บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย 5 การทดลอง คือ สัณฐานวิทยา กายวิภาคศาสตร์ เซลล์วิทยา แบบแผน allozyme และการวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ข้อมูล 4 การทดลองร่วมกันของพืชตระกูลขิง จำนวน 15 ชนิด ได้แก่

1. กระชาย	6. ขมิ้นชัน	11. ข่าหยวก
2. กระชายดำ	7. ขมิ้นดำ	12. ข่าใหญ่
3. กระวานขาว	8. ขมิ้นอ้อย	13. ขิง
4. กะทือ	9. ข่า	14. ไพล
5. ขมิ้นขาว	10. ข่าน้ำ	15. ไพลดำ

พืชตระกูลขิงทั้งหมดที่ใช้ทดลองได้จากแปลงรวบรวมพันธุ์ของสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อำเภอแม่ริม ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด และศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่ นำมาปลูกไว้ในแปลงรวบรวมพันธุ์ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ก่อนเริ่มการทดลองเป็นเวลา 8 เดือน

การทดลองที่ 1 สัณฐานวิทยา

นำพืชตระกูลขิงทั้ง 15 ชนิด มาศึกษาลักษณะ บันทึกข้อมูล และถ่ายภาพลักษณะของ ราก แง่ง ลำต้นเหนือดิน ใบ ดอก เขียนคำบรรยายรายละเอียด (descriptions) ทำรูปวิธานสู่ชนิด (key to species) และใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาที่ได้ นำมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้วิธีจัดจำแนกแบบ numerical taxonomy ตามวิธีการของ Sneath and Sokal (1973)

1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1 พันธุ์พืชทั้ง 15 ชนิด

1.1.2 กระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16 นิ้ว จำนวน 15 ใบ

1.1.3 วัสดุปลูก ได้แก่ ดิน : ขี้เถ้าแกลบ : ขุยมะพร้าว ในอัตราส่วน 2 : 1 : 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.4 ตลับเมตร

1.1.5 ไม้บรรทัด

1.1.6 เวอร์เนียคาลิปเปอร์

1.1.7 กล้องถ่ายรูป

1.1.8 ฟิล์ม

1.1.9 ปุ๋ยสูตร 15 – 15 – 15

1.2 วิธีการทดลอง

ปลูกพืชตระกูลขิงที่รวบรวมได้ลงในกระถาง โดยปลูกจากแง่งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 – 5.0 เซนติเมตร สุ่มตัวอย่างละ 10 ต้น เพื่อบันทึกข้อมูลในช่วงที่ต้นมีการเจริญเติบโตและระยะการพัฒนาเต็มที่ของอวัยวะแต่ละส่วนที่จะบันทึกข้อมูล ตามวิธีการของวรรณภา (2540)

1.3 การบันทึกข้อมูล

บันทึกลักษณะ แง่ง ลำต้น ใบ ช่อดอก และดอกย่อย โดยสุ่มตัวอย่างละ 10 ตัวอย่าง นำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด – ค่าสูงสุด)

1.3.1 แง่ง

1. เส้นผ่าศูนย์กลาง
2. ความกว้าง
3. ความยาว
4. สีผิว สีใบเกล็ด และสีเนื้อ
5. ความยาวปล้อง

1.3.2 ลำต้น – ลำต้นเทียม

1. ความสูงทรงพุ่ม (วัดจากระดับผิวดินถึงปลายสุดของทรงพุ่ม)
2. เส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดที่ลำต้นระดับเหนือพื้นดิน 5 เซนติเมตร)

1.3.3 ใบ (วัดใบเรียงแบบสลับหรือแบบเวียนของคู่ใบที่ 3 จากปลายยอด)

1. ความกว้างและความยาวของใบ ความกว้างใบวัดที่ตำแหน่งกว้างที่สุดจากขอบด้านหนึ่งถึงขอบอีกด้านหนึ่ง และความยาวใบวัดจากฐานใบถึงปลายใบ
2. รูปร่าง ปลาย ฐานใบ
3. สีใบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ลักษณะผิวใบ
5. ความหนาใบ
6. จำนวนใบต่อต้น

1.3.4 ช่อดอก

1. ความยาวก้านช่อดอก
2. ความกว้าง
3. ความยาว
4. ความสูง
5. สีช่อดอก

1.3.5 ดอก

1. สีดอก
2. โครงสร้างดอก
3. สูตรดอก
4. แผนผังดอก

1.4 การวิเคราะห์กลุ่มพืช (plant cluster analysis)

นำข้อมูลทางสัณฐานวิทยาที่ได้มาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยวิธีจัดจำแนกแบบ numerical taxonomy ตามวิธีการ Sneath and Sokal (1973) วิเคราะห์ทางสถิติแบบนอนพาราเมตริก (non parametric) ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ใช้โปรแกรม SPSS release 6.0

ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ปรากฏใน Descriptor list ดังนี้

สีเนื้อของแง่ง

0 สีเหลือง
1 สีม่วง

กลิ่นของแง่ง

0 มีกลิ่น
1 ไม่มีกลิ่น

ขนาดใบ

0 ขนาดเล็ก (น้อยกว่า 5.00 เซนติเมตร)
1 ขนาดปานกลาง (5.01 – 9.00 เซนติเมตร)
2 ขนาดใหญ่ (มากกว่า 9.01 เซนติเมตร)

ขนาดทรงพุ่ม

0 ขนาดเล็ก (น้อยกว่า 30.00 เซนติเมตร)
1 ขนาดปานกลาง (30.01 – 60.00 เซนติเมตร)
2 ขนาดใหญ่ (มากกว่า 60.01 เซนติเมตร)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลักษณะรูปใบ

0 รูปไข่

1 รูปใบหอก

2 รูปใบหอกกลับ

ขนาดดอก

0 ขนาดเล็ก (น้อยกว่า 2.00 เซนติเมตร)

1 ขนาดปานกลาง (2.01 – 5.00 เซนติเมตร)

2 ขนาดใหญ่ (มากกว่า 5.01 เซนติเมตร)

การเรียงใบ

0 แบบสลับ

1 แบบเวียน

แนวการเรียงใบ

0 ขนานกับแง่ง

1 ตั้งฉากกับแง่ง

ฐานใบ

0 มน

1 รูปลิ่ม

ปลายใบ

0 แหลม

1 เรียวแหลม

การออกดอก

0 ออกที่ปลายยอด

1 ออกที่แง่งใต้ดิน

ชนิดช่อดอก

0 แบบช่อเชิงลด (spike)

1 แบบช่อกระจะ (raceme)

การทดลองที่ 2 กายวิภาคศาสตร์

นำอวัยวะต่างๆ ได้แก่ ราก ใบ และปลายยอด ของพืชตระกูลขิงมาศึกษาลักษณะของเนื้อเยื่อ โดยการตัดชิ้นส่วนและย้อมสีโดยวิธี free – hand section และวิธี paraffin embedding method ตามเทคนิคของ Johansen (1940) และ Sass (1966) และใช้ข้อมูลทางกายวิภาคศาสตร์ที่ได้นำมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้วิธีจัดจำแนกแบบ numerical taxonomy ตามวิธีการของ Sneath and Sokal (1973)

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 เนื้อเยื่อ ราก ใบ และปลายยอดของพืชทั้ง 15 ชนิด

2.1.2 ขวดสำหรับใส่น้ำยาเคมี และเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อพืช

2.1.3 ขวดแก้วสำหรับย้อมสี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.4 แผ่นสไลด์และแผ่นปิดสไลด์

2.1.5 แผ่นให้ความร้อนสำหรับอุ่นสไลด์ (hot plate)

2.1.6 ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ระดับอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส

2.1.7 เครื่องตัดเนื้อเยื่อพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome)

2.1.8 แท่งไม้ขนาด 1.5 x 1.5 x 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2.1.9 เข็มเขี่ยและมีดผ่าตัด

2.1.10 ตะเกียงแอลกอฮอล์

2.1.11 กล้องจุลทรรศน์ กล้องถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ และฟิล์ม

2.2 สารเคมีที่ใช้และวิธีการในการเตรียมชิ้นส่วนพืชและสไลด์ถาวรตามวิธีการของ Johansen (1940) (ภาคผนวก)

2.3 วิธีการทดลอง

การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อการศึกษาทางกายวิภาคศาสตร์ โดยใช้เทคนิค paraffin embedding ตามวิธีการของ Johansen (1940) โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.3.1 การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ นำส่วนราก ใบ และปลายยอด นำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ

2.3.2 การฆ่าและรักษาสภาพเนื้อเยื่อ นำชิ้นส่วนพืชจากข้อ 2.3.1 แช่ในน้ำยา FAA ให้ท่วมชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช แช่เนื้อเยื่อไว้ในน้ำยาอย่างน้อย 1 สัปดาห์

2.3.3 การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อจากข้อ 2.3.2 แช่ในน้ำยาสำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์โดยผ่านเนื้อเยื่อลงในน้ำยาจากระดับที่ 1 ถึงระดับที่ 5 ตามด้วย TBA บริสุทธิ์ และ TBA ผสมกับพาราฟินเหลว (1:1) ตามลำดับ โดยแต่ละระดับใช้ระยะเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นผ่านเนื้อเยื่อลงใน paraplast ซึ่งหลอมไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส และเก็บเนื้อเยื่อไว้ในขวดที่บรรจุพาราฟินดังกล่าวไว้ในตู้อบอย่างน้อย 1 สัปดาห์

2.3.4 การฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน ใช้กระดาษพับเป็นกระทงแล้วเท paraplast ที่หลอมไว้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ไม่ต่ำกว่า 24 ชั่วโมงลงไปจนเกือบเต็มกระทง รอจนส่วนล่างของ paraplast เย็นตัวจึงใช้เข็มเขี่ยลนไฟจนร้อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปาดผิวหน้า paraplast ให้เหลว แล้วนำเนื้อเยื่อพืชจากข้อ 2.3.3 ใส่ลงไป ปล่อยให้เย็นตัว จากนั้นนำมาตัดเป็นแท่งสี่เหลี่ยมตามลักษณะของเนื้อเยื่อ

2.3.5 การตัดเนื้อเยื่อด้วย rotary microtome นำชิ้นส่วนพืชที่ฝังใน paraplast แล้วมาติดบนแท่งไม้ นำเนื้อเยื่อไปตัดให้มีความหนา 10 – 15 ไมครอน เมื่อได้แถบชิ้นส่วนพืช (ribbon) มาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.3.6 นำแถบชิ้นส่วนพืชที่ได้ติดลงบนแผ่นสไลด์โดยหยดน้ำยา adhesive ลงบนแผ่นสไลด์ นำแผ่นสไลด์ไปวางบนแผ่นให้ความร้อนสำหรับอุ่นแผ่นสไลด์ เป็นเวลา 2 – 3 วัน เพื่อให้แถบชิ้นส่วนแห้งและติดแน่น

2.3.7 ขั้นตอนการย้อมสี ในแต่ละขั้นตอนใช้เวลา 3 – 5 นาที โดยผ่านแผ่นสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อพืชติดอยู่ ตามขั้นตอนดังนี้

1. xylene
2. ethyl alcohol 100% + xylene ในอัตราส่วน 1:1
3. ethyl alcohol 95% + xylene ในอัตราส่วน 1:1
4. ethyl alcohol 95%
5. ethyl alcohol 70%
6. ethyl alcohol 50%
7. ethyl alcohol 30%
8. สี hematoxylin
9. น้ำกลั่น
10. ethyl alcohol 30%
11. ethyl alcohol 50%
12. ethyl alcohol 70%
13. ethyl alcohol 95%
14. ethyl alcohol 95% + xylene ในอัตราส่วน 1:1
15. ethyl alcohol 100% + xylene ในอัตราส่วน 1:1
16. xylene

2.3.8 ปิดแผ่นสไลด์ด้วยแผ่นปิดสไลด์ โดยใช้ Canada balsam เพื่อทำเป็นสไลด์ถาวร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4 การบันทึกข้อมูล

บันทึกภาพตัดตามขวางของราก ใบ และภาพตัดตามยาวของปลายยอดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยายต่างๆ

2.5 การวิเคราะห์กลุ่มพืช

นำข้อมูลทางกายวิภาคศาสตร์ที่ได้มาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยวิธีจัดจำแนกแบบ numerical taxonomy ตามวิธีการ Sneath and Sokal (1973) โดยวิเคราะห์ทางสถิติแบบนอนพาราเมตริก ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ใช้โปรแกรม SPSS release 6.0

ข้อมูลทางกายวิภาคศาสตร์ที่ใช้ปรากฏใน Descriptor list ดังนี้

ราก

รูปร่างเซลล์พาเรงคิมาชั้นคอร์เทกซ์

0 รูปสี่เหลี่ยม

1 รูปหกเหลี่ยม

การเรียงตัวเซลล์พาเรงคิมาชั้นคอร์เทกซ์

0 เป็นระเบียบ

1 ไม่เป็นระเบียบ

ใบ

จำนวนชั้นเซลล์พาเรงคิมา

0 1 – 2 ชั้น

1 3 – 4 ชั้น

จำนวนชั้นเซลล์สเกลอเรงคิมา

0 1 – 2 ชั้น

1 3 – 4 ชั้น

ปลายยอด

การติดสีของนิวเคลียส

0 ติดสีเข้ม

1 ติดสีเข้มมาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 เซลล์วิทยา

เก็บตัวอย่างของพืชแต่ละชนิดมาศึกษาด้วยเทคนิคของเซลล์วิทยา ตามวิธีการของ Shiotani (1994) คัดเลือกเซลล์ที่กระจายตัวดีนำมาถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนโครโมโซม วัดขนาดความยาวของโครโมโซม และจัดทำอิดิโอแกรม และใช้ข้อมูลทางเซลล์วิทยาที่ได้นำมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้วิธีจัดจำแนกแบบ numerical taxonomy ตามวิธีการของ Sneath and Sokal (1973)

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 ปลายรากที่เริ่มงอก ขนาดความยาว 3 – 5 มิลลิเมตร

3.1.2 ขวดแก้วขนาดความจุ 15 มิลลิลิตร สำหรับเก็บตัวอย่างราก

3.1.3 แผ่นสไลด์และแผ่นปิดสไลด์

3.1.4 เข็มเขี่ย

3.1.5 คีมปลายแหลม

3.1.6 กระดาษป้ายชื่อ

3.1.7 อ่างต้มน้ำ

3.1.8 กล้องจุลทรรศน์ กล้องถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ และฟิล์ม

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาจำนวนโครโมโซม

3.2.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับการหยุดการสร้างสปินเดิลไฟเบอร์ (pre-treatment solution) ได้แก่ para-dichlorobenzene

3.2.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมน้ำยาในการหยุดการเจริญของเซลล์ และรักษาสภาพเซลล์ (fixative solution) คือ เอทธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะซิติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 3 : 1

3.2.3 สารเคมีสำหรับแยกเซลล์ (hydrolytic solution) คือ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล

3.2.4 สารเคมีที่ใช้ย้อมสีโครโมโซม คือ carbol fuchsin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 ใช้ปลายรากของต้นพืชทั้ง 15 ชนิด ตัดปลายรากบริเวณที่มีสีขาวขุ่น ยาว 3 – 5 มิลลิเมตร นำปลายรากไปแช่ในน้ำยา para-dichlorobenzene ในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 10 – 15 องศาเซลเซียส นาน 8 – 12 ชั่วโมง

3.3.2 นำปลายรากจากข้อ 3.3.1 ไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ นาน 5 นาที แล้วล้างด้วย เอทธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และน้ำเปล่า

3.3.3 นำปลายรากจากข้อ 3.3.2 แช่ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และน้ำเปล่า

3.3.4 นำปลายรากจากข้อ 3.3.3 ไปย้อมสีด้วย carbol fuchsin นาน 24 ชั่วโมง

3.3.5 นำปลายรากวางบนสไลด์ ตัดบริเวณปลายรากยาว 1 มิลลิเมตร ใช้เข็มขยี้เพื่อให้เซลล์กระจายตัวแล้วใช้สีย้อมหยดลงไป 1 หยด แล้วปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ ใช้หัวแม่มือกดลงบนแผ่นเพื่อให้เซลล์แนบติดสไลด์

3.4 การบันทึกข้อมูล

3.4.1 นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟส นับจำนวนโครโมโซมและบันทึกภาพ

3.4.2 นำภาพที่ได้ไปขยายด้วยเครื่องถ่ายเอกสาร ตัดโครโมโซมแล้วจัดคู่โครโมโซม และกำหนดตำแหน่งเซนโทรเมียร์ วัดความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (Ll) และความยาวแขนข้างสั้น (Ls) โดยใช้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์เป็นหลัก

3.4.3 นำค่า Ll Ls และ ΣLT มาคำนวณหาค่า Relative Length (RL) และค่า Centromeric Index (CI) ตามวิธีการของดวงทิพย์ (2539) โดยคำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\text{Relative Length (RL)} = \frac{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง}}{\text{ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมทุกคู่}}$$

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.4 นำค่า Centromeric Index (CI) มาใช้ในการกำหนดชนิดของโครโมโซม (ดัดแปลงจาก ดวงทิพย์, 2539) ได้ดังนี้

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

3.4.5 จัดขนาดโครโมโซม โดยกำหนดให้โครโมโซมเป็น 3 ขนาด คือ ขนาดใหญ่ (Large = L) ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 1 ซึ่งเป็นคู่ยาวที่สุด โครโมโซมขนาดกลาง (Medium = M) ได้แก่ โครโมโซมที่มีค่าความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมที่ยาวที่สุดรวมกับโครโมโซมที่สั้นที่สุด ส่วนโครโมโซมขนาดเล็ก (Small = S) ได้แก่ โครโมโซมที่มีค่าความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยโครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุด

3.4.6 การทำอิดิโอแกรม จัดเรียงโครโมโซมตามขนาดของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่ที่สุดไปหาคู่ที่เล็กที่สุด โดยกำหนดให้โครโมโซมคู่ที่ 1 เป็นคู่ใหญ่ที่สุด เรียงลำดับไปถึงจนถึงขนาดเล็กที่สุด ให้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์อยู่ในแนวเดียวกัน

3.5 การวิเคราะห์กลุ่มพืช

นำข้อมูลทางเซลล์วิทยาที่ได้มาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยวิธีจัดจำแนกแบบ numerical taxonomy ตามวิธีการ Sneath and Sokal (1973) โดยวิเคราะห์ทางสถิติแบบนอนพาราเมตริก ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ใช้โปรแกรม SPSS release 6.0

ข้อมูลทางเซลล์วิทยาที่ใช้ปรากฏใน Descriptor list ดังนี้

โครโมโซมชนิด metacentric

0 พบ
1 ไม่พบ
2 ไม่มีข้อมูล

โครโมโซมชนิด submetacentric

0 พบ
1 ไม่พบ
2 ไม่มีข้อมูล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

	โครโมโซมชนิด acrocentric		โครโมโซมชนิด telocentric
0	พบ	0	พบ
1	ไม่พบ	1	ไม่พบ
2	ไม่มีข้อมูล	2	ไม่มีข้อมูล

	ขนาดโครโมโซมทั้งหมด (ไมครอน)		จำนวนโครโมโซม (แท่ง)		
0	ขนาดสั้น (0 – 100 ไมครอน)	0	22 แท่ง	1	32 แท่ง
1	ขนาดยาว (มากกว่า 101 ไมครอน)	2	36 แท่ง	3	42 แท่ง
2	ไม่มีข้อมูล	4	48 แท่ง	5	63 แท่ง

การทดลองที่ 4 แบบแผน allozyme

เก็บตัวอย่างใบอ่อนของพืชแต่ละชนิดมาใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้เอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ acid phosphatase, esterase, malate dehydrogenase และ peroxidase ตามวิธีการของ Paisooksantivatana *et al.* (2001) และนำข้อมูลมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้วิธีจัดจำแนกแบบ numerical taxonomy ตามวิธีการของ Sneath and Sokal (1973)

4.1 วัสดุและอุปกรณ์

4.1.1 เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบชนิดแผ่น (slab)

4.1.2 ตู้เย็น และตู้แช่ –20 องศาเซลเซียส

4.1.3 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

4.1.4 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)

4.1.5 เครื่องกวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer)

4.1.6 เครื่องหมุนเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็น (refrigerated centrifuge)

4.1.7 เข็มฉีดยาใส่สารปรับปริมาตรได้ (micro syringe) ขนาด 100 ไมโครลิตร

4.1.8 โกร่งบดตัวอย่าง

4.1.9 ไมโครปิเปต

4.1.10 หลอดใส่สารขนาด 5 มิลลิเมตร (eppendrof tube)

4.1.11 เครื่องแก้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1.12 กล้องถ่ายรูป และฟิล์ม

4.1.13 อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ถุงมือ กระดาษชั่งสาร ช้อนตักสาร กระดาษป้ายชื่อ ปากกาเคมี ถาดพลาสติก กระดาษกรอง ฯลฯ

4.2 สารเคมีที่ใช้และวิธีการเตรียมสารในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (ภาคผนวก)

4.3 วิธีการทดลอง

4.3.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืช คือนำใบอ่อนของพืชตระกูลขิงทั้ง 15 ชนิด ล้างด้วยน้ำเปล่าให้สะอาดแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นแช่แข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

4.3.2 การสกัดเอนไซม์

1. ชั่งใบพืชตัวอย่าง 3 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปบดในโกร่งบดที่เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สกัดด้วย phosphate buffer 0.1 M pH 7.5 จำนวน 5 มิลลิลิตร
2. นำตัวอย่างที่สกัดได้จากข้อ 1 ไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วแยกสารละลายใสด้านบนที่ได้ใส่ใน eppendorf tube เก็บในตู้แช่ –20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำ polyacrylamide gel electrophoresis ต่อไป

4.3.3 การเตรียม slab gel (วิธีการเตรียมตามภาคผนวก)

1. ต่อชุดแผ่นแก้วสำหรับทำ slab gel ใช้ spacer เป็นตัวปรับความหนาของเจลตามความต้องการ (0.75 – 1.00 มิลลิเมตร)
2. เทสารละลายของเจล 8.5 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ให้สูง 15 เซนติเมตร จากนั้นหยดน้ำกลั่นให้คลุมผิวเจล
3. เสียบหวีลงใน gel plate
4. ดึงหวีออกแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 – 4 ครั้ง แล้วซับน้ำออกให้หมด

4.3.4 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. ต่อชุดทำอิเล็กโทรโฟรีซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วเติม electrode buffer ลงใน chamber
2. ใส่ตัวอย่างพืชที่ผสม marker dye solution ลงในช่องบน stracking gel โดยใช้ micropipet สำหรับ loading

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. ต่อขั้วบวกและลบเข้ากับ chamber เปิดสวิตช์ของเครื่องจ่ายไฟฟ้า โดยใช้กระแสที่ 220 โวลต์
4. เมื่อเวลาผ่านไป 3 – 4 ชั่วโมง สี bromophenol blue จะเคลื่อนที่มาถึงเหนือปลายล่างประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
5. นำแผ่นแก้วออกจาก chamber และนำแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นแก้วออกมาวางบน plate เพื่อย้อมเอนไซม์ต่อไป

4.3.5 การย้อมสีเอนไซม์ในเจล

เตรียม staining solution ของไอโซไซม์แต่ละชนิด เทลงใน plate ที่มีเจลอยู่ นำไปเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จะปรากฏแถบสี

4.4 การบันทึกข้อมูล

4.4.1 รูปแบบของแถบสี (banding pattern)

4.4.2 แผนภาพของแถบเอนไซม์ (zymogram)

นำค่าเจลที่ย้อมสีแล้วมาศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ จากตำแหน่ง จำนวน และขนาดความกว้างของแถบสี จากนั้นบันทึกค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Relative mobility ; Rm) ตามสูตรของอาภัสสรา (2537) ดังนี้

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

นำค่าที่ได้ไปเขียนแผนภาพไซโมแกรม

4.5 การวิเคราะห์กลุ่มพืช

กำหนดให้ตัวอย่างพืชเป็น operational taxonomic unit (OTU) และแถบสีเป็นลักษณะ (character) ค่าที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้จากการมีแถบสีหรือไม่มีแถบสีของแต่ละตัวอย่าง แปลงค่าที่มีแถบสีเป็น 1 และค่าที่ไม่มีแถบสีเป็น 0 (Sneath and Sokal, 1973) นำค่าที่ได้นี้มาวิเคราะห์ความแตกต่างของพืชตระกูลขิง 15 ชนิด โดยใช้เครื่องคอมพิวเตอร์โปรแกรม SPSS release 6.0 คำนวณหาระดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และจัดกลุ่มพืชตามระดับความสัมพันธ์โดยวิธีของ Jaccard's coefficient ที่ระดับความคล้ายคลึงกัน 95 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 5 การวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรรม

นำข้อมูลทางสัณฐานวิทยา กายวิภาคศาสตร์ เซลล์วิทยา และแบบแผน allozyme ร่วมกันมาวิเคราะห์กลุ่มพืช และจัดกลุ่มพืชตามระดับความสัมพันธ์ โดยวิเคราะห์ทางสถิติแบบนอนพาราเมตริก ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ใช้โปรแกรม SPSS release 6.0

สถานที่ในการดำเนินการทดลองและรวบรวมข้อมูล

สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่
ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่
ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ อ.หางดง จ.เชียงใหม่
แปลงรวบรวมพันธุ์ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาในการดำเนินการทดลอง

ระหว่างเดือนมิถุนายน 2545 ถึงเดือนตุลาคม 2546

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved