บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การรวบรวมและศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลมะเขือในประเทศไทย แบ่งออกเป็น 5 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1-4 ใช้ตัวอย่างพืชเหมือนกันทุกการทดลอง คือใช้พืชสกุลมะเขือ 8 ชนิด ได้แก่ *S. ferox* Linn., *S. mammosum* Linn., *S. melongena* Linn. (4 สายพันธุ์ คือ พันธุ์แจ้ พันธุ์เจ้าพระยา พันธุ์ม่วงก้านเขียว และพันธ์แจ้ม่วง), *S. nigrum* Linn., *S. sanitwongsei* Craib., *S. seaforthianum* Andr., *S. spirale* Roxb., *S. torvum* Swartz. รวม 11 สายพันธุ์

การทดลองที่ 1 การรวบรวมและการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลมะเขือโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุลมะเขือที่รวบรวมได้จาก 1. สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ ฯ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่ ได้แก่ *S. mammosum* Linn. (มะเขือสาแหรก) *S. seaforthianum* Andr. (มะเขือเครือ) *S. spirale Roxb.* (ต้อยตั่ง) และ *S. nigrum* Linn. (มะแว้งนก) 2. สวนสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้แก่ *S. torvum* Swartz. (มะเขือพวง) 3. ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่ ได้แก่ *S. ferox* Linn. (มะอึก) *S. sanitwongsei* Craib. (มะแว้ง) และ *S. melongena* Linn. (มะเขือ) จำนวน 4 สายพันธุ์

เก็บรวบรวมเมล็ดพันธุ์ของพืชสกุลมะเขือที่ได้จาก สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ ฯ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่ และ สวนสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ไปเก็บรักษาไว้ที่ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่ เพื่อเป็นแหล่งเก็บรักษาพันธุกรรมของพืชสกุลมะเขือ

1.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์ ได้แก่ อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างพืช ประกอบด้วย มีด กรรไกรตัดกิ่งขนาดเล็ก เสียม ถุงพลาสติกขนาดต่างๆ สมุดจดบันทึก ปากกาหรือดินสอสำหรับจดบันทึก ไม้บรรทัด กล้องถ่ายรูป ฟิล์มสี

1.2 วิธีการวิจัย

1. วัดขนาดความยาวและความกว้างของ ใบ ดอก ผลและเมล็ดของพืชสกุลมะเขือ การวัดขนาดและน้ำหนักวัดเป็นค่าเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด-สูงสุด)

2. บันทึกภาพถ่าย และบรรยายลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุลมะเขือที่รวบรวมได้ พร้อมทั้งสร้างรูปวิธานชนิด (key to species) และรูปวิธานชนิดปลูก (key to cultivated species) ของพืชสกุลมะเขือ และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลมะเขือโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุลมะเขือจาก Descriptor list (ดัดแปลงจาก IBPGR,1988) และวิเคราะห์ทางสถิติแบบนอนพาราเมตริก ตามวิธีการที่เสนอโดย Sneath and Sokal (1973) โดยใช้โปรแกรม SPSS for Window version 6.0

Descriptor list ของพืชสกุลมะเขือ (ดัดแปลงจาก IBPGR,1988)

1. นิสัยการเจริญเติบโต
   0 ไม้ล้มลุก
   1 ไม้ยืนต้นข้ามปี

2. ลักษณะทรงพุ่ม
   0 แผ่ราบ
   1 ไม้เลื้อย

3. ขนที่ลำต้น
   0 รูปนิ้วมือ
   1 รูปดาว

4. ขนาดของทรงพุ่ม
   0 ขนาดเล็ก (น้อยกว่า 100 เซนติเมตร)
   1 ขนาดกลาง (100-200 เซนติเมตร)
   2 ขนาดใหญ่ (มากกว่า 200 เซนติเมตร)

5. หนามที่ลำต้น
   0 ไม่มี
   1 มี

6. ประเภทใบ
   0 ใบเดี่ยว
   1 ใบประกอบแบบขนนก

7. ขอบใบ
   0 ไม่เป็นหยัก
   1 เป็นหยัก

8. ขนที่ใบ
   0 รูปนิ้วมือ
   1 รูปดาว

9. หนามที่เส้นใบ
0 ไม่มี
1 มี

10. ความลึกของหยักใบ
1 ตื้น
2 ปานกลาง
3 ลึก

11. สีของกลีบดอก
0 ขาว
1 ม่วงปนขาวหรือม่วงปนน้ำเงิน

12. ขนที่กลีบดอก
0 รูปนิ้วมือ
1 รูปดาว

13. เส้นผ่าศูนย์กลางดอก
1 น้อยกว่า 1 เซนติเมตร
2 อยู่ระหว่าง 1-5 เซนติเมตร
3 มากกว่า 5 เซนติเมตร

14. ชนิดของช่อดอก
0 cyme
1 raceme

15. ช่อดอกเป็นแบบซ้ำซ้อน
0 ไม่ใช่
1 ใช่

16. การติดผล
0 ห้อยลง
1 ขนานหรือตั้งขึ้น

17. ผลมีระยางค์ยื่นออกมา
0 ไม่มี
1 มี

18. ขนที่ผล
0 ไม่มี
1 มี

19. น้ำหนักผลเฉลี่ย
1 น้อยกว่า 1 กรัม
2 อยู่ระหว่าง 1-20 กรัม
3 มากกว่า 20 กรัม

20. รูปร่างเมล็ด
0 กลมหรือค่อนข้างกลม
1 รี

21. สีเมล็ด
0 เหลือง
1 น้ำตาลอ่อนหรือดำ

22. ขนที่เมล็ด
0 ไม่มี
1 มี

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

23. น้ำหนักเมล็ด

1 น้อยกว่า 0.001 กรัม

2 อยู่ระหว่าง 0.001-0.003 กรัม

3 มากกว่า 0.003 กรัม

การทดลองที่ 2 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลมะเขือ โดยใช้ลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์

2.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์ ได้แก่ ขวดเก็บตัวอย่างพืช ตู้อบไฟฟ้า (hot air oven) hand microtome ใบมีด (microtome knife) sliding microtome แผ่นสไลด์ขนาด 22x75 มิลลิเมตร หนา 1-2 มิลลิเมตร กระจกปิดสไลด์ขนาด 22x22 มิลลิเมตร อุปกรณ์เครื่องแก้ว เตาไฟฟ้า (hot plate) เครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer) กล่องใส่แผ่นสไลด์ เครื่องใช้อื่นๆ ได้แก่ พู่กัน เข็มเขี่ย ใบมีดโกน ผ้าขาวบาง หลอดหยด ขวดสีชาที่มีหลอดหยด ตะเกียงแอลกอฮอล์ ไม้ขีดไฟ และกระดาษ label อุปกรณ์บันทึกภาพและข้อมูล ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบและติดตั้งกล้องถ่ายรูป (compound microscope) กล้องจุลทรรศน์สามมิติ (stereo microscope) กล้องถ่ายรูป ฟิล์มสี เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ (vernier caliper)

สารเคมี ได้แก่ น้ำกลั่น เอทธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (95 % ethyl alcohol) กรดกลาเซียล อะซิติก (glacial acetic acid) ฟอร์มาลิน (formalin) แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolute alcohol) ไซลีน (xylene) พาราฟิน (parafin) พาราฟินเหลว (liquid parafin), tertiary butyl alcohol (TBA) สี Dalafield s' hematoxylin และ Canada balsum

2.2 วิธีการวิจัย

การศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของพืช จำเป็นที่จะต้องเตรียมตัวอย่างพืชโดยการเตรียมสไลด์ถาวร เพื่อให้สามารถศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของพืชโดยการดูและบันทึกภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งการทำสไลด์ถาวรโดยการฝังในพาราฟิน(parafin embedding method) ตามวิธีที่เสนอโดย Sass (1966) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ คือ

2.1 การเลือกชิ้นส่วนพืช (collection of plant material) ชิ้นส่วนพืชที่นำมาทำสไลด์ถาวรจะต้องมีสภาพสมบูรณ์ และไม่ผิดปกติ โดยเลือกชิ้นส่วนพืช จากต้นที่สมบูรณ์ที่สุด

2.2 การตัดแบ่งชิ้นส่วนพืช (subdividing of plant material) โดยใช้ใบมีดตัดส่วนที่ต้องการศึกษา ให้อยู่ในลักษณะที่เมื่อนำเข้าเครื่องตัด แล้วสามารถตัดตามระนาบที่ต้องการได้

2.3 การฆ่าเซลล์และรักษาให้เซลล์คงสภาพ (killing and fixing) หลังจากเก็บตัวอย่างพืชและตัดแบ่งชิ้นส่วนพืชแล้ว นำชิ้นส่วนพืชที่ได้ใส่ลงในขวดที่มีน้ำยารักษาสภาพเซลล์อยู่ เพื่อฆ่าเซลล์และคงสภาพเนื้อเยื่อให้อยู่ในสภาพเหมือนเดิมทุกประการ เป็นการทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อหยุดกิจกรรมทุกอย่างและตายลง แต่คงสภาพโครงสร้างและองค์ประกอบของเซลล์ยังคงสภาพเหมือนตอนที่ยังมีชีวิตอยู่

2.4 การดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) โดยใช้สารเคมีที่มีคุณสมบัติสามารถเข้าไปแทนที่น้ำในเซลล์ได้ โดยการใช้ Tertiary Butyl Alcohol (TBA) ซึ่งเป็นสารที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ที่แพร่หลายที่สุด มีความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อทุกชนิด โดยที่ TBA นั้นมี จุดแข็งตัวที่ 25.5 องศาเซลเซียส และมีจุดเดือดที่ 82.8 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อนำชิ้นส่วนพืชออกจากน้ำยารักษาสภาพเซลล์ (FAA) ที่มีส่วนผสมของ ethyl alcohol 50 % แล้วจึงผ่านไปตามขั้นตอนของ TBA ทั้ง 6 ระดับ ซึ่งมีส่วนผสมดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ระดับของการดึงน้ำออกจากเซลล์โดยใช้ TBA

Grade	Ethyl alcohol 95 % (มล.)	Ethyl alcohol 100 % (มล.)	TBA (มล.)	น้ำกลั่น (มล.)
1	50	-	10	40
2	50	-	20	30
3	50	-	35	15
4	50	-	50	-
5	-	25	75	-
6	-	-	100	-

การดึงน้ำออกจากเซลล์แต่ละระดับใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง และเมื่อครบทั้ง 6 ระดับแล้วจึงนำเข้าสู่ขั้นตอนต่อไปคือ การทำให้พาราฟินแทรกซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อ (infiltration) ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่ทำให้พาราฟินแทรกซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช จนกระทั่งที่ว่างภายในอิ่มตัวด้วยพาราฟิน ซึ่งขั้นตอนนี้ประกอบด้วยการเติมพาราฟินลงไปในสารที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์โดยที่ยังมีเนื้อเยื่อพืชแช่อยู่แล้วเพิ่มความเข้มข้นของพาราฟินทีละน้อย และลดความเข้มข้นของตัวทำละลายลงโดยการรินออก สำหรับการทดลองนี้ใช้วิธีการเติมพาราฟินเหลว โดยการนำพาราฟินเหลวใส่ลงไปในขวดที่มีชิ้นส่วนพืชและ TBA ให้มีปริมาตร 1 ต่อ 1 แช่ไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเทส่วนผสมของพาราฟินเหลวและ TBA ทิ้ง เปลี่ยนใส่พาราฟินเหลวลงไปและเติมพาราฟินที่หลอมเอาไว้ภายในตู้อบลงไปอีกครั้งหนึ่ง

2.5 การฝังชิ้นส่วนพืชในพาราฟิน (embedding) ลักษณะเหมือนการหล่อโลหะในแม่พิมพ์ ซึ่งเมื่อพาราฟินแข็งตัวจะห่อหุ้มและทำหน้าที่ยึดชิ้นส่วนพืชให้สามารถรับคมมีดได้เต็มที่ และไม่ให้เนื้อเยื่อพืชบางส่วนหลุดออกจากกันขณะที่กำลังตัดด้วยเครื่องตัด (rotary microtome) พาราฟินที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อจะช่วยค้ำจุนให้เซลล์อยู่ในสภาพที่ปกติ และทนต่อสภาพของคมมีด ซึ่งเนื้อเยื่อพืชจะถูกฝังลงในกระทง (boat) ที่ทำด้วยกระดาษที่พับเป็นรูปสี่เหลี่ยมพื้นผ้าสูง 1-1.5 เซนติเมตร กว้าง 2-3 เซนติเมตร ยาว 4-6 เซนติเมตร ขึ้นอยู่กับขนาดของเนื้อเยื่อพืช โดยวางกระทงลงบนโต๊ะที่ราบเรียบ แล้วเทพาราฟินบริสุทธิ์ที่หลอมไว้ลงในกระทง ให้ระดับของพาราฟินอยู่ต่ำกว่าระดับของขอบกระทงเล็กน้อย ใช้เข็มเขี่ยลนไฟให้ปลายร้อน ไล่ฟองอากาศที่เกิดขึ้นในพาราฟินที่หลอมละลายออกให้หมดโดยเร็วจากนั้นยกกระทงลงไปแช่ในภาชนะที่บรรจุน้ำแข็งเพื่อให้พาราฟินแข็งตัว เมื่อพาราฟินแข็งตัวเต็มที่แล้วจึงแกะกระทงออกจากแท่งพาราฟิน ซึ่งเมื่อแกะกระทงออกแล้วจะได้แท่งพาราฟินรูปแท่งสี่เหลี่ยมและมีชิ้นส่วนของพืชฝังอยู่ข้างใน หลังจากนั้นใช้มีดตัดแต่งแท่งพาราฟินเป็นแท่งสี่เหลี่ยมให้ได้ขนาดที่เหมาะสมเพื่อนำไปติดกับแท่งไม้ที่จะใช้ในขั้นตอนการตัดเนื้อเยื่อพืชด้วยเครื่องมือตัด (microtome)

2.6 การตัดชิ้นส่วนพืชด้วยเครื่องมือตัด (sectioning) มีขั้นตอนคือ ตัดแต่งแท่งพาราฟินที่มีเนื้อเยื่อพืชฝังอยู่ โดยตัดแต่งให้มีด้านหน้าตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมพื้นผ้าหรือจตุรัส โดยมีส่วนฐานกว้างกว่าส่วนบน หลังจากนั้นนำแท่งพาราฟินที่ผ่านการตัดแต่งแล้วติดกับแท่งไม้โดยใช้พาราฟินหลอมเป็นตัวยึด และนำแท่งไม้ไปติดกับเครื่องตัด โดยในการตัดนั้นควรตัดให้มีความหนาของแผ่นริบบอน (ribbon) อยู่ระหว่าง 10-25 ไมครอน ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อพืช

2.7 การติดริบบอนลงบนแผ่นสไลด์ (fixing) ตัวอย่างพืชที่ตัดเป็นชิ้นบางๆ แล้วจะต้องนำมาติดบนแผ่นสไลด์ถาวรโดยตัดแบ่งริบบอนออกเป็นช่วงสั้นๆเพื่อนำมาติดบนแผ่นกระจก สไลด์ โดยใช้น้ำยายึด (adhesive) ซึ่งอุปกรณ์ที่ใช้ได้แก่ เครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer) น้ำกลั่นและแผ่นสไลด์ที่สะอาดปราศจากฝุ่น โดยตั้งอุณหภูมิของเครื่องอุ่นให้อยู่ประมาณ 40-42 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นหยดน้ำยายึดลงบนแผ่นสไลด์ เมื่อเรียบร้อยแล้วใช้พู่กันขนาดเล็กแตะแผ่นริบบอนที่ตัดแบ่งเป็นชิ้นสั้นๆนำมาวางบนสไลด์ให้ได้ตามจำนวนที่ต้องการ โดยคำนึงถึงกระจกปิดแผ่นสไลด์ด้วย เมื่อแผ่นริบบอนลอยอยู่บนน้ำกลั่น นำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ ซึ่งจะทำให้แผ่นริบบอนคลี่ตัวและแผ่ออก ขณะเดียวกันจัดเรียงชิ้นส่วนให้อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมด้วย แผ่นริบบอนจะแนบติดกับแผ่นสไลด์ อุณหภูมิของเครื่องอุ่นสไลด์ไม่ควรร้อนเกินไป จะทำให้พาราฟินละลาย และโครงสร้างของเนื้อเยื่อเสียหายไปด้วย แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำเกินไป ริบบอนจะแผ่ออกไม่เต็มที่ ไม่ได้เนื้อเยื่อที่สมบูรณ์ พับย่นและติดแผ่นสไลด์ไม่แน่น วางสไลด์บนเครื่องอุ่นจนสไลด์แห้ง

2.8 การย้อมสี (staining) เป็นการทำให้สีหรือสารเคมีไปรวมกับสิ่งที่ต้องการศึกษาเพื่อช่วยให้เห็นรายละเอียดโครงสร้าง และความแตกต่างของเซลล์เด่นชัดขึ้น โดยย้อมด้วยสี Dalafield s' hematoxylin

2.9 การปิดแผ่นสไลด์ (mounting) เป็นขั้นตอนสุดท้ายของการทำแผ่นสไลด์ถาวร หลังจากเนื้อเยื่อผ่านการย้อมสีเรียบร้อยแล้ว และทำการปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover glass หรือ cover slip) โดยอาศัยตัวกลางสำหรับการยึดปิดแผ่นสไลด์ (mounting media) เพื่อให้ติดแน่นถาวร สำหรับในการทดลองนี้ใช้สารผสมระหว่าง xylene กับ Canada balsum ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 แล้วทำความสะอาดแผ่นสไลด์ และบริเวณรอบๆเนื้อเยื่อซึ่งมักสกปรกเนื่องจากมีเศษพาราฟินสีย้อมติดเป็นคราบโดยใช้เข็มเขี่ยหรือเข็มหมุดปลายแหลม และกระดาษซับเช็ดให้สะอาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วางแผ่นสไลด์ลงบนโต๊ะที่ได้ระดับ หยดสารตัวกลางลงบนแผ่นสไลด์ หลังจากนั้นนำแผ่นกระจกปิดสไลด์ปิดทับลงไป ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ถ้ามีฟองอากาศให้ใช้เข็มเขี่ยแตะไล่เบาๆ ไล่ฟองอากาศออกตามกระจกปิดสไลด์แล้วนำ สไลด์ไปวางในตู้อบอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส หรือชั้นเก็บที่ไม่มีฝุ่นเพื่อให้สารตัวกลางแห้ง

2.10 บันทึก ถ่ายภาพ และบรรยายลักษณะทางกายวิภาคศาตร์

หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลมะเขือโดยใช้ลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของพืชสกุลมะเขือโดยกำหนดให้ตัวอย่างพืชเป็น operational taxonomic unit (OTU) และลักษณะทางกายวิภาคเป็นลักษณะ (character) ดัง descriptor list แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติแบบนอนพาราเมตริก ตามวิธีการที่เสนอโดย Sneath and Sokal (1973) โดยใช้โปรแกรม SPSS for Window version 6.0

Descriptor list ของลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของพืชสกุลมะเขือ

1. จำนวนชั้นเซลล์ collenchyma ของส่วนลำต้น
   0 3-4 ชั้น
   1 6-8 ชั้น

2. รูปร่างขนที่ลำต้น
   0 รูปนิ้วมือ
   1 รูปดาว

3. สัดส่วนความยาวของเส้นกลางใบด้านล่างต่อความยาวเส้นกลางใบด้านบน
   0 เส้นกลางใบด้านล่างมีขนาดเท่าๆกันกับเส้นกลางใบด้านบน
   1 เส้นกลางใบด้านล่างมีขนาดใหญ่กว่าเส้นกลางใบด้านล่าง 2 เท่า หรือมากกว่า
4. รูปร่างขนที่เส้นกลางใบด้านบนและที่เส้นกลางใบด้านล่าง
   0 รูปนิ้วมือ
   1 รูปดาว

5. รูปร่างของดอกเมื่อตัดเนื้อเยื่อตามยาว
   0 รูปรี
   1 รูปไข่

6. รูปร่างขนที่กลีบดอก
   0 รูปนิ้วมือ
   2 รูปดาว

7. ตำแหน่งของก้านเกสรตัวผู้
   0 ก้านเกสรตัวผู้อยู่ระดับเดียวกับรังไข่
   1 ก้านเกสรตัวผู้อยู่สูงกว่าระดับรังไข่

8. ระยางค์ที่ฐานของรังไข่
   0 ไม่มี
   1 มี

การทดลองที่ 3 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลมะเขือ โดยใช้ลักษณะทางเซลล์พันธุศาสตร์

การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชโดยใช้ลักษณะทางเซลล์พันธุศาสตร์นั้น จำเป็นที่จะต้องใช้เนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโต ซึ่งมีการแบ่งเซลล์แบบ mitosis เพื่อศึกษาจำนวนและโครงสร้างของโครโมโซมพืชได้จากระยะเมตาเฟสนั่นเอง ซึ่งสามารถศึกษาลักษณะทางเซลล์พันธุศาสตร์ของพืชได้ โดยวิธีการของ Dyer (1979)

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

ตัวอย่างพืช ได้แก่ ปลายรากที่เริ่มงอกออกมาและมีความยาว 3-5 มิลลิเมตร

อุปกรณ์ ได้แก่ ขวดแก้วขนาดจุ 1.5 มิลลิลิตร สำหรับเก็บตัวอย่างราก แผ่นกระจกและแผ่นกระจกปิด เข็มเขี่ย กล้องจุลทรรศน์ กล้องถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์พร้อมฟิล์ม

สารเคมี ได้แก่ เอทธิลแอลกอฮอล์ (95 % ethyl alcohol) กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid) กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 N (HCl) พาราไดคลอโรเบนซีน (paradichlorobenzene) และ สีออซิน (lacto-propionic orcein)

3.2 วิธีการวิจัย

ตอนที่ 1 การนับจำนวนโครโมโซม

1.1 การเตรียมเซลล์เพื่อศึกษาโครโมโซม (pre-treatment) ตัดรากพืชสกุลมะเขือที่งอกจากเมล็ดให้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วนำไปแช่ในสาร p-dichlorobenzene ที่อิ่มตัวเป็นเวลานาน 4-6 ชั่วโมง และนำไปเก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิ 15-18 องศาเซลเซียส เพื่อยับยั้งการเกิด spindle fibre ทำให้โครโมโซมซึ่งประกอบด้วย 2 โครมาติดไม่ถูกดึงไปแต่ละขั้วของเซลล์ และจะกระจายอยู่ทั่วๆไปภายในเซลล์หลังจากถูกขยี้ โครโมโซมในระยะเมตาเฟสจะหดตัวอย่างเต็มที่ทำให้ง่ายต่อการศึกษาจำนวนและรูปร่างของโครโมโซม

1.2 การรักษาสภาพเซลล์ (fixing) ล้างตัวอย่างรากพืชโดยใช้น้ำกลั่นก่อน แล้วจึงนำไปแช่ไว้ในสารละลายที่มีส่วนประกอบของ glacial acetic acid ต่อ absolute ethanol อัตราส่วน 1:3 แช่เป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเซลล์ให้เร็วที่สุด และมีสภาพเหมือนกับเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่

1.3 การย่อยสลายเนื้อเยื่อ (macerating) ล้างรากพืชที่ได้จากขั้นตอนที่ 2 โดยใช้เอทธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำตัวอย่างรากพืชที่ได้ไปแช่ไว้ในสารละลายของ HCl เข้มข้น 1 M ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อาจใช้ water bath หรือ oven ก็ได้ ทั้งนี้เพื่อที่จะให้เซลล์ที่ปลายรากพืชแยกตัวออกมาเป็นเซลล์เดี่ยวๆให้มากที่สุด เพื่อเป็นการลดจำนวนเซลล์ที่อยู่ซ้อนกันหลายๆชั้น โดยใช้กรดช่วยทำลายโครงสร้างที่ยึดระหว่างเซลล์

1.4 การย้อมสีโครโมโซม (staining) นำตัวอย่างรากพืชที่ได้จากขั้นตอนที่ 3 มาล้างด้วยน้ำกลั่น และนำไปแช่ไว้ในสารละลายสี lacto-propionic orcein เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งสามารถเตรียมสีดังกล่าวได้โดยเตรียมเป็น stock solution โดยชั่ง lacto-propionic orcein 2 กรัม ละลายในส่วนผสมของ lactic acid 50 มิลลิลิตร และ propionic acid 50 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ค้างคืนแล้วจึงนำมากรอง ใน การนำมาใช้ให้นำ stock solution มาเจือจางโดยใช้น้ำให้มีความเข้มข้นระหว่าง 45-60 เปอร์เซ็นต์ แล้วกรอง อีกครั้งหนึ่ง สีที่เตรียมไว้สามารถเก็บไว้ใช้ได้เป็นเวลานาน

1.5 การเตรียมสไลด์ นำตัวอย่างรากพืชที่ได้จากขั้นตอนที่ 4 มาวางบนแผ่นสไลด์ ใช้เข็มเขี่ยตัดปลายรากพืชให้มีขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร เอาส่วนที่เหลือทิ้งไป แล้วหยดสีลงบนปลาย

รากพืชดังกล่าว จากนั้นใช้เข็มเขี่ยขยี้ปลายรากเพื่อให้เซลล์หลุดจากกัน แล้วค่อยๆวางกระจกปิดแผ่นสไลด์ปิดบนเนื้อเยื่อพืช จากนั้นนำตัวอย่างรากพืชไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่อยู่ในระยะเมตาเฟส และเห็นโครโมโซมกระจายอย่างชัดเจน สะดวกต่อการนับและวัดขนาดโครโมโซม จากนั้นใช้น้ำยาทาเล็บทาบนขอบกระจกปิดแผ่นสไลด์เพื่อนำไปถ่ายรูปโครโมโซมที่ได้ต่อไป

1.6 การถ่ายรูปโครโมโซม ทำการถ่ายรูปจากสไลด์ตัวอย่างเซลล์รากพืชที่ต้องการโดยใช้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบและติดตั้งกล้องถ่ายรูป ใช้กำลังขยาย 100 เท่า

ตอนที่ 2 การทำอิดิโอแกรม

2.1 การนำภาพถ่ายไปขยายด้วยเครื่องถ่ายเอกสาร ให้หมายเลขโครโมโซมแต่ละแท่งกำหนดตำแหน่งเซนโทรเมียร์และวัดความยาวโครโมโซมจากภาพถ่าย วัดความยาวโครโมโซม ทั้งแท่ง (LT) วัดความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (Ll) และความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Ls) โดยใช้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์เป็นหลัก ตัดรูปโครโมโซมแล้วจัดคู่โครโมโซม

2.2 การนำค่า Ll, Ls และ ผลรวมของค่า LT มาคำนวณหาค่า Relative Length (RL) และค่า Centromeric Index (CI) โดยคำนวณจากสูตร ดังนี้

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

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

2.3 การนำค่า 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

2.4 การจัดขนาดของโครโมโซม โดยกำหนดให้โครโมโซมเป็น 3 ขนาด คือ ขนาดใหญ่ (large = L) ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 1 ซึ่งเป็นคู่ที่ยาวที่สุด โครโมโซมขนาดกลาง (medium = M) ได้แก่ โครโมโซมที่ยาวที่สุดรวมกับโครโมโซมที่สั้นที่สุดหารด้วยสอง ส่วนโครโมโซมขนาดเล็ก (small = S) ได้แก่ โครโมโซมที่มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยโครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุด

2.4 การจัดเรียงโครโมโซมตามขนาดของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่ที่สุดไปหาคู่ที่เล็กที่สุด และจัดตำแหน่งเซนโทรเมียร์ให้อยู่ในแนวเดียวกัน

2.6 การบันทึกข้อมูล บันทึกภาพถ่ายโครโมโซมที่ได้จัดเรียงไว้แล้ว

การทดลองที่ 4 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลมะเขือโดยใช้วิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส

ใช้วิธีการแยกไอโซไซม์ของพืชโดยอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อศึกษาการเคลื่อนที่ของแถบสีของเอนไซม์ที่สกัดจากใบแก่ ตามวิธีการของ Hiratsuka *et al.* (1986) และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลมะเขือโดยใช้วิธีการทางสถิติที่เสนอโดย Sneath and Sokal (1973)

4.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

ตัวอย่างพืช ได้แก่ ใบแก่ของพืชสกุลมะเขือที่รวบรวมได้

อุปกรณ์ ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิต่ำที่ 4 และ –20 องศาเซลเซียส น้ำแข็ง กระติกน้ำแข็ง ถุงพลาสติก ยางรัด โกร่งบดตัวอย่าง เครื่องหมุนเหวี่ยงตัวอย่างชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง เครื่องชั่งละเอียด เครื่องกวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก กระดาษรองชั่ง ช้อนตักสาร หลอดทดลอง กระบอกตวง กระดาษกรอง บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ แท่งแก้วสำหรับคนกรวยกรอง ถุงมือ ปิเปต หลอดใส่สารปรับปริมาตรได้ (micro syringe) ขนาด 100 ไมโครลิตร หลอดหยด กล้องถ่ายรูป ฟิล์ม ตู้ส่องไฟ หลอด eppendrorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร aluminium foil, micropipette, adjustable automatic pipette พร้อม yellow tips ชุดสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ slab gel เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าของ LKB model 2001

สารเคมี ทริส ไฮดรอกซี เมทธิล อะมิโนมีเทน (tris-hydroxymethyl aminomethane) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ซีสทีน (cystine) แอสคอร์บิก แอซิด (ascorbic acid) แคลเซียมคลอไรด์

($CaCl_2$) NA2EDTA นิโคทีน (nicotine) โพลีอะคริลามายน์ (polyacrylamine) บิสอะคริลามายด์ (N, N-methylene bisacrylamind) แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulphate) โคมาสซี บริลเลียน บลู จี-250 (comassie brilliant blue G-250) ไกลซีน (glycine) กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 3 amino-9 ethylcarbazole อะซิโตน (acetone) แมกนีเซียม คลอไรด์ ($MgCl_2$) ฟาสท์ บลู บี ซอลท์ (fast blue B salt) อะซิเตต บัฟเฟอร์ (acetate buffer 0.5 pH 4.8) แนปธิล เอซิด ฟอสเฟต (napthyl acid phophate (monosodium salt)) ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (phosphate buffer 0.1 M 6.0) แนปธิล อะซิเตต (napthyl acetate) กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid)

4.2 วิธีการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างพืช (sample collection) โดยการนำตัวอย่างใบของพืชสกุลมะเขือแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดลอง มาชั่งน้ำหนักให้ได้น้ำหนัก 2 กรัม จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2. การสกัดสารตัวอย่าง (extraction) โดยนำตัวอย่างใบพืชสกุลมะเขือแต่ละชนิดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ --20 องศาเซลเซียสมาบดในโกร่งพร้อมกับเติมไนโตรเจนเหลวให้บดง่ายขึ้น หลังจากนั้นเติมสารสกัดเอนไซม์จำนวน 3 มิลลิเมตร แล้วนำสารละลายที่ได้ไปแยกส่วนด้วยเครื่องเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดูดของเหลวใส (supernatant) ที่ได้นำมาเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง แล้งจึงดูดของเหลวใสที่ได้ เก็บไว้ในหลอดทดลอง โดยในแต่ละหลอดจะมีของเหลวใสปริมาณ 135 ไมโครลิตรต่อหลอด แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เหตุที่เก็บไว้ที่ปริมาณเช่นนี้เพื่อที่จะใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแต่ละครั้งให้เพียงพอและป้องกันไม่ให้เอนไซม์เสื่อมสภาพเร็วเนื่องจากการนำเอนไซม์ออกมาจากตู้เย็น เมื่อจะทำการวิเคราะห์จึงผสม supernatant 90 เปอร์เซ็นต์ กับ marker 10 เปอร์เซ็นต์ แล้วเขย่าให้เข้ากัน

3. การเตรียมเจล (vertical slab gel) ทำความสะอาดแผ่นกระจกโดยการเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ประกอบชุดแผ่นแก้วสำหรับทำ slab gel และเตรียมสารละลาย separating gel และ stacking gel (วิธีการเตรียมตามภาคผนวก) ดูดสารละลาย separating gel ลงระหว่างแผ่นแก้ว ด้านใดด้านหนึ่งอย่างช้าๆ เพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศ ดูดน้ำกลั่นแล้วหยดน้ำกลั่นลงช้าๆทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 30-60 นาที เมื่อเจลแข็งตัวจะเห็นชั้นระหว่างเจลและ

น้ำกลั่นแยกกันชัดเจน ล้างส่วนของเจลด้วยน้ำกลั่นและดูดน้ำออก ดูดสารละลาย stacking gel ลงบน separating gel สอดหวีเสียบลงในเจล ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดในช่องของหวีเสียบ ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวดึงหวีเสียบออกจากเจล ล้างช่องว่างระหว่างเจล (well) ด้วยน้ำกลั่น แล้วดูดน้ำกลั่นออกให้หมด

4. การแยกแถบโปรตีน (protein banding separation) นำส่วนบนของ chamber มาประกบกับแผ่นเจลที่เตรียมไว้ เติม electrode buffer ลงในถังบรรจุสารละลายด้านบน และด้านล่าง หลังจากนั้นแยกแถบโปรตีนดังขั้นตอนต่อไปนี้ คือ

4.1 การหยอดตัวอย่าง เขย่าสารตัวอย่างที่เตรียมไว้ให้เข้ากัน หยอดสารตัวอย่างลงบนเจลแต่ละช่องๆละ 1 ตัวอย่าง จำนวน 100 ไมโครลิตร ระวังอย่าให้สารฟุ้งกระจาย ปิดฝาครอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส พร้อมทั้งต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

4.2 การผ่านกระแสไฟฟ้าช่วงแรกใช้กระแสไฟฟ้า 20 มิลลิแอมแปร์ เมื่อสารตัวอย่างที่มี marker เคลื่อนที่ใน stacking gel เป็นแนวเส้นตรงแล้วจึงเปลี่ยนมาใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ที่ 250-300 โวลต์ รอจนกระทั่งระดับของ marker อยู่ห่างจากขอบด้านล่างของกระจกประมาณ 2-3 เซนติเมตร จึงหยุดจ่ายกระแสไฟฟ้า แล้วนำเจลออกจากชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส ระหว่างที่มีการจ่ายกระแสไฟ ควบคุมอุณหภูมิที่ 4-7 องศาเซลเซียสตลอดเวลา โดยการควบคุมของเครื่องควบคุมอุณหภูมิน้ำเย็นหมุนเวียนเข้าออก

5. การย้อมสี (staining) นำแผ่นเจลที่ได้มาแกะแผ่นกระจกที่ประกบแผ่นเจลออก แล้วนำเจลลงแช่ในสารละลายสำหรับย้อมสี เพื่อทำปฏิกิริยากับ substrate, coenzyme และ dye ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเอนไซม์ esterase ในสภาพที่ไม่มีแสง ที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าเบาๆ เพื่อเร่งปฏิกิริยาจนเห็นแถบสีชัดเจน หลังจากนั้นนำแผ่นเจลล้างน้ำไหลช้าๆ ล้างจนพื้นเจลไม่เกิดแถบสีใส แล้วนำมาแช่ในสารละลาย acetic acid 7 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสม glycerol 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อหยุดปฏิกิริยา และละลายสีส่วนเกินออก

6. การบันทึกข้อมูล โดยวัดระยะทางที่เกิดแถบสีแต่ละแถบของไอโซไซม์ และระยะทางที่สารตัวอย่างที่มี marker เคลื่อนที่และบันทึกการแสดงออกของไอโซไซม์แต่ละชนิดของมะเขือที่ได้โดยถ่ายรูปของแถบสีที่ได้ไว้ และวาดภาพ zymogram ของไอโซไซม์ ดังกล่าว แสดงตำแหน่งจำนวนและขนาดของแถบสี วัดการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Relative mobility, Rm) ตามสูตรของอาภัสสรา (2537) คือ

ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rm) = ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสี / ระยะทางการเคลื่อนที่ของ marker

นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลมะเขือโดยใช้วิธีการทางสถิติแบบนอนพาราเมตริกที่เสนอโดย Sneath and Sokal (1973)โดยใช้โปรแกรม SPSS for Window version 6.0

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University