BRT 543022

การศึกษาเปรียบเทียบพืชสกุล *GOMPHIA* SCHREB. และ *OCHNA* L.

COMPARATIVE STUDIES OF *GOMPHIA* SCHREB. AND *OCHNA* L.

นางสาววิไลลักษณ์ สุดวิไล

วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2545
ISBN 974-668-618-6

12 ส.ย. 2545

โครงการพัฒนาองค์ความรู้และจัดทำนโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
c/o ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
73/1 ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี
กรุงเทพฯ 10400

การศึกษาเปรียบเทียบพืชสกุล *GOMPHIA* SCHREB. และ *OCHNA* L.

COMPARATIVE STUDIES OF *GOMPHIA* SCHREB. AND *OCHNA* L.

นางสาววิไลลักษณ์ สุดวิไล

วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พ.ศ. 2545

ISBN 974-668-618-6

การศึกษาเปรียบเทียบพืชสกุล *GOMPHIA* SCHREB. และ *OCHNA* L.

นางสาววิไลลักษณ์ สุดวิไล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2545

ISBN 974-668-618-6

COMPARATIVE STUDIES OF *GOMPHIA* SCHREB. AND *OCHNA* L.

MISS WILAILUX SUDWILAI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

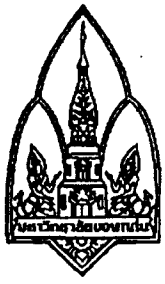
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

IN BIOLOGY

GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY

2002

ISBN 974-668-618-6



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาเปรียบเทียบพืชสกุล *GOMPHIA* SCHREB. และ *OCHNA* L.
ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์ นางสาววิไลลักษณ์ สุดวิไล
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปิยะดา ธีระกุลพิศุทธิ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประนอม จันทรโณทัย)

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมหมาย ปรีเปรม)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วันชัย สุ่มเล็ก)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สำเร็จการศึกษาเมื่อวันที่ 10 เม.ย. 2545

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น

BRT 543021

วิไลลักษณ์ สุดวิไล. 2545. ***การศึกษาเปรียบเทียบพืชสกุล Gomphia Schreb. และ Ochna L.*** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. [ISBN 974-668-618-6]

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รศ. ดร. ปิยะดา ธีระกุลพิศุทธิ์, รศ. ดร. ประนอม จันทรโณทัย

บทคัดย่อ

ศึกษาพืช 2 ชนิดคือ *Gomphia serrata* Kanis และ *Ochna integerrima* Merr. โดยศึกษากายวิภาคศาสตร์ด้วยการลอกผิว ตัดตามขวางใบ พัฒนาการของเมกะสปอร์และแกมีโทไฟต์เพศเมียด้วยวิธีพาราฟินและวิธีทำให้ใส พัฒนาการของไมโครสปอร์และแกมีโทไฟต์เพศผู้ด้วยวิธีพาราฟินและย้อมด้วยสีโพรพิโอโนคาร์มิน พบว่าปากใบของ *O. integerrima* และ *G. serrata* เป็นแบบพาราไซติกเซลล์คุมของ *O. integerrima* มีขนาดใหญ่กว่า และ *G. serrata* มีความหนาแน่นของปากใบมาก บริเวณเส้นใบย่อยมีเซลล์แปลกปลอมกระจายอยู่ จากการตัดตามขวางของใบพบเซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวของพืช 2 ชนิดทั้งด้านบนและด้านล่างเรียง 1 ชั้น ผนังเซลล์เรียบเรียงเป็นระเบียบ เนื้อเยื่อแพลิเสดมี 1-2 ชั้น ออวุลเป็นแบบคว่ำ ผนังออวุลมี 2 ชั้น ไมโครไพล์เกิดจากผนังออวุลชั้นใน ถุงเอ็มบริโอเป็นแบบโพลิโกนัม เมื่อแก่ถุงเอ็มบริโอของ *G. serrata* มีขนาดยาวกว่า *O. integerrima* ผนังอับเรณูประกอบด้วยชั้น เอ็นโดเดอร์มิส เอ็นโดทีเซียม เนื้อเยื่อชั้นกลาง และชั้นทาพีทัม พัฒนาการของแกมีโทไฟต์เพศผู้พบเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์แบ่งไมโอซิสครั้งที่ 2 ได้ 4 ไมโครสปอร์จัดเรียงแบบพีระมิด (tetrahedral) และมีแคลโลสห่อหุ้ม ในระยะที่เรณูเจริญเต็มที่มี 2 นิวเคลียส ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการงอกของเมล็ด *O. integerrima* โดยแช่เมล็ดในสารละลายกรดจิบเบอเรลลิค 0.3 มิลลิโมลาร์ และ 0.6 มิลลิโมลาร์ สารละลายกรดอะซิติลซาลิไซลิค 0.3 มิลลิโมลาร์ และ 0.6 มิลลิโมลาร์ พบว่าเมล็ดที่แช่ในสารละลายกรดอะซิติลซาลิไซลิค 0.6 มิลลิโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุด ต้นกล้าที่นำไปปลูกลงดิน พบว่าต้นอ่อนที่เกิดจากเมล็ดที่แช่ในสารละลายกรดจิบเบอเรลลิค ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ มีความสูงของต้นอ่อนและพื้นที่ใบต่อต้นสูงที่สุด

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *G. serrata* และ *O. integerrima* โดยใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสุ่ม 50 ชนิด โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่ามีไพรเมอร์ 29 ชนิดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *G. serrata* ได้และขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 89-1,122 คู่เบส ส่วนใน *O. integerrima* มีไพรเมอร์ 32 ชนิดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 129-1,585 คู่เบส

BRT 543022

Wilailux Sudwilai. 2002. ***Comparative studies of Gomphia Schreb. and Ocna L.*** Master of Science Thesis in Biology, Graduate School, Khon Kaen University. [ISBN 974-668-618-6]

Thesis Advisory Committee: Assoc.Prof.Dr. Piyada Theerakulpisut,
Assoc.Prof.Dr. Pranom Chantaranothai

Abstract

The anatomy of leaf, development of female and male gametophytes of *Gomphia serrata* Kanis and *Ochna integerrima* Merr. were studied using leaf epidermal peel preparation, paraffin sectioning of leaves and floral buds, clearing techniques for ovules and smearing techniques for anthers. The stomata of both species are of paracytic type, with longer guard cells in *O. integerrima* and higher stomatal density in *G. serrata*. Idioblasts are commonly distributed along the veinlet in both species. Transverse sections of leaves showed similar internal anatomy consisting of single layer of upper and lower epidermis, smooth epidermal cell wall, 1-2 layers of palisade parenchyma. The ovules are anatropous, bitegmic, micropyle formed from inner integument. The development of ovule in both species is of Polygonum type. The mature embryo sac of *G. serrata* is more elongated than that of *O. integerrima* Anther wall consists of four layers including an epidermis, an endothecium, a middle layer and a bi-nucleate tapetum. Microspore mother cells undergo meiosis resulting in 4 microspores in tetrahedral arrangement enclosed in a callose wall. Mature male gametophytes are bi-nucleate. The effect of gibberellic acid (GA_3) and acetylsalicylic acid (ASA) on seed germination was observed by pretreatment of *O. integerrima* seeds with 0.3 and 0.6 mM GA_3 or ASA prior to germination. Acetylsalicylic acid 0.6 mM is the most effective treatment for promoting seed germination.

The PCR condition for RAPD analysis of *G. serrata* and *O. integerrima* DNA were screened with 50 arbitrary primers. Twenty-nine primers resulted in the amplification of *G. serrata* DNA bands ranging from approximately 89-1,122 base pairs, thirty-two primers for *O. integerrima* DNA bands ranging from approximately 129-1,585 base pairs.

งานวิทยานิพนธ์นี้มอบส่วนดีให้บุพการีและคณาจารย์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ปิยะดา ธีระกุลพิศุทธิ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ประนอม จันทรโณทัย ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา ตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ตลอดจนปลูกฝังการทำงานอย่างมีระบบ และเป็นตัวอย่างที่ดีแก่ผู้วิจัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัจฉรา ธรรมถาวร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจแก้ไขข้อผิดพลาดวิทยานิพนธ์ ซึ่งทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สำอาง หอมชื่น กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจแก้ไขข้อผิดพลาดวิทยานิพนธ์ ซึ่งทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และเจ้าหน้าที่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมือการทำวิจัย

ขอขอบคุณโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (Biodiversity Research and Training Program, BRT) รหัสโครงการ BRT 543022 ที่สนับสนุนทุนการวิจัย

ขอขอบคุณ คุณภาสกร บุญชาลี คุณจรัล ลีรติวงศ์ คุณมนทิณี กมลธรรม ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างภาคสนาม และภาพถ่าย

ขอขอบพระคุณ คุณบุญเสฐียร บุญสูง คุณปวีณา สาลีทอง ที่ให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

ขอขอบคุณ คุณกนกอร โคตรนนท์ คุณประภาพร พงษ์ไทย คุณจุฬาลักษณ์ ลาเกิด ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านอื่น ๆ รวมทั้งคำแนะนำต่าง ๆในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ นักศึกษาปริญญาโท สาขาสรีรวิทยาและชีวโมเลกุลของพืช สาขากายวิภาคศาสตร์และสาขาอนุกรมวิธานของพืช ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ช่วยเหลือให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ และเป็นกำลังใจตลอดการวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาและพี่ ๆ ทุกคน ที่เป็นที่รักเคารพของข้าพเจ้า ที่ให้อิสระในการศึกษา เป็นกำลังใจอันสำคัญยิ่ง พร้อมทั้งเกื้อหนุนข้าพเจ้าตลอดมา

วิไลลักษณ์ สุดวิไล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
คำอุทิศ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1 หลักการและเหตุผล	1
2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	2
3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
4 ขอบเขตและข้อจำกัดในการวิจัย	2
5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 การศึกษาการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นอ่อน	5
1 การตรวจเอกสาร	6
2 วิธีการศึกษา	6
3 ผลการศึกษา	7
4 สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา	9
บทที่ 3 การศึกษากายวิภาคศาสตร์ของใบ	10
1 การตรวจเอกสาร	10
2 วิธีการศึกษา	11
3 ผลการศึกษา	12
4 สรุปผลการศึกษา	13
5 วิจารณ์ผลการศึกษา	13
บทที่ 4 การศึกษาพัฒนาการของเมกะสปอร์และแกมีโทไฟต์เพศเมีย	16
1 การตรวจเอกสาร	17
2 วิธีการศึกษา	17
3 ผลการศึกษา	18
4 สรุปผลการศึกษา	18
5 วิจารณ์ผลการศึกษา	18
บทที่ 5 การศึกษาพัฒนาการของอับเรณูและเรณู	29
1 การตรวจเอกสาร	30
2 วิธีการศึกษา	30
3 ผลการศึกษา	31
4 สรุปผลการศึกษา	32

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5 วิจารณ์ผลการศึกษา	32
บทที่ 6 การศึกษาจำนวนโครโมโซม	36
1 การตรวจเอกสาร	37
2 วิธีการศึกษา	37
3 ผลการศึกษา	38
4 สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา	38
บทที่ 7 การศึกษาการสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	40
1 การตรวจเอกสาร	40
2 วิธีการศึกษา	45
3 ผลการศึกษา	52
4 สรุปผลการศึกษา	58
5 วิจารณ์ผลการศึกษา	59
บทที่ 8 สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา	66
เอกสารอ้างอิง	69
ภาคผนวก	73
ประวัติผู้เขียน	78

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ความสูงเฉลี่ยและพื้นที่ใบต่อต้นของต้นอ่อน *O. integerrima* หลังจากย้ายปลูกลงดิน เป็นเวลา 30 วัน ที่เกิดจากเมล็ดที่แช่ในสารละลายกรดจิบเบอเรลลิค และ กรดอะซิติลซาลิไซลิค ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ก่อนเพาะ 8

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 50

ตารางที่ 3 ปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดจากใบอ่อนของ *O. integerrima* และ *G. serrata* 52

ตารางที่ 4 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *O. integerrima* และ *G. serrata* 54

ตารางที่ 5 ขนาดของดีเอ็นเอของ *O. integerrima* ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยเทคนิค RAPD 56

ตารางที่ 6 ขนาดของดีเอ็นเอของ *G. serrata* ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยเทคนิค RAPD 57

ตารางที่ 7 ลักษณะที่เหมือนกันและแตกต่างกันของ *G. serrata* และ *O. integerrima* 66

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ดอก *O. integerrima* และ *G. serrata* 4

ภาพที่ 2 เปอร์เซ็นต์การงอกของ *O. integerrima* ในแต่ละวันหลังจากแช่เมล็ดในสารละลายกรดจิบเบอเรลลิค และ กรดอะซิติลซาลิไซลิคความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ก่อนเพาะ 7

ภาพที่ 3 เปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุดของเมล็ด *O. integerrima* ที่แช่ในสารละลายกรดจิบเบอเรลลิค และ กรดอะซิติลซาลิไซลิคความเข้มข้นระดับต่าง ๆก่อนเพาะ 8

ภาพที่ 4 ความสูงของต้นอ่อน *O. integerrima* หลังจากย้ายปลูกลงดินเป็นเวลา 30 วัน ที่เกิดจากเมล็ดที่แช่ในสารละลายกรดจิบเบอเรลลิค และ กรดอะซิติลซาลิไซลิค ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ 8

ภาพที่ 5 พื้นที่ใบของต้นอ่อน *O. integerrima* หลังจากย้ายปลูกลงดิน เป็นเวลา 30 วัน ที่เกิดจากเมล็ดที่แช่ในสารละลาย กรดจิบเบอเรลลิค และ กรดอะซิติลซาลิไซลิคความเข้มข้นระดับต่าง ๆ 9

ภาพที่ 6 เนื้อเยื่อชั้นผิว *O. integerrima* และ *G. serrata* 14

ภาพที่ 7 กายวิภาคศาสตร์แผ่นใบ 15

ภาพที่ 8 พัฒนาการของเมกะสปอร์และแกมีโทไฟต์ของ *O. integerrima* 20

ภาพที่ 9 พัฒนาการของเมกะสปอร์และแกมีโทไฟต์ของ *O. integerrima* โดยวิธีพาราฟิน 22

ภาพที่ 10 พัฒนาการของเมกะสปอร์และแกมีโทไฟต์ของ *G. serrata* 25

ภาพที่ 11 พัฒนาการของเมกะสปอร์และแกมีโทไฟต์ของ *G. serrata* โดยวิธีพาราฟิน 27

ภาพที่ 12 เนื้อเยื่อตัดตามขวางของอับเรณู 33

ภาพที่ 13 พัฒนาการของเรณูของ *O. integerrima* 34

ภาพที่ 14 พัฒนาการของเรณูของ *G. serrata* 35

ภาพที่ 15 โครโมโซมของ *O. integerrima* และ *G. serrata* 39

ภาพที่ 16 ปริมาณดีเอ็นเอต่อเนื้อเยื่อพืช 1กรัม 52

ภาพที่ 17 ค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ 53

ภาพที่ 18 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสของตัวอย่างดีเอ็นเอ *G. serrata* และ *O. integerrima* ที่สกัดได้จากแต่ละวิธี 63

ภาพที่ 19 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *G. serrata* และ *O. integerrima* โดยเทคนิค RAPD 64

ภาพที่ 20 เปรียบเทียบแบบแผนดีเอ็นเอของ *G. serrata* และ *O. integerrima* 65

บทที่ 1
บทนำ

1. หลักการและเหตุผล

พืชในสกุล *Gomphia* Schreb. และ *Ochna* L. จัดอยู่ในวงศ์ Ochnaceae มีลักษณะเป็นไม้พุ่มเล็กถึงไม้ต้น ใบเดี่ยวออกสลับรูปขอบขนาน รูปไข่กลับ (obovate) หรือรูปหอกกลับ (oblanceolate) ขอบจักถี่เส้นใบละเอียด ดอกช่อออกเป็นกระจุกตามกิ่ง กลีบเลี้ยง 5 กลีบ กลีบดอก 5-10 กลีบ สีเหลืองร่วงง่าย เกสรเพศผู้มีจำนวนมาก เกสรเพศเมียมี 2-10 (-15) คาร์เพล รังไข่มี 1 คาร์เพลและ 1 ออวุล ผลเมล็ดเดี่ยวแข็ง (drupe) ผลสุกมีสีดำติดอยู่บนฐานรองดอกสีแดง (Kanis, 1934) เจริญได้ดีในดินทราย ดินร่วน ดินหินภูเขา ทนแล้งและทนไฟได้ดีพบตามป่าเต็งรังและป่าดิบแล้ง ออกดอกในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนพฤษภาคม ประโยชน์ในด้านสมุนไพรของ *O. integerrima* คือรากสามารถขับพยาธิ แก้น้ำเหลืองเสีย เนื้อไม้แข็งปานกลางสีน้ำตาลแดงใช้สร้างบ้านได้ (กรมวิชาการเกษตร, 2542) ส่วน *G. serrata* รากและใบนำมาต้มแก้โรคกระเพาะ และเป็นยาสำหรับแก้อาการอาเจียน กิ่งอ่อนนำมาแนบไว้กับฟันที่ปวดสามารถลดอาการปวดฟันได้ (Kanis, 1934) ชาวแอฟริกาตะวันตกยังใช้สารสกัดจาก *Lophira alata* เป็นยาสมุนไพรบรรเทาอาการเจ็บปวด และมีรายงานว่าสารนี้มีโครงสร้างคล้าย polyphenol สามารถต่อต้านและลดการเกิดเนื้องอกได้ (Murakami et al.,1991)

พืชวงศ์ Ochnaceae ที่พบในประเทศไทยมีทั้งหมด 4 สกุล สำหรับสกุล *Gomphia* การกระจายพันธุ์ส่วนมากจะพบในแถบแอฟริกา ส่วนแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีเพียง 1 ชนิด คือ *G. serrata* Kanis ส่วนสกุล *Ochna* การกระจายพันธุ์ส่วนมากพบในแถบแอฟริกา สำหรับแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีพืชสกุลนี้ 4 ชนิด แต่ในประเทศไทยมีเพียง 1 ชนิด คือ *O. integerrima* Merr. จะพบว่าในประเทศไทยมีพืชทั้งสองสกุลนี้เพียงสกุลละ 1 ชนิดเท่านั้น จึงน่าที่จะมีการศึกษาพืชทั้ง 2 ชนิดนี้ไว้ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ อณูชีวโมเลกุล และสรีรวิทยาเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐาน นอกจากนี้นักอนุกรมวิธานเคยจัดให้ *G. serrata* อยู่ในสกุล *Ochna* โดยใช้จำนวนเกสรเพศผู้ จำนวนรังไข่ และลักษณะเส้นใบย่อยช่วยในการจำแนก ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จะนำข้อมูลที่ได้มาสนับสนุนว่าพืชทั้งสองชนิดอยู่ต่างสกุลกัน นอกจากนี้ดอกของพืชทั้งสองสกุลมีลักษณะสวยงามและมีกลิ่นหอมเหมาะที่จะนำมาพัฒนาเป็นไม้ประดับและให้มีการขยายพันธุ์ ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาอัตราการงอกของเมล็ดของพืชทั้ง 2 ชนิดนี้ด้วย

ในปัจจุบันนี้การจำแนกพันธุ์พืชได้นำเทคนิคทางชีวเคมีมาใช้กันอย่างกว้างขวาง เช่น การใช้เอนไซม์โปรตีน หรือดีเอ็นเอ แต่การใช้เอนไซม์ หรือโปรตีนมีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมมาเกี่ยวข้องอยู่มากทำให้คลาดเคลื่อนได้ (ภาณี เตมีศักดิ์ และคณะ, 2538) สำหรับวิธีการที่นิยมกันคือวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) โดยการใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว สายสั้นที่มีเบส 10 ตัว ทำหน้าที่สุ่มดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แล้วนำผลที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาวิเคราะห์อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) เปรียบเทียบแถบ (band) ที่ได้ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการศึกษาซึ่งอาจเป็นชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกัน จะได้ข้อมูลในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ (ปรีชา ประเทพา, 2540)

2. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

G. serrata มีชื่อพื้นเมืองว่า ช้างน้าว ช้างโน้ม (เต็ม สมิตินันท์, 2523) เป็นไม้พุ่มสูงประมาณ 1-3 เมตร เปลือกสีน้ำตาล กิ่งเกลี้ยงไม่มีขน ใบ รูปไข่กลับ ฐานใบรูปลิ่ม ปลายใบแหลม ทู่หรือมน ขอบใบหยักฟันเลื่อย ก้านใบอวบยาว 4-5 มิลลิเมตร ขนาดใบยาว 14-26 เซ็นติเมตร กว้าง 2.6-5.6 เซ็นติเมตร ใบหนาเกลี้ยงคล้ายแผ่นหนัง เส้นใบด้านหลังใบไม่ชัดเจน เส้นกลางใบนูนเด่นชัด ปลายเส้นใบย่อยเชื่อมกัน ด้านท้องใบเส้นกลางใบนูนเด่นชัด เส้นใบย่อยไม่ชัดเจน ช่อดอก ออกตามซอกใบ ก้านช่อดอกยาว 2-4.1 เซ็นติเมตร ก้านดอกยาว 9-10 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยง รูปรีปลายกลีบค่อนข้างมนสีเขียวขอบเรียบมี 5 กลีบ ผิวด้านนอกและด้านในเรียบ ยาว 5-6 มิลลิเมตร กว้าง 3-4 มิลลิเมตร กลีบดอก สีเหลืองมี 5 กลีบ ขอบเรียบ ยาว 8-9 มิลลิเมตร กว้าง 3-4 มิลลิเมตร เกสรเพศผู้ มี 8-9 อัน ไม่มีก้านชูอับเรณู อับเรณูติดที่ฐานรองดอก อับเรณูยาว 4-5 มิลลิเมตร ช่องเปิดอยู่ด้านปลาย เกสรเพศเมีย เชื่อมเป็นหลอดเรียวแหลม ยาว 5-6 มิลลิเมตร รังไข่มี 5-6 อัน รูปเมล็ดถั่ว ยาว 0.5-1 มิลลิเมตร กว้างประมาณ 0.4 มิลลิเมตร แต่ละรังไข่มี 1 ออวุล ผล รูปรีผลอ่อนสีเขียว ผลแก่สีดำ

O. integerrima มีชื่อพื้นเมืองว่า ช้างน้าว ช้างโน้ม ช้างโหม กระแจะ ตาลเหลือง และขมิ้นพระต้น (เต็ม สมิตินันท์, 2523) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์คือ เป็นไม้ต้นขนาดกลางสูง 4-8 เมตร เปลือกสีน้ำตาลเข้ม ผิวค่อนข้างเรียบหรือแตกเป็นสะเก็ด กิ่งเกลี้ยงไม่มีขน ใบ รูปรี ฐานใบรูปลิ่ม ปลายใบแหลม ทู่หรือมน ขอบใบหยักฟันเลื่อย ก้านใบอวบ ยาวประมาณ 3 มิลลิเมตร ใบยาว 9.5-14.6 เซ็นติเมตร กว้าง 4-6.5 เซ็นติเมตร ใบหนาเกลี้ยงคล้ายแผ่นหนัง เส้นใบด้านหลังใบชัดเจน เส้นกลางใบนูนเด่นชัด ปลายเส้นใบย่อยไม่เชื่อมกัน ด้านท้องใบเส้นกลางใบนูนเด่นชัด เส้นใบย่อยไม่ชัดเจน ช่อดอก ออกตามซอกใบ แต่ละช่อมีดอก 4-8 ดอก ก้านช่อดอกยาว 3-22 มิลลิเมตร ก้านดอกยาว 2-2.5 เซ็นติเมตร กลีบเลี้ยง รูปรีกว้าง ปลายกลีบมน ขอบเรียบมี 5 กลีบ ผิวด้านนอกและด้านในเรียบ ยาว 1.3-1.5 เซ็นติเมตร กว้าง 8-10 มิลลิเมตร กลีบดอก สีเหลืองมี 5 กลีบ ขอบหยัก ยาว 1.8-2.0 เซ็นติเมตร กว้าง 1.2-1.4 เซ็นติเมตร เกสรเพศผู้ มี 32-49 อัน ก้านชูอับเรณูยาว 4-9 มิลลิเมตร อับเรณูยาว 4-5 มิลลิเมตร ช่องเปิดอยู่ด้านปลาย เกสรเพศเมีย เชื่อมกันเป็นหลอด ยาว 2.0-2.3 เซ็นติเมตร ปลายแฉก รังไข่มี 8-9 อัน รูปคล้ายเมล็ดถั่ว ยาวประมาณ 1.2 มิลลิเมตร กว้างประมาณ 1 มิลลิเมตร แต่ละรังไข่มี 1 ออวุล ผล รูปรี ผลอ่อนสีเขียว ผลแก่สีดำ (ภาพที่ 1)

3. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาเปรียบเทียบอัตราการงอกและการเจริญของต้นอ่อนของพืชทั้ง 2 สกุล
2. ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะกายวิภาคศาสตร์ของใบของพืช 2 สกุล
3. ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของเมกะสปอร์ และแกมีโทไฟต์เพศเมียของพืชทั้ง 2 สกุล
4. ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของอับเรณู ไมโครสปอร์ และแกมีโทไฟต์เพศผู้ของพืชทั้ง 2 สกุล
5. ศึกษาเปรียบเทียบจำนวนโครโมโซมของพืชทั้ง 2 สกุล
6. ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะอณูชีวโมเลกุลของพืชทั้ง 2 สกุล

4. ขอบเขตและข้อจำกัดของการวิจัย

1. พืชที่ใช้ในการศึกษา คือ *O. integerrima* จากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี โคกภูตากา อ. ภูเวียง จ. ขอนแก่น อุทยานแห่งชาติ

ภูพาน อำเภอภูพาน จ. สกลนคร และ ภายในบริเวณมหาวิทยาลัยขอนแก่น ส่วน *G. serrata* เก็บตัวอย่างจากอุทยานแห่งชาติภูพาน อำเภอภูพาน จ. สกลนคร และ อ. ห้วยผึ้ง จ. กาฬสินธุ์

2. ศึกษาอัตราการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นอ่อน

3. ศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ ได้แก่ กายวิภาคศาสตร์ของใบ ชนิด ขนาด ความหนาแน่นของปากใบ

4. ศึกษาพัฒนาการของเมกะสปอร์แและแกมีโทไฟต์เพศเมีย

5. ศึกษาพัฒนาการของอับเรณู ไมโครสปอร์และแกมีโทไฟต์เพศผู้

6. ศึกษาจำนวนโครโมโซม

7. ศึกษาเบื้องต้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA โดยอาศัยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR)

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงปัจจัยที่ช่วยเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ดของพืชทั้ง 2 สกุล

4. ทราบกายวิภาคศาสตร์ของใบ ปากใบ ความหนาแน่นของปากใบของพืชทั้ง 2 สกุล

3. ทราบพัฒนาการของเมกะสปอร์ และแกมีโทไฟต์เพศเมียของพืชทั้ง 2 สกุล

4. ทราบพัฒนาการของอับเรณู ไมโครสปอร์ และแกมีโทไฟต์เพศผู้ของพืชทั้ง 2 สกุล

5. ทราบจำนวนโครโมโซมของพืชทั้ง 2 สกุล

6. ทราบวิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมเพื่อนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณ โดยเทคนิค PCR-RAPD และทราบไพรเมอร์ที่ช่วยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชทั้ง 2 สกุล

ภาพที่ 1. ก: ดอก *O. integerrima* ข: ดอก *G. serrata*

บทที่ 2
การศึกษาการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นอ่อน

เมล็ดเป็นสิ่งเริ่มต้นและสิ้นสุดของพืชในแต่ละช่วงอายุ ในชั่วชีวิตหนึ่ง ๆของพืชที่มีเมล็ดจะเริ่มต้นที่เมล็ดและอีกนัยหนึ่งจะสิ้นสุดด้วยการสร้างเมล็ดพันธุ์ เพื่อเป็นตัวนำลักษณะต่าง ๆของพืชนั้นไปยังชั่วอายุต่อไป เมล็ดพืชจึงเริ่มมีกำเนิดและมีการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆอยู่บนต้นพืชในส่วนของดอก การงอกของเมล็ดหมายถึงระยะตั้งแต่เริ่มแรกที่เมล็ดมีขบวนการต่าง ๆเกิดขึ้นในเมล็ดที่กำลังพักตัวไปจนถึงระยะที่ต้นอ่อนเจริญเติบโตและพัฒนาไปเป็นต้นกล้าที่แข็งแรงสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ต่อไปภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม (จวงจันทร์ ดวงพัตรา, 2521) การงอกของเมล็ดต้องได้รับปัจจัยที่จำเป็นเพื่อให้กระบวนการต่าง ๆของการงอกเกิดขึ้น ปัจจัยที่จำเป็นได้แก่ (1) น้ำหรือความชื้นโดยทั่วไปแล้วเมล็ดที่อยู่ในสภาพที่แห้งมีความชื้น 6-14 เปอร์เซ็นต์ แต่การที่เมล็ดจะงอกได้นั้นเมล็ดต้องมีความชื้น 30-60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (ศุภชัย เบญจดำรงกิจ และ ประพันธ์ ผู้กฤตยาคามี, 2534) (2) อากาศ การงอกของเมล็ดเป็นขบวนการที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ที่มีชีวิตและต้องใช้พลังงานจึงต้องใช้ออกซิเจนในการหายใจ โดยทั่วไปเมล็ดพืชงอกได้ในบรรยากาศที่มีออกซิเจนประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ 0.03 เปอร์เซ็นต์ และกาซไนโตรเจนประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ (Copeland & McDonald, 1995) (3) อุณหภูมิที่เหมาะสม เมล็ดพืชแต่ละชนิดสามารถงอกได้ในช่วง หรือระดับอุณหภูมิที่แตกต่างกัน อุณหภูมิสูงเกินไป หรือต่ำเกินไป จะยับยั้งหรือทำให้เมล็ดไม่งอก ปกติเมล็ดจะงอกได้ที่อุณหภูมิ 10-35 องศาเซลเซียส (จวงจันทร์ ดวงพัตรา, 2521) (4) แสง เมล็ดบางชนิดไม่ต้องการแสงในการงอก เช่นเมล็ดของพืชพวกไม้วงศ์ยาง ได้แก่ *Shorea curtisii*, *S. dasyphylla*, *S. leprosula* และ *S. parvifolia* (Yue-Luan, 1993) เมล็ดพืชบางชนิดอยู่ในสภาพที่มีชีวิต แต่ไม่ยอมงอกในสภาพแวดล้อมต่าง ๆที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดซึ่งลักษณะนี้เรียกว่าเมล็ดมีการพักตัว เมล็ดที่มีการพักตัวเกิดขึ้นเนื่องจากสาเหตุหลายประการ เช่นการพักตัวที่เกิดขึ้นเนื่องจากส่วนของเปลือก หรือส่วนที่ทำหน้าที่ห่อหุ้มเมล็ดไม่ยอมให้น้ำซึมผ่านเข้าไปยังส่วนต่าง ๆภายในเมล็ด ส่วนใหญ่พบในพืชวงศ์ถั่ว (Leguminosae) วงศ์ฝ้าย (Malvaceae) การพักตัวของเมล็ดเนื่องจากส่วนประกอบภายในของเมล็ด (endogenous dormancy) และจากสารยับยั้งการเจริญเติบโต สารเคมีที่ยับยั้งการงอกของเมล็ด เช่น คอมาริน (coumarin) กรดแอบซิสิค (abscisic acid) และไซยาไนด์ (cyanide) สำหรับไซยาไนด์ถ้ามีในปริมาณน้อยก็จะไม่มีผลต่อการยับยั้งการงอกของเมล็ดได้ (Copeland & McDonald, 1995) การแก้การพักตัวของเมล็ดอาจทำได้โดยใช้สารเร่งการงอกของเมล็ด เช่น ออกซิน (auxin) จิบเบอเรลลิน (gibberellin, GA) เอทธิลิน (ethylene) (จวงจันทร์ ดวงพัตรา, 2521) ไธโอยูเรีย (thiourea) ซึ่งเป็นสารที่เร่งการงอกของเมล็ดที่ไม่งอกในที่มืด หรืออุณหภูมิสูง (ภัญชนา มีแก้วกุญชร และ ช. ณิฏฐ์ศิริ สุยสุวรรณ, 2535) นอกจากนี้ Raskin (1992) ยังรายงานว่า ซาลิไซเลต (salicylate) เป็นฮอร์โมนชนิดใหม่ของพืช และกรดอะซิติลซาลิไซลิค (acetylsalicylic acid, ASA) เป็นอนุพันธ์ของซาลิไซเลตสังเคราะห์ขึ้นเมื่อต้นยาสูบติดเชื้อจากไวรัส (Takaki & Rosim, 2000) ซึ่งสารนี้มีผลต่อการชักนำให้พืชออกดอก และทนต่ออุณหภูมิสูงได้ และเมล็ดที่บ่มในสารละลายกรดซาลิไซลิคยังมีอัตราการงอกสูงด้วย (Raskin, 1992)

1. การตรวจเอกสาร

ศุภชัย เบญจดำรงกิจ และ ประพันธ์ ผู้กฤตยาคามี (2534) ศึกษาการงอกของเมล็ดพะยูงในวัสดุเพาะชำที่แตกต่างกัน โดยทำการศึกษาในตู้เพาะในห้องปฏิบัติการและในเรือนเพาะชำ สำหรับการศึกษาในตู้เพาะใช้วัสดุ 5 ชนิด คือ ขุยมะพร้าว ทรายละเอียด ดิน vermiculite เบอร์ 4 และกระดาษทิชชู ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส ให้แสง 8 ชั่วโมงต่อวัน ความชื้นสัมพัทธ์ 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เพาะในเรือนเพาะชำใช้ ทรายละเอียด ดิน และทรายโรยด้วยขุยมะพร้าวหนา 1-1.5 เซ็นติเมตร รดน้ำวันละ 2 ครั้ง เช้า และเย็น ในการทดสอบการงอกครั้งนี้เมล็ดที่ถือว่างอก คือเมล็ดซึ่งสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นสมบูรณ์โผล่พ้นผิววัสดุเพาะ กรณีที่ใช้เพาะกระดาษทิชชูเป็นวัสดุเพาะ เมล็ดที่ถือว่างอกคือมีรากแรกเกิด (radicle) ยาวประมาณ 4 เท่าของความยาวเมล็ดและเจริญเป็นต้นกล้าปกติ ทำการทดสอบการงอก 30 วัน ผลการศึกษาพบว่า วัสดุทุกชนิดยกเว้นดิน สามารถใช้ได้ดีในการเพาะเมล็ดไม้พะยูงทั้งห้องปฏิบัตรการและในเรือนเพาะชำ

ภัญชนา มีแก้วกุญชร และ ช. ณิฏฐ์ศิริ สุยสุวรรณ (2535) ศึกษาผลของสารเคมีต่าง ๆที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดและผลผลิตของมะเขือเปราะ สารเคมีต่าง ๆที่ใช้ได้แก่ น้ำกลั่น น้ำผึ้ง 5 เปอร์เซ็นต์ โปรแตสเซียมไนเตรต (KNO_3) 0.2 เปอร์เซ็นต์ ไธโอยูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ จิบเบอเรลลิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ และไคเนติน (kinetin) 100 ppm แช่เมล็ดมะเขือเปราะนาน 12 ชั่วโมงก่อนเพาะเมล็ด ผลการศึกษาพบว่าเมล็ดมะเขือเปราะที่แช่ในสารละลายไธโอยูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ให้ผลดีที่สุดคือเมล็ดงอกเร็วกว่าวิธีอื่น ๆ เปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุดและน้ำหนักผลผลิตรวมจากค่าเฉลี่ยแต่ละเดือนมากที่สุด

Takaki & Rosim (2000) ทดสอบผลของกรดอะซิติลซาลิไซลิค ต่อการงอกของเมล็ด *Raphanus sativus* L. cvar Early Scarlet Globe ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ทำการทดลองโดยแช่เมล็ดก่อนเพาะในน้ำกลั่น หรือกรดอะซิติลซาลิไซลิค 10 ไมโครโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆในช่วง 5.5-46.7 องศาเซลเซียสก่อนเพาะนับจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน พบว่าเมล็ดที่แช่ในกรดอะซิติลซาลิไซลิค ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ก่อนนำไปเพาะที่อุณหภูมิ 21.4-32.6 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงถึง 80.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดที่แช่ในน้ำกลั่นไม่งอก

2. วิธีทำการศึกษา

2.1 ศึกษาการงอกของเมล็ด

วิธีการศึกษามีดังนี้

2.1.1 เก็บเมล็ดที่แก่มาตากให้แห้ง

2.1.2 แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก

2.1.3 แช่เมล็ดที่แกะเปลือกแล้วในสารละลายกรดจิบเบอเรลลิค (GA_3) ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์, 0.6 มิลลิโมลาร์ สารละลายกรดอะซิติลซาลิไซลิค (ASA) ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์, 0.6 มิลลิโมลาร์ และในน้ำกลั่น โดยแช่เมล็ดในสารละลายความเข้มข้นต่าง ๆนาน 24 ชั่วโมง

2.1.4 นำเมล็ดที่แช่ในสารละลายความเข้มข้นต่าง ๆมาเพาะในกล่องพลาสติกใสบนกระดาษทิชชู รดน้ำทุกวัน วันละ 10 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงวันละ 8 ชั่วโมงนับจำนวนเมล็ดที่งอก และวัดความยาวของต้นอ่อนทุกวันเป็นเวลา 30 วัน ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ๆละ 30 เมล็ด

2.1.5 เมื่อครบ 30 วัน ต้นอ่อนที่ได้นำไปปลูกลงกระถางเพื่อศึกษาการเจริญเติบโต

2.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นอ่อน

มีวิธีการศึกษาดังนี้

2.2.1 นำดินรุ่งรุจีใส่ลงในกระถางพลาสติกโดยให้ทุกกระถางมีปริมาณเท่ากัน

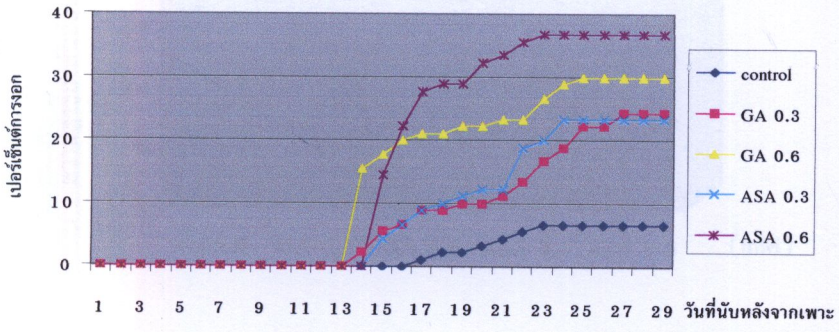
2.2.2 ย้ายต้นอ่อนจากแต่ละกล่องพลาสติก มาปลูกในกระถางที่เตรียมดินไว้

2.2.3 รดน้ำทุกวันและวัดความยาวต้น หาพื้นที่ใบทุก 3 วัน เป็นเวลา 1 เดือน

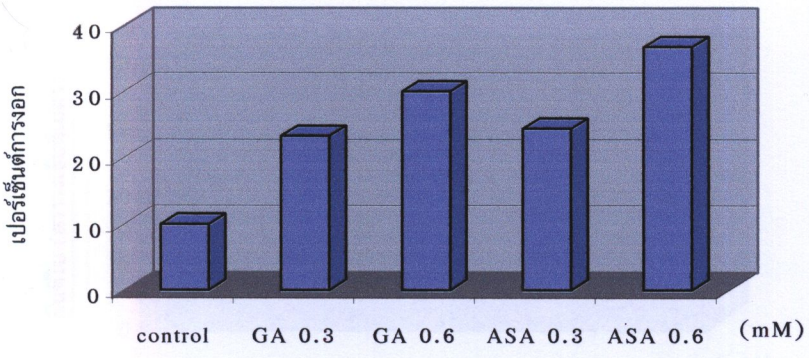
3. ผลการศึกษา

จากการศึกษาการงอกของ *O. integerrima* และ *G.serrata* ที่แกะเปลือกหุ้มเมล็ดและแช่ในน้ำกลั่น สารละลายกรดจิบเบอเรลลิค ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์, 0.6 มิลลิโมลาร์ สารละลายกรดอะซิติลซาลิไซลิค ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์, 0.6 มิลลิโมลาร์ โดยแช่เมล็ดไว้นาน 24 ชั่วโมงก่อนที่จะนำมาเพาะในกล่องพลาสติกใส บนกระดาษทิชชู พบว่า ก่อนที่เมล็ดจะงอกเมล็ดจะบวม หลังจากนั้นใบเลี้ยงทั้งสองจะเริ่มแยกออกจากกัน และเริ่มมีรากงอกออกมา เมล็ดของ *O. integerrima* ที่แช่ในสารละลายกรดอะซิติลซาลิไซลิค ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุด (ภาพที่ 2,3) ส่วนเมล็ดของ *G. serrata* ไม่งอกทุกความเข้มข้นของสารละลาย และผลของสารละลายกรดจิบเบอเรลลิค และ กรดอะซิติลซาลิไซลิค ที่มีต่อการงอกของเมล็ดมีความแตกต่างทางสถิติ แต่ระดับความเข้มข้นของสารละลายไม่มีความแตกต่างทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าเมล็ดที่แช่ในสารละลายกรดจิบเบอเรลลิคทั้งสองความเข้มข้นงอกวันที่ 14 หลังจากเพาะ เมล็ดที่แช่ในสารละลาย กรดอะซิติลซาลิไซลิค ทั้งสองความเข้มข้นงอกวันที่ 15 หลังจากเพาะและเมล็ดที่แช่ในน้ำงอกวันที่ 17 หลังจากเพาะ วัดความยาวของต้นกล้าทุกวัน พบว่าต้นกล้าของเมล็ดที่แช่ในสารละลายกรดจิบเบอเรลลิค ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ มีความยาวเฉลี่ยสูงที่สุด

ต้นกล้าที่นำไปปลูกลงดินแล้ววัดความสูงและหาพื้นที่ใบทุก ๆ 3 วัน พบว่าต้นอ่อนที่เกิดจากเมล็ดที่แช่ในสารละลายกรดจิบเบอเรลลิคความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ มีความสูงของต้นอ่อนสูงที่สุด (ตารางที่ 1 และภาพที่4) รองลงมาคือต้นอ่อนที่เกิดจากเมล็ดที่แช่ในสารละลายกรดจิบเบอเรลลิคความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ซึ่งสารละลายกรดจิบเบอเรลลิค กับ กรดอะซิติลซาลิไซลิคมีผลต่อความสูงของต้นอ่อนแตกต่างกันทางสถิติและความเข้มข้นของสารละลายก็มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนพื้นที่ใบต่อต้นของต้นอ่อน พบว่าพื้นที่ใบของต้นอ่อนที่เกิดจากเมล็ดที่แช่ในสารละลายกรดจิบเบอเรลลิค ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ มีพื้นที่ใบมากที่สุดรองลงมาคือต้นที่เกิดจากเมล็ดที่แช่ในสารละลายกรดจิบเบอเรลลิค ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 5) สารละลายกรดจิบเบอเรลลิค และ กรดอะซิติลซาลิไซลิค มีผลต่อพื้นที่ใบของต้นอ่อนแตกต่างกันทางสถิติ แต่ความเข้มข้นของสารละลายไม่มีความแตกต่างทางสถิติ



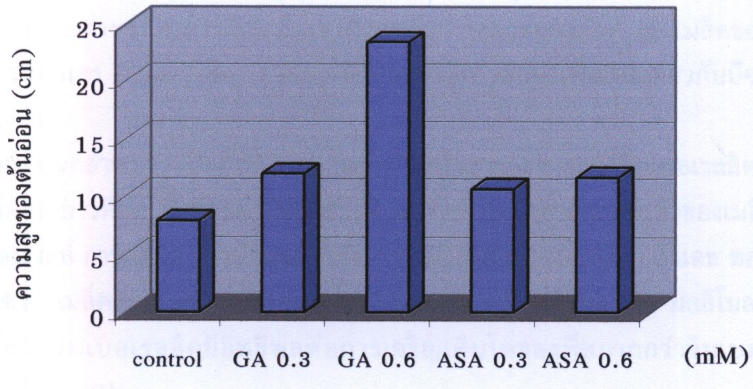
ภาพที่ 2 เปอร์เซ็นต์การงอกของ *O. integerrima* ที่งอกในแต่ละวันหลังจากแช่เมล็ดในสารละลายกรดจิบเบอเรลลิค และ กรดอะซิติลซาลิไซลิคความเข้มข้นต่าง ๆก่อนเพาะ



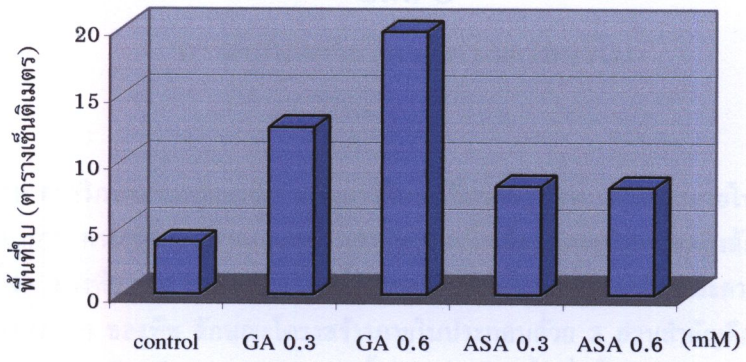
ภาพที่ 3 เปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุดของเมล็ด *O. integerrima* ที่แช่ในสารละลายกรดจิบเบอเรลลิค และ กรดอะซิติลซาลิไซลิค ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ก่อนเพาะ

ตารางที่ 1 ความสูงเฉลี่ยและพื้นที่ใบต่อต้นของต้นอ่อน *O. integerrima* หลังจากย้ายปลูกลงดินเป็นเวลา 30 วัน ที่เกิดจากเมล็ดที่แช่ในสารละลายกรดจิบเบอเรลลิค และ กรดอะซิติลซาลิไซลิค ความเข้มข้นระดับต่าง ๆก่อนเพาะ

ข้อมูลของต้นอ่อน	ความเข้มข้น				
	control	GA_3		ASA	
		0.3 mM	0.6 mM	0.3 mM	0.6 mM
ความสูง (cm)	7.91± 3.78	11.97± 1.7	23.42± 2.7	10.66± 3.9	11.66± 4.0
พื้นที่ใบ (cm^2)	3.93±2.04	12.06± 6.5	19.75± 7.7	8.18± 6.04	8.09± 5.9



ภาพที่ 4 ความสูงของต้นอ่อน *O. integerrima* วันหลังจากย้ายปลูกลงดินเป็นเวลา 30 วัน ที่เกิดจากเมล็ดที่แช่ในสารละลายกรดจิบเบอเรลลิค และ กรดอะซิติลซาลิไซลิค ความเข้มข้นระดับต่าง ๆก่อนเพาะ



ภาพที่ 5 พื้นที่ใบต่อต้นของต้นอ่อน *O. integerrima* หลังจากย้ายปลูกลงดินเป็นเวลา 30 วัน ที่เกิดจากเมล็ดที่แช่ในสารละลายกรดจิบเบอเรลลิค และ กรดอะซิติลซาลิไซลิค ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ

4. สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากการศึกษาการงอกของเมล็ด *O. integerrima* และ *G. serrata* ที่แกะเปลือกหุ้มเมล็ดและแช่ในน้ำกลั่น สารละลายกรดจิบเบอเรลลิค ความเข้มข้น 0.3, 0.6 มิลลิโมลาร์ และสารละลายกรดอะซิติลซาลิไซลิค ความเข้มข้น 0.3, 0.6 มิลลิโมลาร์ โดยแช่ไว้นาน 24 ชั่วโมง พบว่าเมล็ด *O. integerrima* ที่แช่ในสารละลายกรดอะซิติลซาลิไซลิค ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับ Takaki & Rosim (2000) ที่รายงานว่าเมล็ดที่บ่มในสารละลายกรดซาลิไซลิคจะมีอัตราการงอกสูงกว่ากลุ่มควบคุม และจากการศึกษาได้แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกเพื่อให้สารละลายซึมเข้าไปส่วนต่าง ๆภายในเมล็ด เนื่องจากเมล็ดของ *O. integerrima* และ *G. serrata* มีเปลือกหุ้มเมล็ดหนา ซึ่งเมล็ดพืชที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดหนาส่วนใหญ่จะไม่ยอมให้สารละลายซึมเข้าไปและทำให้ไม่มีการงอกเกิดขึ้น (ดวงจันทร์ ดวงพัตรา, 2521) ส่วนเมล็ดของ *G. serrata* ไม่งอกอาจจะเนื่องจากเมล็ดที่เก็บมาศึกษาไม่สมบูรณ์ หรือเป็นหมัน เพราะ Pagliarini et al. (1992) ที่ศึกษาเซลล์วิทยาบางประการของ *Ochna* sp. พบว่าส่วนมากแล้วผลจะไม่สมบูรณ์ และเมล็ดฝ่อ และอาจจะเป็นเพราะเมล็ดมีการพักตัวหรือปัจจัยต่าง ๆที่ทำการศึกษาไม่เหมาะสมกับการงอกของเมล็ด เช่นเมล็ดของพืชพวกวงศ์ไม้ยางจะไม่งอกในสภาพที่มีแสง (Yue-Luan, 1993) ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการงอกของเมล็ด *G. serrata*

ความยาวของต้นกล้าพบว่าต้นกล้าที่เกิดจากเมล็ดที่แช่ในสารละลายกรดจิบเบอเรลลิค ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ มีความยาวที่สุด ซึ่งผลของจิบเบอเรลลิคนอกจากจะทำลายการพักตัวของเมล็ด ยังเป็นสารที่ควบคุมการยืดตัวของเซลล์ การติดผล การเกิดดอก เร่งการเจริญเติบโตของต้นพืช (พีรเดช ทองอำไพ, 2529) จึงทำให้ต้นกล้าที่เกิดจากเมล็ดที่แช่ในสารละลายกรดจิบเบอเรลลิค ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ มีความยาวที่สุดและนอกจากนี้กรดจิบเบอเรลลิคมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของพืชมากกว่าจิบเบอเรลลินชนิดอื่น (สัมพันธ์ คัมภิรานนท์, 2527)

ความสูงและพื้นที่ใบของต้นอ่อนที่นำมาปลูกลงดิน พบว่าต้นอ่อนที่เกิดจากเมล็ดที่แช่ในสารละลายกรดจิบเบอเรลลิค ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ มีความสูงและพื้นที่ใบสูงที่สุด เนื่องจากสารละลายกรดจิบเบอเรลลิค เป็นสารละลายที่ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (พีรเดช ทองอำไพ, 2529) จึงทำให้ต้นอ่อนของเมล็ดที่แช่ในสารละลายกรดจิบเบอเรลลิค ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ มีความสูงและพื้นที่ใบสูงที่สุด

บทที่ 3
การศึกษากายวิภาคศาสตร์ของใบ

การศึกษากายวิภาคศาสตร์ของพืช เป็นการศึกษาเกี่ยวกับรูปร่าง ลักษณะภายใน เนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ การเจริญ วิวัฒนาการ การเปลี่ยนสภาพและความสำคัญของเนื้อเยื่อแต่ละชนิดตลอดถึงลักษณะภายในและการเจริญของส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ราก ลำต้น และใบ โดยเน้นศึกษารูปร่าง และลักษณะการจัดเรียงตัวของเซลล์หรือเนื้อเยื่อในส่วนต่าง ๆ ของพืช ลักษณะโครงสร้างภายในประกอบด้วย 3 ส่วนสำคัญคือ (1) เนื้อเยื่อชั้นผิว ได้แก่ เซลล์เนื้อเยื่อชั้นผิว โดยศึกษารูปร่าง จำนวนชั้นของเซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิว ชนิดของปากใบ และไทรโคม (trichome) (2) เนื้อเยื่อพื้น ได้แก่ เซลล์ชั้นคอร์เทกซ์ (cortex) และไส้ไม้ (pith) โดยศึกษาชนิดของเนื้อเยื่อที่ปรากฏและ (3) เนื้อเยื่อลำเลียง ได้แก่ มัดท่อลำเลียง (vascular bundle) การจัดเรียงตัวของไซเล็ม (xylem) และโฟลเอ็ม (phloem) หรือเยื่อหุ้มท่อลำเลียง (bundle sheath) นอกจากนี้ยังมีความเกี่ยวข้องกับการศึกษาด้านสรีรวิทยาของพืช อนุกรมวิธาน และนิเวศวิทยา (เทียมใจ คมกฤส, 2539)

1. การตรวจเอกสาร

Metcalfe & Chalk (1957) รวบรวมผลการศึกษากายวิภาคศาสตร์ของใบของพืชวงศ์ Ochnaceae สรุปได้ดังนี้

ใบ มีชั้นเคลือบคิวทินหนา มีโซฟิลล์ (mesophyll) ด้านบนและด้านล่างแตกต่างกัน (dorsiventral leaf) พบว่ามีขนเป็นแบบขนเดี่ยว เซลล์เดียว (uniseriate,unicellular hair) หรือแบบหลายเซลล์ (multicellular hair) และพบว่ามีขนแบบต่อมกระจายเต็มหูใบ เนื้อเยื่อชั้นผิว ของ *Blastemanthus* และ *Luxemburgia* แบ่งเซลล์ในแนวตั้งฉากกับผิว และใน *Ochna* มีการแบ่งเซลล์แบบคดเคี้ยว นอกจากนี้ยังพบว่าใน *Sauvagesia racemosa* St. Hil. มีเซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวขนาดใหญ่เป็นพิเศษเก็บน้ำไว้ ปากใบ พบทั้งผิวใบด้านบนและด้านล่าง ใน *Lohira* และ *Strasburgeria* ไม่มีเซลล์ข้างเซลล์คุม (subsidiary cell) *Godoya* มีปากใบจะอยู่ระหว่างเส้นใบย่อย *Lophira* และ *Strasburgeria* มีเนื้อเยื่อชั้นรองจากชั้นผิว (hypodermis) ที่เนื้อเยื่อชั้นผิวด้านบนภายในเซลล์มีเมือกบรรจุอยู่ มีโซฟิลล์ (mesophyll) พบว่าใน *Brackenridgea, Elvasia, Ochna* และ *Ouratea* มีชั้นแพลิเสด (palisade) 1 ชั้นเซลล์ เซลล์สะสมผลึก หรือบางครั้งเรียก Cristarque cell มีรูปร่างเป็นรูปอักษรยู (U) มีผนังหนา ใน *Sauvagesia* พบผลึกชนิดนี้ในชั้นมีโซฟิลล์ ส่วนใน *Brackenridgea, Elvasia, Gomphia, Ochna* และ *Ouratea* พบผลึกในเนื้อเยื่อชั้นผิวของก้านใบและเนื้อเยื่อลำเลียง

Ludlow (1991) ใช้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) ศึกษาปากใบของ *Ochna pulchra* Hook. พบว่าปากใบกระจายทั่วใบและถ้าใบแก่ขึ้นความหนาแน่นของปากใบจะเพิ่มขึ้น ปากใบเป็นแบบอยู่ต่ำกว่าระดับเซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิว (sunken stoma) เนื้อเยื่อชั้นผิวเรียงอัดแน่นแต่ไม่เป็นระเบียบ พบปากใบด้านท้องใบ ชั้นมีโซฟิลล์มีเนื้อเยื่อชั้นแพลิเสด 1 ชั้น

สุรศักดิ์ เพิ่มลาภ (2539) ศึกษาปากใบของพรรณไม้หอม 50 วงศ์ 123 ชนิด พบว่าปากใบของ *O. integerrima* เป็นแบบแอนอโมไซติก (anomocytic stoma)

Dickison & Weitzman (1996) พบว่า *Neblinaria celiae* มีปากใบแบบพาราไซติก (paracytic stoma) ปากใบจัดเรียงตัวเป็นแถวขนานตามความยาวของเส้นใบ และพบว่าผนังเซลล์ข้างเซลล์คุมของ *Bonnetia rorainea* หนาและมีลิกนิน (lignin) หรือซูเบอริน (suberin) สะสมอยู่เซลล์คุมทั้งสองข้างยาวประมาณ

43 ไมโครเมตร กว้างประมาณ 23 ไมโครเมตร ช่องเปิดของปากใบยาวแต่แคบ ปากใบอยู่ต่ำกว่าระดับเซลล์เนื้อเยื่อชั้นผิว ซึ่งจะมีขอบนูนขึ้นโอบรอบขอบของปากใบส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของความกว้าง และความยาวของปากใบและมีผลต่อการจำแนกชนิดพืช

2. วิธีการศึกษา

2.1 การศึกษาเนื้อเยื่อชั้นผิวของใบ มีวิธีการศึกษาดังนี้

2.1.1 ตัดแบ่งชิ้นตัวอย่างเพื่อเลือกบริเวณที่จะศึกษา

2.1.2 ฆ่าและรักษาเซลล์ในตัวอย่าง โดยแช่ชิ้นตัวอย่างในสารละลาย FAA 70% อย่างน้อย 24 ชั่วโมง

2.1.3 ล้างกรดออกจากชิ้นตัวอย่างโดยใช้น้ำหรือแอลกอฮอล์

2.1.4 ลอกผิวใบ โดยใช้มีดโกนขูดเนื้อเยื่อบนชิ้นตัวอย่างออกเบา ๆ เพื่อกำจัดเนื้อเยื่อเอพิเดอร์มิสด้านหนึ่ง และมีโซฟิลล์ออกให้เหลือแต่เอพิเดอร์มิสอีกด้านหนึ่งเท่านั้น ถ้าชิ้นตัวอย่างไม่ใสพออาจมีคลอโรฟิลล์ติดอยู่ให้ทยด chlorox ให้ท่วมชิ้นตัวอย่าง แล้วใช้พู่กันเช็ดชิ้นตัวอย่าง จนชิ้นตัวอย่างใสสะอาด

2.1.5 นำชิ้นตัวอย่างที่ขูดได้ แช่ในน้ำเพื่อล้าง chlorox ออกให้หมด

2.1.6 ย้อมสีโดยย้อมด้วยสี safranin 1% ในน้ำ แช่ชิ้นตัวอย่างที่ขูดได้ในสี 24 ชั่วโมง แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำ

2.1.7 ดึงน้ำออกจากชิ้นตัวอย่าง โดยแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 15% 30% 50% 70% 95% ตามลำดับ แช่ไว้ความเข้มข้นละ 5 นาที แล้วจึงย้ายไปแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 100% นาน 10 นาที

2.1.8 ผนึกสไลด์ ย้ายชิ้นตัวอย่างแช่ในสารละลายผสมของเอทิลแอลกอฮอล์ 100% กับไซลีน อัตราส่วน 1:1 นาน 5 นาที แล้วจึงย้ายไปแช่ในไซลีนบริสุทธิ์นาน 5 นาที นำชิ้นตัวอย่างไปผนึกโดยใช้ DPX แล้วผึ่งสไลด์ให้แห้ง

2.2 การศึกษากายวิภาคศาสตร์ของใบโดยวิธีพาราฟิน (อัจฉรา ธรรมถาวร, 2538) มีวิธีการศึกษาดังนี้

2.2.1 ตัดแบ่งชิ้นตัวอย่าง

2.2.2 การฆ่าและรักษาเซลล์ในตัวอย่าง (fixation) โดยแช่ในสารละลาย FAA 70%

2.2.3 ดูดอากาศออกจากชิ้นตัวอย่าง (suction) ประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างแช่ในสารละลาย FAA 70% ต่ออีกอย่างน้อย 24 ชั่วโมง

2.2.4 ล้างสารละลาย FAA 70% ออกจากชิ้นตัวอย่างโดยแอลกอฮอล์ 50% 2 ครั้ง

2.2.5 ดึงน้ำออกจากเซลล์ตัวอย่าง โดยแช่ชิ้นตัวอย่างในสารละลาย TBA (tertiary butyl alcohol) ลำดับความเข้มข้น (grade) จาก 1 ถึง 5 ขั้นตอนละ 12 ชั่วโมงจากนั้นแช่ใน TBA บริสุทธิ์ 24 ชั่วโมง

2.2.6 นำพาราฟินเข้าสู่เซลล์ในตัวอย่าง โดยนำชิ้นตัวอย่างในสารละลายที่มีส่วนผสมของ paraffin oil และ TBA บริสุทธิ์ อัตราส่วน 1 ต่อ 1 แล้วนำไปไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างแช่ในพาราฟินบริสุทธิ์แล้วนำไปไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 12 ชั่วโมง 3 ครั้ง

2.2.7 ฝังตัวอย่าง (embedding) โดยนำชิ้นตัวอย่างฝังในพาราฟินบริสุทธิ์และปล่อยให้พาราฟินแข็ง และนำชิ้นตัวอย่างติดบนแท่งไม้

2.2.8 ตัดชิ้นตัวอย่างด้วยไมโครโตมแบบใช้มือหมุน (rotary microtome) ความหนาชิ้นตัวอย่าง 12-15 ไมโครเมตร

2.2.9 ติดริบบ้อนบนสไลด์ที่เคลือบด้วย Haupt's adhesive โดยยึดแผ่นตัวอย่างด้วย formaldehyde 4 % ในน้ำและทำให้แห้งด้วยเครื่องอุ่นสไลด์

2.2.10 ย้อมสี (staining) ด้วยสี safranin ควบคู่กับสี fast green

2.2.11 ผนึกสไลด์ อธิบายสไลด์ และนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3. ผลการศึกษา

3.1 เนื้อเยื่อชั้นผิวและกายวิภาคศาสตร์ใบของ *O. integerrima* (ภาพที่ 6 และ 7)

เนื้อเยื่อชั้นผิวมีคิวทินเคลือบชัดเจน เซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวทั้งด้านบนและด้านล่างเรียง 1 ชั้น เซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวด้านบนมีรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าถึงเกือบกลมเรียงเป็นระเบียบผนังเรียบบางเซลล์มีผลึกรูปดอกไม้สะสมอยู่ ส่วนเซลล์เนื้อเยื่อชั้นผิวด้านล่างมีขนาดเล็กกว่าด้านบน เซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวที่อยู่บริเวณเส้นกลางใบมีรูปเกือบกลม ผนังเซลล์เรียบเรียงเป็นระเบียบ เมื่อมองจากการลอกผิวใบเซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวใบด้านบนและด้านล่างของแผ่นใบมีรูปร่างไม่แน่นอน ผนังหยักเล็กน้อย เซลล์ที่ผิวใบด้านล่างมีขนาดใหญ่กว่าผนังเซลล์มีความลึกและถี่กว่าเซลล์ที่ผิวด้านบน พบปากใบเฉพาะด้านล่างของแผ่นใบและเป็นแบบพาราไซติกอยู่ระดับเดียวกับเซลล์เนื้อเยื่อชั้นผิว เซลล์คุมมีรูปร่างเหมือนรูปไตยาว 27.16 $\pm$ 2.38 ไมโครเมตร ความหนาแน่นของปากใบ 268.9 $\pm$ 1.8 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร เนื้อเยื่อลำเลียงบริเวณเส้นกลางใบมีโฟลเอ็มอยู่ด้านนอกไซเล็มอยู่ด้านในใจกลางเป็นเซลล์พาเรงคิมา เส้นใบย่อยมีมัดท่อลำเลียง 2 ขนาด ด้านบนของมัดท่อลำเลียงมีเซลล์เส้นใย 4-5 ชั้นเซลล์ ด้านล่าง 1-2 ชั้นเซลล์ ภายในหรือเหนือกลุ่มเซลล์เส้นใยมีผลึกรูปดอกไม้ อยู่ใกล้ผิวด้านบนหรือด้านล่าง มีโซฟิลล์ มีเซลล์แพลิเสดเป็นรูปแท่งเรียวยาวเรียง 1-2 ชั้น เซลล์สปองจีรูปร่างไม่แน่นอนเรียงไม่เป็นระเบียบ ขอบใบไม่โค้งลง มีชั้นเซลล์พาเรงคิมา 1 ชั้น เรียงชิดเนื้อเยื่อชั้นผิวและกลุ่มเซลล์เส้นใยอยู่ชิดชั้นเซลล์พาเรงคิมา

3.2 เนื้อเยื่อชั้นผิวและกายวิภาคศาสตร์ใบของ *G. serrata* (ภาพที่ 6 และ 7)

เนื้อเยื่อชั้นผิวมีคิวทินเคลือบชัดเจน เซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวทั้งด้านบนและด้านล่างเรียง 1 ชั้น เซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวด้านบนมีรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าถึงเกือบกลม เรียงเป็นระเบียบผนังเรียบ บางเซลล์มีผลึกรูปดอกไม้สะสมอยู่ ส่วนเซลล์เนื้อเยื่อชั้นผิวด้านล่างมีขนาดเล็ก เซลล์เนื้อเยื่อชั้นผิวที่อยู่บริเวณเส้นกลางใบมีรูปเกือบกลม ผนังเซลล์เรียบเรียงเป็นระเบียบ เมื่อมองจากการลอกผิวใบเซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวใบด้านบนและด้านล่างของแผ่นใบมีรูปร่างไม่แน่นอนผนังหยักเล็กน้อย เซลล์ที่ผิวใบด้านล่างมีขนาดใหญ่กว่าและผนังเซลล์มีความลึกและถี่กว่าเซลล์ที่ผิวใบด้านบน พบปากใบเฉพาะด้านล่างของแผ่นใบอยู่ระดับเดียวกับเซลล์เนื้อเยื่อชั้นผิวมีปากใบแบบพาราไซติกเซลล์คุมมีรูปร่างเหมือนรูปไต ยาว 21.83 $\pm$ 2.45 ไมโครเมตร ความหนาแน่นของปากใบ 402.4 $\pm$ 2.8 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร เนื้อเยื่อลำเลียงบริเวณเส้นกลางใบมีโฟลเอ็มอยู่ด้านนอกล้อมไซเล็มที่อยู่ด้านใน ใจกลางเป็นเซลล์พาเรงคิมา เส้นใบย่อยมีมัดท่อลำเลียง 2 ขนาด ด้านบนของมัดท่อลำเลียงมีเซลล์เส้นใย 4-5 ชั้นเซลล์ ด้านล่าง 1-2 ชั้นเซลล์ ภายในหรือเหนือกลุ่มเซลล์เส้นใยมีผลึกรูปดอกไม้ อยู่ใกล้ผิวด้านบนหรือด้านล่าง มีโซฟิลล์ มีเซลล์แพลิเสดเป็นรูปแท่งเรียวยาวเรียง 1-2 ชั้น เซลล์ สปองจีรูปร่างไม่แน่นอนเรียงไม่เป็นระเบียบ ขอบใบโค้งลงเล็กน้อย มีเซลล์พาเรงคิมา 2-3 ชั้น เรียงชิดเนื้อเยื่อชั้นผิว มีกลุ่มเซลล์เส้นใยยื่นออกจากเยื่อหุ้มมัดท่อลำเลียงมาชิดกลุ่มพาเรงคิมาที่ขอบใบ

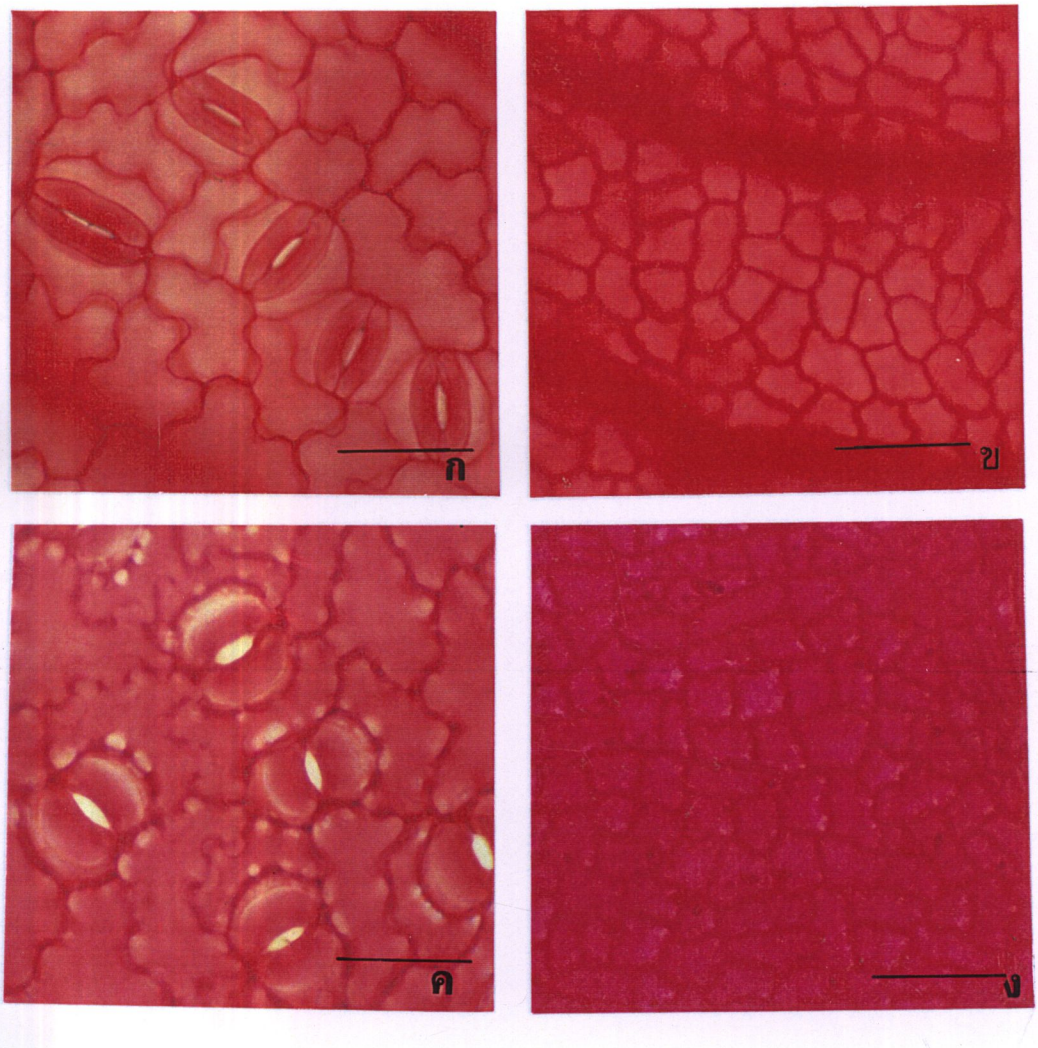
4. สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษากายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อชั้นผิวใบและแผ่นใบของ *O. integerrima* และ *G. serrata* พบว่าเนื้อเยื่อผิวมีคิวทินเคลือบชัดเจน เซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวด้านล่างและด้านบนเรียง 1 ชั้น เซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวด้านบนมีรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้าถึงเกือบกลมเรียงเป็นระเบียบบางเซลล์มีผลึกรูปดอกไม้สะสมอยู่ ส่วนเซลล์เนื้อเยื่อชั้นผิวด้านล่างมีขนาดเล็กกว่าด้านบน เมื่อมองจากการลอกผิวใบเซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวด้านบนและด้านล่างมีรูปไม่แน่นอน ผนังเซลล์หยักเล็กน้อย ปากใบมีเฉพาะด้านล่างของแผ่นใบ ปากใบแบบพาราไซติกอยู่ระดับเดียวกับเซลล์เนื้อเยื่อชั้นผิว เซลล์คุมของ *O. integerrima* ยาวกว่าของ *G. serrata* ส่วนความหนาแน่นของปากใบพบว่า *G. serrata* มีปากใบหนาแน่นกว่า ภาคตัดตามขวางบริเวณเส้นกลางใบ พบเนื้อเยื่อลำเลียงบริเวณเส้นกลางใบมีโฟลเอ็มอยู่ทางด้านนอกล้อมไซเล็มที่อยู่ด้านในใจกลางเป็นเซลล์พาเรงคิมา ที่เส้นใบย่อยมีมัดท่อลำเลียง 2 ขนาด ด้านบนของเนื้อเยื่อลำเลียงมีเซลล์เส้นใย 4-5 ชั้นเซลล์ ด้านล่างมี 1-2 ชั้นเซลล์ภายในหรือเหนือกลุ่มเซลล์เส้นใยมีเซลล์สะสมผลึกรูปดอกไม้ สำหรับขอบใบของ *O. integerrima* ขอบใบไม่โค้งลงมีชั้นเซลล์พาเรงคิมา 1 ชั้น เรียงชิดเนื้อเยื่อชั้นผิวและกลุ่มเซลล์เส้นใยอยู่ชิดชั้นเซลล์พาเรงคิมา ส่วนของ *G. serrata* ขอบใบโค้งลงเล็กน้อยมีเซลล์พาเรงคิมา 2-3 ชั้น เรียงชิดเนื้อเยื่อชั้นผิว มีกลุ่มเซลล์เส้นใยยื่นออกจากเยื่อหุ้มมัดท่อลำเลียงมาชิดกลุ่มพาเรงคิมาที่ขอบใบ มีโซฟิลล์ มีเซลล์แพลิเสดเป็นรูปแท่งเรียวยาวเรียง 1-2 ชั้น เซลล์สปองจีรูปร่างไม่แน่นอนเรียงไม่เป็นระเบียบขอบใบไม่โค้งลง มีชั้นเซลล์พาเรงคิมา 1 ชั้น เรียงชิดเนื้อเยื่อชั้นผิวและกลุ่มเซลล์เส้นใยอยู่ชิดชั้นเซลล์พาเรงคิมา

5. วิจารณ์ผลการศึกษา

จากการศึกษากายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อชั้นผิวและแผ่นใบของ *O. integerrima* และ *G. serrata* พบว่าเนื้อเยื่อผิวมีคิวทินเคลือบชัดเจน เซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวด้านบนและด้านล่างเรียง 1 ชั้น เซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวด้านบนมีรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าถึงเกือบกลมขนาดใหญ่เรียงเป็นระเบียบผนังเรียบ ส่วนเซลล์ในเนื้อเยื่อชั้นผิวด้านล่างมีขนาดเล็กกว่าด้านบน สอดคล้องกับ Metcalfe & Chalk (1957) ที่รายงานว่าเซลล์เนื้อเยื่อชั้นผิวมีการเก็บน้ำไว้จึงทำให้มีขนาดใหญ่เป็นพิเศษ เมื่อมองจากการลอกผิวใบเซลล์เนื้อเยื่อชั้นผิวด้านบนและด้านล่างมีรูปร่างไม่แน่นอน ผนังหยักเล็กน้อย ปากใบมีเฉพาะด้านล่างของแผ่นใบ สำหรับ *O. integerrima* มีปากใบแบบพาราไซติก อยู่ระดับเดียวกับเซลล์เนื้อเยื่อชั้นผิว เซลล์คุมยาว 27.16 $\pm$ 2.3 ไมโครเมตร ความหนาแน่นของปากใบ 268.9 $\pm$ 1.8 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร ไม่สอดคล้องกับสุรศักดิ์ เพิ่มลาภ (2539) ที่รายงานว่าปากใบของ *O. integerrima* เป็นแบบแอนอโมไซติก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะพืชที่ศึกษาเก็บมาจากต่างพื้นที่ ซึ่ง ปรีชา ประเทพา (2533) อ้างจาก Turesson (1922) กล่าวว่าพืชชนิดเดียวกันแต่พบในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันจะมีความแปรผันทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และพันธุกรรม หรือบางครั้งอาจเกิดจากการสับสนในชื่อวิทยาศาสตร์จึงทำให้ผลการศึกษาออกมาไม่สอดคล้องกัน ส่วน *G. serrata* มีปากใบแบบพาราไซอยู่ระดับเดียวกับเซลล์เนื้อเยื่อชั้นผิว เซลล์คุมยาว 21.83 $\pm$ 2.45 ไมโครเมตร ความหนาแน่นของปากใบ 402.4 $\pm$ 2.8 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร เมื่อมองจากการตัดตามขวางของพืชทั้งสองชนิดบริเวณเส้นใบย่อยภายในเซลล์เส้นใยมีเซลล์สะสมผลึกรูปดอกไม้อยู่ใกล้ผิวด้านบนและด้านล่าง สอดคล้องกับ Metcalfe & Chalk (1957) ดังนั้นจากการศึกษากายวิภาคศาสตร์ของใบและการลอกผิวใบของพืชทั้งสองชนิด พบว่าที่แตกต่างกันคือ ขนาดของเซลล์คุมและความหนาแน่นของปากใบ

ภาพที่ 6 เนื้อเยื่อชั้นผิว ก และ ข : *O. integerrima*, ค และ ง : *G. serrata*
ก และ ค : เนื้อเยื่อชั้นผิวใบด้านล่าง
ข และ ง : เนื้อเยื่อชั้นผิวใบด้านบน
(สเกล = 30 ไมโครเมตร)


ก
ข
ค
ง

ภาพที่ 7 กายวิภาคศาสตร์แผ่นใบ ก-ง : *O. integerrima*, จ-ช : *G. serrata*

ก และ จ : ภาคตัดขวางบริเวณเส้นกลางใบ (สเกล = 200 ไมโครเมตร)

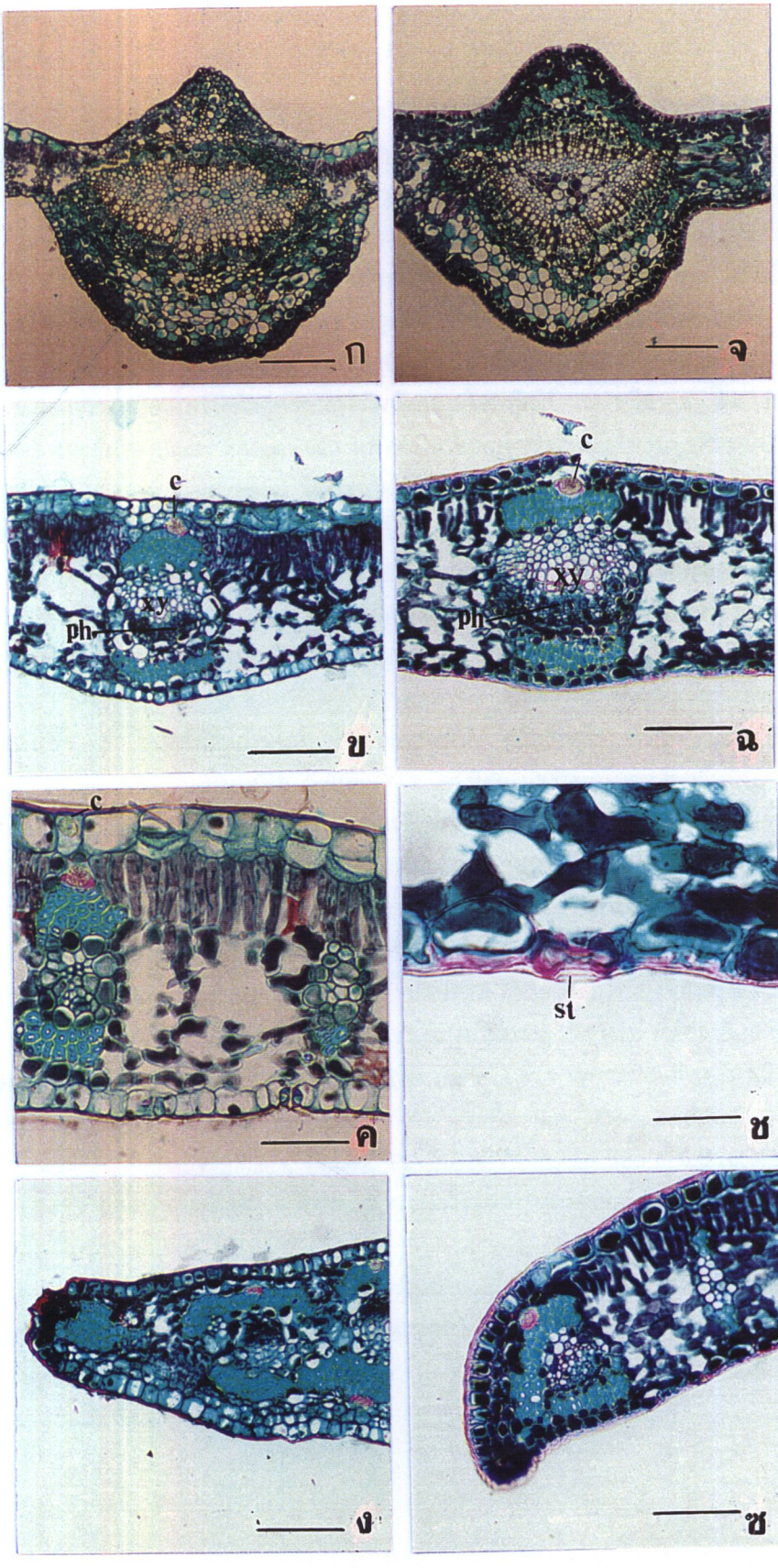
ข และ ฉ : ภาคตัดขวางบริเวณแผ่นใบ (สเกล = 50 ไมโครเมตร)

ค : ภาคตัดขวางบริเวณแผ่นใบ (สเกล = 100 ไมโครเมตร)

ง และ ช : ภาคตัดขวางบริเวณขอบใบ (สเกล = 100 ไมโครเมตร)

ช : ภาคตัดขวางบริเวณแผ่นใบ (สเกล = 50 ไมโครเมตร)

c: ผลึกรูปดอกไม้, ph : โฟลเอ็ม, xy : ไซเล็ม, st : ปากใบ


ก
จ
c
xy
ph
ข
c
xy
ph
ฉ
c
ค
st
ช
ง
ซ

บทที่ 4
การศึกษาพัฒนาการของเมกะสปอร์และแกมีโทไฟต์เพศเมีย

ออวุล ประกอบด้วยนิวเซลลัส (nucellus) ผนังออวุล (integument) และก้าน (funiculus) ทำหน้าที่ให้ออวุลติดกับพลาเซนตา (placenta) ออวุลที่เจริญเต็มที่แล้วแบ่งได้เป็น 5 ชนิด (Maheshwari, 1975) คือ

1. ออวุลตั้งตรง (orthotropous) เป็นออวุลที่มีช่องไมโครไพล์วางในแนวเดียวกับไฮลัม
2. ออวุลคว่ำ (anatropous) เป็นออวุลที่หมุนตัวกลับลงทำให้ช่องไมโครไพล์อยู่ชิดกับไฮลัม
3. ออวุลตะแคง (campylotropous) เป็นออวุลที่มีถุงเอ็มบริโอ (embryo sac) โค้งเล็กน้อย
4. ออวุลแนวนอน (amphithopous) ออวุลโค้งเป็นเกือกม้า ถุงเอ็มบริโอโค้งตาม
5. ออวุลตั้งฉาก (hemianatropous) ออวุลที่มีนิวเซลลัสและผนังออวุลตั้งฉากกับก้านออวุล

นิวเซลลัสเป็นโครงสร้างที่อยู่ตรงกลางมีผนังออวุลโอบหุ้มไว้ 1 หรือ 2 ชั้น คือชั้นนอก (outer integument) และชั้นใน (inner integument) ผนังออวุลที่โอบหุ้มนิวเซลลัสไม่สมบูรณ์จะทำให้เกิดช่องอยู่เหนือนิวเซลลัสเรียกไมโครไพล์ (micropyle) ในพืชบางชนิดไมโครไพล์เกิดจากผนังออวุลเฉพาะชั้นใน บางชนิดเกิดจากผนังออวุลทั้งชั้นนอกและชั้นใน กระบวนการสร้างเมกะสปอร์ (megasporogenesis) เกิดขึ้นโดยเซลล์ทำหน้าที่สร้างเมกะสปอร์ (megaspore mother cell) แบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ได้ 4 เซลล์ (megaspore tetrad) การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสขั้นตอนแรก (meiosis I) ของเซลล์ที่สร้างเมกะสปอร์มักแบ่งในแนวขวางได้ 2 เซลล์ (dyad) ไมโอซิสขั้นตอนที่สอง (meiosis II) มักจะแบ่งตามขวางอีก จึงทำให้เมกะสปอร์ทั้ง 4 เรียงกันเป็นเส้นตรงแนวเดียว (linear) โดยทั่วไปแล้วเมกะสปอร์ที่อยู่ด้านฐานออวุล (chalaza) จะคงอยู่และสร้างถุงเอ็มบริโอ หรือแกมีโทไฟต์ต่อไปอีก 3 สปอร์ที่อยู่ด้านไมโครไพล์จะสลายไป สปอร์ที่สร้างแกมีโทไฟต์เพศเมีย (functioning megaspore) จะแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) 3 ครั้งโดยไม่สร้างผนังเซลล์มากั้นนิวเคลียสออกจากกันจึงเกิดเป็นเซลล์ขนาดใหญ่เซลล์หนึ่งที่มี 8 นิวเคลียส เรียกเซลล์นั้นว่าแกมีโทไฟต์เพศเมีย (female gametophyte) พัฒนาการของเมกะสปอร์ของพืชมีดอกจำแนกออกเป็น 3 กลุ่มตามจำนวนเมกะสปอร์ซึ่งได้จากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของเซลล์กำเนิดเมกะสปอร์และพัฒนาไปเป็นแกมีโทไฟต์เพศเมียได้แก่มอนอสปอริค (monosporic) มี 1 เมกะสปอร์จาก 4 เมกะสปอร์ที่พัฒนาและทำหน้าที่เป็นสปอร์ที่สร้างแกมีโทไฟต์เพศเมียซึ่งแบ่งเป็น 2 แบบคือ *Oenothera* และ *Polygonum* ไบสปอริค (bisporic) มี 2 เมกะสปอร์จาก 4 เมกะสปอร์ที่พัฒนาทำหน้าที่สร้างแกมีโทไฟต์เพศเมีย โดยแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส 2 ครั้งได้ 8 นิวเคลียส ซึ่งแบ่งเป็น 2 แบบ คือ *Allium* และ *Endymion* และ เททระสปอริค (tetrasporic) มี 4 เมกะสปอร์ทำหน้าที่เป็นสปอร์ที่สร้างแกมีโทไฟต์เพศเมียซึ่งแบ่งได้ 9 แบบ คือ *Adoxa*, *Chrysanthemum cinerariaefolium* I, *Chrysanthemum cinerariaefolium* II, *Drusa*, *Fritillaria*, *Penaea*, *Peperonia*, *Plumbago* และ *Plumbaggella* (ปิยะรัตน์ อิฐรัตน์, 2542) แต่ละกลุ่มแตกต่างกันไปตามจำนวนครั้งของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส และการเรียงตัวของนิวเคลียสที่อยู่ในถุงเอ็มบริโอ

ผลการศึกษาพัฒนาการของเมกะสปอร์และแกมีโทไฟต์เพศเมียในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลทางวิทยาเอ็มบริโอของพืชสกุล *Gomphia* และ *Ochna* ในประเทศไทยซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อน

1. การตรวจเอกสาร

Maheshwari (1983) รายงานว่าถุงเอ็มบริโอของ *O. serrulata* ปกติจะมี 8 นิวเคลียสแต่ในบางครั้งอาจจะพบนิวเคลียสน้อยกว่า 8 นิวเคลียส

Ngamkhajornwiwat &Tangmitcharoen (1989) ศึกษาพัฒนาการออวุลของดอกประดู่ (*Pterocarpus macrocarpus*) พบว่ามีผนังออวุล 2 ชั้น ถุงเอ็มบริโอเมื่อพัฒนาจนสมบูรณ์ประกอบด้วย แอนติโพแดล 3 เซลล์ เซลล์กำเนิดเอ็นโดสเปิร์ม 2 เซลล์ เซลล์ไข่ 1 เซลล์และเซเนอร์จิด 2 เซลล์

Johri et al. (1992) รวบรวมข้อมูลทางวิทยาเอ็มบริโอของพืชวงศ์ Ochnaceae พบว่าออวุลเป็นแบบคว่ำมีผนังออวุล 2 ชั้น ไมโครไพล์เกิดจากผนังออวุลชั้นเดียว เซลล์อาร์คิสปอเรียลเกิดขึ้นในชั้นเซลล์ใต้ผิวของนิวเซลลัสและจะพัฒนาไปเป็นเซลล์กำเนิดเซลล์แม่ สำหรับ *O. atropurpurea* เซลล์อาร์คิสปอเรียลเกิดจากผนังออวุลชั้นในเซลล์กำเนิดเมกะสปอร์มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสได้ 4 เมกะสปอร์ที่เรียงกันเป็นเส้นตรง (linear) หรือรูปอักษรที (T-shaped) ถุงเอ็มบริโอเป็นแบบ *Polygonum O. squarrosa* มีแอนติโพแดลมีขนาดใหญ่เนื่องจากนิวเคลียสขยายตัวผิดปกติ

Tsou (1997) ศึกษาพัฒนาการออวุลของ *Camellia, Franklinia* และ *Schima* พบว่าจุดกำเนิดของผนังออวุลเป็นเซลล์ที่มีลักษณะยาวและหนากว่าเซลล์อื่น ผนังออวุลมี 2 ชั้น ผนังออวุลชั้นในยาวกว่าชั้นนอก ในระหว่างที่มีการสร้างเซลล์กำเนิดเซลล์แม่ ผนังออวุลชั้นในจะเจริญหุ้มนิวเซลลัสจนเกิดไมโครไพล์ ผนังออวุลชั้นนอกมีความยาวน้อยกว่าชั้นในเล็กน้อย มีไฮโพสเทสทางด้านฐานออวุล ใน *C. hengehunensis, C. tenuifolia* และ *F. alatamaha* พบว่าออวุลที่เจริญเต็มที่แล้วเป็นแบบคว่ำ ส่วน *S. superba* เป็นแบบตะแคง ผนังออวุลทั้งสองชั้นของ *Franklinia* มี 6-7 ชั้นเซลล์ ส่วนใน *Camellia* และ *Schima* มี 4-5 ชั้นเซลล์ ถุงเอ็มบริโอที่เจริญเต็มที่แล้วของ *C. hengehunensis* และ *C. tenuifolia* มี 8 นิวเคลียสตามแบบ *Allium* ส่วนของ *F. alatamaha* และ *S. superba* ตามแบบ *Polygonum*

2. วิธีการศึกษา

2.1 ศึกษาพัฒนาการของออวุล โดยวิธีพาราฟิน (อัจฉรา ธรรมถาวร, 2538) วิธีการศึกษาเหมือนกับการศึกษากายวิภาคศาสตร์ของใบ

2.2 ศึกษาพัฒนาการของเมกะสปอร์และแกมีโทไฟต์เพศเมียโดยวิธีทำให้ใส (ปิยะรัตน์ อิฐรัตน์, 2542) วิธีศึกษาดังนี้

2.2.1 วัดขนาดของดอก เขี่ยเอาเฉพาะออวุล แช่ในสารละลาย FPA 70% (formalin propionic acid alcohol) นานประมาณ 24 ชั่วโมง

2.2.2 ดึงน้ำออกจากตัวอย่าง โดยแช่ตัวอย่างในแอลกอฮอล์ 30% 50% 70% 95% และ 100% ตามลำดับ

2.2.3 นำตัวอย่างแช่ในสารละลายทำให้ใส (clearing solution) นาน 7 วัน หรือจนกว่าชิ้นตัวอย่างใสพอเหมาะ

2.2.4 นำชิ้นตัวอย่างวางบนสไลด์ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์นำไปศึกษาภายใต้กล้อง Nomarski interference optics

3. ผลการศึกษา

3.1 พัฒนาการของเมกะสปอร์และแกมีโทไฟต์เพศเมียของ *O. integerrima* (ภาพที่ 8 และ 9)

พบว่าออวุลเป็นแบบคว่ำผนังออวุลมี 2 ชั้น การเกิดเมกะสปอร์เริ่มจากระยะที่สร้างเซลล์กำเนิดเมกะสปอร์ มีเนื้อเยื่อด้านข้างทางไมโครไพล์จำนวน 1 ชั้นเซลล์ เซลล์กำเนิดเมกะสปอร์แบ่งเซลล์แบบไมโอซิสครั้งที่ 1 ได้ 2 เมกะสปอร์ และแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสครั้งที่ 2 ได้ 4 เมกะสปอร์ เรียงตัวเป็นแถวเดียวเซลล์ที่ 4 นับจากด้านไมโครไพล์ทำหน้าที่เป็นสปอร์ที่สร้างแกมีโทไฟต์เพศเมีย และ 3 เซลล์ที่เหลือสลายไป

พัฒนาการของแกมีโทไฟต์เพศเมีย สปอร์ที่สร้างแกมีโทไฟต์เพศเมียแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสได้ถุงเอ็มบริโอที่มี 2 นิวเคลียส ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกัน มีแวคิวโอล (vacuole) อยู่ตรงกลางถุงเอ็มบริโอ นิวเคลียสทั้งสองแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสครั้งที่สอง ได้ 4 นิวเคลียสซึ่ง 2 นิวเคลียสอยู่ด้านไมโครไพล์ อีก 2 นิวเคลียสอยู่ด้านฐานของออวุล จากนั้นทั้ง 4 นิวเคลียสแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสครั้งที่สามได้ 8 นิวเคลียส ตามแบบ *Polygonum* เซลล์ไข่อยู่ด้านไมโครไพล์ถุงเอ็มบริโอรูปไข่

3.2 พัฒนาการของเมกะสปอร์และแกมีโทไฟต์เพศเมียของ *G. serrata* (ภาพที่ 10 และ 11)

พบว่าออวุลเป็นแบบคว่ำ ผนังออวุลมี 2 ชั้น การเกิดเมกะสปอร์เริ่มจากระยะที่สร้างเซลล์กำเนิดเมกะสปอร์มีเนื้อเยื่อด้านข้างทางไมโครไพล์จำนวน 1 ชั้นเซลล์ เซลล์กำเนิดเมกะสปอร์แบ่งเซลล์แบบไมโอซิสครั้งที่ 1 ได้ 2 เมกะสปอร์ และแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสครั้งที่ 2 ได้ 4 เมกะสปอร์ เรียงตัวเป็นแถวเดียวเซลล์ที่ 4 นับจากด้านไมโครไพล์ทำหน้าที่เป็นสปอร์ที่สร้างแกมีโทไฟต์เพศเมีย และ 3 เซลล์ที่เหลือสลายไป

พัฒนาการของแกมีโทไฟต์เพศเมีย สปอร์ที่สร้างแกมีโทไฟต์เพศเมียแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสได้ถุงเอ็มบริโอที่มี 2 นิวเคลียส ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกัน มีแวคิวโอลอยู่ตรงกลางถุงเอ็มบริโอ ถุงเอ็มบริโอจะยาว นิวเคลียสทั้งสองแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสครั้งที่สอง ได้ 4 นิวเคลียสซึ่ง 2 นิวเคลียสอยู่ด้านไมโครไพล์ อีก 2 นิวเคลียสอยู่ด้านฐานของออวุล จากนั้นทั้ง 4 นิวเคลียสแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสครั้งที่สามได้ 8 นิวเคลียส ตามแบบ *Polygonum* เซลล์ไข่อยู่ด้านไมโครไพล์ แอนติโพแดลมีขนาดใหญ่ผิดปกติ และถุงเอ็มบริโอรูปร่างผอมและยาวกว่าของ *O. integerrima*

4. สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาพัฒนาการของออวุล เมกะสปอร์และแกมีโทไฟต์เพศเมียของ *O. integerrima* และ *G. serrata* พบว่าพืชทั้ง 2 ชนิดมีออวุลแบบคว่ำ มีผนังออวุล 2 ชั้น ไมโครไพล์เกิดจากผนังออวุลชั้นใน เมกะสปอร์ทั้งสี่มีการเรียงตัวกันเป็นแถวเดียว เซลล์ที่ 4 นับจากด้านไมโครไพล์ทำหน้าที่เป็นสปอร์ที่สร้างแกมีโทไฟต์เพศเมีย และมีพัฒนาการของเมกะแกมีโทไฟต์เป็นแบบ *Polygonum* นอกจากนั้นยังพบว่า *G. serrata* มีถุงเอ็มบริโอยาวกว่า *O. integerrima* และมีแอนติโพแดลขนาดใหญ่ผิดปกติ

5. วิจารณ์ผลการศึกษา

จากการศึกษาพัฒนาการของออวุล เมกะสปอร์และแกมีโทไฟต์เพศเมียของ *O. integerrima* และ *G. serrata* พบว่าพืชทั้ง 2 ชนิดมีออวุลแบบคว่ำ มีผนังออวุล 2 ชั้น ไมโครไพล์เกิดจากผนังออวุลชั้นใน เมกะสปอร์ทั้งสี่มีการเรียงตัวเป็นแถวเดียว และมีพัฒนาการของเมกะแกมีโทไฟต์แบบ *Polygonum* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Johri et al. (1992) ที่ได้ศึกษา *O. squarrosa* ที่รายงานไว้ว่า แอนติโพแดลที่มีขนาดใหญ่เนื่องมาจากนิวเคลียสขยายตัวผิดปกติ

จากการศึกษาซึ่งทำการศึกษาทั้งเทคนิคการทำให้ใสและกรรมวิธีพาราฟิน พบว่าการทำให้ใสสามารถใช้กับชิ้นตัวอย่างที่อายุน้อย เซลล์ขนาดเล็ก แต่ถ้าชิ้นตัวอย่างมีอายุมากขึ้นภายในเซลล์จะมีสารสะสมปิดบังนิวเคลียสในถุงเอ็มบริโอ ทำให้ไม่สามารถมองเห็นนิวเคลียสได้ ถึงแม้ว่าผู้ศึกษาแก้ปัญหาความไม่ชัดเจนโดยการกำจัดส่วนที่ปกคลุมไว้ออกให้มากที่สุด โดยเฉพาะ *G. serrata* มีสารสีน้ำตาลสะสมที่ผนังนิวเซลลัสหนามาก จึงทำให้ไม่สามารถหาระยะต่าง ๆได้ครบ และในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาครั้งแรก

ภาพที่ 8 พัฒนาการของเมกะสปอร์ และแกมีโทไฟต์ของ *O. integerrima*

ก : ระยะที่สร้างเซลล์กำเนิดเมกะสปอร์

ข : ระยะที่สร้างเมกะสปอร์มี 2 เมกะสปอร์

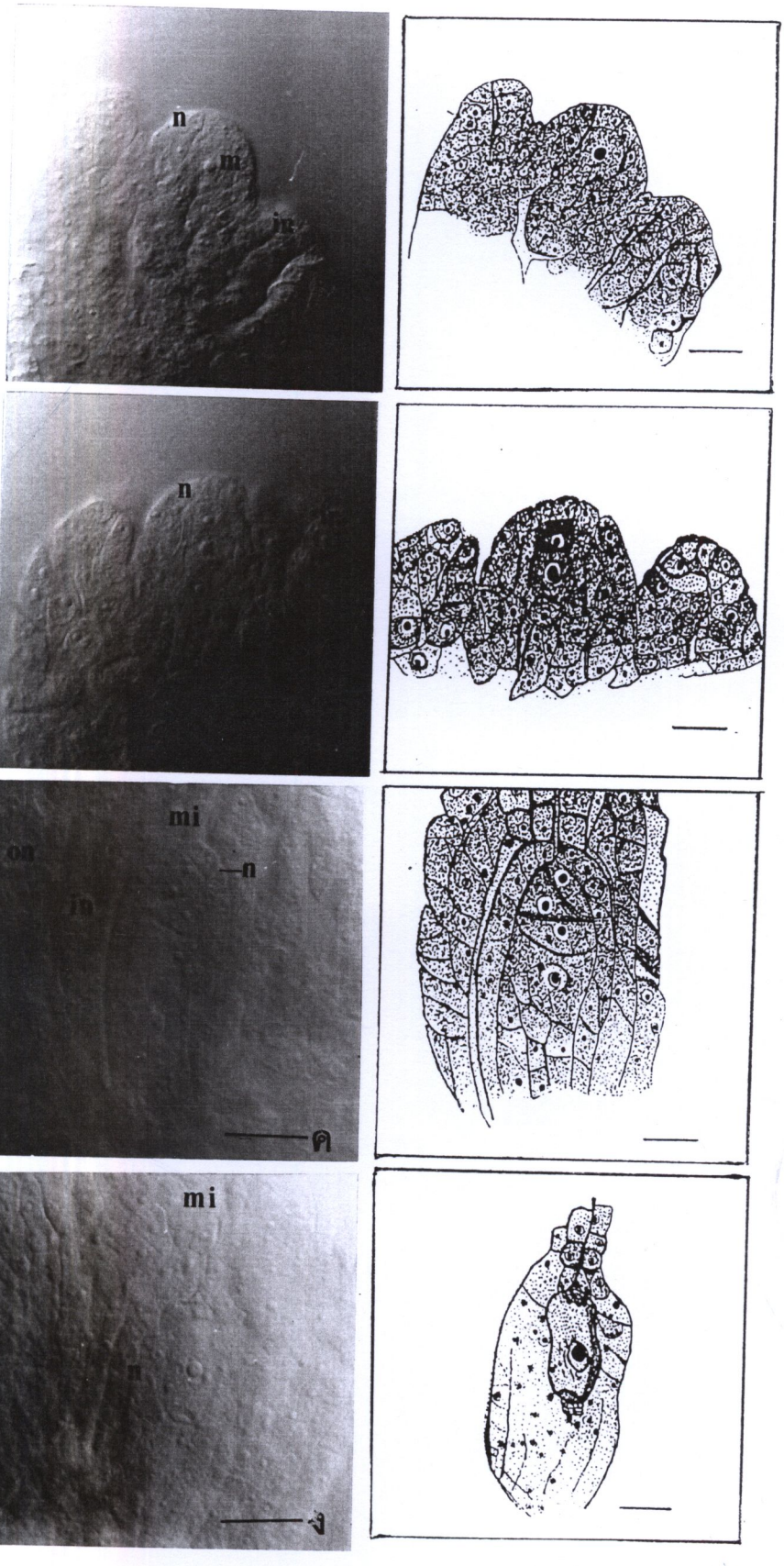
ค : ระยะที่ สร้างเมกะสปอร์มี 4 เมกะสปอร์

ง : ระยะที่สร้างสปอร์ที่สร้างแกมีโทไฟต์เพศเมีย

in : ผนังออวุลชั้นใน, m : เซลล์กำเนิดเมกะสปอร์

mi : ไมโครไพล์ n : นิวเซลลัส on : ผนังออวุลชั้นนอก

(สเกล = 30 ไมโครเมตร)


n
m
in
n
mi
on
n
in
mi
n

ภาพที่ 8 พัฒนาการของเมกะสปอร์ และแกมีโทไฟต์ของ *O. integerrima* (ต่อ)

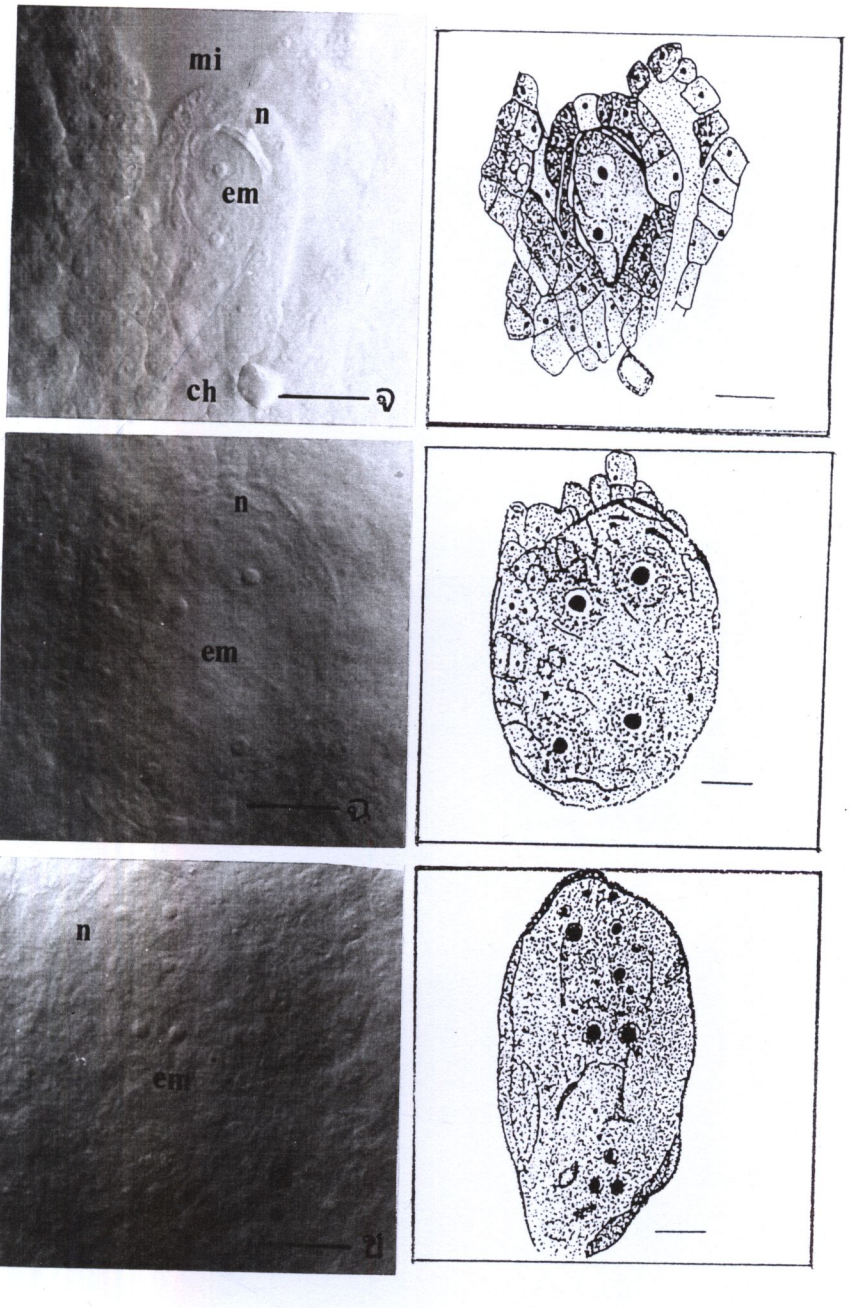
จ : ระยะที่สร้างถุงเอ็มบริโอที่มี 2 นิวเคลียส

