บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การเปรียบเทียบตำแหน่งของข้อที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกิ่งชำในหญ้านวลน้อย และหญ้ามาเลเซีย

หญ้าที่ใช้ทดลองได้จากหญ้าแผ่นที่มีขายใน อ.เมือง จ.เชียงใหม่ วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ กรรมวิธีที่ 1 ใช้ข้อที่ 1 นับจากปลายของไหล,กรรมวิธีที่ 2 ใช้ข้อที่ 2, กรรมวิธีที่ 3 ใช้ข้อที่ 3, กรรมวิธีที่ 4 ใช้ข้อที่ 4 และกรรมวิธีที่ 5 ใช้ข้อที่ 5 ชำในถาดหลุมใช้ขุยมะพร้าวละเอียด : ทรายละเอียด : ปุ๋ยอินทรีย์ อัตราส่วน 2 : 1 : 1 เป็นวัสดุปักชำ แล้วคลุมด้วยถุงพลาสติก นำไปวางไว้ในโรงเรือนพรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์ ที่มีความเข้มแสง 13,790 lux เป็นเวลา 10 วัน หลังจากนั้นเปิดถุงแล้วย้ายมาไว้ในโรงเรือนพลาสติกใส ที่มีความเข้มแสง 35,900 lux บันทึกข้อมูลทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 15 วัน ข้อมูลที่บันทึกได้แก่ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ความสูง จำนวนใบ จำนวนหน่อข้าง ความยาวราก และจำนวนราก

3.2 ศึกษาลักษณะดอกของหญ้านวลน้อยและหญ้ามาเลเซีย

นำยอดอายุได้ 20 วันที่ได้จากการชำไหลที่ได้จากข้อที่ 1 ลงถาดเพาะ ย้ายลงปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว จนกระทั่งออกดอก ศึกษาช่อดอก โดยวัดความกว้าง ความยาวของช่อดอก ความยาวของก้านช่อดอก โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ ในส่วนของดอกนั้นวัดความกว้าง ความยาวของดอกตูมและดอกบานผ่านทางกล้องจุลทรรศน์สามมิติ (stereo microscope) บันทึกจำนวนเกสรตัวผู้และส่วนประกอบของดอก วัดความกว้างและความยาวของเมล็ดผ่านทางกล้องจุลทรรศน์สามมิติ และบันทึกจำนวนเมล็ดต่อช่อ เก็บข้อมูลจากพืชทดลองชนิดละ 2 ต้น ต้นละ 4 ตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมา

3.3.1 การฉายรังสี

เตรียมยอดของหญ้าซึ่งได้จากข้อที่ 3 ของไหลจากแผ่นหญ้านวลน้อย และข้อที่ 1 ของไหลจากแผ่นหญ้ามาเลเซีย ล้างทำความสะอาดและผึ่งลมให้แห้ง นำไปฉายรังสีแกมมาที่อัตรารังสี 4.8 Gy/นาที 5 ระดับ ระดับละ 100 ยอดโดยกรรมวิธีที่ 1 เป็นชุดควบคุม ไม่ได้รับรังสี กรรมวิธีที่ 2 ได้รับปริมาณรังสี 5 Gy กรรมวิธีที่ 3 10 Gy กรรมวิธีที่ 4 15 Gy และกรรมวิธีที่ 5 20 Gy โดยศึกษาผลของการฉายรังสี 2 ระยะคือระยะต้นกล้า และระยะหลังย้ายปลูก ในระยะต้นกล้า นำส่วนของกิ่งชำที่ผ่านการฉายรังสีแล้วชำในถาดหลุมโดยใช้ขุยมะพร้าว : ทรายหยาบ อัตราส่วน 1:1 เป็นวัสดุชำ ภายใต้สภาพพรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์ มีความเข้มแสง 13,790 lux เป็นเวลา 20 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น บันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์การอดชีวิตและจำนวนต้นกล้าที่ปรากฏลักษณะแตกต่างจากปกติ

การทดลองระยะหลังย้ายปลูกนั้น นำต้นกล้าที่มีอายุ 20 วัน ย้ายลงปลูกในถุงดำขนาด 8 x 16 นิ้ว ในสภาพกลางแจ้ง โดยใช้ขุยมะพร้าว : ปุ๋ยอินทรีย์ : ทรายหยาบ อัตราส่วน 5 : 1 : 1 เป็นวัสดุปลูก วางแผนการทดลองแบบ RCBD มี 5 Block สุ่มเก็บข้อมูล Block ละ 10 ต้น ทุก 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 7 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังย้ายปลูกในสภาพกลางแจ้งหลังย้ายปลูก 1 สัปดาห์ วัดความยาวไหลโดยวัดจากโคนของต้นที่งอกจากไหลเดิมถึงข้อใบที่สูงที่สุด บันทึกการแตกแขนงโดยนับจำนวนแขนงที่แตกออกจากต้นหลัก นับจำนวนใบของแขนงที่แตกออกจากต้นหลัก วัดความยาวของปล้องเฉลี่ยโดยวัดปล้องที่ 4, 5 และ 6 จากโคนต้น และนับจำนวนต้นที่ปรากฏลักษณะแตกต่างจากปกติและคัดเลือกเพื่อนำไปขยายพันธุ์ต่อโดยเก็บข้อมูลของต้นที่คัดเลือกได้แก่ ความกว้างใบ ความยาวใบ ความยาวปล้อง และจำนวนต้นต่อกอ

3.3.2 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การคลุมพื้นที่ในสภาพแสงที่แตกต่างกันของต้นหญ้ากลายพันธุ์

ขยายพันธุ์ต้นที่เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้ข้อ จากไหลของต้นที่คัดเลือก จำนวน 6 ยอด ชำลงในถาดหลุมโดยใช้ ขุยมะพร้าว : ทรายหยาบ อัตราส่วน 1 : 1 เป็นวัสดุชำจนอายุได้ 20 วัน หลังจากนั้นย้ายลงปลูกในแปลงขนาด 1 ตารางเมตร และศึกษาการเจริญเติบโตภายใต้ความเข้มแสง 2 ระดับ

ปัจจัยที่ 1 สภาพพรางแสง ได้แก่ สภาพแสงปกติ (17,271.46 lux) และ สภาพ พรางแสง โดยใช้ตาข่ายพรางแสง แสง 50 เปอร์เซ็นต์ (6,372.83 lux)

ปัจจัยที่ 2 ต้นที่ปรากฏลักษณะแตกต่างจากปกติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วางแผนการทดลองแบบ Strip-plot Design มี 3 ซ้ำ เก็บข้อมูลทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ วัดเปอร์เซ็นต์การคลุมพื้นที่ทุก 1 สัปดาห์เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ด้วยวิธี Digital image analysis ที่ประยุกต์จาก Richardson *et al.*(2001) โดยใช้โปรแกรม Adobe photoshop CS 2 เพื่อนับจำนวนพิกเซล (pixel) จากภาพถ่ายดิจิตอลของแปลงปลูกหญ้า โดยเปรียบเทียบจำนวนพิกเซลของพื้นที่ 1 ตารางเมตร กับจำนวนพิกเซลของพื้นที่ที่หญ้าขึ้นปกคลุมแล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การคลุมพื้นที่} = \frac{\text{จำนวนพิกเซลของพื้นที่ที่หญ้าขึ้นปกคลุม}}{\text{จำนวนพิกเซลของพื้นที่ 1 ตารางเมตร}} \times 100$$

เก็บข้อมูลทางสัณฐานวิทยา โดยเมื่ออายุได้ 8 สัปดาห์ทำการคัดเลือกต้นที่มีความแตกต่างทางลักษณะที่ปรากฏ เก็บข้อมูล ความกว้างและความยาวของใบ ความกว้างและความยาวของกาบใบ เส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวของปล้องทั้งในสภาพพรางแสงและไม่พรางแสง

วัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของต้นที่คัดเลือกทั้งในสภาพปกติและพรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์ ใช้วิธีของ Witham *et al.* (1971) โดยใช้ใบพืชหนัก 1 กรัม บดในโกร่งบด ขณะบดให้เติมอะซีโตน 80 เปอร์เซ็นต์ลงไปเล็กน้อย หลังจากบดละเอียดแล้ว กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 และปรับปริมาตรอะซิโตนให้ได้ 20 มิลลิลิตรในกระบอกตวง นำสารละลายที่กรองแล้วใส่ในหลอด cuvette นำไปวัดค่าการดูดกลืนของแสง (Optical density ; OD.) ที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวิเคราะห์การดูดกลืนแสง (spectophotometer) บันทึกค่าที่ได้แล้วนำไปคำนวณตามสูตร

$$\text{คลอโรฟิลล์ เอ} = (\ 12.7(OD.663) - 2.96(OD.645))\ \times \frac{V}{1000 \times W}$$

$$\text{คลอโรฟิลล์ บี} = (22.9\ (OD.645) - 4.68(OD.663))\ \times \frac{V}{1000 \times W}$$

โดยที่ V คือ ปริมาตรสารละลายที่นำมาหาปริมาณคลอโรฟิลล์

W คือ น้ำหนักของพืชที่นำมาสกัดคลอโรฟิลล์

OD. คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากเครื่องวิเคราะห์การดูดกลืนแสงในความยาวคลื่นที่กำหนด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 การศึกษาขนาดปากใบ ความยาวราก และจำนวนรากของต้นกลายพันธุ์

สุ่มเก็บใบจากต้นกลายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ 3 ต้นมาศึกษาปากใบโดยใช้ใบตำแหน่งที่ 3, 4 และ 5 นับจากยอด นำมาเก็บในกล่องพลาสติกที่ให้ความชื้น เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ใช้มีดโกนลอกเนื้อเยื่อใต้ผิวใบ นำไปวางบนกระจกสไลด์แล้วหยดน้ำ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า ตามวิธีของ Ruaf *et* al.(2006) บันทึกความกว้าง ความยาวของปากใบ และจำนวนปากใบต่อพื้นที่

ศึกษาความยาวรากและจำนวนราก รวมทั้งหาความสัมพันธ์ระหว่างความยาวรากกับความยาวไหล และความยาวใบ โดยนำยอดของต้นหญ้าที่คัดเลือก และต้นควบคุม ชำในกระถางพลาสติกขนาด 2 นิ้ว ใช้ขุยมะพร้าวละเอียด : ทรายละเอียด อัตราส่วน 2 : 1 เป็นวัสดุชำ แล้วคลุมด้วยถุงพลาสติก นำไปวางไว้ในโรงเรือนพรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์ มีความเข้มแสง 13,790 lux เป็นเวลา 10 วัน หลังจากนั้นเปิดถุงแล้วย้ายไปไว้ในโรงเรือนพลาสติกใส ความเข้มแสง 35,900 lux จนอายุได้ 30 วันล้างวัสดุชำออกแล้วบันทึกข้อมูล ความยาวราก ความยาวไหล และความยาวใบ

3.5 การจำแนกความแตกต่างของลักษณะที่ปรากฏทางกายวิภาควิทยา เซลล์วิทยา และการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

3.5.1 การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยา

นำต้นที่กลายพันธุ์ มาศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของเนื้อเยื่อลำต้น ใบ และราก โดยวิธีการศึกษาเนื้อเยื่อแบบ paraffin embedding ที่ประยุกต์จากวิธีของ Johansen (1940) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. แช่ตัวอย่างในน้ำยา FAA (formalin-acetic acid – alcohol) เพื่อหยุดการทำงานของเซลล์และรักษาสภาพเซลล์

2. ดึงน้ำออกจากเซลล์ของเนื้อเยื่อ (dehydration) โดยให้ผ่านขั้นตอนของน้ำยาจากระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำยา 50เปอร์เซ็นต์ ไปจนถึงระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้ายเนื้อเยื่อลงไปแช่ใน TBA นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่น้ำยาที่ประกอบด้วย TBA และพาราฟินเหลว อัตราส่วน 1 : 1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. ย้ายเนื้อเยื่อลงไปในขวดแก้วที่บรรจุพาราฟินที่หลอมแล้ว นำไปเก็บไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 56 °Cนานอย่างน้อย 1 สัปดาห์เพื่อให้พาราฟินแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อได้เต็มที่

4. นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟิน แล้วจัดตำแหน่งของเนื้อเยื่อให้อยู่ในตำแหน่งและระนาบที่ต้องการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. นำแท่งพาราฟินที่ได้ไปตัดแต่งให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมโดยให้มีชิ้นส่วนพืชอยู่ตรงกลาง แล้วนำมาติดกับแท่งไม้ หลังจากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุนหนา 13 – 15 ไมครอน

6. นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชที่ตัดได้ มาติดบนแผ่นกระจกสไลด์โดยใช้ albumin เป็นตัวยึด

7. วางแผ่นสไลด์บนเครื่องอุ่นสไลด์จนแถบชิ้นส่วนแห้ง

8. นำชิ้นส่วนไปละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อแล้วนำไปย้อมสี Delafield nematoxylin แล้วทำให้เป็นสไลด์ถาวร โดยใช้ Canada balsam

9. เมื่อแผ่นกระจกสไลด์แห้งสนิทนำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาเนื้อเยื่อใต้กล้องจุลทรรศน์และบันทึกภาพ

3.5.2 การศึกษาจำนวนโครโมโซม

ศึกษาจำนวนโครโมโซมของต้นที่กลายพันธุ์ที่สุ่มมา 1 ต้น เปรียบเทียบกับต้นปกติด้วยวิธี orcein squash technique (อดิศร, 2547) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมรากพืชโดยการนำข้อที่ 2, 3, 4 มาวางไว้ในกล่องชื้นและรักษาอุณหภูมิให้อยู่ในระดับ 32 – 35 ^{o}C โดยใช้ความร้อนจากโคมไฟ

2. เก็บตัวอย่างรากในช่วงเวลา 8.00 – 10.00 น. โดยเลือกรากที่ปลายมีสี ขาวขุ่น ความยาว 3–5 มิลลิลิตร

3. หยุดการเจริญของเส้นใยสปินเดิลภายในเซลล์ โดยการแช่ปลายรากใน สารละลาย para dichlorobenzene (PDB) 1 ชั่วโมง 30 นาที ที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C

4. ล้างรากด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ (fixative) นาน 5 นาที แล้วล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น

5. ย่อยเซลล์ให้แยกจากกันโดยการแช่รากใน HCL ที่มีความเข้มข้น 1 M นาน 6-8 นาที ที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น

6. นำปลายรากมาวางบนสไลด์ และใช้เข็มเขี่ยตัดเฉพาะส่วนปลายรากไว้ ประมาณ 1 มิลลิลิตร หยดสี Lacto – propionic orcine ลงบนปลายราก ใช้เข็มเขี่ย แยกปลายรากออกจากกัน แล้วเคาะบนเนื้อเยื่อให้เซลล์กระจาย ใช้ปากคีบ คีบส่วนที่ไม่ต้องการออกแล้วปิดแผ่นกระจกปิดสไลด์ซับสีที่มากเกินไปออกแล้วกดแผ่นกระจกปิดสไลด์เพื่อให้เซลล์อยู่ในระนาบ

7. นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งตัวในระยะเมตาเฟสที่มีการกระจายตัวของโครโมโซม เมื่อได้เซลล์ที่ต้องการแล้ว ใช้น้ำยาเคลือบเล็บ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทาบริเวณขอบแผ่นกระจกปิดสไลด์เพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อแห้ง นำแผ่นกระจกสไลด์ไปนับจำนวนโครโมโซมและบันทึกภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.5.3 การจำแนกความแตกต่างโดยใช้เทคนิค RAPD

เปรียบเทียบต้นที่กลายพันธุ์ และพันธุ์เดิมในระดับโมเลกุล โดยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล High Annealing Temperature – Random Amplified Polymorphic DNA (HAT-RAPD) (Anuntalabhochai *et al*.,2000) โดยเก็บตัวอย่างใบที่ 4 และ 5 จากยอดของต้นกลายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกมาขยายพันธุ์ต่อในกระถาง นำตัวอย่างใบใส่ในซิลิกาเจลเพื่อเก็บเป็นตัวอย่างแห้งและรักษาสภาพดีเอ็นเอไว้ จากนั้นนำตัวอย่างแห้งที่ได้เก็บในตู้แช่อุณหภูมิ -20 ^{o}C เพื่อใช้ในขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ตัดตัวอย่างใบแห้งที่เก็บในตู้แช่อุณหภูมิ –20^{o}C ด้วยกรรไกรให้ละเอียด

2. สกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) โดย extraction buffer ประกอบด้วย double deionized water, CTAB 2เปอร์เซ็นต์, Tris- HCL 100 mM (pH 8.0), EDTA 20 mM (pH 8.0), NaCl 1.4 M และ β- mercaptoethanol 0.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบปริมาณและคุณภาพโดยใช้วิธี agarose gel electrophoresis เก็บรักษาดีเอ็นเอที่ได้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 ^{o}C นำเอาดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยเทคนิค HAT- RAPD ซึ่งดัดแปลงจาก Anuntalabhochai *et* al. (2000) โดยใช้ไพร์เมอร์อย่างสุ่ม (random primer) ของ University of British Columbia (UBC) ซึ่งมีชื่อและลำดับเบสดังนี้

ชื่อไพร์เมอร์	ลำดับเบส
	5'_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _3'
101	GCG GCT GGA G
103	GTG ACG CCG C
155	CTG GCG GCG G
173	CAG CGC CGC T
203	CAC GGC GAG T

เทคนิค PCR ทำโดยการใส่สารผสมปริมาตรประมาณ 20 ไมโครลิตร ซึ่ง ประกอบไปด้วย double deionized water 15.0 ไมโครลิตร, 10x buffer 2.0 ไมโครลิตร, 50 mM $MgCl_2$ 1.0 ไมโครลิตร, 25 mM dNTP 0.16 ไมโครลิตร Primer 100 ng/µl 0.8 ไมโครลิตร, 5 unit Taq DNA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

polymerase 0.125 ไมโครลิตร, DNA template 1 ไมโครลิตร ลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตรและนำเข้าเครื่อง PCR เพื่อกำหนดสภาวะตามเงื่อนไขดังนี้

94 °C 5 นาที
94 °C 30 วินาที ┐
46 °C 30 วินาที ├ 40 รอบ
72 °C 45 วินาที ┘
72 °C 10 นาที

วิเคราะห์ข้อมูลโดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ไปแยกโดยวิธีการแยกสารชีวโมเลกุลด้วยไฟฟ้า (electrophyoresis) โดยใช้ agarose gel 2.0 เปอร์เซ็นต์ และนำเจลที่ได้ย้อมด้วยสาร Ethidium bromide 5 µl/TBE buffer 100 ml. เพื่อนำไปดูการเกิดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีของเครื่อง UV. transilluminator แล้วบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพดิจิตอล ตรวจดูความคมชัดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าแต่ละต้น นับจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอและบันทึกผล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved