนกความแตกต่างของสาคูที่เก็บรวบรวมได้ 13 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค Polyacryamide Gel Electrophoresis (PAGE) และเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ acid phosphatase (ACP), esterase (EST), malate dehydrogenase (MDH) และ peroxidase (PER) เพื่อศึกษาแบบแผนการกระจายตัวของ allozyme และเพื่อนำไปหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสาคูที่เก็บรวบรวมได้ทั้งหมด

4.1 วัสดุ และอุปกรณ์

ตัวอย่างใบอ่อนของสาคู เครื่องชั่งอย่างละเอียด โกร่งบด ไนโตรเจนเหลวและถังบรรจุ เครื่องหมุนเหวี่ยงตัวอย่าง eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร micro-pipette และ adjustable automatic pipette พร้อม tip ตู้ทำความเย็นควบคุมอุณหภูมิที่ 4 และ –20 องศาเซลเซียส เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) หลอดใส่สารปรับปริมาตร ชุดสำหรับอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแผ่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เครื่องจ่ายกระแสไฟของ LKB model 2001 กระดาษกรอง กล่องพลาสติก อุปกรณ์เครื่องแก้ว ถุงมือ กล้องถ่ายรูป และฟิล์มสี

4.2 สารเคมี

polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris), HCl, NaCl, cysteine, ascorbic acid, $CaCl_2$, Na_2-ethylene diamine tetraacetate (Na_2-EDTA), nicotine, bromophenol blue, glycine, glycerol, N, N, N′, N′-tetramethylethlenediamine (TEMED), acrylamide, N,N-methylene bisacrylamide gel, ammonium persulfate, 3 amino-9 ethylcarbazole, β-napthol, acetone, Tris-hydroxymethyl aminomethane, acetic acid, H_2O_2, $C_2H_2O_2Na_3H_2O$ $C_2H_3O_2Na_3H_2O$, fast blue-B salt, 1% napthyl acid phosphate (monosodium salt), $MgCl_2$ 10%, α-naphtylacetate, β-naphtylacetate, L-malic acid, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 10%, nitroblue tetrazolium (NBT) 10% และ phenazine methosulfate (PMS) 10%

4.3 วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

เก็บใบอ่อนของต้นสาคูจากแปลงปลูก โดยนำตัวอย่างพืชแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดลองมาล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด เช็ดให้แห้ง ตัดใบให้เป็นชิ้นเล็กๆ นำไปชั่งตัวอย่างละ 1 กรัม

2. การสกัดเอนไซม์

นำตัวอย่างพืชที่ได้แต่ละชนิดมาบดในโกร่งพร้อมกับเติมไนโตรเจนเหลว เพื่อให้ใบกรอบและบดง่ายขึ้น ใส่ extraction buffer (วิธีเตรียมดูในภาคผนวก) ปริมาณ 3 มิลลิลิตร และ PVPP หนัก 0.4 กรัม บดพร้อมตัวอย่างให้เข้ากันจนละเอียด บรรจุสารละลายตัวอย่างที่ได้ลงใน eppendorf tube แล้วนำไปปั่นแยกส่วนให้ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที ดูดของเหลวส่วนที่ใส (supernatant) ที่ได้นำมาเข้าเครื่องเหวี่ยงอีกครั้ง แล้วจึงดูด supernatant ที่ได้เก็บใน eppendorf tube แล้วเก็บเพื่อรักษาสภาพไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ทดสอบขั้นตอนต่อไป เมื่อจะทำการวิเคราะห์จึงผสม supernatant กับ marker (วิธีเตรียมดูในภาคผนวก) อัตราส่วน 1 : 10 เขย่าให้เข้ากัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การเตรียมเจล

ทำความสะอาดแผ่นกระจกโดยเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70% ประกอบชุดแผ่นกระจกสำหรับทำ slab gel ใช้ spacer เป็นตัวปรับความหนาของ gel ใส่ running gel (วิธีเตรียมดูในภาคผนวก) ที่เตรียมไว้ลงระหว่างแผ่นแก้วด้านใดด้านหนึ่งอย่างช้าๆ เพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศ เสียบหวีเสียบ (comb) ลงในเจล ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดในช่องของหวีเสียบ ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวดึงหวีเสียบ ออกจากเจล ล้างช่องว่างระหว่างเจล (well) ด้วยน้ำกลั่น แล้วดูดน้ำกลั่นออกให้หมด

4. การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

ประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเติม electrode buffer (วิธีเตรียมดูในภาคผนวก) ลงใน chamber หยอดตัวอย่างเอนไซม์ลงในช่องว่างบน running gel ช่องละหนึ่งตัวอย่าง โดยใช้หลอดใส่สารปรับปริมาตร ค่อยๆ หยอดผ่าน buffer ลงในช่องเจล ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ระวังอย่าให้ตัวอย่างฟุ้งกระจาย ต่อขั้วบวก และขั้วลบเข้ากับ chamber ด้านซ้าย และขวา เปิดสวิตช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยควบคุมกระแส 60 มิลลิแอมแปร์ และควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ตัวอย่างที่มี marker ก็จะเคลื่อนที่ลงมา จนระดับของ marker อยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่นเจล ประมาณ 1 นิ้ว จึงปิดสวิตช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า นำแผ่นกระจกออกจาก chamber วัดระยะห่างระหว่างขอบเจลกับ marker ทำเครื่องหมายโดยตัดขอบเจลด้านล่างเพื่อเป็นสัญลักษณ์ให้ทราบว่าตัวอย่างเอนไซม์เริ่มต้นที่ใด ค่อยๆ แกะเจลออกจากแผ่นกระจก นำเจลวางบนกล่องพลาสติกที่มีสีย้อมเอนไซม์แต่ละชนิดอยู่

5. การย้อมสีเอนไซม์

เตรียมสีย้อมเอนไซม์ 4 ชนิด คือ acid phosphatase (ACP), esterase (EST), malate dehydrogenase (MDH) และ peroxidase (PER) (วิธีเตรียมดูในภาคผนวก) นำแผ่นเจลไปย้อมสี โดยทำปฏิกิริยากับ substrate ของเอนไซม์แต่ละชนิด เก็บไว้ในที่มืดอุณหภูมิห้อง ใช้เวลาย้อมจนกว่าจะเห็นแถบสีชัดเจน จากนั้นล้างเจลให้สะอาด และเก็บเจลในกรดแอซิติกเข้มข้น 7% (วิธีเตรียมดูในภาคผนวก) เพื่อล้างสีส่วนเกิน และตรึงสีย้อม

6. การบันทึกข้อมูล

นำเจลที่ย้อมสีแล้วมาศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ บันทึกการแสดงออกของไอโซไซม์แต่ละชนิดของพันธุ์สาคูที่ได้เป็นภาพถ่ายของแถบสี และเขียนแผนภาพของแถบไอโซไซม์ (zymogram) ดังกล่าว แสดงตำแหน่ง จำนวน และความหนาแถบสีที่เกิดขึ้น บันทึกภาพถ่ายของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แถบสีที่ปรากฏบนเจล แล้วเขียนแผนภาพของไอโซไซม์จากการหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility ; Rm) ของแถบสี (อาภัสสรา, 2537ข) ตามสมการต่อไปนี้

$$\text{ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rm)} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสี}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของ marker}}$$

7. การวิเคราะห์กลุ่มพืช

กำหนดให้ตัวอย่างพืชเป็น operational taxonomic unit (OTU) และแถบสีเป็นลักษณะ (character) ค่าที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้จากการมีแถบสี หรือไม่มีแถบสีของแต่ละตัวอย่าง แล้วแปลงค่าที่มีแถบสีเป็น 1 และค่าไม่มีแถบสีเป็น 0 (Sneath and Sokal, 1973) นำค่าการมีแถบสีและไม่มีแถบสีมาวิเคราะห์กลุ่มพืช (cluster analysis) ของไอโซไซม์นั้น นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ โดยใช้โปรแกรม SPSS for Window version 6.0

การทดลองที่ 5 สรีรวิทยาของการเจริญเติบโต

ติดตามบันทึกลำดับการเจริญเติบโตของพืชทดลองตามสภาพธรรมชาติ เพื่อให้ทราบสรีรวิทยาการเจริญเติบโต และเสนอเป็นวงจรการเจริญเติบโต