ฉ : ระยะที่สร้างถุงเอ็มบริโอที่มี 4 นิวเคลียส

ช : ระยะที่สร้างถุงเอ็มบริโอที่มี 8 นิวเคลียส

ch : ฐานออวุล, em : ถุงเอ็มบริโอ, mi : ไมโครไพล์,

n : นิวเซลลัส (สเกล= 30 ไมโครเมตร)


mi
n
em
ch
จ
n
em
ฉ
n
em
ช

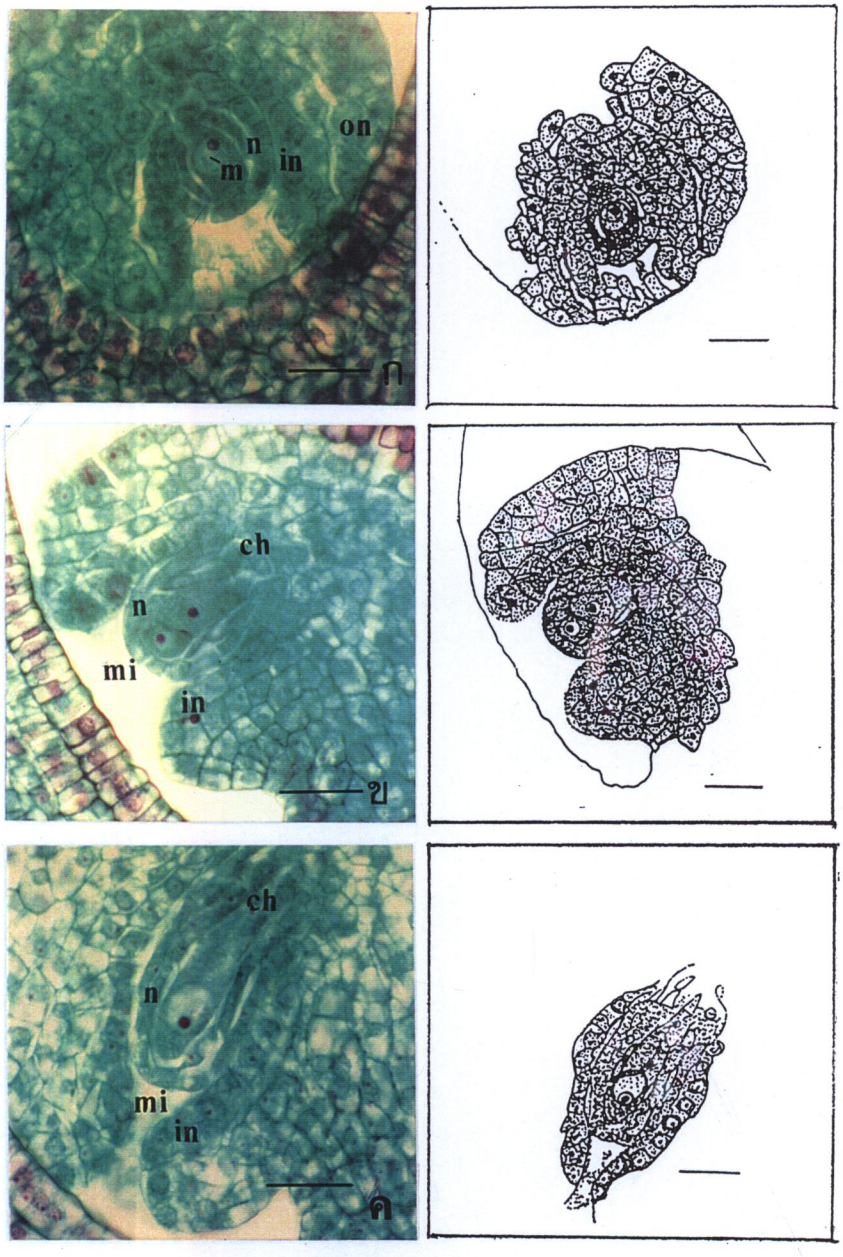
ภาพที่ 9 พัฒนาการของเมกะสปอร์ และแกมีโทไฟต์ของ *O. integerrima* โดยวิธีพาราฟิน

ก : ระยะที่สร้างเซลล์กำเนิดเมกะสปอร์

ข : ระยะที่สร้างเมกะสปอร์มี 2 เมกะสปอร์

ค : ระยะที่สร้างสปอร์ที่สร้างแกมีโทไฟต์เพศเมีย

ch : ฐานออวุล, in : ผนังออวุลชั้นใน, m : เซลล์กำเนิดเมกะสปอร์,
mi : ไมโครไพล์, n : นิวเซลลัส, on : ผนังออวุลชั้นนอก
(สเกล = 20 ไมโครเมตร)


on
n
m
in
ก
ch
n
mi
in
ข
ch
n
mi
in
ค

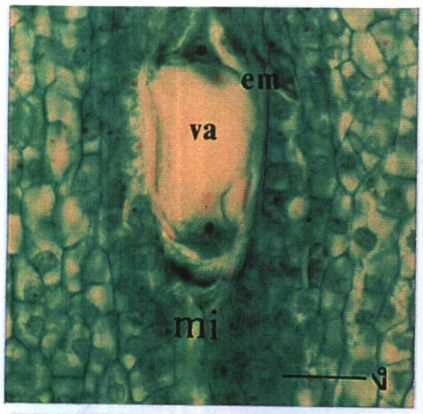
ภาพที่ 9 พัฒนาการของเมกะสปอร์ และแกมีโทไฟต์ของ *O. integerrima* โดยวิธีพาราฟิน (ต่อ)

ง : ระยะที่สร้างถุงเอ็มบริโอที่มี 2 นิวเคลียส

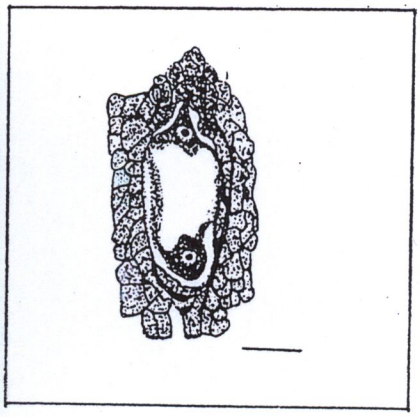
จ-ฉ : ระยะที่สร้างถุงเอ็มบริโอที่มี 4 นิวเคลียส

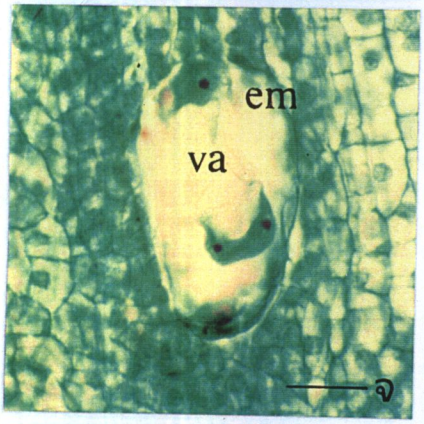
em : ถุงเอ็มบริโอ, mi : ไมโครไพล์, va : แวคิวโอล

(สเกล = 20 ไมโครเมตร)

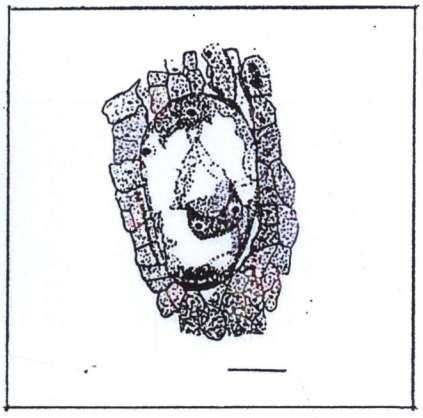


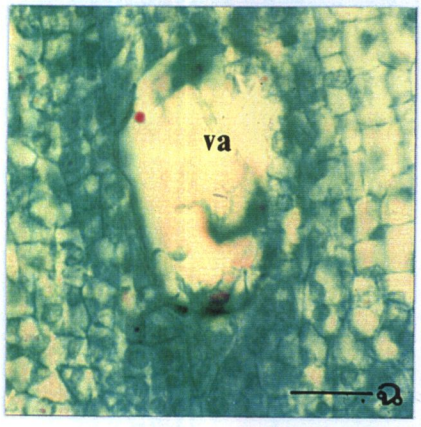
ง





จ





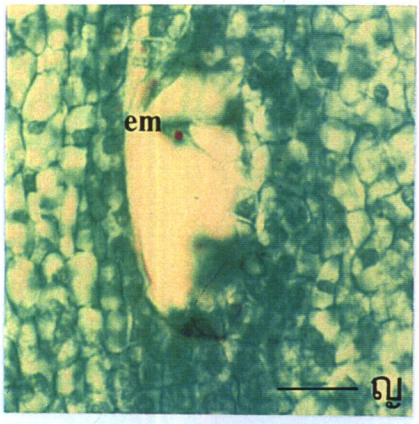
ฉ

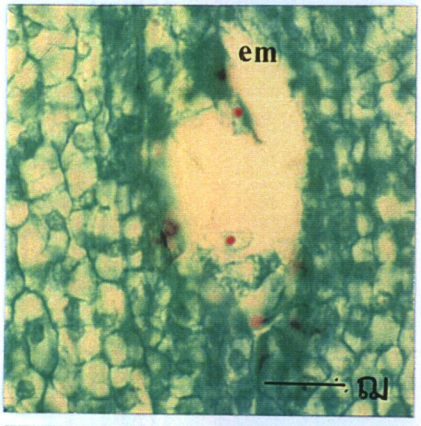
ภาพที่ 9 พัฒนาการของเมกะสปอร์และแกมีโทไฟต์ของ *O. integerrima* โดยวิธีพาราฟิน (ต่อ)

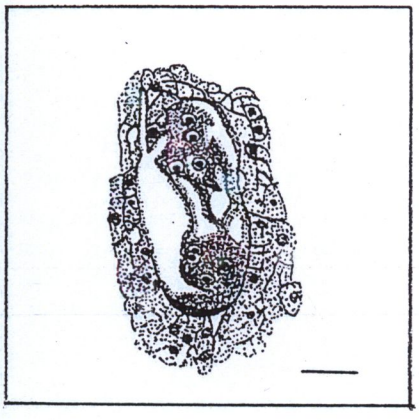
ญ – ซ : ระยะที่สร้างถุงเอ็มบริโอที่มี 8 นิวเคลียส

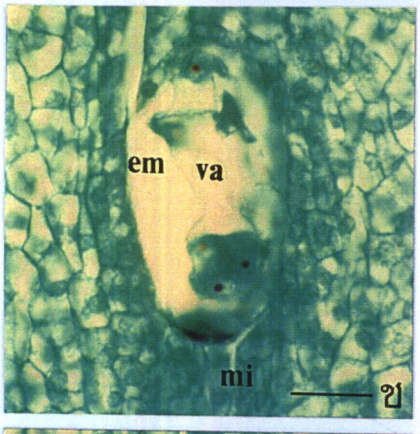
em : ถุงเอ็มบริโอ, va : แวคิวโอล, mi : ไมโครไพล์

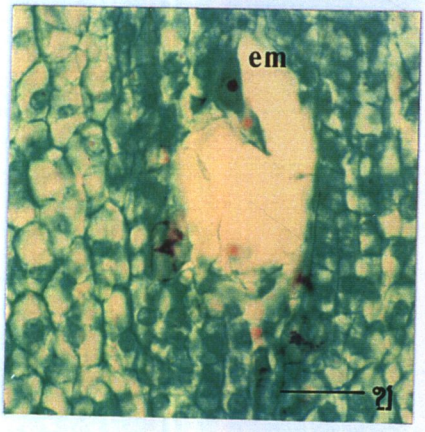
(สเกล = 20 ไมโครเมตร)


em
ญ


em
ฌ




em
va
mi
ป


em
ป

ภาพที่ 10 พัฒนาการของเมกะสปอร์ และแกมีโทไฟต์ของ *G. serrata*

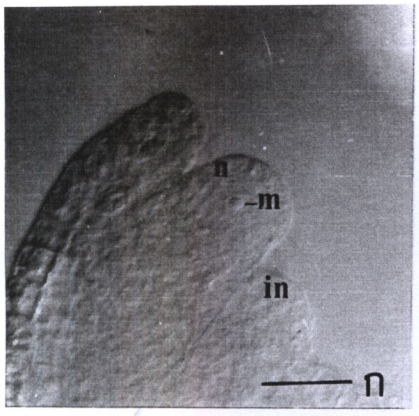
ก : ระยะที่สร้างเซลล์กำเนิดเมกะสปอร์

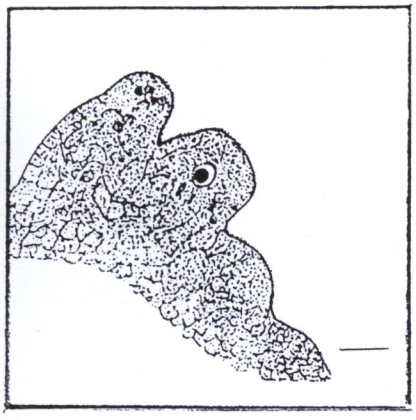
ข : ระยะที่สร้างเมกะสปอร์มี 2 เมกะสปอร์

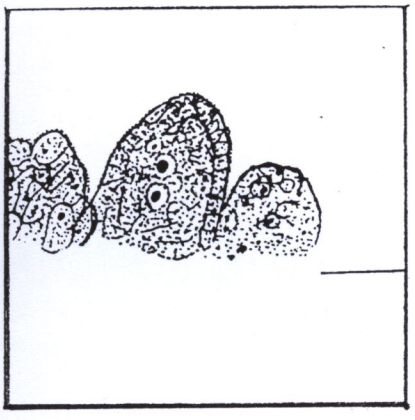
ค : ระยะที่สร้างสปอร์มี 4 เมกะสปอร์

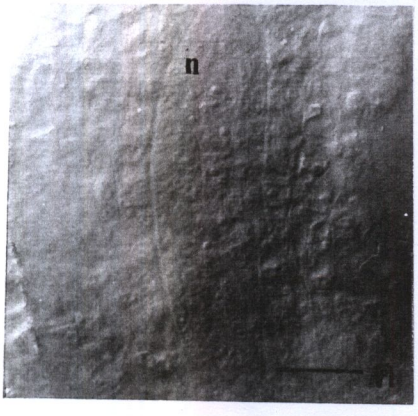
in : ผนังออวุลชั้นใน, n : นิวเซลลัส, m : เซลล์กำเนิดเมกะสปอร์

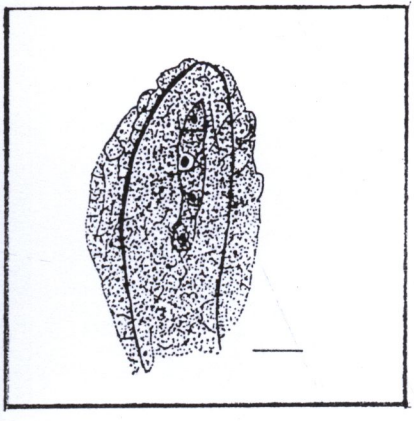
(สเกล = 30 ไมโครเมตร)


n
m
in






n



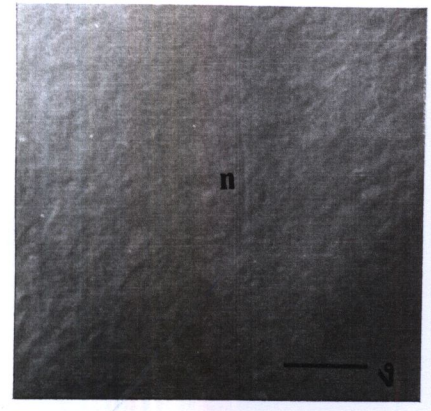
ภาพที่ 10 พัฒนาการของเมกะสปอร์ และแกมีโทไฟต์ของ *G. serrata* (ต่อ)

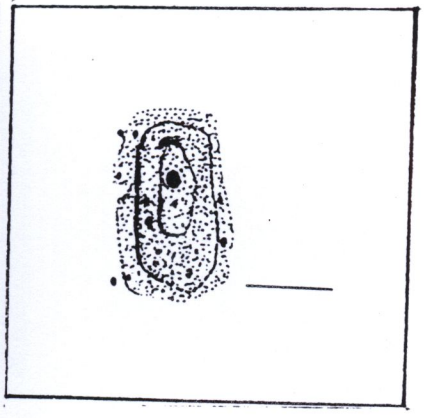
ง : ระยะที่สร้างสปอร์ที่สร้างแกมีโทไฟต์เพศเมีย

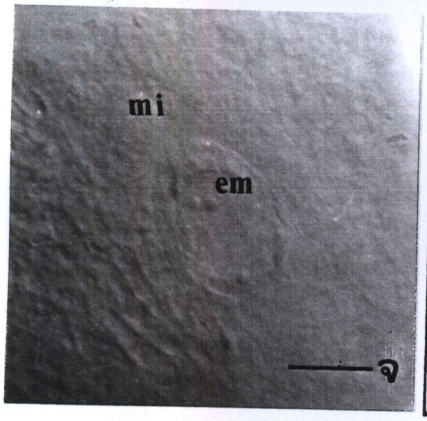
จ : ระยะที่สร้างถุงเอ็มบริโอที่มี 4 นิวเคลียส

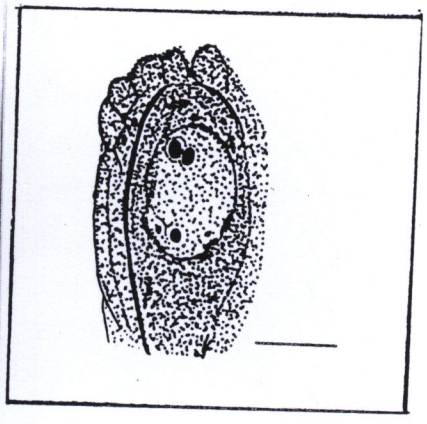
em : ถุงเอ็มบริโอ, n : นิวเซลลัส, mi : ไมโครไพล์

(สเกล = 30 ไมโครเมตร)


n




mi
em



ภาพที่ 11 พัฒนาการของเมกะสปอร์ และแกมีโทไฟต์ของ *G. serrata* โดยวิธีพาราฟิน

ก : ระยะที่สร้างเซลล์กำเนิดเมกะสปอร์

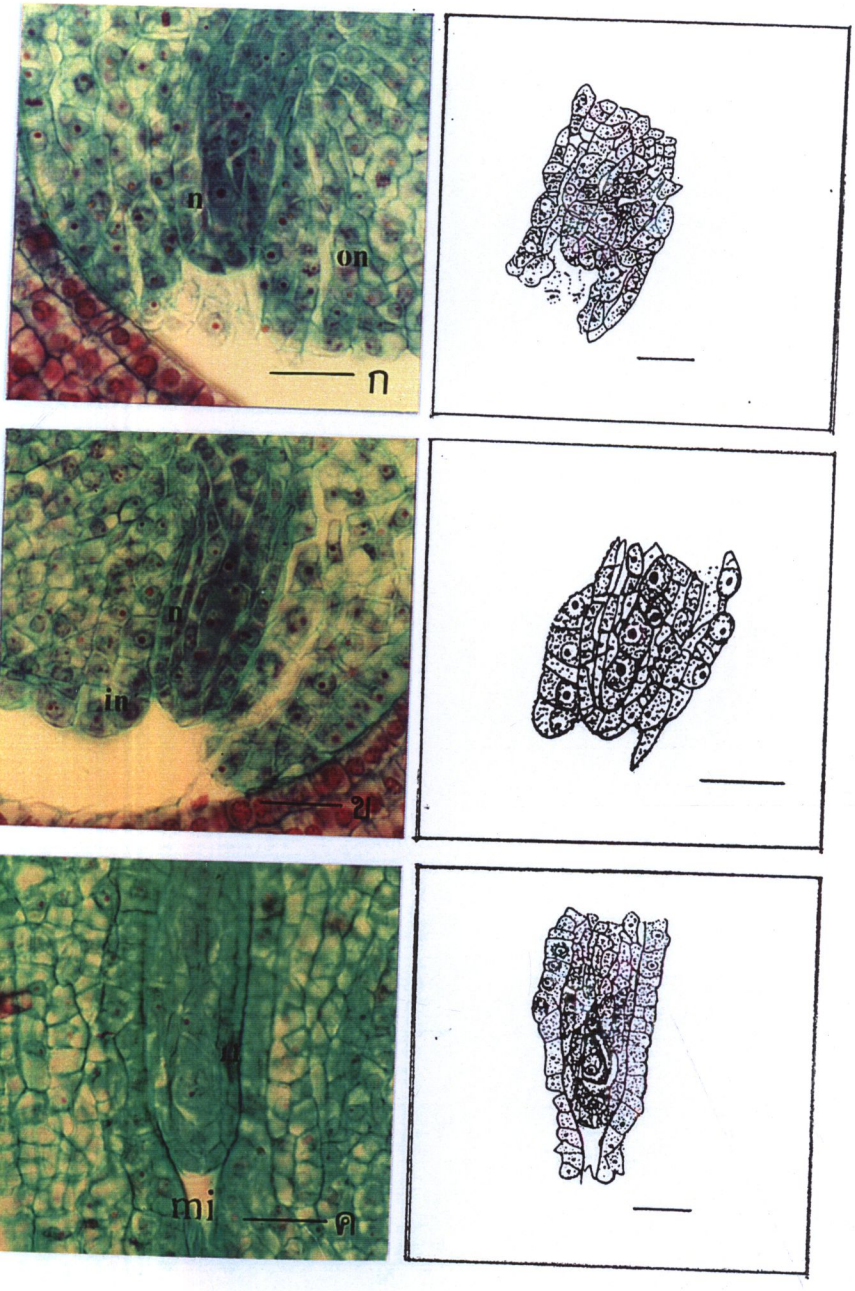
ข : ระยะที่สร้างเมกะสปอร์มี 4 เมกะสปอร์

ค : ระยะที่สร้างสปอร์ที่สร้างแกมีโทไฟต์เพศเมีย

in : ผนังออวุลชั้นใน, mi : ไมโครไพล์,

n : นิวเซลลัส, on : ผนังออวุลชั้นนอก

(สเกล = 20 ไมโครเมตร)


n
on
ก
n
in
ข
mi
ค

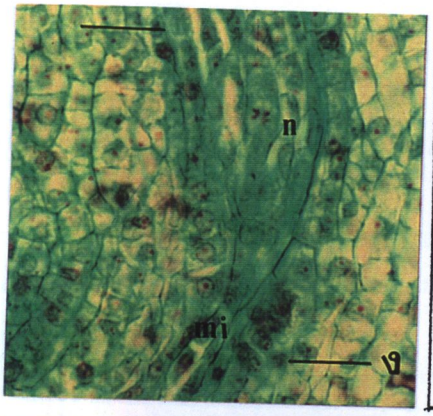
ภาพที่ 11 พัฒนาการของเมกะสปอร์ และแกมีโทไฟต์ของ *G. serrata* โดยวิธีพาราฟิน (ต่อ)

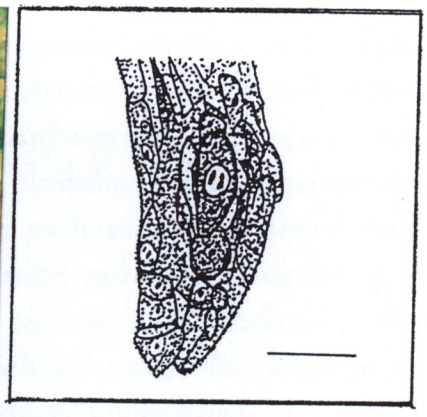
ง : เมกะสปอร์ที่สร้างแกมีโทไฟต์เพศเมียกำลังแบ่งเซลล์

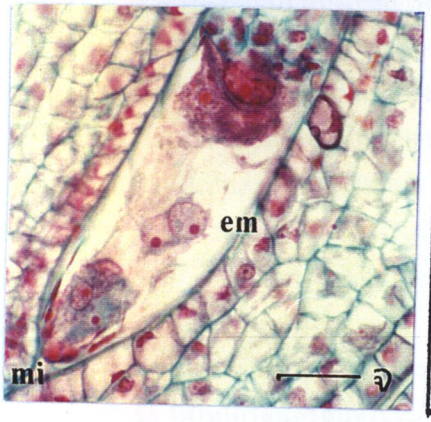
จ : ระยะสร้างถุงเอ็มบริโอมี 8 นิวเคลียส

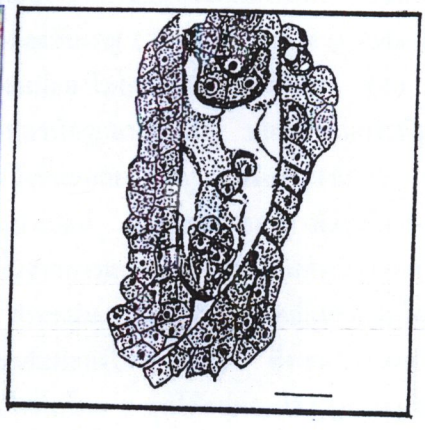
em : ถุงเอ็มบริโอ, mi : ไมโครไพล์, n : นิวเซลลัส

(สเกล = 20 ไมโครเมตร)


n
mi




em
mi



บทที่ 5
การศึกษาพัฒนาการของอับเรณูและเรณู

พัฒนาการของอับเรณูและเรณู โดยทั่วๆไป คือเซลล์ชั้นที่อยู่ติดกับเอพิเดอร์มิสของอับเรณูจะขยายขนาดและยืดตัวในแนวรัศมีและเห็นนิวเคลียสได้ชัดเจนขึ้น เรียกเซลล์เหล่านี้ว่า เซลล์อาร์คีสปอร์ (archesporial cells) เซลล์เหล่านี้จะเกิดเพิ่มขึ้น ขยายขนาดออกไปทั้งแนวกว้างและแนวยาว (Maheshwari, 1983) และต่อมากลุ่มเซลล์นี้แบ่งเซลล์แบบขนานให้เนื้อเยื่อ 2 ชั้น เนื้อเยื่อชั้นนอกจะพัฒนาเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของผนังอับสปอร์ (primary sporogenous cells) ส่วนด้านในจะพัฒนาเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์แม่ของไมโครสปอร์ (primary sporogenous cells) เซลล์ต้นกำเนิดของผนังอับสปอร์จะแบ่งเซลล์ต่อทั้งในแนวขนานและแนวตั้งฉากกับผิว ทำให้เกิดเนื้อเยื่อ 4 ชั้นดังนี้ (1) ชั้นเอพิเดอร์มิส (epidermis) เซลล์ในชั้นนี้จะแบ่งเซลล์ในแนวตั้งฉากกับผิวเท่านั้น (2) ชั้นเอนโดทีเซียม (endothecium) และในชั้นนี้จะเจริญเติบโตเต็มที่เมื่ออับเรณูแก่จัดใกล้จะแตกและมีสารสะสมพวกคิวตินและลิกนินบนผนังเซลล์ พืชบางชนิดในชั้นนี้จะมีแถบเส้นหนาบนผนังเซลล์ เชื่อกันว่าการหนาตัวของผนังเซลล์มีส่วนเกี่ยวข้องกับการแตกของอับเรณู (3) เซลล์ชั้นกลาง (middle layer) เซลล์ชั้นนี้จะแบนลงและถูกเบียดเมื่ออับเรณูพัฒนาถึงขั้นที่เซลล์แม่ของไมโครสปอร์เกิดไมโอซิส (4) ชั้นทาพีตัม (tapetum) เป็นชั้นที่สร้างอาหารให้เซลล์แม่ของไมโครสปอร์ที่อยู่กลางอับเรณู และช่วยในการพัฒนาของเรณู โดยทาพีตัมจะหลั่งสารออกมาเพื่อเป็นส่วนประกอบของผนังชั้นนอกของเรณู (Chasan, 1992) เซลล์ในชั้นทาพีตัมมีโพรโทพลาซึมเข้มข้นเมื่อเซลล์ที่สร้างสปอร์เริ่มแบ่งเซลล์ นิวเคลียสของทาพีตัมมักจะแบ่งตัวทำให้จำนวนนิวเคลียสในเซลล์มากขึ้น เนื้อเยื่อทั้งสี่ชั้นที่เกิดขึ้นจากการแบ่งตัวจากเซลล์ต้นกำเนิดของผนังอับสปอร์เหล่านี้ประกอบกันเป็นผนังของอับเรณู (anther wall) ส่วนกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์แม่ของไมโครสปอร์ จะแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสหลายครั้งเซลล์ที่ได้ทำหน้าที่เป็นเซลล์แม่ของไมโครสปอร์ ซึ่งเซลล์แม่ของไมโครสปอร์แบ่งเซลล์แบบไมโอซิส 2 ครั้ง ได้ไมโครสปอร์ที่มีจำนวนโครโมโซม 1 ชุดได้กลุ่มละสอง (dyad) และกลุ่มละสี่ (tetrad) เซลล์ติดกันซึ่งถูกยึดอยู่ด้วยกันโดยผนังซึ่งประกอบด้วยสารแคลโลส (callose) เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์จะสังเคราะห์แคลโลสขึ้นก่อนที่จะเริ่มแบ่งเซลล์และเชื่อว่าผนังแคลโลสทำหน้าที่ดึงดูดน้ำเพื่อรักษาความชื้นให้แก่ไมโครสปอร์และในระหว่างพัฒนาการของละอองเรณูในระยะที่ยังเป็นเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์และไมโครสปอร์ นอกจากนี้พบว่าแคลโลสทำหน้าที่ในการกรองสาร (กัลยา เพ็ญสุวรรณ, 2538) ในระยะต่อมาชั้นทาพีตัมจะหลั่งเอนไซม์ 1,3 เบต้ากลูคาเนส (1,3 β-glucanase) หรือแคลเลส (callase) ออกมาย่อยแคลโลส (McCormick, 1993) ทำให้ไมโครสปอร์หลุดออกมา ขณะที่ไมโครสปอร์เริ่มแยกตัวเป็นอิสระจากกัน ชั้นทาพีตัมเริ่มมีการแยกตัวออกจากกัน ไมโครสปอร์ที่แยกออกเป็นอิสระในระยะแรกมีไซโทพลาซึมเข้มข้น มีนิวเคลียสหนึ่งอันขนาดเล็กอยู่ตรงกลางเซลล์ ภายในเซลล์มีแวคิวโอลขนาดเล็กอยู่เต็มเซลล์ แล้วแวคิวโอลจะรวมกันเป็นแวคิวโอลขนาดใหญ่และดันให้ไซโทพลาสซึมเล็กลงและอยู่ด้านตรงข้ามกับรูของเรณู (Bedinger, 1992) หลังจากนั้นไมโครสปอร์แบ่งนิวเคลียสแบบไมโทซิส ได้นิวเคลียสใหม่ 2 นิวเคลียสที่มีขนาดต่างกัน คือ นิวเคลียสของเซลล์เจเนอเรทีฟ (generative cell) ซึ่งมีขนาดเล็ก และนิวเคลียสของเซลล์ที่ไม่เกี่ยวกับเพศ (vegetative cell) ที่มีขนาดใหญ่ ในพืชชั้นสูงส่วนใหญ่เรณูที่เจริญเต็มที่ก่อนการถ่ายเรณูประกอบด้วยเซลล์ 2 เซลล์ คือเซลล์เจเนอเรทิฟกับเซลล์ที่ไม่เกี่ยวกับเพศ เรียกเรณูแบบนี้ว่าเรณูมี 2 เซลล์หรือเรณูมี 2 นิวเคลียส (bicellular pollen grain หรือ binucleate pollen grain) (McCormick, 1993) นอกจากนี้ในพืชอีกกลุ่มหนึ่งเรณูที่เจริญเต็มที่ก่อนถ่ายเรณูประกอบด้วยเซลล์ 3 เซลล์ คือ สเปิร์ม 2 เซลล์ และเซลล์ไม่เกี่ยวกับเพศ เรียก

เรณูแบบนี้ว่า เรณูมี 3 เซลล์ หรือเรณูมี 3 นิวเคลียส (tricellular pollen grain หรือ trinucleate pollen grain) สเปิร์มเซลล์ 2 เซลล์นั้นเป็นผลมาจากการแบ่งไมโทซิสของนิวเคลียสของเซลล์เจเนอเรทิฟ (Mascarenhas, 1989) ผลการศึกษาพัฒนาการของไมโครสปอร์และแกมีโทไฟต์เพศผู้ในครั้งนี้เป็นข้อมูลทางเรณูวิทยาของพืชสกุล *Gomphia* และ *Ochna* ในประเทศไทยซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อน

1. การตรวจเอกสาร

Ngamkhajornwiwat & Tangmitcharoen (1989) ศึกษาพัฒนาการเรณูของดอกประดู่ พบว่าเนื้อเยื่อของเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์แม่จะพัฒนาเป็นเซลล์แม่ของไมโครสปอร์ หนึ่งเซลล์ของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์จะแบ่งได้ 4 เซลล์หลังจากนั้นทั้ง 4 เซลล์ จะแยกออกจากกันเข้าสู่ระยะไมโครสปอร์ และนิวเคลียสในไมโครสปอร์จะแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสได้ 2 นิวเคลียส เซลล์ที่มีขนาดใหญ่คือเซลล์ที่ไม่เกี่ยวกับเพศ ส่วนเซลล์ที่มีขนาดเล็กคือเซลล์เจเนอเรทิฟเมื่อแก่เรณูมี 2 นิวเคลียส

Johri et al. (1992) รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับอับเรณูและเรณูของพืชวงศ์ Ochnaceae พบว่าผนังของอับเรณูประกอบด้วยชั้นเอพิเดอร์มิส เอนโดทีเซียมซึ่งมีแถบเส้นบนผนังเซลล์เนื้อเยื่อชั้นกลางและชั้นทาพีตัมซึ่งทาพีตัมทำหน้าที่เหมือนต่อม (secretory tapetum) ส่วนทาพีตัมใน *O. atropurpurea* และ *O. kirkii* มี 2 นิวเคลียส เซลล์กำเนิดเซลล์แม่แบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ผลที่ได้คือได้ 4 เซลล์ จัดเรียงตัวแบบพีระมิด

Pagliarini et al. (1992) ศึกษาเซลล์วิทยาบางประการของ *Ochna* sp. พบว่าจำนวนผลของพืชชนิดนี้มีความแปรผันมาก ทั้งนี้ขึ้นกับการผสมระหว่างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้กับเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย จำนวนผลสูงสุด 6 ผลต่อดอกและยังพบว่าส่วนมากแล้วผลจะเป็นผลที่ไม่สมบูรณ์และเมล็ดฝ่อ การสร้างไมโครสปอร์ส่วนมากจะเกิดความผิดปกติในขั้นสุดท้ายของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสครั้งที่ 1 กับครั้งที่ 2 ซึ่งความผิดปกติของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 นั้นเกิดจากการแยกออกจากกันของโครโมโซมในระยะเมตาเฟส และแอนาเฟส จากความผิดปกติจะทำให้มีไมโครไซต์ (microcyte) หนึ่งถึงหลายเซลล์ที่มีขนาดแตกต่างกัน ซึ่งผลตามมาคือทำให้ไมโครสปอร์และเรณูมีขนาดแตกต่างกัน เรณูที่มีขนาดเล็กจะเป็นหมัน เรณูที่เจริญเต็มที่มี 2 นิวเคลียส

Tsou (1997) ศึกษาพัฒนาการของอับเรณูของ *Camellia, Franklinia* และ *Schima* พบว่าอับเรณูมี 4 ถุง (tetrasporangiate) ซึ่งมีแกนอับเรณู (connective) ค่อนข้างกว้าง ผนังอับเรณูของ *C. hengchunensis* และ *C. tenuifolia* มี 5 ชั้นประกอบด้วยเนื้อเยื่อชั้นผิว เอนโดทีเซียม เซลล์ชั้นกลาง 2 ชั้น และเซลล์ทาพีตัม ส่วน *Franklinia* และ *Schima* มีเซลล์ชั้นกลาง 3-4 ชั้นเซลล์ ทำให้ผนังอับเรณูมี 6-7 ชั้น เมื่อเอนโดทีเซียมเจริญเต็มที่จะมี 2 ชั้นเซลล์ และเป็นเซลล์ที่หนา ทาพีตัมเป็นแบบต่อม (glandular) ไมโครสปอร์แบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วได้เซลล์เจเนอเรทิฟที่มีขนาดเล็กและเซลล์ไม่เกี่ยวกับเพศมีขนาดใหญ่ภายในแกนอับเรณูมีเรณูเทียม (pseudopollen grain) เมื่อเซลล์ปาก (stomia) แตกเรณูเทียมจะกระจายเข้าไปในโพรงอับเรณู (pollen sac)

2. วิธีการศึกษา

2.1 ศึกษาพัฒนาการของอับเรณูโดยวิธีพาราฟิน (อัจฉรา ธรรมถาวร, 2538) วิธีศึกษาเหมือนการศึกษากายวิภาคศาสตร์ของใบ

2.2 ศึกษาพัฒนาการของเรณูโดยการย้อมสีโพรพิโอโนคาร์มิน (Pagliarini et al. 1992) วิธีการศึกษาดังนี้

2.2.1 วัดขนาดของดอก แกะเอาเรณูวางบนแผ่นสไลด์ หยดสีโพรพิโอโนคาร์มินลงบนสไลด์ ใช้เข็มเขี่ยกดให้อับเรณูแตก นำสไลด์ที่ได้ไปลนไฟ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำสไลด์ที่ได้ไปศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ถ้าชิ้นตัวอย่างติดสีมากเกินไปให้ล้างด้วย HCl ความเข้มข้น 45 เปอร์เซ็นต์

2.2.2 เมื่อได้สไลด์ที่ต้องการแล้วให้ทาขอบกระจกปิดสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บชนิดใส เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างแห้ง หลังจากนั้นนำไปบันทึกภาพ

3. ผลการศึกษา

ผลการศึกษาพัฒนาการของอับเรณูของ *O. integerrima* และ *G. serrata* โดยกรรมวิธีพาราฟิน ได้ผลการศึกษาดังนี้

3.1 พัฒนาการอับเรณูของ *O. integerrima* (ภาพที่ 12)

ในอับเรณูจากดอกตูมขนาดยาว 2.5-8 มิลลิเมตร พบเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ถูกล้อมรอบด้วยผนังของอับเรณู นับจากชั้นนอกสุดเข้ามาตามลำดับได้แก่ เซลล์ชั้นเอพิเดอร์มิส เอนโดทีเซียม มิดเดิลเลเยอร์ และทาพีตัมซึ่งเป็นแบบต่อมและมี 2 นิวเคลียส เซลล์ชั้นกำเนิดไมโครสปอร์แบ่งแบบไมโอซิสครั้งที่ 2 ได้ 4 ไมโครสปอร์ เซลล์ทาพีตัมเริ่มหลุดออกจากชั้นมิดเดิลเลเยอร์ และแต่ละเซลล์ทาพีตัมเริ่มจับกันหลวมๆ เมื่อไมโครสปอร์หลุดออกจากแคลโลสชั้นเซลล์ทาพีตัมเริ่มหลุดสลายและเมื่อถึงระยะเรณูมี 2 นิวเคลียส ชั้นทาพีตัมสลายและจัดเรียงไม่เป็นระเบียบ ชั้นเซลล์อื่นของผนังอับเรณูเหลืออยู่น้อย

3.2 พัฒนาการอับเรณูของ *G. serrata* (ภาพที่ 12)

ในอับเรณูจากดอกตูมขนาดยาว 2-6 มิลลิเมตร เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ถูกล้อมรอบด้วยผนังของอับเรณู นับจากชั้นนอกสุดเข้ามาตามลำดับ ได้แก่ เซลล์ชั้นเอพิเดอร์มิส เอนโดทีเซียม มิดเดิลเลเยอร์ และทาพีตัม ซึ่งเป็นแบบต่อมและมี 2 นิวเคลียส เซลล์ชั้นกำเนิดไมโครสปอร์แบ่งแบบไมโอซิสครั้งที่ 2 ได้ 4 เซลล์ เซลล์ทาพีตัมเริ่มหลุดออกจากกัน เมื่อไมโครสปอร์หลุดออกจากแคลโลสชั้นเซลล์ทาพีตัมเริ่มหลุดสลายและเมื่อถึงระยะเรณูมี 2 นิวเคลียส ชั้นทาพีตัมสลายและจัดเรียงไม่เป็นระเบียบ เซลล์ชั้นเอนโดทีเซียมมีแถบเส้นหนาบนผนังเซลล์ชั้นเซลล์อื่นของผนังอับเรณูเหลืออยู่น้อย

การศึกษาพัฒนาการของไมโครสปอร์และแกมีโทไฟต์เพศผู้ ของ *O. integerrima* และ *G. serrata* โดยการย้อมด้วยสี โพรพิโอโมคาร์มิน ได้ผลการศึกษาดังนี้

3.3 พัฒนาการของเรณูของ *O. integerrima* (ภาพที่ 13)

นิวเคลียสของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์มีขนาดใหญ่และย้อมติดสีเข้ม เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์แบ่งแบบไมโอซิส 2 ครั้งได้ 4 เซลล์จัดเรียงตัวแบบพีระมิดนอกจากนั้นพบว่าระยะกลุ่มละ 4 มีขนาดเซลล์แต่ละกลุ่มไม่เท่ากัน และมีผนังแคลโลสรูปร่างกลมห่อหุ้มอยู่ จากนั้นทั้ง 4 เซลล์จะหลุดจากผนังแคลโลส เข้าสู่ระยะไมโครสปอร์ที่มี 1 นิวเคลียสมีขนาดไม่เท่ากัน ในระยะแรกผนังไมโครสปอร์บางและต่อมาจะหนาพร้อมทั้งมีการสร้างแวคิวโอล ในช่วงท้ายของระยะไมโครสปอร์ที่มี 1 นิวเคลียสแวคิวโอลมีขนาดใหญ่เต็มเซลล์ และดันนิวเคลียสให้ติดกับผนังเซลล์ ในระยะเจริญเต็มที่เรณูเป็นแบบ tricolporate มี 2 นิวเคลียส

3.4 พัฒนาการของเรณูของ *G. serrata* (ภาพที่ 14)

นิวเคลียสของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์มีขนาดใหญ่และย้อมติดสีเข้ม เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์แบ่งแบบไมโอซิส 2 ครั้งได้ 4 เซลล์จัดเรียงตัวแบบพีระมิด และมีผนังแคลโลสที่มีลักษณะปลายเรียวแหลมห่อหุ้มอยู่ จากนั้นทั้ง 4 เซลล์จะหลุดจากผนังแคลโลส เข้าสู่ระยะไมโครสปอร์ที่มี 1 นิวเคลียส ในระยะแรกผนังไมโครสปอร์บางต่อมาจะหนาพร้อมทั้งมีการสร้างแวคิวโอล ในช่วงท้ายของระยะไมโครสปอร์ที่มี 1 นิวเคลียส

แวคิวโอลมีขนาดใหญ่เต็มเซลล์และดันนิวเคลียสให้ติดกับผนังเซลล์ระยะเจริญเต็มที่เรณูเป็นแบบ triporate มี 2 นิวเคลียส

4. สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาพัฒนาการของอับเรณูของ *O. integerrima* และ *G. serrata* พบว่าผนังอับเรณูประกอบด้วย 4 ชั้นคือ เอพิเดอร์มิส เอนโดทีเซียม มิดเดิลเลเยอร์ และทาพีตัมซึ่งเป็นแบบต่อมและมี 2 นิวเคลียส เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์แบ่งแบบไมโอซิส 2 ครั้งได้ 2 และ 4 เซลล์ ในระยะนี้เซลล์ทาพีตัมจับกันหลวม ๆเมื่อแคลโลสถูกย่อยและไมโครสปอร์หลุดออกมาชั้นทาพีตัมเริ่มหลุด และเมื่อถึงระยะที่เรณูมี 2 นิวเคลียส ชั้นทาพีตัมสลายและจัดเรียงไม่เป็นระเบียบ ชั้นเซลล์อื่นของผนังอับเรณูเหลืออยู่น้อยแต่ใน *G. serrata* พบว่าเซลล์ชั้นเอนโดทีเซียมมีแถบเส้นหนาบนผนังเซลล์

จากการศึกษาพัฒนาการของไมโครสปอร์ และแกมีโทไฟต์เพศผู้ของ *O. integerrima* และ *G. serrata* โดยการย้อมด้วยสีโพรพิโอโนคาร์มิน พบว่าเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์แบ่งเซลล์แบบไมโอซิส 2 ครั้งได้ 4 เซลล์ จัดเรียงตัวแบบพีระมิดโดยมีแคลโลสห่อหุ้มอยู่และแคลโลสที่หุ้มทั้ง 4 เซลล์ของ *O. integerrima* มีรูปร่างกลม ส่วนของ *G. serrata* มีลักษณะปลายเรียวแหลม นอกจากนี้ยังพบระยะกลุ่มละ 4 มีขนาดเซลล์แต่ละกลุ่มไม่เท่ากัน เมื่อเซลล์ทั้ง 4 หลุดออกจากแคลโลส เข้าสู่ระยะไมโครสปอร์ที่มี 1 นิวเคลียส พบไมโครสปอร์ขนาดแตกต่างกัน จากนั้นไมโครสปอร์จะสร้างแวคิวโอลและดันให้นิวเคลียสติดขอบเซลล์ และเกิดการแบ่งนิวเคลียสได้ 2 นิวเคลียสทำให้ระยะที่เรณูเจริญเต็มที่ของ *O. integerrima* และ *G. serrata* มี 2 นิวเคลียส

5. วิจารณ์ผลการศึกษา

จากการศึกษาพัฒนาการของอับเรณู ไมโครสปอร์และแกมีโทไฟต์เพศผู้ของ *O. integerrima* และ *G. serrata* พบว่าพืชทั้ง 2 ชนิดมีผนังอับเรณู 4 ชั้น เอพิเดอร์มิส เอนโดทีเซียม มิดเดิลเลเยอร์ และทาพีตัมซึ่งเป็นแบบต่อมและมี 2 นิวเคลียสสอดคล้องกับ Johri et al. (1992) อ้างจาก Narayana (1975) ซึ่งได้ศึกษา *O. atropurpurea* และ *O. kirkii* เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์แบ่งเซลล์แบบไมโอซิส 2 ครั้งได้ 2 และ 4 เซลล์จัดเรียงตัวแบบพีระมิด มีผนังแคลโลสหุ้มไว้ จากนั้นเซลล์ทั้ง 4 หลุดออกจากแคลโลส เข้าสู่ระยะไมโครสปอร์ที่มี 1 นิวเคลียส พบไมโครสปอร์ขนาดแตกต่างกัน สอดคล้องกับ Pagliarini et al. (1992) ซึ่งได้ศึกษาใน *Ochna* sp. รายงานไว้ว่า การสร้างไมโครสปอร์ส่วนมากจะเกิดความผิดปกติในการแยกจากกันของโครโมโซมในระยะเมตาเฟส และแอนาเฟส จากความผิดปกตินี้ทำให้ไมโครไซต์มีขนาดแตกต่างกัน ซึ่งผลตามมา คือทำให้ไมโครสปอร์และเรณูแตกต่างกัน เรณูที่มีขนาดเล็กจะเป็นหมัน ไมโครสปอร์จะแบ่งนิวเคลียสแบบไมโทซิสได้ 2 นิวเคลียส ทำให้ระยะเรณูเจริญเต็มที่มี 2 นิวเคลียส เมื่อเจริญเต็มที่เรณูของ *O. integerrima* เป็นแบบ tricolporate ส่วน *G. serrata* เป็นแบบ triporate ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกซึ่งยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับพืชทั้งสองชนิดนี้

ภาพที่ 12 เนื้อเยื่อตัดตามขวางของอับเรณู ก–ง : *O. integerrima*, จ–ช : *G. serrata*

ก : ไมโครสปอร์โรไซต์ (สเกล = 50 ไมโครเมตร)

ข : ไมโครสปอร์ติดกัน 2 เซลล์ (สเกล = 20 ไมโครเมตร)

ค : ไมโครสปอร์ติดกัน 4 เซลล์ มีแคลโลสหุ้ม (สเกล = 20 ไมโครเมตร)

ง : เรณูมี 2 นิวเคลียส (สเกล = 20 ไมโครเมตร)

จ : ไมโครสปอร์โรไซต์ (สเกล = 50 ไมโครเมตร)

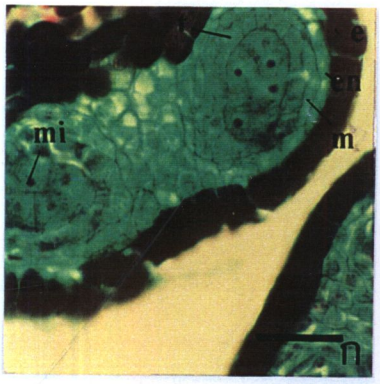
ฉ : ไมโครสปอร์ที่มีแวคิวโอลเต็มเซลล์ (สเกล = 50 ไมโครเมตร)

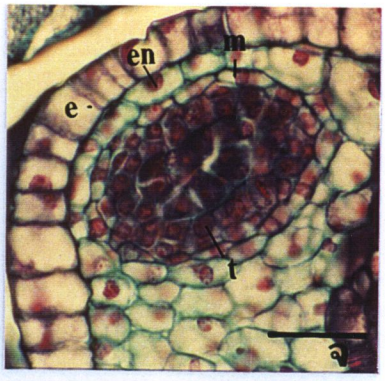
ช : เรณูมี 2 นิวเคลียส (สเกล = 20 ไมโครเมตร)

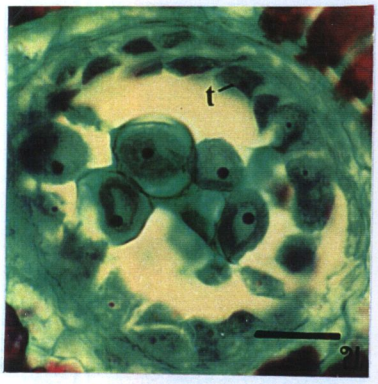
ซ : เอ็นโดทีเซียมเป็นเส้นหนา (สเกล = 20 ไมโครเมตร)

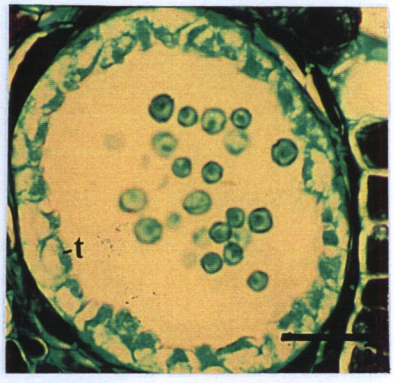
c : แคลโลส, e : เอพิเดอร์มิส en : เอนโดทีเซียม

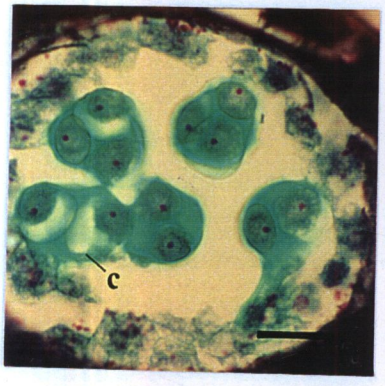
m : มิดเดิลเลเยอร์, p : เรณู, t : ทาพีทัม

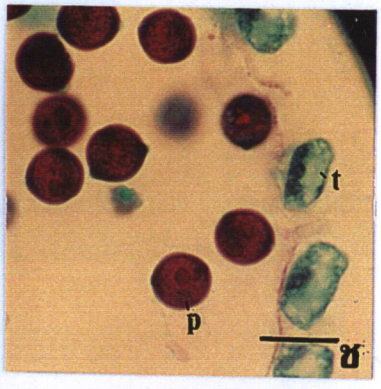

mi
m


en
m
e
t

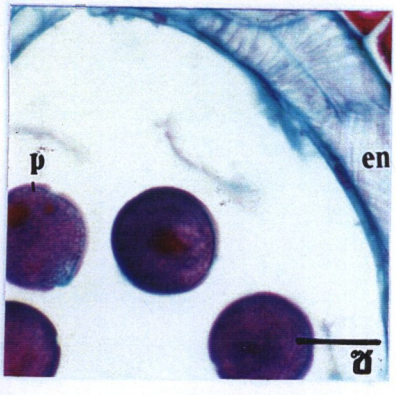

t


t


c


t
p

p


p
en

ภาพที่ 13 พัฒนาการของเรณูของ *O. integerrima*

ก : ระยะสร้างเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ (สเกล = 20 ไมโครเมตร)

ข : ระยะสร้างไมโครสปอร์ 2 เซลล์ (สเกล = 20 ไมโครเมตร)

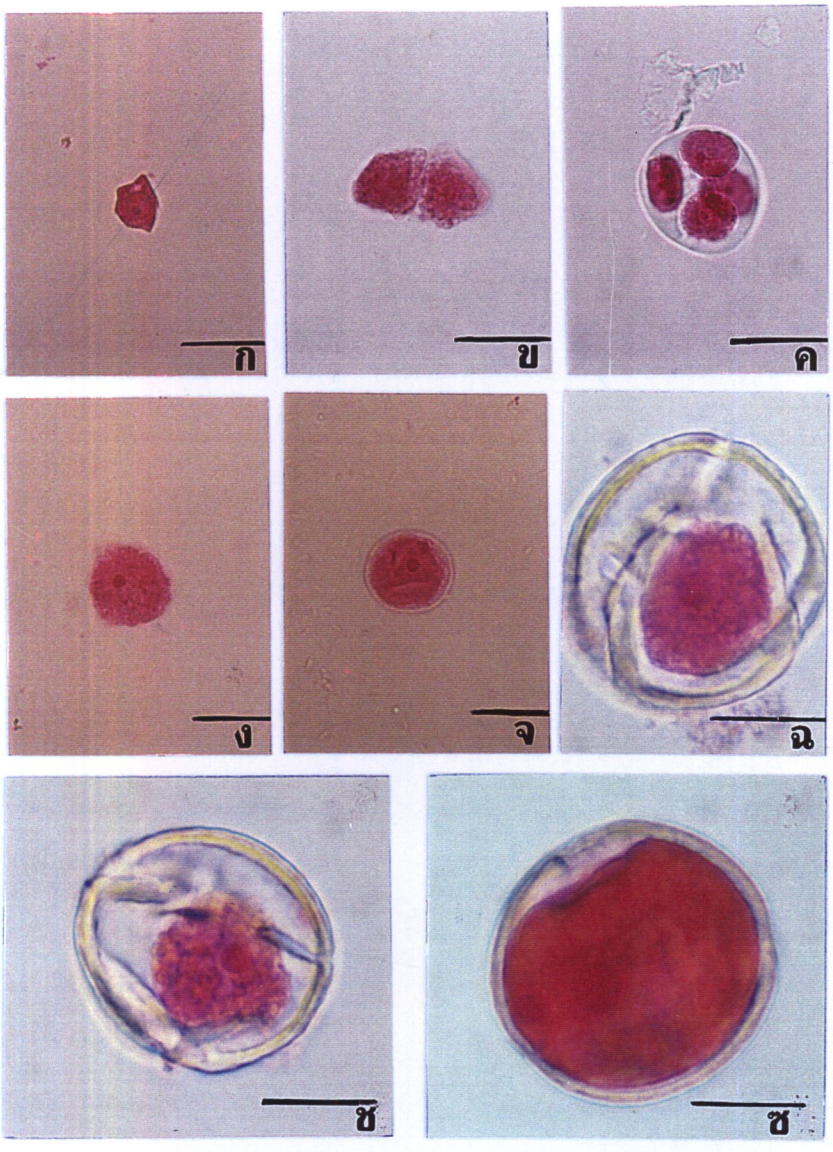
ค : ระยะสร้างไมโครสปอร์ 4 เซลล์ (สเกล = 20 ไมโครเมตร)

ง : ระยะไมโครสปอร์มีผนังบาง (สเกล = 20 ไมโครเมตร)

จ : ระยะไมโครสปอร์ผนังหนา (สเกล = 20 ไมโครเมตร)

ฉ-ช : ระยะไมโครสปอร์มีแวคิวโอล (สเกล = 10 ไมโครเมตร)

ช : เรณูที่เจริญเต็มที่ (สเกล = 10 ไมโครเมตร)


ก
ข
ค
ง
จ
ฉ
ช
ซ

ภาพที่ 14 พัฒนาการของเรณูของ *G. serrata*

ก : ระยะสร้างเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ (สเกล = 10 ไมโครเมตร)

ข : ระยะหลังจากแบ่งไมโอซิสครั้งที่ 1 (สเกล = 20 ไมโครเมตร)

ค : ระยะสร้างไมโครสปอร์ 4 เซลล์ (สเกล = 10 ไมโครเมตร)

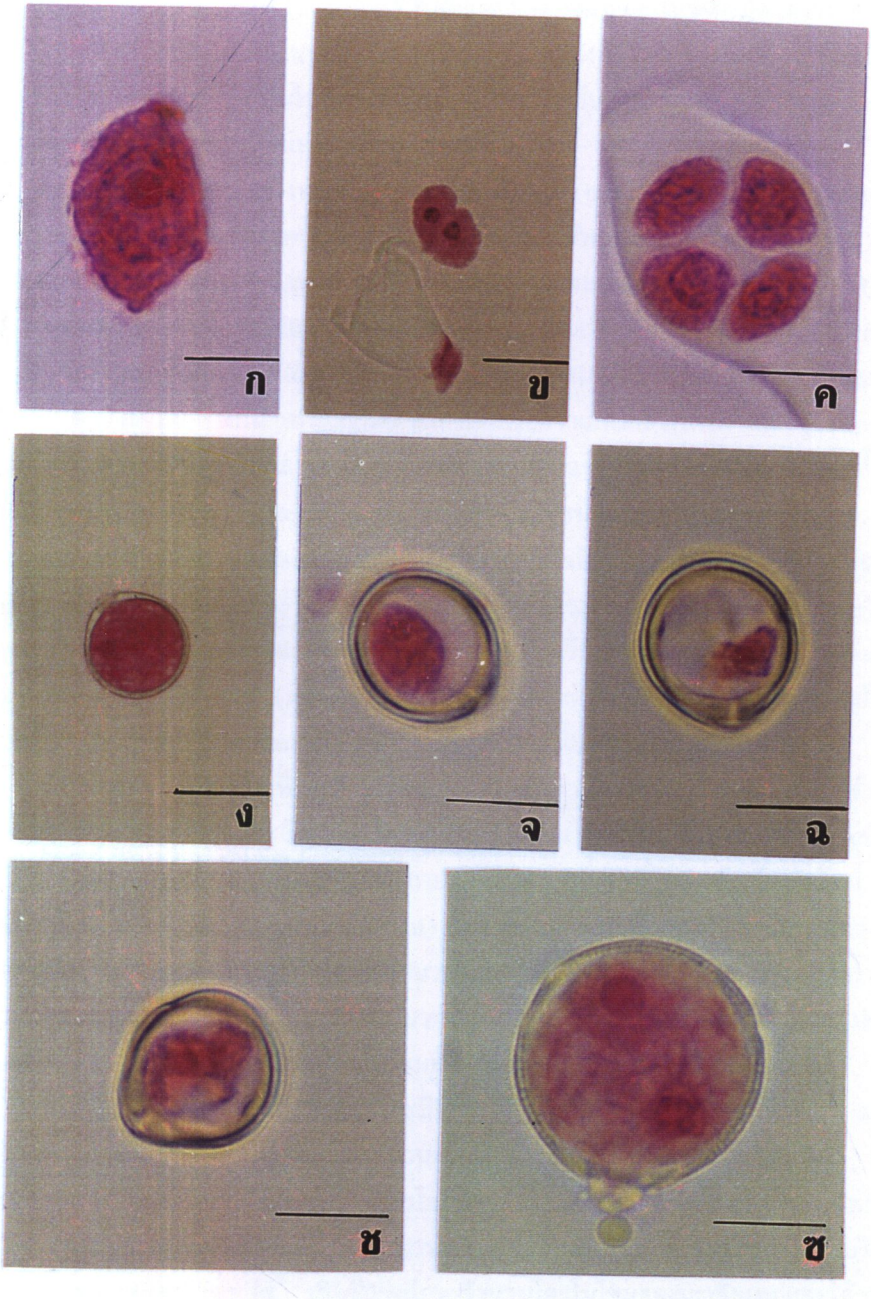
ง : ระยะไมโครสปอร์มีผนังหนา (สเกล = 20 ไมโครเมตร)

จ : ระยะไมโครสปอร์มีแวคิวโอล (สเกล = 10 ไมโครเมตร)

ฉ : ระยะไมโครสปอร์มีแวคิวโอลเต็มเซลล์ (สเกล = 10 ไมโครเมตร)

ช : ระยะแบ่งนิวเคลียส (สเกล = 10 ไมโครเมตร)

ซ : เรณูที่เจริญเต็มที่ (สเกล = 10 ไมโครเมตร)


ก
ข
ค
ง
จ
ฉ
ช
ซ

บทที่ 6
การศึกษาจำนวนโครโมโซม

การแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิส เป็นการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์โดยมีการลดจำนวนโครโมโซมลงครึ่งหนึ่งจากเซลล์เริ่มต้น เซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิสเป็นเซลล์ที่พบเฉพาะอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ และเรียกเซลล์เหล่านี้ว่าไมโอไซต์ (meiocyte) ในอับเรณูของพืชมีเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสเพื่อให้ได้เรณู การแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิสมีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต เพื่อรักษาโครโมโซมให้คงที่ในทุกชั่วรุ่น เนื่องจากเป็นการลดจำนวนโครโมโซมครึ่งหนึ่งเพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เมื่อมีการผสมระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ต่างเพศ จะได้ลูกที่มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับที่พบในพ่อ-แม่

โครโมโซมคือ โครงสร้างทางพันธุกรรมที่เก็บรักษา (storage) แสดงออก (expression) ถ่ายทอด (transmission) ลักษณะของข้อมูลทางพันธุกรรม ซึ่งประกอบด้วยกรดนิวคลีอิกทั้ง ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ โปรตีน ไขมัน แคลเซียม แมกนีเซียม และเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA Polymerase) (Swanson, 1964; พวงผกา สุนทรชัยนาคแสง, 2540) โปรตีนที่อยู่ในโครโมโซมเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นด่างเรียกว่าฮีสโตน (histone) ซึ่งคุณสมบัตินี้จะทำให้เกาะได้ดีกับดีเอ็นเอซึ่งมีคุณสมบัติเป็นกรด ลำดับดีเอ็นเอบนโครโมโซมมีผลทำให้โครโมโซมติดสีแตกต่างกัน บริเวณที่ติดสีแดงเข้มเรียกว่าเฮตเทอโรโครมาติน (heterochoromatin) ซึ่งหมายถึง ส่วนของโครมาตินที่คลายเกลียวไม่หมดในระยะอินเทอร์เฟสเนื่องจากมีดีเอ็นเอซ้ำ ๆกันมักจะพบในบริเวณปลายของโครโมโซม (telomere) และบริเวณที่อยู่ใกล้เซนโตรเมียร์ (นิยะดา ห่อนาค, 2543) บริเวณที่ติดสีจางเรียกว่ายูโครมาติน (euchomatin) เป็นส่วนโครมาตินที่คลายเกลียวหมดในระยะอินเทอร์เฟส รูปร่างของโครโมโซมที่มองเห็นชัดและรูปร่างคงที่ คือโครโมโซมในระยะเมทาเฟส (metaphase) และแอนาเฟส (annaphase) จะเห็นว่าโครโมโซมแต่ละแท่งจะมีส่วนเว้าเข้าไปเรียกว่าเซนโทเมียร์ หรือ primary constriction ที่ตำแหน่งนี้จะมีสปินเดลไฟเบอร์ (spindle fiber) มาเกาะและดึงให้โครมาตินแยกออกจากกัน นอกจากนี้จะมีรอยคอดอื่น ๆ อีกเรียกว่า secondary constriction แต่บริเวณนี้ไม่มีสปินเดิลไฟเบอร์มาเกาะ

นักวิทยาศาสตร์ได้เล็งเห็นความสำคัญของการศึกษาจำนวนโครโมโซมจึงมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางและรวบรวมผลงานไว้ในหนังสือแผนที่โครโมโซมโดยเสนอโครโมโซมเป็น 3 แบบ ได้แก่ somatic number (2n) ซึ่งหมายถึงจำนวนโครโมโซมในเซลล์ร่างกาย (somatic cell) ประกอบด้วยโครโมโซม 2 ชุด ชุดหนึ่งมาจากพ่ออีกชุดหนึ่งมาจากแม่ gametic number (n) หมายถึงจำนวนโครโมโซมในเซลล์สืบพันธุ์ (gamete) ซึ่งอาจพบในเซลล์สืบพันธุ์ของพ่อหรือแม่ก็ได้ปกติมีจำนวนเป็นครึ่งหนึ่ง (haploid) ของจำนวนโครโมโซมในเซลล์ร่างกายเสมอ และ basic number (x) หมายถึงจำนวนโครโมโซมที่น้อยที่สุดที่มีรูปร่างลักษณะไม่เหมือนกันเลย ใน chromosome complement และชุดของโครโมโซมที่ไม่เหมือนกันเลยนี้คือจีโนม (genome)

จำนวนโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆจะมีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกันออกไป แต่ในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะมีจำนวนโครโมโซมที่เท่ากันเป็นจำนวนที่คงที่แต่ ปรีชา ประเทพา, (2533) อ้างจาก Bariks, (1984) ได้ศึกษาจำนวนและชนิดของโครโมโซมของพืชแต่ละถิ่นอาศัยโดยได้ศึกษาจำนวนโครโมโซมของมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) จำนวน 18 พันธุ์ (varieties) ที่เก็บตัวอย่างจากบริเวณต่าง ๆของรัฐควีนแลนด์ ประเทศออสเตรเลีย เดิมมีการศึกษาจำนวนโครโมโซมของมะเขือเทศและได้รายงานว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n = 24 แต่การศึกษาครั้งนี้พบว่าจำนวนโครโมโซม 2n=25, 26 จะพบ 12 ไบวาเลนท์ (bivalent) หรือ 13 ไบวาเลนท์ ส่วนในมะเขือเทศที่มีจำนวนโครโมโซม 2n=25 จะมีเฉพาะ 12 ไบวาเลนท์เท่านั้นแม้ว่า

มะเขือเทศที่ศึกษาจะมีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกันก็ตามลักษณะสัณฐานวิทยาไม่มีความแตกต่างกันแต่อย่างไร

การศึกษาด้านพันธุศาสตร์ระดับเซลล์สามารถนำไปใช้ในการจำแนกร่วมกับลักษณะทางอนุกรมวิธาน กายวิภาคศาสตร์ และชีวโมเลกุล ทำให้สามารถจำแนกพืชได้รวดเร็วยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลในการหาสายสัมพันธ์และวิวัฒนาการของพืช ซึ่งเป็นสิ่งที่บ่งชี้ถึงความหลากหลายทางพันธุกรรม

1. การตรวจเอกสาร

Darlington & Wylie (1955) ได้รวบรวมจำนวนโครโมโซมของพืชดอกไว้ในแผนที่โครโมโซม โดยเสนอจำนวนโครโมโซมเป็น 3 แบบ ได้แก่ somatic number, gametic number และ basic number ซึ่งได้รายงานไว้ว่า *Ochna serrulata* มีจำนวน basic number = 7 และ somatic number = 35 วงศ์ Dipterocapraceae จำนวน basic number ของ *Pentacme siamensis* = 6 และ somatic number = 12 ส่วนสกุล *Dipterocarpus* 3 ชนิดคือ *D. alatus*, *D. intricatus* และ *D. obtusifolius* มี basic number = 10 และ somatic number = 20

พวงผกา อัมพันธ์จันทร์ (2533) ศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืชดอกบางชนิดในบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยการเตรียมโครโมโซมจากเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์และไมโครสปอร์ อวัยวะที่นำมาใช้เตรียมโครโมโซมได้แก่ ดอก นำดอกแช่ใน Carnoy's solution เพื่อหยุดกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งส่วนผสมของน้ำยานี้จะมีคุณสมบัติในการหยุดการทำงานของเซลล์ได้อย่างรวดเร็วโดยละลายโปรตีนแต่ไม่ละลายนิวคลีโอโปรตีน และยังทำให้โครโมโซมพองตัว คลอโรฟอร์มมีคุณสมบัติในการละลายไขมันและไข (wax) ที่อยู่บนผิวเนื้อเยื่ออย่างรวดเร็วและดึงน้ำออกจากเซลล์ทำให้โปรตีนที่เสียสภาพไปไม่เปลี่ยนกลับมาสภาพเดิม ทำให้เนื้อเยื่อแข็งและโครโมโซมหดตัว ส่วนสีที่ใช้ในการย้อมโครโมโซมคือ โพรพิโอโนคาร์มิน (propionocarmine)

Zhang & Min (1999) ศึกษาคาริโอไทป์ของพืชสกุล *Camellia* 9 ชนิด 2 พันธุ์ พบว่า *C. henryana* 2n= 30 = 21m+ 8sm+ 1st, *C. furfuracea* 2n= 30 = 20m+ 10s, *C. wadii* 2n= 30 = 18m+ 11sm+ 1st, *C. anlungensis* 2n= 30 = 19m+ 9sm + 2st, *C. anlungensis* var. acutiperlata 2n= 30 = 19m+ 9sm+ 2at, *C. pyxidiacea* 2n= 30 = 20m+ 8sm+ 2st, *C. pyxidiacea* var. rubitubreculata 2n= 30 = 21m+ 8sm+ 1st, *C. brevistyla* 2n= 30 = 18m+ 10sm+ 2st, *C. leptophylla* 2n= 30 = 24m+ 4sm+ 2st, *C. yunnanensis* 2n= 30 = 18m+ 10sm+ 2st, *C. pitardii* 2n= 30 = 18m+ 12sm ซึ่งพืชทั้ง 9 ชนิดที่ศึกษายังไม่เคยมีรายงานการศึกษามาก่อน เมื่อเปรียบเทียบกันแล้วพืชแต่ละชนิดมีคาริโอไทป์เหมือนกันมาก ดังนั้นในการศึกษาคาริโอไทป์ควรมีการเปรียบเทียบระหว่างหมู่ (section) ดีกว่าที่จะมีการเปรียบเทียบระหว่างชนิด

2. วิธีการศึกษา

2.1 นำชิ้นตัวอย่างพืช คือดอกอ่อนของ *O. integerrima* และ *G. serrata* แช่ใน Carnoy's solution เพื่อหยุดกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

2.2 ล้างชิ้นตัวอย่างด้วย แอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเก็บชิ้นตัวอย่างไว้ในตู้เย็นได้นาน 6-12 เดือน

2.3 ล้างดอกที่จะศึกษาด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้งๆละ 5 นาที เพื่อล้างแอลกอฮอล์ออกจากชิ้นตัวอย่าง

2.4 นำดอกที่ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วมาย้อมสีโครโมโซม โดยแกะเอาเฉพาะอับเรณูจำนวนหนึ่งออกมาวางบนสไลด์ หยดสีโพรพิโอโนคาร์มิน 1 หยด ใช้เข็มเขี่ยขยี้อับเรณูเพื่อให้เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ออกมา ทิ้งชิ้นตัวอย่างแช่ในสีประมาณ 5 นาที

2.5 นำสไลด์ไปลนไฟให้ร้อนพอหลังมือทนได้เพื่อให้เซลล์พองตัว ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์ ใช้กระดาษซับสีส่วนเกินออก หลังจากนั้นนำสไลด์ที่ได้ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย ×10 และ ×40 ตามลำดับ

2.6 ถ้าโครโมโซมที่ได้ไม่กระจายให้ใช้ดินสอด้านที่มียางลบเคาะสไลด์เบา ๆเพื่อให้โครโมโซมกระจาย

2.7 ทำให้โครโมโซมอยู่ในระนาบเดียวกันโดยใช้กระดาษซับวางบนกระจกปิดสไลด์และใช้นิ้วรีดลงบนกระดาษซับ

2.8 เคลือบแผ่นกระจกด้วยน้ำยาทาเล็บ

2.9 บันทึกภาพ

3. ผลการศึกษา

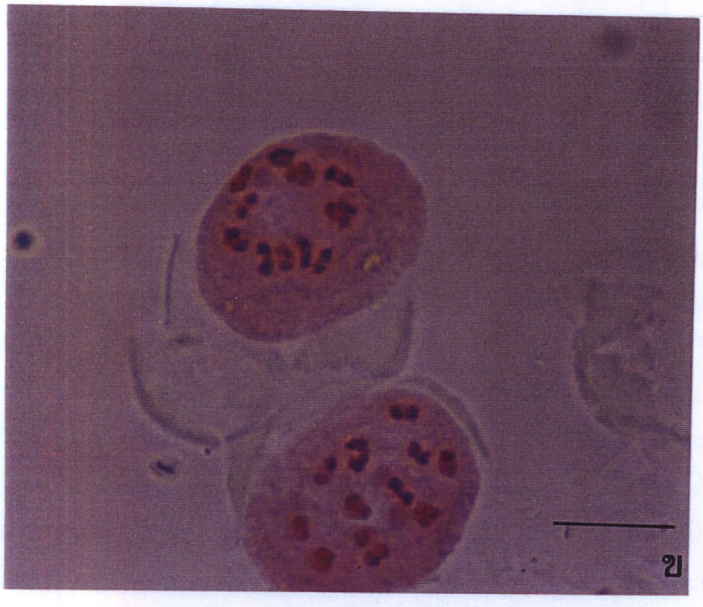
จากการศึกษาโครโมโซมของ *O. integerrima* และ *G. serrata* โดยใช้ดอกอ่อนแช่ใน Carnoy's solution และย้อมโครโมโซมของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ด้วยสีโพรพิโอโนคาร์มินประมาณ 3-5 นาที พบว่า *O. integerrima* ระยะแอนาเฟสแรกมี n = 11 ส่วน *G. serrata* มี n = 12 (ภาพที่ 15)

4. สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

การศึกษาจำนวนโครโมโซมจากดอกอ่อนของ *O. integerrima* และ *G. serrata* พบว่า *O. integerrima* ระยะแอนาเฟตแรก n = 11 ส่วน *G. serrata* มี n = 12 ซึ่งพืชทั้งสองชนิดนี้ยังไม่มีรายงานว่ามีการศึกษาจำนวนโครโมโซม จากการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากดอกของ *O. integerrima* พบว่าโครโมโซมมีขนาดเล็กกว่าโครโมโซมของ *G. serrata* มากซึ่งพวงผกา อัมพันธ์จันทร์ (2533) กล่าวไว้ว่าพืชที่มีเนื้อไม้ (ไม้พุ่มและไม้ต้น) มีโครโมโซมขนาดเล็กมาก และโดยเฉลี่ยจะมีโครโมโซมมากกว่าไม้ล้มลุกและยังพบว่าพืชวงศ์เดียวกันจะมีลักษณะและจำนวนโครโมโซมเหมือนกันหรือใกล้เคียงกัน แต่พืชต่างวงศ์กันจะมีจำนวนโครโมโซมต่างกัน จากการศึกษาพบว่าโครโมโซมของ *O. integerrima* ติดสีไม่ค่อยดีวิธีแก้คือหลังจากไมโครสปอโรไซต์ออกมาแล้วหยดสีโพรพิโอโนคาร์มินและแช่ไว้ประมาณ 5-10 นาทีจึงลนไฟให้เซลล์พองตัวจะช่วยให้โครโมโซมกระจาย

ภาพที่ 15 โครโมโซม ก : *O. intgerrima* ข : *G. serrata*
(สเกล = 20 ไมโครเมตร)

ก


ข

บทที่ 7
การศึกษาการสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

การจำแนกพืชศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลัก ได้แก่ ลำต้น ใบ ดอก ผล และเมล็ด ต้องใช้เวลาในการศึกษาค่อนข้างนาน เพราะพืชบางชนิดต้องใช้เวลาหลายปีในการเจริญเติบโตจนกระทั่งออกดอก ติดผล ถ้าพืชที่ศึกษามีความใกล้ชิดกันมาก การจัดหมู่ที่ศึกษาจากลักษณะทางสันฐานวิทยาเพียงประการเดียวนั้นอาจเกิดความผิดพลาดได้ จึงนำความรู้ทางด้าน กายวิภาคศาสตร์ และนิเวศวิทยามาช่วย และได้มีการนำความรู้ทางวิทยาศาสตร์สาขาอื่นๆมาช่วยอีก เช่น การจำแนกโดยใช้องค์ประกอบทางเคมีพืช (chemotaxonomy) การจำแนกโดยเรณูวิทยา (palynological taxonomy) เป็นต้น ได้มีการใช้ระบบการจำแนกพืชโดยพิจารณาถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationships) โดยมีการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆเกี่ยวกับโครโมโซมหรือดีเอ็นเอ เข้ามาช่วยในการจำแนกพืช เช่น เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมที่สามารถจำแนกของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยความแตกต่างของดีเอ็นเอและช่วยในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ รวมทั้งใช้ในการตรวจสอบพันธุ์ และตรวจสอบพ่อแม่ที่ถูกต้อง เทคนิคดังกล่าวได้แก่ การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอซึ่งสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนใดก็ได้ไม่ขึ้นกับอวัยวะที่ใช้ในการตรวจสอบระยะการเจริญเติบโตและสภาพแวดล้อม (มลิวรรณ นาคขุนทด และ คณะ, 2542; สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล และ ธีระชัย ธนานันท์, 2540) ส่วนการวิเคราะห์โดยเทคนิคไอโซไซม์และโปรตีนจะมีข้อจำกัด เนื่องจากการแสดงออกของยีนที่ศึกษาขึ้นอยู่กับชนิดและเนื้อเยื่อและระยะเวลาของช่วงพัฒนาจึงต้องใช้เนื้อเยื่อชนิดเดียวกันและอยู่ในระยะพัฒนาการเดียวกันเท่านั้น นอกจากนี้ยังมีอิทธิพลทางสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนด้วย (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2543)

1. การตรวจเอกสาร

1.1 การเตรียมดีเอ็นเอจากพืช

การเตรียมดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จากพืช เตรียมได้จากเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น เตรียมจากใบสด (Porebski et al., 1997) ช่อดอก เมล็ด ปลายราก และกลุ่มเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Boiteux et al., 1999) ในสมัยก่อนนิยมแยกส่วนของนิวเคลียสออกจากเซลล์ก่อนแล้วจึงนำมาเตรียมดีเอ็นเอ แต่ปัจจุบันไม่ค่อยทำเนื่องจากพบว่าดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดียและคลอโรพลาสต์ไม่ได้ทำให้เกิดปัญหาในการโคลนยีนแต่อย่างไร รวมทั้งอาร์เอ็นเอที่ปะปนอยู่บ้างก็ไม่มีผลต่อการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะหรือเอ็นไซม์อื่นๆที่ใช้ตัด (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2543) สำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากพืชในปัจจุบันนิยมบดเนื้อเยื่อพืชให้แตกละเอียดพร้อมกันโดยไนโตรเจนเหลวเพื่อทำลายเซลล์หรือเนื้อเยื่อและเพื่อให้เมมเบรนของนิวเคลียสถูกทำลายโดยสารประกอบพวกดีเทอร์เจน (detergent) เช่น โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate; SDS) ethyl trimethylammonium bromide (CTAB) และ polyvinyl pyrrolidone (PVP) ทำให้มีการปลดปล่อยดีเอ็นเอสู่สารสกัด (extraction buffer) (Thomson & Murray, 1980) โดยปกติดีเอ็นเอที่ถูกปลดปล่อยออกมาสู่สารสกัดมักมีสารประกอบอื่นๆ เช่นคาร์โบไฮเดรต โปรตีน เศษเมมเบรน และผนังเซลล์ที่ปนมาด้วย ซึ่งมักใช้สารละลายคลอโรฟอร์ม (chloroform) ช่วยกำจัดคาร์โบไฮเดรต หรือฟีนอล (phenol) ช่วยกำจัดโปรตีน ในกรณีที่เนื้อเยื่ออายุ

มากหรือพืชนั้นเป็นไม้ต้นมักจะมีสารประกอบทุติยภูมิ (secondary metabolite) เช่น พอลิฟีนอล (polyphenol) แทนนิน (tannin) และโพลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) (Porebski et al., 1997) ซึ่งสารดังกล่าวมีอุปสรรคต่อการสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ พอลิฟีนอลจับกับดีเอ็นเอโดยพันธะโควาเลนต์ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้เกิดเป็นสีน้ำตาล (Peterson et al., 1997) ซึ่งทำให้ยากต่อการนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เพราะสารประกอบโพลิแซ็กคาไรด์จะไปยับยั้งกิจกรรมของเอ็นไซม์พอลิเมอร์เลส (polymerase) ไลเกส (ligase) และเรสติกชัน เอ็นโดนิวคลีเอส (restriction endonuclease) (Boiteux et al., 1999)

ในการกำจัดพอลิฟีนอลนั้นนิยมใช้ PVP โดย PVP จะจับตัวเป็นคอมเพล็กซ์กับพอลิฟีนอล โดยพันธะไฮโดรเจน (Porebski et al., 1997) นอกจากนั้นยังมี CTAB ที่เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวก ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับประจุลบของดีเอ็นเอ ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง และเกิดเป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้ และเมื่อลดความเข้มข้นของเกลือลงจะทำให้ดีเอ็นเอตกตะกอนแยกตัวออกมาจากสารอื่น (ปวีณา สาลีทอง, 2541 อ้างจากปรีดา จันทะพงษ์, 2535)

ในการตกตะกอนดีเอ็นเอจะใช้เอทานอล (ethanol) หรือไอโซโพรพานอล (isopropanol) ที่เย็นจัด ซึ่งจะช่วยให้ดีเอ็นเอตกตะกอนได้มากที่สุด

1.2 เทคนิค Polymerase Chain Reaction

Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มดีเอ็นเอต้นแบบให้มีปริมาณมากขึ้นในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยใช้เวลาไม่นาน เทคนิคนี้ถูกคิดค้นโดย Mullis แห่งบริษัทซีตัส หลักการพื้นฐานของ PCR คือการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอสายคู่ในหลอดทดลองโดยใช้ปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอ็นไซม์ DNA polymerase โดยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้องอาศัย (1) ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) (2) ดีเอ็นเอสายสั้น (primer) ที่สามารถจับได้ดีกับดีเอ็นเอต้นแบบ เพื่อเป็นจุดเริ่มต้นสำหรับการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ โดยทั่วไปไพรเมอร์ที่นิยมใช้มักมีปริมาณ guanin (G) + cytosine (C) 50-70 เปอร์เซ็นต์ และมีความยาว 20-30 นิวคลีโอไทด์ โดยมี (3) DNA polymerase ทำหน้าที่นำเอานิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด (dNTPs) คือ dATP, dCTP, dTTP และ dGTP เข้ามาต่อให้เป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ และ (4) บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา PCR ลำดับเบสที่สามารถจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวแต่ละสายของช่วงดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณทางปลายด้าน 3′ ดังนั้นปฏิกิริยาจึงต้องใช้ primer 2 เส้นที่มีนิวคลีโอไทด์ต่างกันแต่ละเส้นจะจับกับดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นสายเดี่ยวแต่ละสายและมีทิศทางตรงกันข้าม (กนกวลัย กุลทนันทน์, 2537)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเกิดขึ้นได้จากปฏิกิริยาซ้ำ ๆกัน 3 ขั้นตอนดังนี้

1. ขั้นตอนทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบเสียสภาพ (denaturation) เป็นการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาให้เป็นสายเดี่ยว (single strand) ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 91-95 องศาเซลเซียส (โดยทั่วไปมักใช้ 92 องศาเซลเซียส) ซึ่งความร้อนจะทำลายพันธะไฮโดรเจนที่ยึดดีเอ็นเอ 2 สายออกจากกัน

2. ขั้นตอนไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) เป็นขั้นตอนที่ไพรเมอร์ที่อยู่ในส่วนผสมในหลอดทดลองจะจับ (anneal) กับดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สมกัน (complementary) ทางด้านปลาย 3′ของแต่ละสาย ซึ่งเกิดขึ้นหลังจากที่ลดอุณหภูมิจากขั้นตอนแรกลงให้อยู่ในช่วง 50-55 องศาเซลเซียส

3. ขั้นตอนสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (primer extension) โดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวทั้งสองเส้นเป็นต้นแบบสร้างต่อออกไปจากไพรเมอร์ในทิศทาง 5′ → 3′ ของไพรเมอร์ โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase และดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ครบทั้ง 4 ชนิด (dGTP, dTTP, dATP และ dCTP) อุณหภูมิที่ใช้ซึ่งเหมาะสมสำหรับเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNA polymerase คือ 70-75 องศาเซลเซียส

เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสิ้นซึ่งนับเป็นหนึ่งรอบ จะได้ดีเอ็นเอเป็นสองเท่าของจำนวนคู่เมื่อเริ่มต้นฉะนั้นในรอบที่ 1 จากดีเอ็นเอต้นแบบ 1 คู่จะได้ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 2 คู่ ในรอบต่อมาดีเอ็นเอที่ทั้งที่มีอยู่เดิมและที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่จะถูกใช้เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำกันหลาย ๆรอบปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นจากหนึ่งเป็น 2, 4, 8 เท่าไปเรื่อย ๆจนถึง 2^n เมื่อปฏิกิริยาผ่านไป n รอบ

1.3 หลักการของการวิเคราะห์ Random Amplified Polymorphic DNA

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่อาศัยเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวเข้าไปสุ่ม (random primer) เกาะกับดีเอ็เอต้นแบบบนตำแหน่งที่มีลำดับเบสคู่สมกันเพื่อเป็นจุดเริ่มต้นสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Williams et al., 1990)

ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR สำหรับวิเคราะห์ RAPD เป็นไพรเมอร์ที่ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary primer) มีขนาด 9-10 นิวคลีโอไทด์ และต้องมีส่วนประกอบของเบส G+C เป็น 50-80 เปอร์เซ็นต์ (Williams et al., 1990; สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2540) การจับเกาะของไพรเมอร์เป็นการสุ่มจับเกาะดีเอ็นเอต้นแบบโดยดีเอ็นเอต้นแบบทั้งสองสายที่เป็นคู่กันต้องมีตำแหน่งของลำดับเบสที่เป็น inverted sequence ซึ่งเป็นบริเวณที่เปิดโอกาสให้ไพรเมอร์เข้าเกาะจับได้ 2 ตำแหน่งบนดีเอ็นเอต้นแบบทั้งสองสาย ในทิศทางปกติและทิศทางกลับกัน (inverted orientation) ทำให้ดีเอ็นเอแต่ละชิ้นสามารถเพิ่มปริมาณได้ แต่อย่างไรก็ตามชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จะมีขนาดไม่เกิน 3,000 คู่เบสเนื่องจากข้อจำกัดของเอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่สามารถนำเอานิวคลีโอไทด์แต่ละตัวมาต่อกันได้ยาวไม่เกิน 3000 คู่เบสจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ขึ้นกับชนิดของไพรเมอร์ชนิดเดียวกันแต่ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่แตกต่างกันแบบแผนของดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกันด้วย จึงทำให้สามารถจำแนกพืช หรือสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมออกจากกันได้ (ประสาน สืบสุข, 2541)

1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อ RAPD

1.4.1 ดีเอ็นเอต้นแบบ คุณภาพและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ RAPD และ PCR ขึ้นกับลักษณะของงานที่จะศึกษา ถ้างานที่ศึกษาเป็นการทำแผนที่ยีน (genetic mapping) หรือเซลล์วิทยาระดับโมเลกุล (molecular cytology) จำเป็นต้องใช้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูง ในกรณีที่ดีเอ็นเอต้นแบบมีการปนเปื้อนของสารอื่นมากอาจมีผลต่อปฏิกิริยาของ PCR เช่น ดีเอ็นเอต้นแบบที่ปนเปื้อนโดยพอลิแซ็กคาไรด์จะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase, ligases และ restriction endonuclease (Boiteux et al., 1999) ความเข้มข้นที่เหมาะสมของดีเอ็นเอต้นแบบมีผลอย่างมากต่อการเกิดแบบแผนดีเอ็นเอที่แน่นอนถ้าใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณน้อยเกินไปจะทำให้ผลผลิตหรือแบบแผนดีเอ็นเอที่ได้ไม่คงที่ ถ้าใช้ดีเอ็นเอต้นแบบมากเกินไปจะ

ทำให้เกิดผลผลิตดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ (non specific ampification) เกิดขึ้นจำนวนมาก ช่วงความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้อยู่ในช่วง 10-500 นาโนกรัม แต่นิยมใช้ 20-50 นาโนกรัม

1.4.2 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide, dNTP) นิวคลีโอไทด์ต่างๆได้แก่ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP มีผลต่อการทำงานของแมกนีเซียมไอออน (Mg^{+2}) โดย dNTP จะจับกับ Mg^{+2} โดยทั่วไปปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ dNTP แต่ละชนิดในความเข้มข้น 200 μM ความเข้มข้นของ Mg^{+2} ที่ใช้อยู่ในช่วง 0.5-2.5 mM แต่ใช้ความเข้มข้นของ dNTP สูงกว่านี้อาจจะเพิ่มความเข้มข้นของ Mg^{+2} Levi et al. (1993) รายงานว่าความเข้มข้นของ dNTP ที่เหมาะสมที่สุดกับพืชมีเนื้อไม้คือ 200 μM

1.4.3 *Taq* DNA polymerase ในเทคนิคนี้จะเห็นว่า มีขั้นตอนที่ดีเอ็นเอต้องได้รับความร้อนสูงถึง 95 องศาเซลเซียส ในระยะที่ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออกจากกัน ในสมัยแรกของการทำ PCR ได้ใช้เอนไซม์ polymerase จาก *E. coli* (*Klenow fragment*) ซึ่งไม่ทนต่อความร้อน ทำให้ต้องมีการเติมเอนไซม์ใหม่ในทุกๆรอบของปฏิกิริยา ต่อมา Saiki et al. (1988) ใช้เอนไซม์ polymerase จากแบคทีเรียชื่อ *Thermus aquaticus* ซึ่งแยกได้จากน้ำพุร้อนแทน (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2540) *Taq* DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 94 กิโลดาลตัน เป็นเอนไซม์ที่มีส่วนสำคัญในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปฏิกิริยา PCR และ RAPD เนื่องจาก *Taq* DNA polymerase จะเป็นตัวนำนิวคลีโอไทด์มาเชื่อมต่อกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ การปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอและความแน่นอนของแบบแผนดีเอ็นเอมาจากความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ให้สูงขึ้นจำนวนแถบของดีเอ็นเอจะเพิ่มขึ้น และแถบของดีเอ็นเอจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำลง การใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์สูงเกินไปจะทำให้เกิดผลผลิตดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้นจำนวนมาก ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *Taq* DNA polymerase ในปฏิกิริยาทั่วๆไปอยู่ในช่วง 1.0-2.5 units ต่อ 100 ไมโครลิตร (วุฒิพงษ์ มหาคำ, 2542) ส่วนความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase ที่เหมาะสมกับพืชที่มีเนื้อไม้คือ 2.8 unit ต่อ 100 ไมโครลิตร (Levi et al., 1993)

1.4.4 ไพรเมอร์ เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่มีความยาวประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ และมีปริมาณ G+C 50 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป มีหน้าที่เป็นตัวสุ่มจับกับ genomic DNA ของดีเอ็นเอต้นแบบในตำแหน่งที่เป็นคู่สม การใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่สูงจะทำให้โอกาสจับคู่ระหว่างดีเอ็นเอต้นแบบกับไพรเมอร์ลดลง สำหรับความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเออยู่ในช่วง 0.3-10 μM ส่วนความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้กับพืชที่มีเนื้อไม้คือ 0.2 μM (Levi et al., 1993)

1.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อพืชโดยเทคนิค RAPD

Levi et al. (1993) ศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำ PCR-RAPD ของบลูเบอร์รี่ สตรอเบอร์รี่ เชอรี่ แอปเปิล และลูกแพร์ ทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบด้วยวิธีของ Doyle & Doyle (1987) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือระยะที่ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบเสียสภาพอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30-45 วินาที ระยะไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบอุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 70 วินาที ระยะสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ให้ยาวขึ้น (elongation) อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 120 วินาที จำนวน 50 รอบ

ภาณี เตมีศักดิ์ และคณะ (2538) ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในไม้ไทยสกุลหว้า โดยการทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Doyle & Doyle (1987) ในการทำ RAPD ใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ 0.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สภาพอุณหภูมิในปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้ ระยะก่อนที่จะทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพใช้อุณหภูมิ

91.5 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นเข้าสู่ระยะดีเอ็นเอเสียสภาพคือใช้อุณหภูมิ 91.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที ระยะไพรเมอร์จับให้ลดอุณหภูมิลงที่ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และในช่วงสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที จำนวน 45 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสอีก 1 รอบ ผลการศึกษาคือ ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 85 หมายเลข พบว่ามี 47 หมายเลขที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ

ประสาน สืบสุข (2541) ศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเตรียม RAPD เพื่อวิเคราะห์หา molecular markers ของมะเขือเทศที่ต้านทานต่อโรคเหี่ยวเขียว พบว่าส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดดีเอ็นเอ คือใบอ่อน ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RAPD ใช้ *Taq* DNA polymerase ปริมาตร 2.0 unit จะมีความเหมาะสมที่สุด คือสามารถเพิ่มปริมาณและจำนวนแถบดีเอ็นเอได้มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าแถบที่ได้มีความคมชัดสูง ส่วนการแยกแถบดีเอ็นเอที่เหมาะที่สุดคือ ใช้ polyacrylamide gel ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวกลางค้ำจุน ส่วนการย้อมแผ่นเจลด้วย silver ควรแช่แผ่นเจลที่สารละลาย silver นาน 30 นาที และระยะสร้างแถบ (develop) ควรแช่แผ่นเจลในสารละลายสร้างภาพ (developer) ที่มีความเข้มข้นของ formaldehyde 0.056 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้อุณหภูมิ 10-12 องศาเซลเซียส จึงจะทำให้แผ่นเจลที่ได้มีสีพื้นน้อยและจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ 35 ชนิด มี 30 ชนิดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

มลิวรรณ นาคขุนทด และคณะ (2542) ศึกษาอนุกรมวิธานของพืชสกุลมังคุดบางชนิดโดยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งสารสกัดดีเอ็นเอใช้วิธีการประยุกต์จาก Agranal et al. (1992) ซึ่งเหมาะกับพืชในสกุลมังคุดที่มีใบค่อนข้างหนาและมียางและถ้าใช้ใบของมังคุดที่แก่จะทำให้บดยาก ไม่ละเอียด ทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยและคุณภาพไม่ดี ในการทำ RAPD เลือกชนิดของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ขนาดความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 12 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ปริมาณชัดเจนและมีแถบดีเอ็นเอมาก ในการทำปฏิกิริยา RAPD ใช้ปริมาณสุทธิ 15 ไมโครลิตร ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบเข้มข้น 100 นาโนกรัม อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาดังนี้ ระยะก่อนดีเอ็นเอต้นแบบเสียสภาพ (pre-denature) ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วเริ่มปฏิกิริยาโดยระยะดีเอ็นเอต้นแบบเสียสภาพใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ระยะไพรเมอร์จับ ใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ระยะสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 35 รอบ และสิ้นสุดปฏิกิริยาด้วย 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ ผลการศึกษาพบว่าพืชทั้ง 12 ชนิดมีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphism) โดยแถบดีเอ็นเอจะมีขนาดอยู่ระหว่าง 0.3 ถึง 3.0 กิโลเบส จำนวนทั้งหมด 107 แถบ ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดจะขึ้นอยู่กับชนิดของไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบจากพืชแต่ละชนิด จากแบบแผนดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์เหล่านี้สามารถใช้จำแนกชนิดภายในพืชสกุลมังคุดได้

Porebski et al. (1997) ดัดแปลงสารสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ CTAB รวมกับ PVP เป็นส่วนประกอบเพื่อให้เหมาะกับพืชที่มีพอลิแซ็กคาไรด์ และพอลิฟีนอล ซึ่งศึกษาในใบแก่ของสตรอเบอร์รี่พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้อยู่ในช่วง 20-84 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักของเนื้อเยื่อ 1 กรัม จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยการทำ RAPD โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 0.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นอกจากนี้ยังได้รายงานไว้ว่า PVP เป็นสารที่มีโมเลกุลใหญ่และมีความหนืดสูงและเป็นตัวกำจัดพอลิฟีนอล โดย PVP จะเป็นตัวจับกับพอลิฟีนอลด้วยพันธะไฮโดรเจนและจะแยกออกจากดีเอ็นเอ นอกจาก PVP ที่ใช้ในการกำจัดพอลิฟีนอลแล้วยังมี PVPP (polyvinyl polypyrrolidone) ซึ่งเป็นสารอีกชนิดหนึ่งที่ใช้ในการกำจัดพอลิฟีนอล แต่ได้ผลน้อยกว่าการใช้ PVP คือ

เนื้อเยื่อพืช 1 กรัมจะได้ปริมาณดีเอ็นเอ 2-3 ไมโครกรัม นอกจากนี้ดีเอ็นเอที่สกัดได้นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไม่ได้ผล

Wang et al. (1997) ได้ปรับปรุงวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเถาองุ่นที่ทำให้แห้งโดย silica gel พบว่าวิธีสกัดแบบนี้ประหยัดค่าใช้จ่ายและสะดวกต่อการเก็บตัวอย่างนอกพื้นที่ ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ 20-30 ไมโครกรัมต่อเนื้อเยื่อใบแห้ง 1 กรัม ดีเอ็นเอที่สกัดได้สามารถนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ อาร์เอ็นเอที่ปะปนมากับดีเอ็นเอไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในการกำจัดอาร์เอ็นเอทำได้โดยเติมเอนไซม์ RNase A ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

Boiteux et al. (1999) ได้ศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนต่างของแครอทให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปทำ RAPD โดยมีวิธีการสกัดดีเอ็นเอ 7 วิธี และนำส่วนต่าง ๆของพืชมา 6 ส่วนมาสกัดเพื่อหาค่า (1) ปริมาณดีเอ็นเอ (2) ค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (3) การตัดดีเอ็นเอด้วย Hind III (4) ความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอ และ (5) วิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมเพื่อจะนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำ RAPD พบว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอแต่ละวิธีได้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยสารที่ใช้ในการสกัดและมีความเหมาะสมคือ CTAB ทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอสูงสุด ส่วนของพืชที่นำมาสกัดแล้วได้ดีเอ็นเอสูงที่สุดคือ ดอก รองลงมาคือใบสด แต่ค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยอัตราส่วนของค่าดูดกลืนแสง 260 ต่อ ค่าดูดกลืนแสง 280 พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแคลลัสมีค่าความบริสุทธิ์สูงสุด ผลของเกลือที่มีปริมาณสูงเพื่อเป็นปัจจัยช่วยในการกำจัดพอลิแซ็กคาไรด์พบว่าไม่มีผลต่อดีเอ็นเอและไม่มีผลต่อเอนไซม์ Hind III แต่จากรายงานของ Boiteux (1999) อ้างจาก Fang et al. (1992) พบว่าเกลือมีผลต่อดีเอ็นเอของแตงกวาและแตงโม แต่อย่างไรก็ตามเกลือที่ใช้ในการทำความสะอาดดีเอ็นเอไม่สามารถอธิบายได้ว่ามีผลต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหรือไม่

2. วิธีการศึกษา

2.1 ตัวอย่างพืช

ตัวอย่างใบอ่อนของ *O. integerrima* จากอุทยานแห่งชาติภูพาน อำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร บริเวณโคกภูตากา อำเภอภูเวียง จังหวัดขอนแก่น และบริเวณโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น ส่วนตัวอย่างใบอ่อนของ *G. serrata* เก็บตัวอย่างจากอุทยานแห่งชาติภูพาน อำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร และอำเภอห้วยผึ้ง จังหวัดกาฬสินธุ์

2.2 การศึกษาที่ 1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมจากใบอ่อนของ *O. integerrima* และ *G. serrata* โดยใช้วิธีของ Doyle & Doyle (1987) ดัดแปลง, Porebski et al. (1997) ดัดแปลง, Wang et al. (1997) ดัดแปลง และ Boiteux et al. (1999) ดัดแปลง

2.2.1 วิธีการเตรียมดีเอ็นเอโดยวิธีของ Porebski et al. (1997) ดัดแปลง

2.2.1.1 นำตัวอย่างใบพืชสด 0.5 กรัม นำไปบดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลว จนเนื้อเยื่อพืชแตกละเอียดเป็นผง แล้วย้ายมาใส่หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร

2.2.1.2 เติมสารสกัด (extraction buffer) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาณ 5 มิลลิลิตร และเติม PVP ปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อเนื้อเยื่อพืช 0.5 กรัม หลังจากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาทีถึง 60 นาที

2.2.1.3 ย้ายหลอดทดลองมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง 4 - 6 นาที

2.2.1.4 เติม chloroform:octanol (24 : 1) ลงไปในหลอดทดลองผสมให้เข้ากันเบา ๆ

2.2.1.5 นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 20 นาที

2.2.1.6 ย้ายสารละลายชั้นบนใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ หลังจากนั้นเติม chloroform : octanol (24 : 1) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร เพื่อล้าง PVP แล้วผสมให้เข้ากันเบา ๆ

2.2.1.7 นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที

2.2.1.8 ย้ายสารละลายชั้นบนใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ แล้วเติม NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตรครึ่งหนึ่งของสารละลายสุทธิในหลอด ผสมให้เข้ากันเบา ๆ

2.2.1.9 เติม ethanol ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ที่เย็นจัดลงไป 2 เท่าของสารละลายสุทธิที่อยู่ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันเบา ๆ

2.2.1.10 นำหลอดทดลองไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ถึง 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

2.2.1.11 นำหลอดไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 นาที

2.2.1.12 เทสารละลายชั้นบนทิ้งให้เหลือเฉพาะตะกอนที่ติดที่ก้นหลอดแล้วล้างตะกอนด้วย ethanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส

2.2.1.13 เทแอลกอฮอร์ทิ้งแล้วตากตะกอนให้แห้ง

2.2.1.14 ละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน แล้วย้ายสารละลายที่ได้เก็บไว้ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.2.1.15 กำจัดอาร์เอ็นเอโดยเติมเอนไซม์ RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.2.1.16 กำจัดโปรตีนโดยเติมเอนไซม์ Proteinase K ความเข้มข้น 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 -30 นาที

2.2.1.17 เติม chloroform:phenol (1 : 1) ในหลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน

2.2.1.18 นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10-15 นาที

2.2.1.19 ย้ายสารละลายชั้นบนใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม sodium acetate ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 1 ใน 10 ของสารละลายสุทธิในหลอดทดลอง

2.2.1.20 เติม ethanol ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสุทธิในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันเบา ๆ

2.2.1.21 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

2.2.1.22 นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10-20 นาที หลังจากนั้นเทสารละลายชั้นบนทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วย ethanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วเทสารละลายทิ้ง

2.2.1.23 ตากตะกอนให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 100-200 ไมโครลิตร (แล้วแต่ปริมาณตะกอน)

2.2.1.24 เก็บตัวอย่างที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2.2 การเตรียมดีเอ็นเอโดยวิธีของ Wang et al. (1997) ดัดแปลง

2.2.2.1 นำตัวอย่างพืช 2 กรัม บดรวมกับผง PVP โดยใช้โกร่ง

2.2.2.2 ย้ายผงที่บดได้ใส่หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารสกัดที่ 1 ที่เย็นจัด ปริมาตร 35 มิลลิลิตร และ β-mercaptoethanol ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันกับผงตัวอย่างที่บดได้ แล้วนำไปบ่มที่ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.2.2.3 นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2.2.2.4 เติมสารสกัดที่ 2 ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสปริมาตร 15 มิลลิลิตร และเติม β-mercaptoethanol ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

2.2.2.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสนาน 40 นาที หรือ 1 ชั่วโมง 30 นาที เขย่าทุก ๆ 10 นาที

2.2.2.6 เติม chloroform:isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายสุทธิ เขย่าเบา ๆ

2.2.2.7 นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็ว 7,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที

2.2.2.8 ย้ายสารละลายชั้นบนใส่หลอดทดลองใหม่ หลังจากนั้นเติม isopropanol ที่เย็นจัดปริมาตร 2 ใน 3 ของสารละลายทั้งหมด และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที

2.2.2.9 นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเทสารละลายทิ้ง

2.2.2.10 ละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2.2.2.11 เติม NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตรครึ่งหนึ่งของปริมาตรทั้งหมด

2.2.2.12 เติม ethanol ที่เย็นจัดปริมาตร 2 เท่าของสารละลายทั้งหมด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.2.2.13 นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วย ethanol ความเข้มข้น70 เปอร์เซ็นต์ 2 รอบ

2.2.2.14 ตากตะกอนให้แห้งและละลายตะกอนด้วย TE buffer แล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน

2.2.2.15 กำจัดอาร์เอ็นเอโดยการเติมเอนไซม์ RnaseA ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.2.2.16 เก็บตัวอย่างที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2.3 การเตรียมดีเอ็นเอโดยวิธีของ Boiteux et al. (1999) ดัดแปลง

2.2.3.1 นำเนื้อเยื่อตัวอย่าง 1 กรัมบดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นเติมสารสกัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.2.3.2 บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาทีเขย่าเป็นระยะ ๆ

2.2.3.3 เติม chloroform:isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2.2.3.4 นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็ว 11,240 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที

2.2.3.5 ย้ายสารละลายชั้นบนใส่หลอดทดลองหลอดใหม่

2.2.3.6 เติม chloroform:isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็ว 11,240 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที

2.2.3.7 ย้ายสารละลายชั้นบนใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ หลังจากนั้นเติม isopropanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 2 ใน 3 ส่วนของสารละลายทั้งหมด เขย่าเบา ๆ

2.2.3.8 นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็ว 11,240 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที

2.2.3.9 เทสารละลายชั้นบนทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วย ethanol ความเข้มข้น 76 เปอร์เซ็นต์ผสมกับ ammonium acetate ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นตากตะกอนให้แห้ง

2.2.3.10 ละลายตะกอนด้วย TE buffer หลังจากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน

2.2.3.11 กำจัดอาร์เอ็นเอโดยการเติมเอนไซม์ RNaseA ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร แล้วนำไปอบที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที

2.2.3.12 เก็บสารละลายที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2.2.4 การเตรียมดีเอ็นเอโดยวิธีของ Doyle & Doyle (1987) ดัดแปลง

2.2.4.1 นำเนื้อเยื่อตัวอย่างพืช 0.2 กรัม มาบดในโกร่งโดยใช้ไนโตรเจนเหลว

2.2.4.2 เติมสารสกัด 1 มิลลิลิตร แล้วย้ายไปใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.2.4.3 นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เขย่าเบา ๆทุก 10 นาที

2.2.4.4 เติม chloroform:isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 0.4 เท่าของสารละลายสุทธิ

2.2.4.5 นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที

2.2.4.6 ย้ายสารละลายชั้นบนไปใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ หลังจากนั้นเติม isopropanol ปริมาตร 0.7 เท่าของปริมาตรสุทธิ

2.2.4.7 กลับหลอดไปมาเบา ๆ ให้ดีเอ็นเอตกตะกอน จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที

2.2.4.8 เทสารละลายทิ้ง หลังจากนั้นล้างตะกอนด้วย ethanol ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ ammonium acetate ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 400 มิลลิลิตร

2.2.4.9 กลับหลอดไปมาเบา ๆ แล้วตั้งหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

2.2.4.10 นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2.2.4.11 เทสารละลายทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนอีกครั้งด้วย ethanol ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ที่เย็นจัด หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

2.2.4.12 นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที

2.2.4.13 เทสารละลายทิ้ง จากนั้นตากตะกอนให้แห้ง

2.2.4.14 ละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

2.2.4.15 กำจัดอาร์เอ็นเอโดยการเติมเอนไซม์ RNaseA ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที

2.2.4.16 เก็บสารละลายที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2.3 การศึกษาที่ 2 การหาปริมาตรและประเมินคุณภาพของดีเอ็นเอ

2.3.1. การหาปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ มีวิธีการโดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการหาความเข้มข้น 5 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 995 ไมโครลิตร ภายในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายผสมกันแล้วย้ายใส่ cuvette ชนิดที่ทำด้วย quartz นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 260 (A_{260}) และ 280 (A_{280}) นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอดังนี้

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ = $A_{260} \times 50 \times$ dilution factor ($\mu g/ml$)

การหาความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอทำได้โดยหาอัตราส่วนระหว่าง $A_{260} : A_{280}$

ถ้าค่าที่ได้อยู่ในช่วง 1.65-1.85 ถือว่าสารละลายดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์และสามารถนำไปใช้งานต่อไปได้ (สิรินดา ยุ่นฉลาด, 2541)

2.3.2 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส เพื่อพิจารณาว่าชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความสมบูรณ์มากน้อยเพียงใด และขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้เป็นอย่างไร

2.3.3 วิธีการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ เตรียมอะกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์โดยนำอะกาโรส 0.32 กรัมมาหลอมให้ละลายด้วยสารละลาย 1X TBE buffer ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เมื่อหลอมเสร็จแล้วตั้งสารละลายไว้ที่อุณหภูมิห้องให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วเติมเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 2 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน แล้วเทสารละลายเจลลงในถาดรองเจลที่มีหวีเสียบอยู่ ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวแล้วค่อย ๆดึงหวีออกระวังอย่าให้เจลแตก แล้วนำเจลไปวางใน อิเล็กโทรโฟริซิส chamber เทสารละลาย 1X TBE buffer ให้ท่วมจากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ (สารละลายดีเอ็นเอ 10 ไมโครลิตร + loading dye 2 มิลลิลิตร) นำมาหยอดลงในช่องและหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ DNA) เพื่อเปรียบเทียบ เมื่อหยอดครบทุกช่องแล้วปิดฝา อิเล็กโทรโฟริซิส chamber ทำการต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง power supply ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ ที่ 50 โวลล์ ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมงถึง 1 ชั่วโมง 30 นาที ให้สีของ bromophenol blue จาก loading dye เคลื่อนที่ผ่านเจลไปประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของเนื้อเจลเสร็จแล้วนำเจลที่ได้ไปส่องดูภายใต้เครื่อง UV transilluminator เพื่อตรวจดูการเรืองแสงของดีเอ็นเอ ถ่ายภาพเก็บไว้ด้วยกล้องโพลารอยด์

2.4 การศึกษาที่ 3 การศึกษาหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD

ใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสุ่ม 50 ชนิด (kitB, kitJ และ kitW จากบริษัท Operon Technologies) มีลำดับเบสดังตารางที่ 2 เพื่อตรวจสอบว่าไพรเมอร์ใดสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยเทคนิค RAPD โดยเตรียมสารละลายสำหรับปฏิกิริยา PCR-RAPD ดังนี้

สารละลาย 1 หลอดมีปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

- buffer ที่ประกอบด้วย 2 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM KCl, 0.01 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 5% glycerol, 0.05% Tween 20 และ 0.05% Nonidet-P40
- dATP, dCTP, dGTP และ dTTP แต่ละชนิดความเข้มข้น 200 μM
- $MgCl_2$ 1.5 mM
- Primer 25 pmol
- DNA template 200 ng

- *Taq* DNA polymerase 2 unit

เติมน้ำให้ครบ 25 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีประมาณ 15 วินาที แล้วนำไปเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิและจำนวนรอบดังนี้

- ขั้นตอนก่อนที่ดีเอ็นเอจะเสียสภาพ อุณหภูมิ 91.5 °C นาน 1 นาที จำนวน 1 รอบ
- ขั้นตอนที่ดีเอ็นเอเสียสภาพ อุณหภูมิ 91.5 °C นาน 5 นาที
- ขั้นตอนที่ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ อุณหภูมิ 36 °C นาน 1 นาที
- ขั้นตอนที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ อุณหภูมิ 72 °C นาน 2 นาที

ทำซ้ำทั้งหมด 45 รอบ โดยดีเอ็นเอต้นแบบของ *O. integerrima* และ *G. serrata* ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดตามวิธีของ Boiteux et al. (1999) ดัดแปลง เมื่อทำซ้ำครบ 45 รอบแล้วนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ที่ใช้ความเข้มข้นของอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำมาส่องดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสง UV แล้วถ่ายรูปด้วยกล้องโพลารอยด์

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Operon Tecnologies)

Code	$5' \rightarrow 3'$	มวลโมเลกุล
OPB-01	GTTTCGCTCC	2961
OPB-02	TGATCCCTGG	3010
OPB-03	CATCCCCCTG	2915
OPB-04	GGACTGGAGT	3099
OPB-05	TGCGCCCTTC	2946
OPB-06	TGCTCTGCCC	2946
OPB-07	GGTGACGCAG	3084
OPB-08	GTCCACACGG	3004
OPB-09	TGGGGGACTC	3075
OPB-10	CTGCTGGGAC	3035
OPB-11	GTAGACCCGT	3019
OPB-12	TTCCGACGCT	2979
OPB-13	TTCCCCCGCT	2096
OPB-14	TCCGCTCTGG	2986
OPB-15	GGAGGGTGTT	3130
OPB-16	TTTGCCCGGA	3010
OPB-17	AGGGAACGAG	3117
OPB-18	CCACAGCAGT	2988

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Operon Tecnologies) (ต่อ)

Code	$5' \rightarrow 3'$	มวลโมเลกุล
OPB-19	ACCCCCGAAG	2973
OPB-20	GGACCCTTAC	2979
OPJ-01	CCCGGCATAA	2988
OPJ-02	CCCGTTGGGA	3035
OPJ-03	TCTCCGCTTG	2961
OPJ-04	CCGAACACGG	3013
OPJ-05	CTCCATGGGG	3035
OPJ-06	TCGTTCCGCA	2970
OPJ-07	CCTCTCGACA	2939
OPJ-08	CATACCGTGG	3019
OPJ-09	TGAGCCTCAC	2979
OPJ-10	AAGCCCGAGG	3053
OPJ-11	ACTCCTGCGA	2979
OPJ-12	GTCCCGTGGT	3026
OPJ-13	CCACACTACC	2908
OPJ-14	CACCCGGATG	3004
OPJ-15	TGTAGCAGGG	3099
OPJ-16	CTGCTTAGGG	3050
OPJ-17	ACGCCAGTTC	2979
OPJ-18	TGGTCGCAGA	3059
OPJ-19	GGACACCACT	2988
OPJ-20	AAGCGGCCTC	3004
OPW-01	CTCAGTGTCC	2970
OPW-02	ACCCCGCCAA	2933
OPW-03	GTCCGGAGTG	3075
OPW-04	CAGAAGCGGA	3077
OPW-05	GGCGGATAAG	3108
OPW-06	AGGCCCGATG	3044
OPW-07	CTGGACGTCA	3019
OPW-08	GACTGCCTCT	2970
OPW-09	GTGACCGAGT	3059
OPW-10	TCGCATCCCT	2930

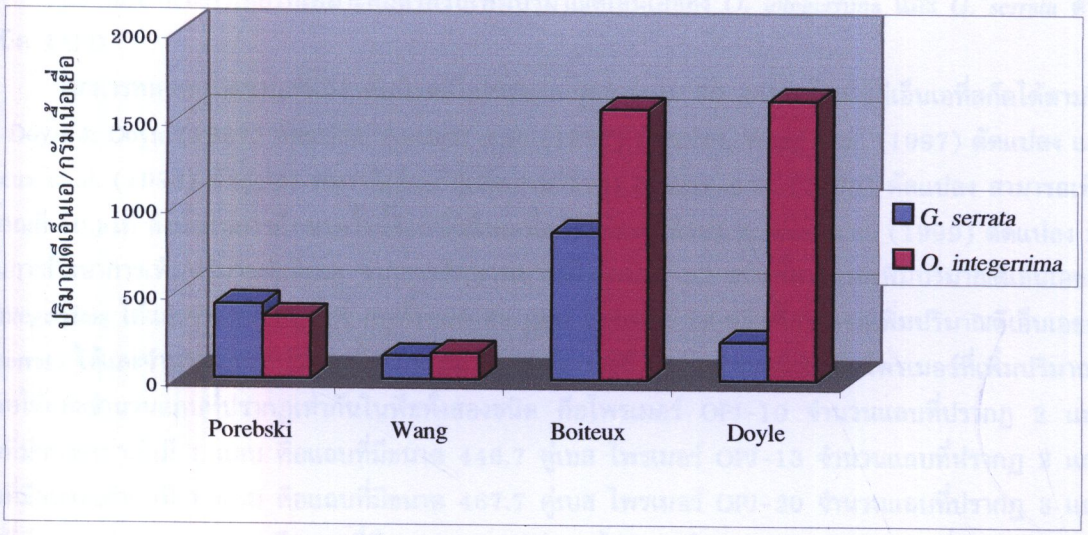
3. ผลการศึกษา

3.1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสม

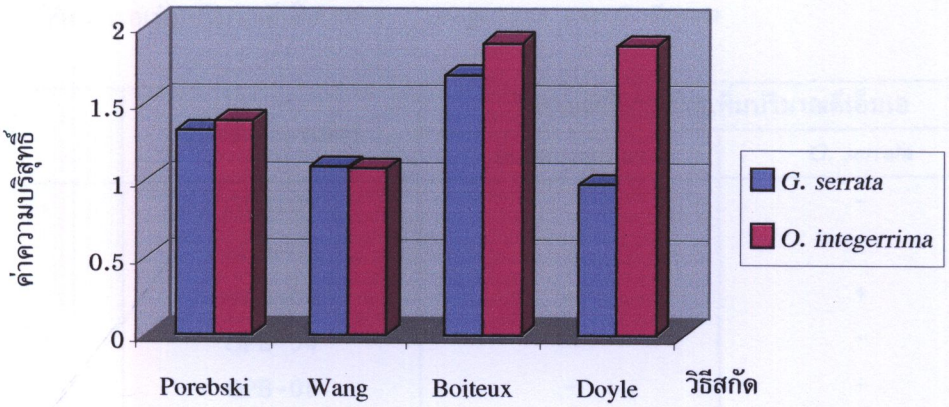
จากการศึกษาวิธีการเตรียมดีเอ็นเอจากยอดอ่อนของ *O. integerrima* และ *G. serrata* โดยวิธีของ Doyle & Doyle (1987) ดัดแปลง, Porebski et al. (1997) ดัดแปลง, Wang et al. (1997) ดัดแปลง และ Boiteux et al. (1999) ดัดแปลง พบว่าปริมาณดีเอ็นเอและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละวิธีมีค่าดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดจากใบอ่อนของ *G. serrata* และ *O. integerrima*

วิธีสกัด	*G. serrata*		*O. integerrima*	
	ปริมาณ (µg/g)	ความบริสุทธิ์	ปริมาณ (µg/g)	ความบริสุทธิ์
Porebski et al.	430±27.5	1.32±0.12	359.37 ±121.8	1.38 ±0.15
Wang et al.	133.75±65.0	1.09±0.07	151.88 ±76.9	1.08 ±0.09
Boiteux et al.	851.88±116.8	1.68±0.19	1,561± 348.5	1.89± 0.1
Doyle and Doyle	223.1±160.3	0.98±0.16	1,614.37± 321.3	1.87 ±0.1



ภาพที่ 16 ปริมาณดีเอ็นเอต่อเนื้อเยื่อพืช 1 กรัม



ภาพที่ 17 ค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของ *G. serrata* ที่สกัดโดยวิธีของ Boiteux et al. (1999) ดัดแปลง ได้ปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 851.88± 116.8 ไมโครกรัมต่อเนื้อเยื่อใบอ่อน 1 กรัม และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอก็สูงที่สุดคือ 1.685 การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของ *O. integerrima* ที่สกัดโดยวิธีของ Doyle & Doyle (1987) ดัดแปลง ได้ปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 1,614.37± 321.3 ไมโครกรัมต่อเนื้อเยื่อใบอ่อน 1 กรัม และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอสูงที่สุดคือการสกัดตามวิธีของ Boiteux et al. (1999) ดัดแปลงคือ 1.89 รองลงมาคือวิธีการสกัดของ Doyle & Doyle (1987) ดัดแปลงคือ 1.87 (ภาพที่ 16 และ 17)

3.2 ศึกษาหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *O. integerrima* และ *G. serrata* ด้วยเทคนิค RAPD

จากการทดสอบไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มจำนวน 50 ชนิด โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้ตามวิธีของ Doyle & Doyle (1987) ดัดแปลง, Porebski et al. (1997) ดัดแปลง, Wang et al. (1997) ดัดแปลง และ Boiteux et al. (1999) ดัดแปลง พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดตามวิธีของ Boiteux et al. (1999) ดัดแปลง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ตามวิธีของ Boiteux et al. (1999) ดัดแปลง มาใช้ในการศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จากการศึกษาพบว่ามีไพรเมอร์ 32 ชนิดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *O. integerrima* ได้และจำนวนแถบที่ปรากฏทั้งหมด 88 แถบ ไพรเมอร์ 29 ชนิดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *G. serrata* ได้และจำนวนแถบที่ปรากฏทั้งหมด 68 แถบ (ตารางที่ 4) นอกจากนี้พบว่า ไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และจำนวนแถบที่ปรากฏเท่ากันในพืชทั้งสองชนิด คือไพรเมอร์ OPJ-10 จำนวนแถบที่ปรากฏ 2 แถบ แถบที่มีขนาดเท่ากันมี 1 แถบ คือแถบที่มีขนาด 446.7 คู่เบส ไพรเมอร์ OPJ-13 จำนวนแถบที่ปรากฏ 2 แถบ แถบที่มีขนาดเท่ากันมี 1 แถบ คือแถบที่มีขนาด 467.7 คู่เบส ไพรเมอร์ OPJ-20 จำนวนแถบที่ปรากฏ 3 แถบ แถบที่มีขนาดเท่ากันมี 1 แถบ คือแถบที่มีขนาด 398.1 คู่เบส ไพรเมอร์ OPW-02 จำนวนแถบที่ปรากฏ 5 แถบ ขนาดของแถบที่ปรากฏทุกแถบไม่เท่ากัน ไพรเมอร์ OPW-07 และไพรเมอร์ OPW-09 จำนวนแถบที่ปรากฏไพรเมอร์ละ 1 แถบ และขนาดของแถบที่ปรากฏมีขนาดไม่เท่ากัน ส่วนไพรเมอร์ OPJ-1 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใน *O. integerrima* ได้ และปรากฏแถบ 5 แถบ ใน *G. serrata* จำนวนแถบที่ปรากฏ 3 แถบ และระหว่างพืชทั้ง 2 ชนิดนี้มีแถบที่ปรากฏมีขนาดเท่ากัน 1 แถบคือแถบที่มีขนาด 891.2 คู่เบส

ตารางที่ 4 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *O. integerrima* และ *G. Serrata*

ลำดับที่	ชนิดของไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	
		O. integerrima	*G. serrata*
1	OPB-01	-	-
2	POB-02	-	+
3	OPB-03	+	+
4	OPB-04	+	-
5	OPB-05	-	-
6	OPB-06	-	-
7	OPB-07	+	-
8	OPB-08	+	+
9	OPB-09	-	-
10	OPB-10	-	+
11	OPB-11	-	+
12	OPB-12	-	+
13	OPB-13	-	+
14	OPB-14	-	-
15	OPB-15	-	+
16	OPB-16	-	-
17	OPB-17	+	+
18	OPB-18	+	+
19	OPB-19	-	-
20	OPB-20	+	+
21	OPJ-01	+	+
22	OPJ-02	+	+
23	OPJ-03	-	+
24	OPJ-04	+	+
25	OPJ-05	+	-
26	OPJ-06	+	-
27	OPJ-07	+	-
28	OPJ-08	+	-
29	OPJ-09	-	+

ตารางที่ 4 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *O. integerrima* และ *G. Serrata* (ต่อ)

ลำดับที่	ชนิดไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	
		O. integerrima	*G. serrata*
30	OPJ-10	+	+
31	OPJ-11	+	+
32	OPJ-12	+	+
33	OPJ-13	+	+
34	OPJ-14	+	-
35	OPJ-15	+	-
36	OPJ-16	-	-
37	OPJ-17	-	-
38	OPJ-18	+	-
39	OPJ-19	+	-
40	OPJ-20	+	+
41	OPW-01	+	+
42	OPW-02	+	+
43	OPW-03	+	+
44	OPW-04	+	-
45	OPW-05	+	+
46	OPW-06	+	-
47	OPW-07	+	+
48	OPW-08	+	+
49	OPW-09	+	+
50	OPW-10	-	+

- = ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

+ = สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เมื่อนำมาวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสได้ผลดังภาพที่ 19 และ20 เมื่อทำการวัดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยเทียบกับขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละไพรเมอร์มีความแตกต่างกัน ดังตารางที่ 5 และ 6

ตารางที่ 5 ขนาดของดีเอ็นเอของ *O. integerrima* ที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิค RAPD

ลำดับที่	ชนิดของไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ	ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏโดยประมาณ (คู่เบส)
1	OPB-03	2	269, 759
2	OPB-04	1	891
3	OPB-07	5	447, 501, 588, 912, 1,260
4	OPB-08	1	912
5	OPB-17	8	316, 354, 447, 562, 776, 891, 1122, 1,259
6	OPB-18	3	355, 707, 794
7	OPB-20	1	501
8	OPJ-01	5	251, 316, 741, 891, 1,259
9	OPJ-02	3	229, 316, 562
10	OPJ-04	4	174, 281, 363, 478
11	OPJ-05	1	513
12	OPJ-06	1	427
13	OPJ-07	1	891
14	OPJ-08	4	331, 398, 490, 562
15	OPJ-10	2	447, 562
16	OPJ-11	3	427, 562, 741
17	OPJ-12	1	708
18	OPJ-13	2	355, 468
19	OPJ-14	4	324467, 708, 1,585
20	OPJ-15	1	630
21	OPJ-18	1	794
22	OPJ-19	1	832
23	OPJ-20	3	355, 389, 871
24	OPW-01	3	417, 457, 1,259
25	OPW-02	5	355, 446, 602, 708, 1,047
26	OPW-03	3	513, 1,047, 1,413
27	OPW-04	6	129, 355, 436, 832, 955, 1,318
28	OPW-05	7	141, 224, 316, 468, 559, 813, 1,023

ตารางที่ 5 ขนาดของดีเอ็นเอของ *O. integerrima* ที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิค RAPD (ต่อ)

ลำดับ	ชนิดไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ	ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏโดยประมาณ (คู่เบส)
29	OPW-06	2	355, 933
30	OPW-07	1	603
31	OPW-08	2	631, 759
32	OPW-09	1	224

ตารางที่ 6 ขนาดดีเอ็นเอของ *G.serrata* ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยเทคนิค RAPD

ลำดับ	ชนิดไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ	ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏโดยประมาณ (คู่เบส)
1	OPB-02	3	324, 371, 794
2	OPB-03	1	513
3	OPB-08	4	562, 692, 851, 891
4	OPB-10	1	447
5	OPB-11	4	347, 490, 525, 813
6	OPB-12	3	209, 355, 398
7	OPB-13	3	372, 631, 708
8	OPB-15	4	309, 537, 646, 741
9	OPB-17	2	631, 759
10	OPB-18	1	776
11	OPB-20	4	398, 457,631, 891
12	OPJ-01	3	380,646, 891
13	OPJ-02	2	355, 759
14	OPJ-03	2	282, 562
15	OPJ-04	1	398
16	OPJ-09	1	501
17	OPJ-10	2	339,447

ตารางที่ 6 ขนาดดีเอ็นเอของ *G.serrata* ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยเทคนิค RAPD (ต่อ)

ลำดับ	ชนิดไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ	ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ โดยประมาณ (คู่เบส)
18	OPJ-11	4	316, 436, 562, 1,122
19	OPJ-12	3	417, 758, 912
20	OPJ-13	2	468, 794
21	OPJ-20	3	282, 398, 501
22	OPW-01	1	794
23	OPW-02	5	251, 426, 794, 871, 1,000
24	OPW-03	4	316, 447, 759, 832
25	OPW-05	1	447
26	OPW-07	1	316
27	OPW-08	1	589
28	OPW-09	1	89
29	OPW-10	1	316

4. สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของ *G. serrata* และ *O. integerrima* ที่เหมาะสม โดยสกัดตามวิธีของ Porebski et al. (1997)ดัดแปลง, Wang et al. (1997) ดัดแปลง, Boiteux et al. (1999) ดัดแปลง และ Doyle & Doyle (1987) ดัดแปลง พบว่าวิธีสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของ *G. serrata* ตามวิธีของ Boiteux et al. (1999) ดัดแปลง ได้ผลดีที่สุด คือได้ปริมาณดีเอ็นเอ 851.88 ± 116.8 ไมโครกรัมต่อเนื้อเยื่อใบอ่อน 1 กรัม และค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอซึ่งได้จากค่าการดูดกลืนแสง 260 (A_{260}) ต่อ 280 (A_{280}) ได้ค่าสูงสุดเช่นกันคือ 1.685 ส่วนการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของ *O. integerrima* วิธีที่ได้ปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุดคือการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Doyle & Doyle (1987) ดัดแปลง คือได้ปริมาณดีเอ็นเอ 1,614.37 ± 321.3 ไมโครกรัมต่อเนื้อเยื่อใบอ่อน 1 กรัม และค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอสูงสุดคือการสกัดตามวิธีของ Boiteux et al. (1999) ดัดแปลง ได้ค่าความบริสุทธิ์เท่ากับ 1.89 และเมื่อนำไปศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธีของ Boiteux et al. (1999) ดัดแปลง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

การทดสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *G. serrata* และ *O. integerrima* โดยใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้น (10 นิวคลีโอไทด์) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสุ่ม 50 ชนิด (จากบริษัท Operon Technologies) สำหรับทำปฏิกิริยา PCR- RAPD พบว่ามีไพรเมอร์ 32 ชนิดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *O. integerrima* ส่วน *G. serrata* พบว่ามีไพรเมอร์ 29 ชนิดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จำนวนแถบของดีเอ็นเอของ *O. integerrima* และ *G. serrata* ที่ปรากฏทั้งหมด 103 แถบ เป็นแถบที่ไม่เหมือนกัน (polymorphic) 100

แถบ คิดเป็น 97.08 เปอร์เซ็นต์ ขนาดของแถบดีเอ็นเอของ *O. integerrima* อยู่ในช่วง 129-1,585 คู่เบส ส่วนของ *G. serrata* ในช่วง 89-1,122 คู่เบส

5. วิจารณ์ผลการศึกษา

จากการศึกษาเปรียบเทียบวิธีสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของ *G. serrata* กับ *O. integerrima* พบว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอของ *G. serrata* สูงสุดคือ การสกัดตามวิธีของ Boiteux et al. (1999) ได้ปริมาณดีเอ็นเอ 815.88 ± 116.8 ไมโครกรัมต่อเนื้อเยื่อใบอ่อน 1 กรัม ส่วน *O. integerrima* วิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมที่สุดคือวิธีของ Doyle & Doyle (1987) ดัดแปลง คือได้ปริมาณดีเอ็นเอ 1,614.37± 321.3 ไมโครกรัมต่อเนื้อเยื่อใบอ่อน 1 กรัม ซึ่งสาเหตุที่ทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอแตกต่างกันอาจจะเป็นเพราะวิธีการสกัดและสารเคมีที่ใช้ในการสกัด สารสกัดตามวิธีของ Boiteux et al. (1999) ดัดแปลง ประกอบด้วย CTAB ซึ่ง CTAB เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวก ซึ่งจะไปทำปฏิกิริยากับประจุลบของดีเอ็นเอในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงเกิดเป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้ และเมื่อลดความเข้มข้นของเกลือลงจะทำให้ดีเอ็นเอตกตะกอนแยกตัวออกจากสารอื่น (ปวีณา สาลีทอง, 2542 อ้างจาก ปรีดา จันทะพงษ์, 2535) ส่วนสารสกัดตามวิธีสกัดดีเอ็นเอของ Doyle & Doyle (1987) ดัดแปลง ประกอบด้วย CTAB และ PVP ซึ่ง PVP จะจับตัวกับโพลิฟีนอลโดยพันธะไฮโดรเจนเกิดเป็นสารประกอบ (Porebski et al., 1997) วิธีสกัดดีเอ็นเอที่ได้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุดทั้งดีเอ็นเอของ *O. integerrima* และ *G. serrata* คือการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Wang et al. (1997) ดัดแปลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิธีสกัดดีเอ็นเอของ Wang et al. (1997) ดัดแปลง ไม่ได้ใช้ไนโตรเจนเหลวในการสกัดเหมือนวิธีอื่น เพราะการบดเนื้อเยื่อพืชด้วยไนโตรเจนเหลวจะทำให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อแตกและทำให้เมมเบรนของนิวเคลียสถูกทำลายโดยสารประกอบพวกดีเทอร์เจนต์ทำให้มีการปลดปล่อยดีเอ็นเอสู่สารสกัด (extraction buffer) (Thomson & Murray, 1980) เมื่อพิจารณาถึงขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอของแต่ละวิธีจะเห็นว่า ขั้นตอนการสกัดของ Boiteux et al. (1999) ดัดแปลง และ Doyle & Doyle (1987) ดัดแปลง ใช้เวลาในการสกัดไม่นานเท่าวิธีการของ Porebski et al. (1997) ดัดแปลง และ Wang et al. (1997) ดัดแปลง ถ้าขั้นตอนการสกัดมีหลายขั้นตอนเกินไปจะทำให้ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ลดลง (Boiteux et al., 1999)

เมื่อเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ่อนซึ่งสาเหตุที่เลือกใบอ่อนเพราะว่า ใบอ่อนเป็นส่วนที่มีการแบ่งเซลล์สูง และภายในเซลล์มีการสะสมสารประกอบพวกโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และสารประกอบอื่นๆ อยู่ภายในเซลล์ปริมาณน้อย ในขณะที่ใบแก่มีสารประกอบพวกแทนนิน และพอลีแซ็กคาไรด์สะสมอยู่มาก (Porebski et al., 1997) จากการสกัดดีเอ็นเอแต่ละวิธี พบว่าค่าเฉลี่ยรวมของความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ่อนของ *G. serrata* และ *O. integerrima* โดยวิธีการสกัดของ Boiteux et al. (1999) ดัดแปลง ได้ความบริสุทธิ์สูงที่สุดคือ 1.685 และ 1.89 ตามลำดับ ซึ่งค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 1.65-1.85 ถือว่าเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีความบริสุทธิ์ มีคุณภาพดี และนำไปไปใช้งานต่อได้ แต่ถ้าค่าความบริสุทธิ์น้อยกว่า 1.65 ถือว่าดีเอ็นเอนั้นมีโปรตีนและสารละลายฟีนอลปนเปื้อนอยู่ ถือว่าเป็นดีเอ็นเอที่คุณภาพไม่ดีควรทำความสะอาดอีกครั้ง เพื่อกำจัดโปรตีนและฟีนอล (สิรินดา ยุ่นฉลาด, 2541) ซึ่งจากวิธีการสกัดของ Boiteux et al. (1999) ดัดแปลง ใช้สารสกัดที่ประกอบด้วย CTAB เป็นสารที่ช่วยในการกำจัดสารประกอบพวกพอลีแซ็กคาไรด์ และขั้นตอนการสกัดในช่วงเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ได้ทำซ้ำ 2 รอบ ซึ่ง chloroform มีคุณสมบัติช่วยกำจัดสารประกอบคาร์โบไฮเดรต (วุฒิพงษ์ มหาคำ, 2542 อ้างจาก Taylor et al., 1993) เมื่อพิจารณาถึงสารเคมีที่ใช้ในขั้น

ตอนการสกัดดีเอ็นเอของแต่ละวิธีการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Porebski et al. (1997) ดัดแปลง และวิธีสกัดของ Doyle & Doyle (1987) ดัดแปลง สารสกัดประกอบด้วย CTAB และ PVP ซึ่ง PVP เป็นตัวช่วยในการกำจัดสารประกอบโพลิฟีนอล นอกจากนี้ในขั้นตอนการสกัดได้กำจัดโปรตีนโดยการเติมเอนไซม์ Proteinase K และนอกจากนี้ยังเติม chloroform และ phenol ซึ่งเป็นสารละลายที่ช่วยให้โปรตีนเสื่อมสภาพและตกตะกอนแยกออกจากกรดนิวคลีอิค แต่ค่าความบริสุทธิ์ยังมีค่าน้อย ทั้งนี้อาจจะไม่ขึ้นกับสารเคมีมากนัก แต่อาจจะขึ้นกับความเหมาะสมของพืชแต่ละชนิดกับวิธีการสกัด และเทคนิคของผู้ทำการศึกษา เมื่อนำดีเอ็นเอมาตรวจสอบคุณภาพโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซิส พบว่าวิธีสกัดดีเอ็นเอทั้ง 4 วิธี ให้ชิ้นดีเอ็นเอทั้ง *G. serrata* และ *O. integerrima* ไม่สมบูรณ์เนื่องจากเกิดการแตกหักโดยสังเกตได้จากเกิดแถบยาวไปตามเจล (ภาพที่ 18) ซึ่งในสารสกัดแต่ละวิธีนั้นมีสาร ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) เป็นส่วนประกอบซึ่ง EDTA มีคุณสมบัติช่วยให้เอนไซม์ endonuclease ไม่ทำงาน เนื่องจาก EDTA เป็นตัวจับกับ Mg^{2+} ซึ่งจำเป็นสำหรับการทำงานของเอนไซม์ endonuclease (ประสาน สืบสุข, 2541) ดังนั้นอาจจะเป็นไปได้ว่าสาเหตุที่ทำให้ดีเอ็นเอเกิดการแตกหักเป็นเพราะขั้นตอนการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์อาจจะเขย่าแรงเกินไป หรือขั้นตอนการปั่นเหวี่ยง ถ้าใช้ความเร็วสูงเกินไปอาจจะทำให้ชิ้นดีเอ็นเอแตกหักได้ ดังนั้นในการสกัดดีเอ็นเอแต่ละขั้นตอนควรมีความระมัดระวัง ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำดีเอ็นเอที่สกัดจากใบอ่อนของ *O. integerrima* และ *G. serrata* โดยวิธีสกัดของ Boiteux et al. (1999) ดัดแปลง ไปใช้ในการศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD เนื่องจากความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้อยู่ในช่วง 1.65-1.89 ซึ่งถือว่าเป็นดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์มีคุณภาพดีและนำไปใช้งานต่อไปได้ แต่ถ้าเลือกดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ต่ำกว่า 1.65 อาจจะมีสารประกอบพวกพอลิแซ็กคาไรด์ปนเปื้อนอยู่ ซึ่งสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ polymerase (Boiteux et al., 1999)

การหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *G. serrata* และ *O. integerrima*

การทดสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *G. serrata* และ *O. integerrima* โดยใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้น (10 นิวคลีโอไทด์) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสุ่ม 50 ชนิด (จากบริษัท Operon Technologies) สำหรับทำปฏิกิริยา RAPD พบว่ามีไพรเมอร์ 32 ชนิดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *O. integerrima* ได้ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วง 129-1,585 คู่เบส ส่วน *G. serrata* พบว่ามีไพรเมอร์ 29 ชนิดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และขนาดแถบดีเอ็นเอที่ได้อยู่ในช่วง 89-1,122 คู่เบส

ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แสดงว่าให้เห็นว่าดีเอ็นเอของ *G. serrata* และ *O. integerrima* มีลำดับของเบสที่เป็นคู่สม (complementary) กับไพรเมอร์ ซึ่งทำให้ไพรเมอร์สามารถเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอได้ และชิ้นดีเอ็นเอที่ไพรเมอร์เข้าไปเกาะนั้นต้องมีตำแหน่งดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสแบบ inverted sequence ที่อยู่ในช่วง 100-3,000 คู่เบส ซึ่งเป็นบริเวณที่เปิดโอกาสให้ไพรเมอร์เข้าจับเกาะได้ 2 ตำแหน่งบนดีเอ็นเอต้นแบบในทิศทางปกติและทิศทางกลับกันทำให้ดีเอ็นเอแต่ละชิ้นสามารถเพิ่มปริมาณได้ แต่อย่างไรก็ตามชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดไม่เกิน 3,000 คู่เบส เนื่องจากข้อจำกัดของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่สามารถนำเอานิวคลีโอไทด์แต่ละตัวมาต่อกันได้ยาวไม่เกิน 3,000 คู่เบส (ประสาน สืบสุข, 2541 อ้างจาก Tingey & Tufo, 1993) เมื่อพิจารณาถึงจำนวนแถบดีเอ็นเอของ *O. integerrima* ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากที่สุดคือไพรเมอร์ OPB17 ให้จำนวนแถบของดีเอ็นเอ 8 แถบ แสดงว่าดีเอ็นเอของ *O. integerrima* มีตำแหน่งที่มีลำดับเบสที่เป็น inverted sequence ที่อยู่ในช่วง 100-3,000 คู่เบสอยู่ 8 แห่ง ในขณะที่จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้น้อยที่สุด คือให้จำนวนแถบดีเอ็น

เอ 1 แถบ แสดงว่าดีเอ็นเอของ *O. integerrima* มีตำแหน่งที่มีลำดับเบสที่เป็น inverted sequence ในช่วง 100-3,000 คู่เบสมีเพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้น ส่วนดีเอ็นเอของ *G. serrata* เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้สูงสุดคือ ไพรเมอร์ OPW2 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ 5 แถบ แสดงว่าดีเอ็นเอของ *G. serrata* มีตำแหน่งที่มีลำดับเบสที่เป็น inverted sequence อยู่ที่ช่วง 100-3,000 คู่เบสอยู่ 5 ตำแหน่ง ในขณะที่จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มได้น้อยที่สุดคือให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ แสดงว่าดีเอ็นเอของ *G. serrata* มีตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าจับได้เพียง 1 ตำแหน่งเช่นกัน

นอกจากตำแหน่งเบสคู่สมระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบแล้วปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เช่น (1) ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้นที่เหมาะสมของดีเอ็นเอต้นแบบมีผลอย่างมากต่อการเกิดแบบแผนดีเอ็นเอที่แน่นอน ถ้าใช้ดีเอ็นเอต้นแบบน้อยเกินไปจะทำให้แบบแผนดีเอ็นเอที่ได้ไม่คงที่ ถ้าใช้ดีเอ็นเอต้นแบบมากเกินไปจะทำให้เกิดแบบแผนดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ ช่วงความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้อยู่ในช่วง 10-500 นาโนกรัมแต่ส่วนมากนิยมใช้ 20-50 นาโนกรัม (วุฒิพงษ์ มหาคำ, 2542) มลิวรรณ นาคขุนทด และคณะ (2542) ได้ศึกษาอนุกรมวิธานของพืชสกุลมังคุดบางชนิดโดยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ 100 นาโนกรัมต่อปริมาตรสุทธิ 15 ไมโครลิตร ซึ่งนอกจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบแล้วความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอก็มีผลต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ถ้าดีเอ็นเอที่นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไม่บริสุทธิ์พอ เช่น อาจจะมีสารประกอบพวกพอลิแซ็กคาไรด์ หรือพอลิฟีนอลปนเปื้อนอยู่ สารดังกล่าวจะไปยับยั้งเอนไซม์ polymerase ทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอลดลง (Boiteux et al., 1999) (2) ปริมาณของ *Taq* DNA polymerase ถ้าใช้ปริมาณเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase มากเกินไปจะทำให้จำนวนแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นมากเกินไปและไม่จำเพาะ แต่ถ้าใช้ปริมาณน้อยเกินไปจะทำให้ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อย ช่วงปริมาณที่เหมาะสมของ *Taq* DNA polymerase ในปฏิกิริยาทั่วๆไปอยู่ในช่วง 1.0-2.5 unitต่อ 100 ไมโครลิตร Levi et al. (1993) รายงานว่าปริมาณของ *Taq* DNA polymerase ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชที่มีเนื้อไม้คือ 2.8 unit ต่อ 100 ไมโครลิตร ประสาน สืบสุข (2541) รายงานว่าปริมาณ *Taq* DNA polymerase 2.0 unit มีความเหมาะสมมากที่สุดสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะเขือเทศ โดยสามารถเพิ่มปริมาณ และจำนวนแถบของดีเอ็นเอได้มากที่สุดและแถบดีเอ็นเอคมชัดซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ (3) นิวคลีโอไทด์ Levi et al. (1993) รายงานว่าความเข้มข้นของ dNTP ที่เหมาะสมที่สุดในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชทีมีเนื้อไม้คือ 200 ไมโครโมลาร์ (4) ไพรเมอร์ ถ้าใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่สูงจะทำให้โอกาสจับคู่ระหว่างดีเอ็นเอต้นแบบกับไพรเมอร์ลดลง ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะเขือเทศคือ 25 pmol (ประสาน สืบสุข, 2541) สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชที่มีเนื้อไม้เท่ากับ 0.2 ไมโครโมลาร์ต่อ 100 ไมโครลิตร (Levi et al., 1993)

จากข้อมูลจะเห็นว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ หลายปัจจัยและพืชแต่ละชนิดก็ต้องการในปริมาณไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า ความเหมาะสมของปัจจัยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขึ้นกับชนิดของพืช นอกจากนี้แล้ว การตั้งโปรแกรมอุณหภูมิและจำนวนรอบก็มีความสำคัญต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งจากการศึกษาได้ตั้งโปรแกรมใกล้เคียงกับการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในไม้ไทยสกุลหว้า (ภาณี เตมีศักดิ์และคณะ, 2538)

ในการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส เพื่อวิเคราะห์ผลของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค RAPD ความเข้มข้นของอะกาโรสที่ใช้ คือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ในการวิเคราะห์ 15 ไมโครลิตร ได้ผลดังภาพที่ 22 และ 23 เนื่องจากดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค RAPD จะมีขนาดเล็ก คือไม่เกิน 3,000 คู่เบส และความเข้มข้นของอะกาโรสที่ใช้อยู่ในช่วง 1.0-1.5 เปอร์เซ็นต์ และจากผลการศึกษาเลือกความเข้มข้นของอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 89-1,585 คู่เบส

จากการศึกษาพบว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้มากที่สุดคือ 8 แถบ ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าเลือกความเข้มข้นของอะกาโรสไม่เหมาะสม และการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ใช้ ethidium bromide ในการย้อม ซึ่ง ethidium bromide สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอที่มีปริมาณต่ำเพียง 1-10 นาโนกรัมเท่านั้น และในการศึกษาครั้งต่อไปควรทดลองแยกดีเอ็นเอด้วยพอลิอะคริลาไมด์เจล แล้วย้อมด้วย silver nitrate เพราะการย้อมด้วย silver มีประสิทธิภาพสูงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอที่มีปริมาณต่ำถึง 1 พิโคกรัม (pg) (Caetano & Gresshoff, 1994)

ดังนั้นจึงกล่าวสรุปโดยรวมว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีผลตั้งแต่คุณภาพของดีเอ็นเอต้นแบบ ปริมาณของไพรเมอร์ที่ใช้ ความจำเพาะของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ และสภาวะอุณหภูมิ ซึ่งพืชแต่ละชนิดจะมีความเหมาะสมในปัจจัยต่าง ๆไม่เหมือนกัน

ภาพที่ 18 ก : อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของตัวอย่างดีเอ็นเอ *G. serrata* ที่สกัดได้จากแต่ละวิธี

ข : อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของตัวอย่างดีเอ็นเอ *O. integerrima* ที่สกัดได้จากแต่ละวิธี

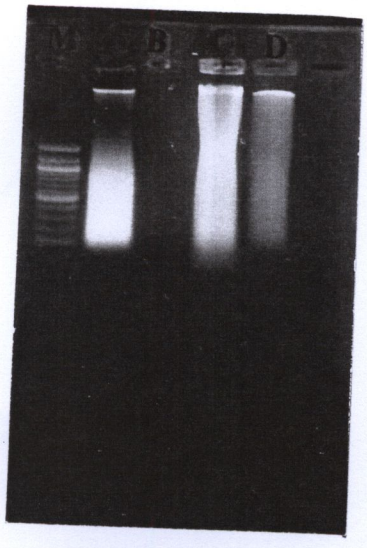
M : DNA marker

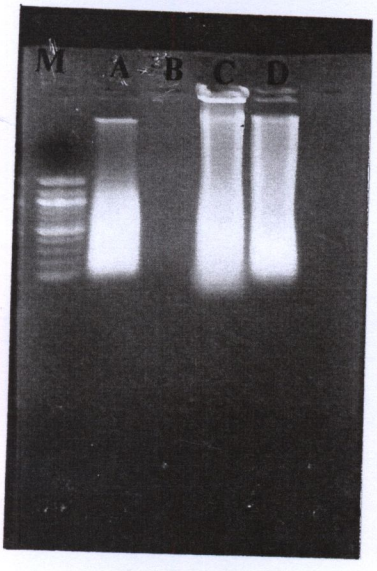
A : ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีของ porebski et al. (1997) ดัดแปลง

B : ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีของ Wang et al. (1997) ดัดแปลง

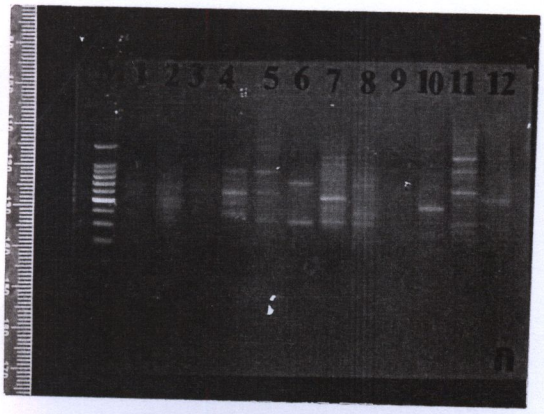
C : ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีของ Boiteux et al. (1999) ดัดแปลง

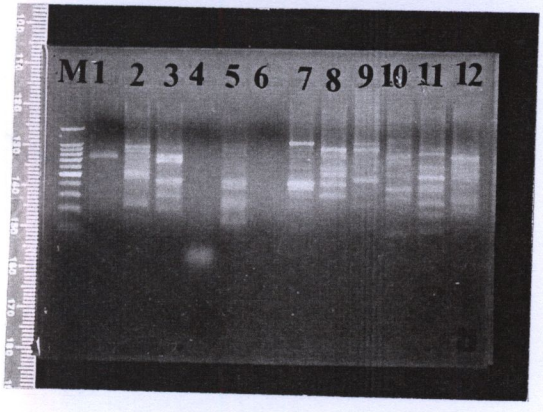
D : ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีของ Doyle & Doyle (1987) ดัดแปลง


M
B
C
D


M
A
B
C
D

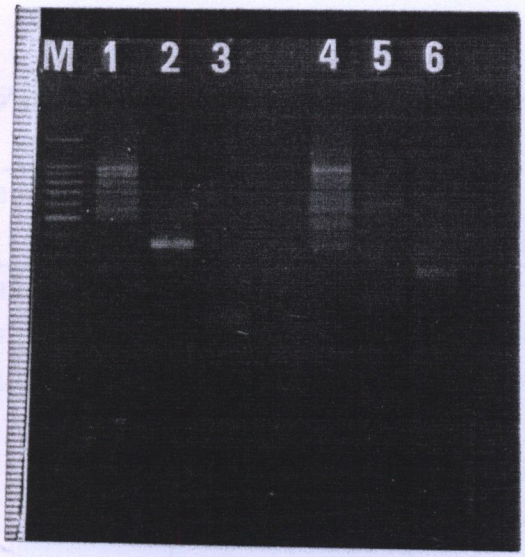
ภาพที่ 19 ก: ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *G.* serrata และ O. *integerrima*
ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RAPD
โดยใช้ไพรเมอร์ OPB17, OPB18, OPB19, OPB20,OPJ1 และ OPJ2
M : DNA marker, 1-6 : *G. serrata*, 7-12: *O. integerrima*
ข : ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *G. serrata* และ *O. integerrima*
ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RAPD
โดยใช้ไพรเมอร์ OPW1, OPW2, OPW3, OPW4, OPW5 และ OPW6
M: DNA marker, 1-6 : *G. serrata*, 7-12 : *O. integerrima*


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12


M1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

ภาพที่ 20 เปรียบเทียบแบบแผนดีเอ็นเอของ *G. serrata* และ *O. integerrima* เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPW2, OPW7 และ OPW9

M : marker, 1-3 : *G. serrata*, 4-6 : *O. integerrima*


M 1 2 3 4 5 6

บทที่ 8
สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา กายวิภาคศาสตร์ พัฒนาการของเมกะสปอร์และแกมีโทไฟต์เพศเมีย พัฒนาการของอับเรณู ไมโครสปอร์และแกมีโทไฟต์เพศผู้ และจำนวนโครโมโซมจากดอก สรุปผลการศึกษาได้ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ลักษณะที่แตกต่างและเหมือนกันของ *G. serrata* และ *O. integerrima*

ลักษณะที่เหมือนกัน	ลักษณะที่แตกต่างกัน		
		G. serrata	*O. integerrima*
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	**ลักษณะทางพฤกษศาสตร์**		
-ใบรูปไข่กลับ ฐานรูปลิ่ม	-ความสูงของลำต้น	1-3 เมตร	4-3 เมตร
-จำนวนกลีบเลี้ยง 5 กลีบ	-ความยาวใบ	14-20 ซม.	9.5-14.6 ซม.
	-จำนวนเกสรเพศผู้	8-9	32-49
	-ความยาวก้านชูอับเรณู	ไม่มี	4- 9 มม.
	-ความยาวอับเรณู	4-5 มม.	4-9 มม.
	-ความยาวเกสรเพศเมีย	5-6 มม.	2-2.3 ซม.
	-จำนวนออวุล	5-6	8-9
ลักษณะกายวิภาคศาสตร์ใบ	**ลักษณะกายวิภาคศาสตร์**		
-ผิวใบมีคิวทินเคลือบชัดเจน	-ลักษณะปากใบ	พาราไซติก	พาราไซติก
-เนื้อเยื่อลำเลียงบริเวณเส้นกลางใบมีโฟลเอ็มอยู่ด้านนอก ไซเล็มอยู่ด้านใน	-ความยาวของเซลล์คุม	21.83±2.45 ไมโครเมตร	27.16±2.38 ไมโครเมตร
-เส้นใบย่อยมีมัดท่อลำเลียง 2 ขนาด	-ความหนาแน่นของปากใบ	402.4±2.8 เซลล์/มม.^{2}	268.9±1.8 เซลล์/มม.^{2}
-เซลล์แพลิเสดเป็นแท่งเรียง 1-2 ชั้นเซลล์			
พัฒนาการของออวุล เมกะสปอร์และแกมีโทไฟต์เพศเมีย	**พัฒนาการของออวุล เมกะสปอร์และแกมีโทไฟต์เพศเมีย**		
-ออวุลแบบคว่ำ			
-ผนังออวุลมี 2 ชั้น	-ถุงเอ็มบริโอ	ยาวกว่า	รูปไข่,สั้นกว่าของ *G.serrata*
- ระยะ 4 เมกะสปอร์ เรียงตัวเป็นแถวเดียว	**เรณู**	triporate	tricolporate
-เซลล์ที่ 4 นับจากไมโครไพล์ทำหน้าที่สร้างแกมีโทไฟต์เพศเมีย	**ลักษณะแคลโลส**	เรียวแหลม	กลม
-ถุงเอ็มบริโอเป็นแบบ *Polygonum*	**จำนวนโครโมโซม**	n = 12	n = 11

ตารางที่ 7 ลักษณะที่แตกต่างและเหมือนกันของ *G. serrata* และ *O. integerrima* (ต่อ)

ลักษณะที่เหมือนกัน	ลักษณะที่แตกต่างกัน		
		G. serrata	*O. integerrima*
พัฒนาการของอับเรณูไมโครสปอร์และแกมีโทไฟต์เพศผู้ - ผนังอับเรณูมี 4 ชั้น - ผนังอับเรณูชั้นทาพีทัมเป็นแบบต่อม และมี 2 นิวเคลียส - ระยะกลุ่มละ 4 จัดเรียงตัวแบบพีระมิด - เรณูระยะเจริญเต็มที่มี 2 นิวเคลียส			

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าลักษณะสัณฐานวิทยาของ *O. integerrima* ที่เก็บตัวอย่างจากอุทยานแห่งชาติภูพานและบริเวณโรงพยาบาลศรีนครินทร์ขอนแก่นมีจำนวนกลีบดอก และขนาดของกลีบดอกแตกต่างจาก *O. integerrima* ที่เกิดบริเวณโคกภูตากา อำเภอภูเวียง คือจำนวนกลีบดอกของพืชที่เกิดบริเวณอุทยานแห่งชาติภูพาน และบริเวณโรงพยาบาลศรีนครินทร์ขอนแก่นมีกลีบดอก 5-6 กลีบ ขนาดของกลีบใหญ่ ในขณะที่พืชที่เกิดบริเวณโคกภูตากา อำเภอภูเวียง มีกลีบดอก 9-10 กลีบ กลีบมีลักษณะยาวและเรียวกว่า ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะลักษณะป่าที่โคกภูตากาแห้งแล้งกว่า ซึ่งลักษณะภูมิประเทศ ลักษณะดิน และความชื้นก็มีผลต่อการแสดงออกของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (Longman & Jenik, 1987) ส่วน *G. serrata* ได้ทำการศึกษาที่อุทยานแห่งชาติภูพานแห่งเดียวจึงไม่ได้เปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยากับพื้นที่อื่น

จากการศึกษา *G. serrata* และ *O. integerrima* พบว่ามีลักษณะสัณฐานวิทยาแตกต่างกันบ้าง แต่กายวิภาคศาสตร์ส่วนมากเหมือนกัน แตกต่างกันเฉพาะขนาดของเซลล์คุมและความหนาแน่นของปากใบ ศึกษาจำนวนโครโมโซมทั้งสองชนิดพบว่าจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน เรณูของ *G. serrata* เป็นแบบ triporat ส่วนของ *O. integerrima* เป็นแบบ tricolporate เมื่อนำดีเอ็นเอไปเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค RAPD และนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยไพรเมอร์ชนิดเดียวกันมาศึกษาแถบดีเอ็นเอพบว่าแถบที่ได้ไม่เหมือนกัน จึงสรุปได้ว่าพืชทั้งสองเป็นคนละสกุลกัน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของ *G. serrata* ของป่าบริเวณอื่นเพิ่มเติม

2. จากการศึกษากายวิภาคศาสตร์ของใบ พบว่าพืชทั้ง 2 ชนิดมีลักษณะเหมือนต่างกันเฉพาะลักษณะของปากใบกันดังนั้นควรมีการศึกษากายวิภาคศาสตร์ของเนื้อไม้เพิ่มเติม

3. จากการศึกษาพัฒนาการของเมกะสปอร์และแกมีโทไฟต์โดยวิธีการทำให้ใส พบว่า *G. serrata* เมื่อดอกแก่ขึ้นจะมีสารสะสมสีน้ำตาลปกปิดจนไม่สามารถศึกษาถึงพัฒนาการระยะต่าง ๆได้ครบทุกระยะ

4. จากการศึกษาพัฒนาการของเมกะสปอร์ และแกมีโทไฟต์เพศเมีย ด้วยกรรมวิธีพาราฟินและวิธีทำให้ใส พบว่ากรรมวิธีพาราฟินต้องใช้ดอกจำนวนมาก เพื่อจะได้ชิ้นตัวอย่างตามต้องการ ทำให้สิ้นเปลืองสารเคมีกว่าวิธีทำให้ใส แต่กรรมวิธีพาราฟินจะเหมาะกับพืชที่มีสารสะสมปกปิดบริเวณนิวเซลลัส หรือบริเวณผนังออวุล

5. จากการศึกษาจำนวนโครโมโซม ได้ทำการศึกษาเฉพาะโครโมโซมจากดอกอ่อนควรมีการศึกษาโครโมโซมจากรากเพิ่มเติม เพื่อข้อมูลจะได้ชัดเจนขึ้น

6. จากการศึกษาการงอกของเมล็ด พบว่าเมล็ดของ *G. serrata* ไม่งอก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าปัจจัยต่าง ๆ ยังไม่เหมาะสม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม

7. เนื่องจากพืชทั้ง 2 สกุล ในประเทศไทยมีเพียงสกุลละ 1 ชนิด มีลักษณะดอกที่สวยงามและเป็นไม้ดอกหอมเหมาะที่จะนำมาพัฒนาเป็นไม้ประดับ นอกจากนี้อัตราการงอกของเมล็ดต่ำควรมีศึกษาการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพิ่มเติม

เอกสารอ้างอิง

กนกวลัย กุลทนันทน์. เทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง. *วารสารคลีนิก* 2537; 10 (11): 752-747.

กรมวิชาการเกษตร. ***พรรณไม้หอม.*** กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์; 2542.

กัลยา เพ็ญสุวรรณ. ***การศึกษาพัฒนาการ ชีวเคมีและการแสดงออกของจีนของอับเรณูและละอองเรณูของข้าว (Oryza sativa L.).*** [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย

จวงจันทร์ ดวงพัตรา. ***เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์.*** ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2521.

เต็ม สมิตินันท์. ***ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย.*** กรุงเทพฯ: ฟันนี่พับบลิชชิ่ง; 2523.

เทียมใจ คมกฤส. ***กายวิภาคศาสตร์ของพฤกษ์.*** พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2539

นิยะดา ห่อนาค. ***พันธุศาสตร์เบื้องต้น.*** ขอนแก่น: ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2534.

ปวีณา สาลีทอง. ***โครงการย่อยเรื่องการเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบสดและใบแห้ง*** [เอกสาร อัดสำเนา]. ขอนแก่น: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2542

ประสาน สืบสุข. ***ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเตรียม RAPD เพื่อวิเคราะห์หา molecular markers ของมะเขือเทศที่ต้านทานต่อโรคเหี่ยวเขียว.*** [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2541.

ปรีชา ประเทพา. ***นิเวศพันธุศาสตร์ของพืชสกุลถั่วแปบช้าง (Afgekia craib) ในประเทศไทย.*** [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2533.

———. การประยุกต์ใช้เทคนิค RAPD (Ramdom Amphified Polymorphic DNA) สำหรับตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมในเชื้อพันธุ์พืช. ***วารสารมหาวิทยาลัยมหาสารคาม*** 2540; 16: 62-68.

ปิยะรัตน์ อิฐรัตน์. ***การศึกษาพัฒนาการของเมกะสปอร์และแกมีโทไฟต์เพศเมียของพืชวงศ์กก (Cyperaceae) 20 ชนิด ในประเทศไทย.*** [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต]. ขอนแก่น : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2542.

พวงผกา อัมพันธ์จันทร์. ***จำนวนโครโมโซมของพืชดอกบางชนิดในบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.*** [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ; 2533.

พวงผกา สุนทรชัยนาคแสง. ***คู่มือปฏิบัติการศึกษาโครโมโซมพืช*** กรุงเทพฯ: ภาควิชาพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2540.

พีรเดช ทองอำไพ. ***ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์ แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย.*** กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2529.

ภัญชนา มีแก้วกุญชร และ ช. ณิฏฐ์ศิริ สุยสุวรรณ. ผลของสารละลายเคมีต่าง ๆ ที่มีต่อการงอกของเมล็ดและผลผลิตของมะเขือเปราะ. ***วารสารเกษตรพระจอมเกล้า*** 2535; 10: 40 - 37.

ภาณี เตมีศักดิ์, พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธ์, พีรศักดิ์ ศรีนิเวศน์. RAPD Fingerprinting ในพันธุ์ไม้ตระกูลหว้า. ***เอกสารประกอบการสัมมนาทางวิชาการเรื่องพันธุกรรมพืชและการพัฒนาพันธุ์พืช.*** กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์; 2538.

มลิวรรณ นาคชุนทด, สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, สุมน นาสุธน, สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช. การศึกษาอนุกรมวิธานของพันธุ์สกุลมังคุดบางชนิดโดยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. ใน:*รายงานผลการวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย*, กรุงเทพฯ: โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพแห่งประเทศไทย; 2542. หน้า 639-644.

วุฒิพงษ์ มหาคำ. *การศึกษาเบื้องต้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพริกพันธุ์ปลูกบางพันธุ์ด้วยเทคนิค RAPD* [เอกสารอัดสำเนา]. ขอนแก่น: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2542. มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2538.

ศุภชัย เบญจดำรงกิจ, ประพันธ์ ผู้กฤตยาคามี. การงอกของเมล็ดพยุงในวัสดุเพาะชำที่แตกต่างกัน. *วารสารวนศาสตร์* 2534; 10: 114 - 110.

สัมพันธ์ คัมภิรานนท์. *ฮอร์โมนพืช*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพฤกษศสาตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2527.

สิรินดา ยุ่นฉลาด. *หนังสือคู่มือปฏิบัติการเทคนิคพื้นฐานทางพันธุวิศวกรรม*. ขอนแก่น: ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2541.

สุรศักดิ์ เพิ่มลาภ. *การศึกษาปากใบของพรรณไม้หอมบางชนิด* [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2539.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, ธีระชัย ธนานันท์, บรรณาธิการ. *การจำแนกพืชโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล*. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต; 2540.

_____. *พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2543.

อัจฉรา ธรรมถาวร. *คู่มือการทำสไลด์ถาวรเนื้อเยื่อพืชโดยกรรมวิธีพาราฟิน*. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2538.

Bedinger P. The remarkable biology of pollen. ***The Plant Cell*** 1992; 4: 746-745.

Boiteux LS, Fonseca MEN, Simon PW. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA- based genetic fingerprinting analysis in carrot. ***Journal of American Society for Horticultural Science*** 1999; 124: 38-32.

Caetano AG, Gresshoff PM. Staining nucleic acids with silver an alternative to radioisotopic and labeling. ***Promega Notes*** 1994; 45: 18-13.

Chasan R. Breaching the callose wall. ***The Plant Cell*** 1992; 4: 746-745.

Copeland LD, McDonald MB. ***Science and Technology***. 3rd ed. New York: Chapman & Hall; 1995.

Darlington CD, Wylie AP. ***Chromosome atlas of flowering plant***. London: George Allen & Unwin LTD; 1955.

Dickison WC, Weitzman AL. Comparative anatomy of the young stem, node and leaf of Bonnetiaceae. ***American Journal of Botany*** 1996; 83: 405-418.

Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. ***Phytochemical Bulletin*** 1987; 19: 11-15.

Johri BM, Ambegaokar KB, Srivastava PS. ***Comparative Embryology of Angiosperm VI.*** Berlin Heidelberg: Spinger-Verlag; 1992.

Kanis A. ***A revision of the Ochnaceae of the Indo-Pacific area.*** Leiden: N.V.J.J. Groen Zoon; 1934.

Levi A, Rowland LJ, Hartung JS. Production of reliable randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from DNA of woody plants. ***Hort Science*** 1993; 28: 1190-1180.

Longman KA, Jenik J. ***Tropical forest and its environment.*** 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Inc; 1987.

Ludlow AE. *Ochna pulchra* Hook.: leaf growth and development related to photosynthetic activity [Abtract]. ***Annals of Botany*** 1991; 68(6): 527-540. [From Agricola 1/92-12/95].

Mascarenhas JP. The male gametophyte of flowering plants. ***The Plant Cell*** 1989; 1: 664-657.

Maheshwari P. ***An Introduction to the Embryology of Angiosperm.*** Lew Dehli: Tata McGraw-Hill; 1996.

McCormick S. Male gametophyte development. ***The Plant Cell*** 1993; l 5: 1275-1265.

Metcalfe CR, Chalk L. ***Anatomy of the Dicotyledons VI.*** London: The Clarendon Press; 1957.

Murakami A, Ohigashi H, Nozaki H, Tada T, Kagi M, Koshimizu K. Possible inhibitor of tumor promotion and related polyphenol from *Lophira alata* a medicinal plant in tropical West Africa [Abstract]. ***Agricultural and Biological Chemistry*** 1991; 55(4): 1151-1153. [From Life Science; 1993-1995].

NgamkhaJornwiwat S, Tangmitcharoen S. Development of pollen and ovule in *Pterocarpus macrocarpus* Kurz. ***Thai Journal Forrest*** 1989; 8: 273-269.

Pagliarini MS, Matinez M, Silva I. Some observations on the cytology in *Ochna* sp. (Ochnaceae). ***Cytologia*** 1992; 57: 240-237.

Peterson DG, Boehm KS, Stack DM. Isolation of milligram quantities of nuclear DNA from tomato (*Lycopersicon esculentum*); A Plant containing high levels of polyphenolic compound. ***Plant Molecular Biology Reporter*** 1997; 15: 9-15.

Porebski SP, Bailey LG, Baum BR. Modification of a CTAB DNA extraction protocal for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. ***Plant Molecular Biology Reporter*** 1997; 15: 15-8.

Raskin I. Salicylate, A new plant hormone. ***Plant Physiology*** 1992; 99: 803-799.

Swanson CP. ***The cell.*** 2nd ed. New Jersey: Prentice- Hall, Inc. Englewood cliffs; 1965.

Takaki M, Rosim RE. Aspirin increases tolerance to high temperature in seeds of *Raphanus sativus* L. cvar Early Scarlet Globe. ***Seed Science and Technology*** 2000; 28: 183-179.

Thomson WF, Murray MG. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. ***Nucleic Acids Research*** 1980; 19: 3425-3421.

Tsou CH. Embryology of the Theaceae-anther and ovule developement of *Camellia*, *Franklinia*, and *Schima*. ***American Journal of Botany*** 1997; 84(3):381-369.

Wang XD, Wang ZP, Zou YP. An improved procedure for the isolation of nuclear DNA form leaves of wild grapevine dried with silica gel. ***Plant Molecular Biology Reporter*** 1997; 14: 373-369.

Williams JGK, Kubclik AE, Levak J, Rafalski JA, Tingey SC. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers. ***Nucleic acids Research*** 1990; 18: 6535-6531.

Yue- Luan H. ***Seed testing for selected tropical trees in ASEAN region***. Saraburi: ASEAN- Cannada forest tree seed center project, Muak- LEK. 1993.

Zhang WJ, Min TL. A cytogeological study of genus Camellia [Abstract]. ***Acta Botanica Yunnanica*** 1999; 21(2): 196-184. [From CAB; 1998/08-1999/10].

ภาคผนวก

1. การดึงน้ำออกจากตัวอย่าง

การดึงน้ำออกจากตัวอย่างด้วย Tertiary butyl alcohol (TBE) ลำดับความเข้มข้น (grade) จาก 1 ถึง 5 ดังตาราง

ส่วนผสม	ปริมาตร (ลบ.ซม.)ในแต่ละ grade				
	grade				
	1	2	3	4	5
น้ำกลั่น	50	30	15	0	0
Ethyl alcohol 95%	40	50	50	45	0
Tertiary butyl alcohol	10	20	35	55	75
Ethyl alcohol 100%	0	0	0	0	25
รวมปริมาตรแอลกอฮอล์ทั้งหมด	50	70	85	95	100

2. การเตรียมสีย้อม

2.1 สี Safranin 0

2.1.1 ละลายสี Safranin 0 4 กรัมด้วย Methyl cellosolve 200 มิลลิลิตรคนจนสีละลายหมด

2.1.2 เติมแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2.1.3 เติม sodium acetate 4 กรัม และฟอร์มาลิน 8 มิลลิลิตร ลงในสารละลายคนให้เข้ากันเก็บในขวดที่มีฝา ปิดสนิทถ้ามีตะกอนมากควรกรองก่อนเก็บ

2.2. สี fast green FCF

2.2.1 เตรียมสารละลายที่เป็นส่วนผสมของ

- methyl cellosolve 60 มิลลิลิตร
- Clove oil 60 มิลลิลิตร
- Absolute alcohol 60 มิลลิลิตร

2.2.2 ชั่งผงสี Fast green 1 กรัมละลายผงสีนี้ด้วยสารละลายในข้อ 2.1 คนให้ละลายมากที่สุดแล้วกรองเก็บไว้ในขวดที่มีฝาปิดสนิท

3. สารฆ่าและรักษาเซลล์

3.1 FAA 70% ประกอบด้วย

Formalin 5 ส่วนโดยปริมาตร
Glacial acetic acid 5 ส่วนโดยปริมาตร
Ethyl alcohol 70% 90 ส่วนโดยปริมาตร

3.2 FPA 70% ประกอบด้วย

Formalin 5 ส่วนโดยปริมาตร
Propionic acid 5 ส่วนโดยปริมาตร

Ethyl alcohol 70% 90 ส่วนโดยปริมาตร

4. สารละลายที่ทำให้ใส (clearing solution) ประกอบด้วยสารต่าง ๆดังนี้

Choral hydrate	1 part by weight
Phenol crystal	1 part by weight
Clove oil	1 part by weight
Xylene	½ part by weight

5. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

5.1 สารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Boiteux et al. (1999)

สารสกัด (Extraction buffer)

- -Tris pH 8.0 500 mM
- -NaCl 1.4 M
- -CTAB 2%
- -β-mercaptoethanol 0.2%
- -EDTA 20 mM

-Chloroform : Isoamyl (24:1)

-Isopropanol ที่เย็นจัด

-Ammonium acetate 10 mM

-Ethanol 70%

-TE buffer

- -Tris-HCl 10 mM (pH 8.0)
- -EDTA 1 mM (pH 8.0)

5.2 สารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Doyle and Doyle (1987)

สารสกัด

- -CTAB 2%
- -Tris-HCl 100 mM (pH 8.0)
- -EDTA 20 mM
- -NaCl 1.4 M
- -PVP 1%

-Chloroform : Isoamyl (24:1)

-Isopropanol

-Ammonium acetate 10mM

-Ethanol 75%

-TE bufer

- -Tris-HCl 10 mM (pH 8.0)

-EDTA 1 mM (pH 8.0)

5.3 สารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Porebski et al. (1997)

สารสกัด

-Tris-HCl 1 M (pH 8.0)

-NaCl 1.4 M

-EDTA 0.5 M

-CTAB 2 %

-β-mercabpoethanol 0.3%

-Chloroform : Octanol (24:1)

-NaCl 5 M

-Chloroform : Phenol (1:1)

-Sodium acetate 2 M

-TE buffer

-Tris-HCl 10 mM (pH 8.0)

-EDTA 1 mM (pH 8.0)

5.4 สารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Wang et. al. (1997)

สารสกัดที่ 1

-NaCl 0.25 M

-Tris-HCl 0.2 M (pH 8.0)

-EDTA 0.5 M

สารสกัดที่ 2

-Tris-HCl 1 M (pH 8.0)

-EDTA 0.5 M

-CTAB 2%

-NaCl

-Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1)

-Isopropanol

-NaCl 5 M

-TE brffer

-Tris-HCl 10 mM (pH 8.0)

-EDTA 1 mM (pH 8.0)

-RNase A

-RNase A 0.2 mg

-Tris-HCl 1 M (pH 7.5) 2 µl

-NaCl 5 M 0.6 µl

ละลายด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ได้ปริมาตรรวมทั้งหมด 0.2 มิลลิลิตร

6. สารเคมีสำหรับการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส

6.1 Tris-borate (TBE) ความเข้มข้น 5 เท่า

-Tris Base	54 กรัม
-Boric acid	27.5 กรัม
-EDTA 0.5 M (pH 8.0)	20 mL

6.2 Tris-borate (TBE) ความเข้มข้น 1 เท่า

-5XTBE	1 ส่วน
-น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	4 ส่วน

6.3 Gel loading buffer ความเข้มข้น 6 เท่า

-Bromophenol blue	0.025 กรัม
-Xylene cyanol	0.025 กรัม
-Ficoll	1.5 กรัม

7. สารเคมีที่ใช้สำหรับศึกษาจำนวนโครโมโซม

7.1 Carnoy's Solution

-Absolute alcohol	6 ส่วน
-Chloroform	3 ส่วน
-Glacial acetic acid	1 ส่วน

เตรียมแล้วใช้ทันทีและเก็บไว้ในตู้เย็น

7.2 การเตรียมสี Propionocarmine 2%

-ผงคาร์มิน (carmine) 2 กรัม

-45% propionic acid 100 มิลลิลิตร

ต้ม propionic acid 45 เปอร์เซ็นต์จนเดือดเติมผงคาร์มินลงไปทีละน้อยคนให้ละลายจนหมด แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง

ประวัติผู้เขียน

นางสาววิไลลักษณ์ สุดวิไล เกิดวันที่ 2 เมษายน 2517 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีจาก ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม เมื่อปี พ.ศ. 2540 และศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปี พ.ศ. 2541 ระหว่างศึกษาในระดับปริญญาโท ได้รับทุนสนับสนุนจากการทำวิทยานิพนธ์จาก โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (Biodiversity Research and Training Program, BRT) รหัส BRT 543022