5.1 วัสดุ และอุปกรณ์

สาคู 13 ตัวอย่าง กระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16 นิ้ว วัสดุปลูก ได้แก่ ดิน : ขี้เถ้าแกลบ : ขุยมะพร้าว ในอัตราส่วน 2 : 1 : 1 จอบ เสียม ดินสอ และสมุดบันทึก

5.2 วิธีการทดลอง

1. การเตรียมพืชทดลอง

ปลูกพืชทดลองลงในกระถาง เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของส่วนของลำต้นเหนือดิน และเหง้า ศึกษาเปรียบเทียบกับพืชทดลองในแปลงปลูกรวบรวม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การบันทึกข้อมูล

ติดตามลำดับการเกิด และการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของลำต้นเหนือดิน และเหง้าใต้ดินอย่างละเอียดทุกสัปดาห์ ตั้งแต่เริ่มปลูกจนกระทั่งเจริญเติบโตเต็มที่ และตาย จนครบวงจร บรรยายรายละเอียดการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโต บันทึกข้อมูลเปรียบเทียบระยะเวลา และแสดงเป็นภาพวงจรโดยละเอียด

การทดลองที่ 6 กายวิภาคศาสตร์ของเม็ดแป้ง

ศึกษาองค์ประกอบของเม็ดแป้ง (starch granule) ในเหง้าของสาคู โดยใช้ส่วนเนื้อในของเหง้า ในช่วงระยะการเจริญเติบโตต่างๆ มาทำการย้อมสี วัดขนาดเม็ดแป้ง เปรียบเทียบ และบันทึกภาพ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

6.1 วัสดุและอุปกรณ์

สาคูจากกระถางปลูก มีด บีกเกอร์ แท่งแก้วสำหรับคน ขวดแก้ว หลอดหยด แผ่นสไลด์ แผ่นปิดสไลด์ เข็มเขี่ย คีมปลายแหลม กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และ photomicroscope กล้องถ่ายรูป และฟิล์มสี

6.2 สารเคมี

ไอโอดีน และโปตัสเซียมไอโอไดด์

6.3 วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างเหง้า

ขุดและตัดเก็บเอาเฉพาะส่วนเหง้าของสาคู จากกระถางหลังปลูกทุกๆ สัปดาห์ จนกระทั่งเหง้าเจริญเติบโตและมีการพัฒนาเต็มที่ ล้างน้ำทำความสะอาดเอาเศษดินออก ผ่าเหง้าสาคูออกตามยาว แล้วบันทึกภาพไว้

2. การเตรียมสไลด์เม็ดแป้ง

ใช้ปลายมีดขูดเนื้อเยื่อบริเวณกึ่งกลางของเหง้า ไล่จากปลายถึงโคนที่ละน้อย นำเนื้อเยื่อที่ได้มาวางบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด หยดสารละลายไอโอดีน (คณาจารย์ภาควิชาเคมี, 2523)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เข้มข้น 2% (วิธีเตรียมดูในภาคผนวก) ลงบนเนื้อเยื่อ 1-2 หยด ใช้ด้ามเข็มเขี่ยขยี้ให้เม็ดแป้งหลุดออกจากเนื้อเยื่อ คีบเอาเศษเนื้อเยื่อที่เหลือทิ้งไป วางแผ่นปิดสไลด์ปิดทับลงไป

3. การบันทึกข้อมูล

นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของเม็ดแป้ง บันทึกข้อมูลลักษณะ และวัดขนาดของเม็ดแป้งเป็นค่าเฉลี่ยความยาว (ค่าต่ำสุด-สูงสุด) เปรียบเทียบความแตกต่าง โดยไล่ตำแหน่งของเนื้อเยื่อในเหง้า บันทึกภาพ ใช้ข้อมูลที่ได้จากทุกระยะการเจริญเติบโตศึกษาเปรียบเทียบกัน

สถานที่ใช้ในการดำเนินการทดลอง และรวบรวมข้อมูล

สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่
ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่
ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ อ.หางดง จ.เชียงใหม่
สวนของชาวบ้าน และเกษตรกรรายย่อย ในพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย
แปลงรวบรวมพันธุ์ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาการดำเนินการทดลอง

ระหว่างเดือนตุลาคม 2545 ถึงเดือนมกราคม 2547

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved