บทที่ 3

ผล

1. การศึกษาการพัฒนาทางเนื้อเยื่อวิทยาของรังไข่ และออวุล

การพัฒนาภายในรังไข่ และออวุลของพืชสกุลลางสาด พบว่า แต่ละ locule มี 1 ออวุล ออวุลมีลักษณะกลมรี มีผนังหุ้ม (integument) 2 ชั้น ออวุลมีลักษณะ anatropous คือ ลักษณะออวุลหัวกลับโค้งขึ้นทำให้ช่องไมโครไพลอยู่ใกล้กับรก (placenta) ส่วนของก้านยึดออวุล (funiculus) โค้งกลับแนบตามแนวยาวของออวุล ภายในออวุลมีนิวเซลลัสอยู่เต็ม (ภาพที่ 4)

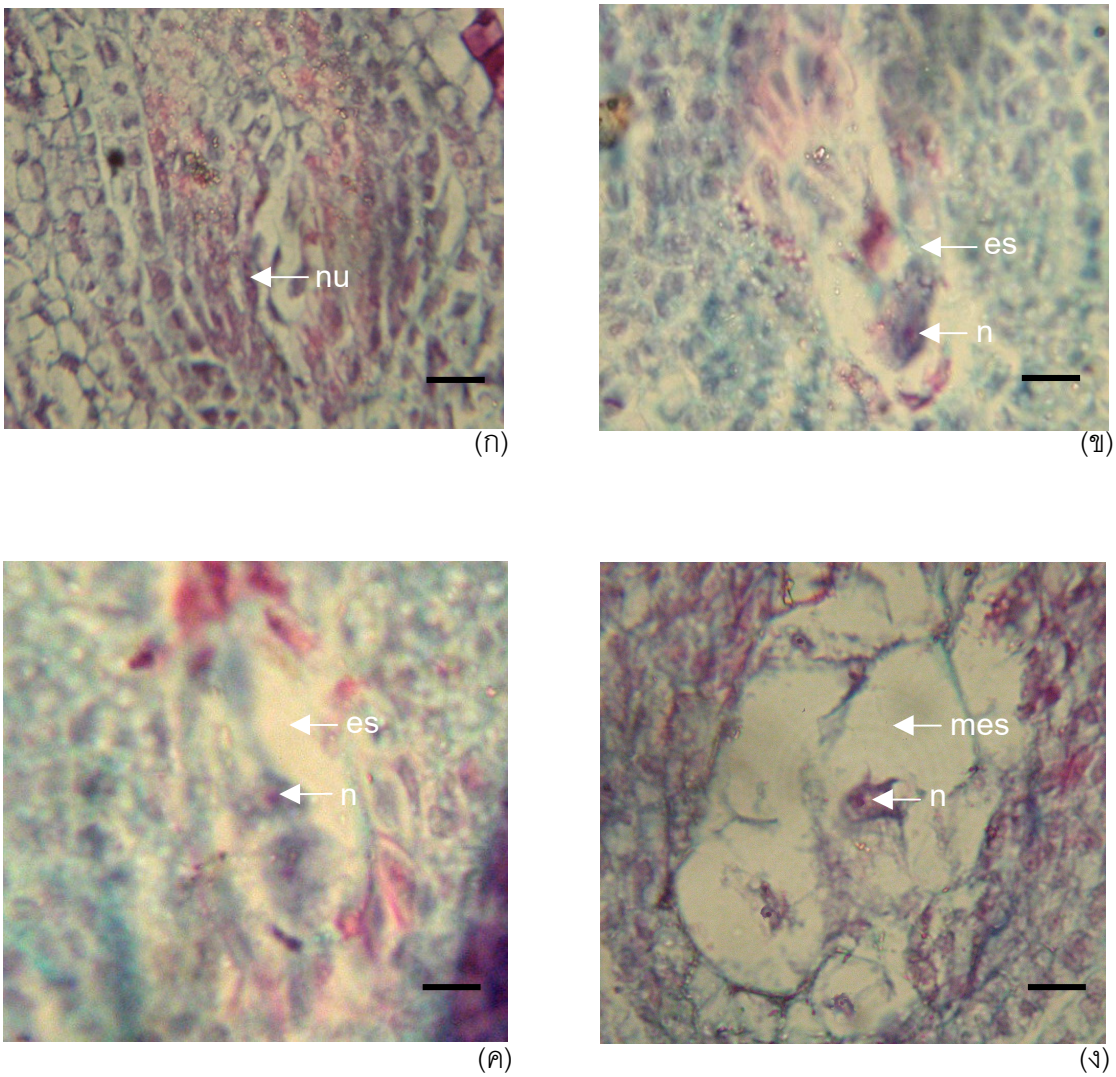
ภาพที่ 4 พัฒนาการของรังไข่ และออวุลของพืชสกุลลางสาด (ลองกองระยะที่ 1) (บาร์ = 20 ไมโครเมตร)

nu = nucellus

i.int. = inner integument

o.int. = outer integument

และจากการศึกษาการพัฒนาทางเนื้อเยื่อวิทยาของรังไข่และออวุลของลองกอง ลางสาด และดูกู ในระยะการเจริญของดอกระยะต่างๆ โดยการตัดเนื้อเยื่อของดอกตามยาว และย้อมสีทำสไลด์ถาวร นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า ภายในออวุลของทั้งลองกอง (ภาพที่ 5ก) ลางสาด (ภาพที่ 6ก) และดูกู (ภาพที่ 7ก) ที่ระยะดอกตูมสีเขียวเข้ม ตรวจไม่พบเซลล์แม่เมกะสปอร์ ภายในออวุลมีนิวเซลลัสอยู่เต็ม แต่ยังไม่มีการพัฒนาของถุงเอ็มบริโอ นอกจากนี้ภายในออวุลของลางสาด (ภาพที่ 6ก) สังเกตเห็นนิวเซลลัสเซลล์เริ่มเกิดการเปลี่ยนแปลงพัฒนาได้เซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่านิวเซลลัสเซลล์อื่นๆ เนื่องจากเซลล์ชนิดนี้มีนิวเคลียสและแวคิวโอลขนาดใหญ่ ในระยะดอกตูม กลีบดอกมีสีเหลืองของทั้งลองกอง (ภาพที่ 5ข) (ภาพที่ 6ข) และดูกู (ภาพที่ 7ข) ภายในออวุลมีลักษณะการสร้างถุงเอ็มบริโอ และสังเกตเห็นว่ามีการสร้างนิวเคลียสเกิดขึ้น ส่วนในระยะดอกแรกแย้ม และเห็นกลีบดอกสีเหลืองครีมชัดเจนของทั้งลองกอง (ภาพที่ 5ค) ลางสาด (ภาพที่ 6ค) และดูกู (ภาพที่ 7ค) พบว่านิวเซลลัสเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเป็นถุงเอ็มบริโอ โดยไม่ผ่านกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส ภายในถุงเอ็มบริโอชนิดนี้มีการสร้างกลุ่มนิวเคลียสจำนวนหนึ่งซึ่งเห็นติดสีแดงอย่างชัดเจน และมีแวคิวโอลขนาดใหญ่ ในระยะดอกบานของลองกอง (ภาพที่ 5ง) และลางสาด (ภาพที่ 6ง) พบว่าภายในหนึ่งออวุลมีการพัฒนาของถุงเอ็มบริโอชนิด aposporous embryo sac เป็นจำนวนมาก ลักษณะนี้เรียกว่า multiple embryo sac ภายในถุงเอ็มบริโอชนิดนี้จะพบนิวเคลียสซึ่งสันนิษฐานว่าน่าจะเป็นเซลล์ไข่ และ polar nuclei ขณะที่ในระยะดอกบานของดูกู (ภาพที่ 7ง) จากการศึกษาครั้งนี้ตรวจไม่พบลักษณะ multiple embryo sac เกิดขึ้น แต่พบลักษณะของถุงเอ็มบริโอใกล้เคียงกับถุงเอ็มบริโอชนิด polygonum



(ก) (ข)

(ค) (ง)

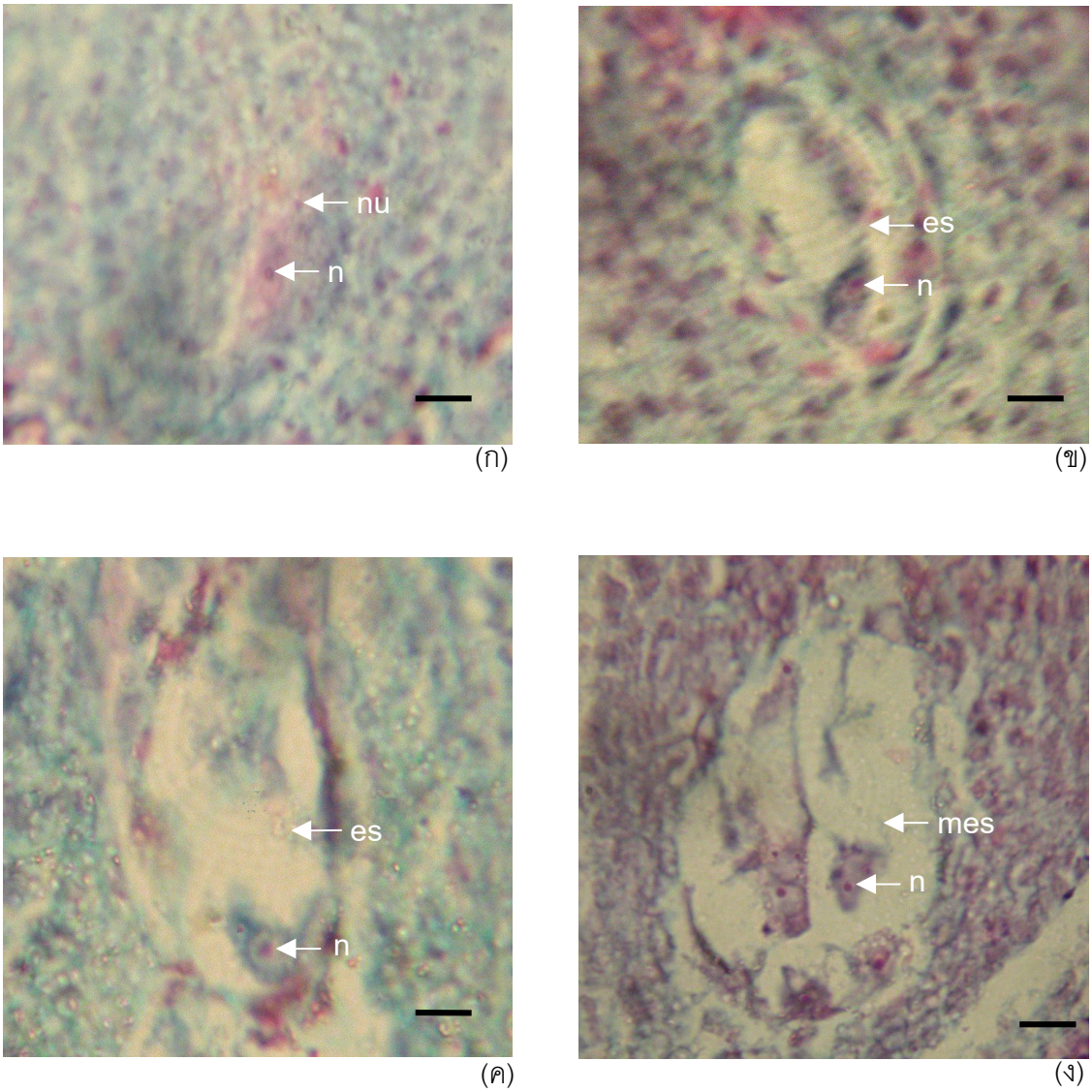
ภาพที่ 5 ลักษณะถุงเอ็มบริโอลองกองระยะดอกตูม-เขียว (ก) ระยะดอกตูม-เหลือง (ข) ระยะดอกแรกแย้ม (ค) และระยะดอกบาน (ง) (บาร์ = 20 ไมโครเมตร)

es = embryo sac

mes = multiple embryo sac

n = nucleus

nu = nucellus



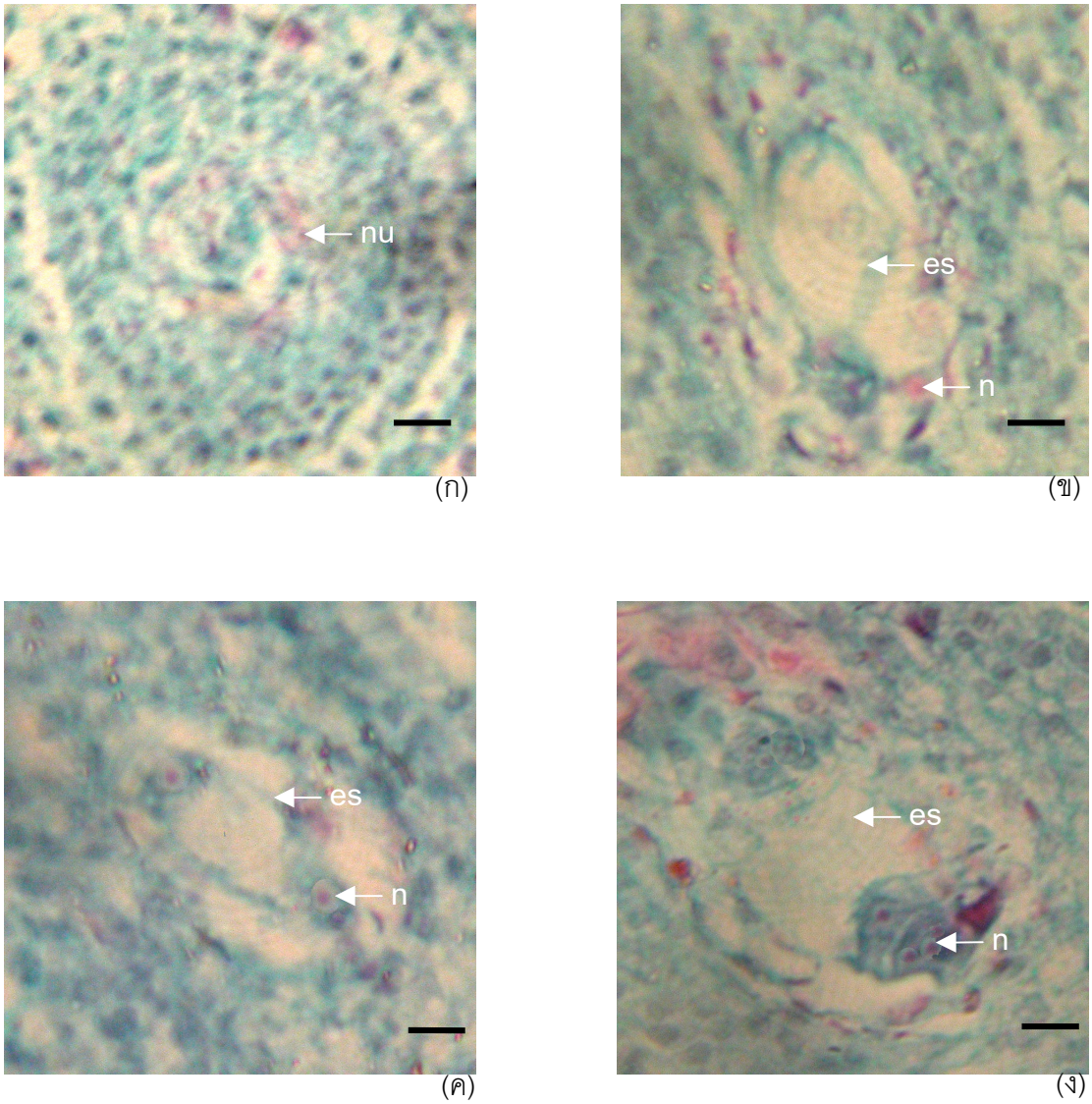
ภาพที่ 6 ลักษณะถุงเอ็มบริโอลางสาดระยะดอกตูม-เขียว (ก) ระยะดอกตูม-เหลือง (ข) ระยะดอกแรกแย้ม (ค) และระยะดอกบาน (ง) (บาร์ = 20 ไมโครเมตร)

es = embryo sac

mes = multiple embryo sac

n = nucleus

nu = nucellus



ภาพที่ 7 ลักษณะถุงเอ็มบริโอดูกระยะดอกตูม-เขียว (ก) ระยะดอกตูม-เหลือง (ข) ระยะดอกแรกแย้ม (ค) และระยะดอกบาน (ง) (บาร์ = 20 ไมโครเมตร)

es = embryo sac

n = nucleus

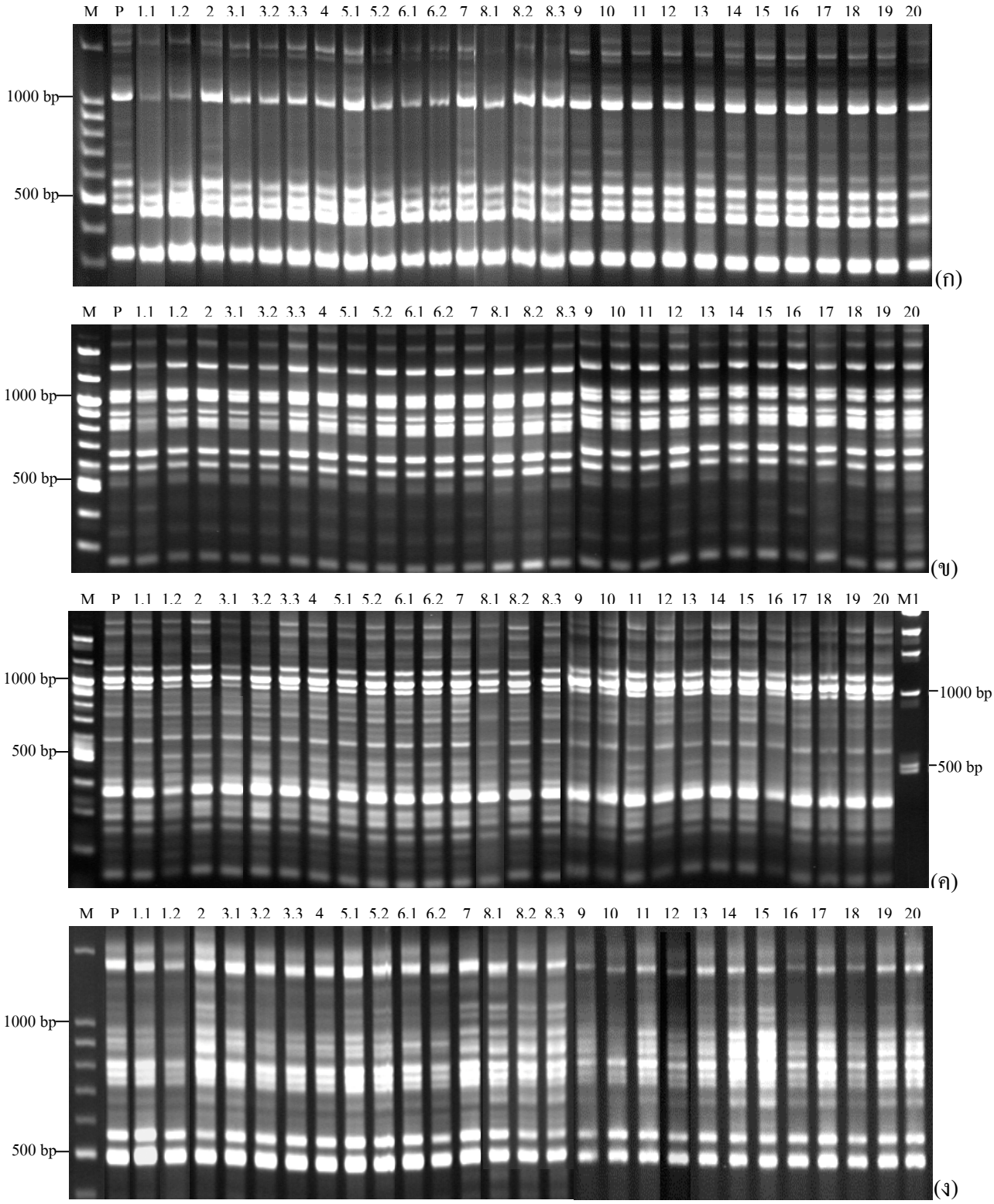
nu = nucellus

2. การศึกษาลักษณะอะโพมิกซีสจากต้นกล้าลองกอง ลางสาด และดูกู ที่ได้จากการเพาะ เมล็ดโดยใช้เทคนิคทางอาร์เอพีดี

การศึกษาลักษณะอะโพมิกซีสจากต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดของพืชสกุลลางสาด โดยใช้เทคนิคทางอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์แบบสุ่มขนาด 10 เบส จำนวนทั้งหมด 8 ไพรเมอร์ คือ OPA-10, OPB-04, OPB-07, OPC-04, OPC-05, OPD-03, OPT-01 และOPT-08 ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นกล้าลองกองจำนวนทั้งสิ้น 149 ต้น ซึ่งได้จากการเพาะเมล็ดจากต้นแม่จำนวน 3 ต้น พบว่า รูปแบบดีเอ็นเอที่ได้ในแต่ละไพรเมอร์ของต้นกล้าทุกต้นที่เก็บจากต้นแม่เดียวกันมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน และไม่มีความแตกต่างจากต้นแม่ (ภาพที่ 8, 9) นอกจากนี้ยังพบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นกล้าลองกอง และต้นแม่ทั้ง 3 ต้นที่สุ่มเก็บตัวอย่างมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบเดียวกันทั้งหมด และต้นกล้าบางส่วนของลองกองซึ่งเป็นต้นกล้า 2-3 ต้นที่ได้จากเมล็ดเดียวกันก็ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน ขณะที่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นกล้าลางสาด และดูกู พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 10, 11, 12, 13) ตัวอย่างเช่น ในภาพที่ 11ข เป็นแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าลางสาดจากต้นแม่เดียวกันที่ได้จากการทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ OPD-03 พบว่า ต้นกล้าที่ 1, 5, 6, 9, 10, 11 และ 13 มีแถบดีเอ็นเอแตกต่างจากต้นแม่ เช่นเดียวกับในภาพที่ 13ข ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าดูกูจากต้นแม่เดียวกันที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ OPD-03 พบว่า ต้นกล้าดูกูส่วนใหญ่มีรูปแบบแถบดีเอ็นเอแตกต่างจากต้นแม่ นอกจากนี้พบว่ามีต้นกล้าบางส่วนซึ่งเป็นต้นกล้า 2 ต้นที่ได้จากเมล็ดเดียวกันของลางสาดให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน ตัวอย่างเช่น ในภาพที่ 11ข เป็นแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าลางสาดที่ได้จากการทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ OPD-03 จะเห็นว่า ต้นกล้าที่ 17.1 และ 17.2 มีรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน แต่ในกลุ่มต้นกล้าของดูกูไม่พบลักษณะดังกล่าว และเมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มต้นกล้าจากต้นแม่เดียวกันของทั้งลางสาด และดูกูก็พบว่ามีรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันด้วย เช่น ต้นกล้าที่ 1, 2, 3 และ 4 ของดูกูจากภาพที่ 13ข จะเห็นว่าแต่ละต้นมีรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน

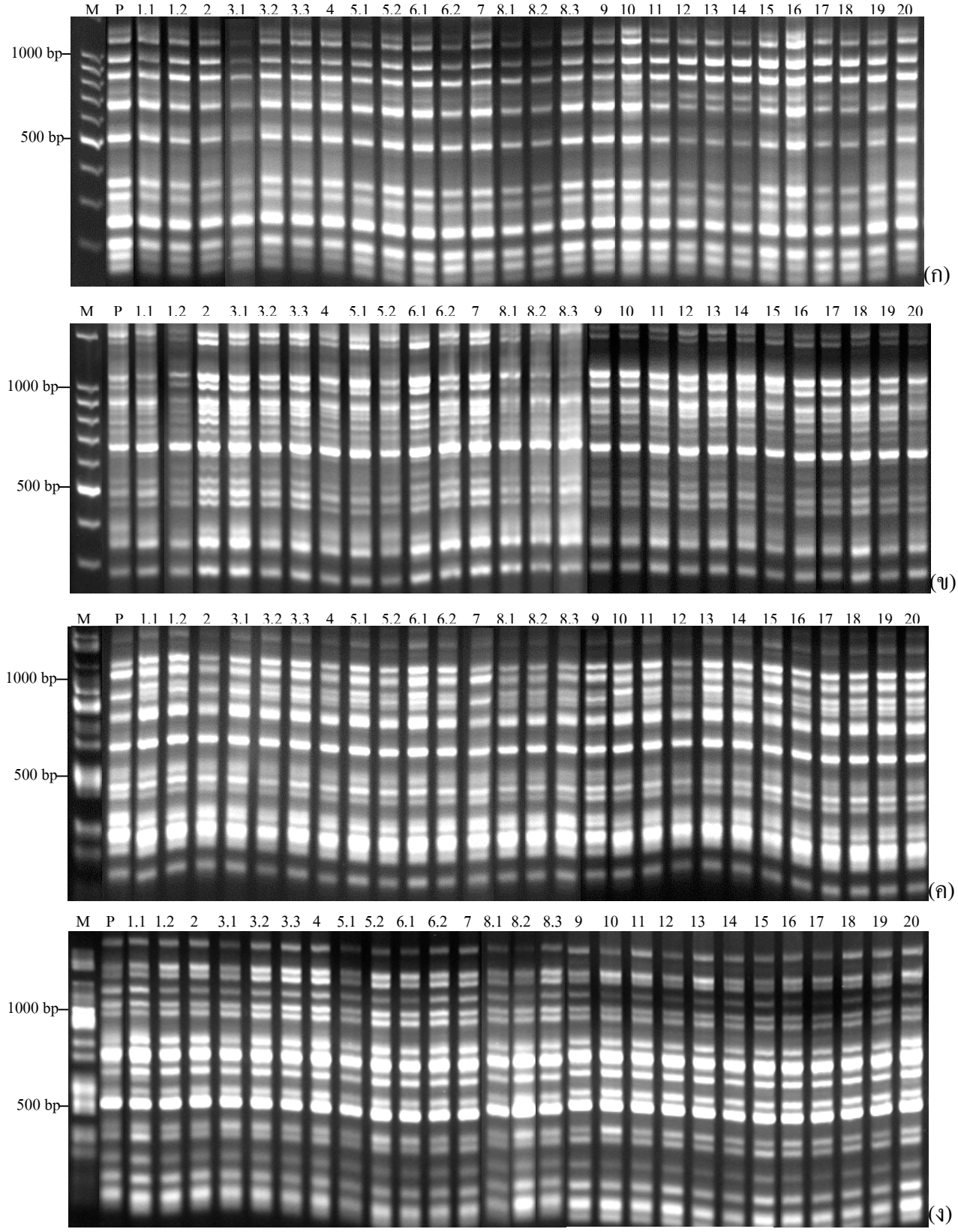
จากตัวอย่างต้นกล้าลางสาด 101 ต้น (รวมทั้งต้นแม่ 3 ต้น) ที่นำมาทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ทั้ง 8 ชนิด พบว่า ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 103 แถบ คิดเป็น 12.88 แถบต่อไพรเมอร์ 21 แถบ (20.57 เปอร์เซ็นต์) เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน และอีก 82 แถบ (79.43 เปอร์เซ็นต์) เป็นแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีความแตกต่างกัน ไพรเมอร์ OPT-08 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอสูงสุด 17 แถบ ไพรเมอร์ OPA-10 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดเท่ากับ 8 แถบ ขณะที่ไพรเมอร์ OPC-05 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากต้นแม่สูงที่สุด 4 แถบ และให้เปอร์เซ็นต์จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากต้นแม่สูงสุดเท่ากับ 28.57 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) แถบดีเอ็นเอมี

ขนาดแตกต่างกันตั้งแต่ 250-2800 คู่เบส เปอร์เซ็นต์รูปแบบแถบดีเอ็นเอของกลุ่มต้นกล้าลางสาดที่เหมือนต้นแม่เฉลี่ยเท่ากับ 71.37 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6) ภาพที่ 10 และ 11 แสดงให้เห็นความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอต้นกล้าลางสาดเมื่อใช้ไพรเมอร์ทั้ง 8 ชนิด ในขณะที่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกลุ่มต้นกล้าดูกูที่ได้จากการเพาะเมล็ด จำนวนทั้งสิ้น 93 ต้น (รวมทั้งต้นแม่ 3 ต้น) พบว่า ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 124 แถบ คิดเป็น 15.50 แถบต่อไพรเมอร์ 69 แถบ (55.65 เปอร์เซ็นต์) เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน และอีก 55 แถบ (44.35 เปอร์เซ็นต์) เป็นแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีความแตกต่างกัน ไพรเมอร์ OPT-01 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอสูงสุด 18 แถบ ไพรเมอร์ OPA-10 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดเท่ากับ 12 แถบ เมื่อพิจารณาถึงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากต้นแม่พบว่า ไพรเมอร์ OPT-08 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากต้นแม่สูงที่สุด 11 แถบ ขณะที่ไพรเมอร์ OPD-03 และ OPT-08 ให้เปอร์เซ็นต์จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากต้นแม่สูงที่สุดเท่ากับ 66.67 และ 64.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5) เปอร์เซ็นต์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอในกลุ่มต้นกล้าดูกูที่เหมือนต้นแม่เฉลี่ยเท่ากับ 12.78 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6) ส่วนในภาพที่ 12 และ 13 แสดงให้เห็นความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอต้นกล้าดูกูจากการใช้ไพรเมอร์ทั้ง 8 ชนิด และเมื่อพิจารณาจากรูปแบบแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าแต่ละต้นจากต้นแม่เดียวกันในกลุ่มต้นกล้าลางสาดที่แตกต่างจากต้นแม่สามารถแบ่งกลุ่มประชากรได้เป็น 2-4 จีโนไทป์ขึ้นอยู่กับชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้ โดยพบว่าไพรเมอร์ OPC-05 และ OPD-03 เป็นไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจสอบความแตกต่างของต้นกล้า คือ สามารถแยกความแตกต่างได้ 4 จีโนไทป์ ในขณะที่ต้นกล้าดูกูมีความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอค่อนข้างมากคือ 11-24 จีโนไทป์ โดยไพรเมอร์ OPT-08 สามารถแยกความแตกต่างได้สูงสุด (ตารางที่ 7)

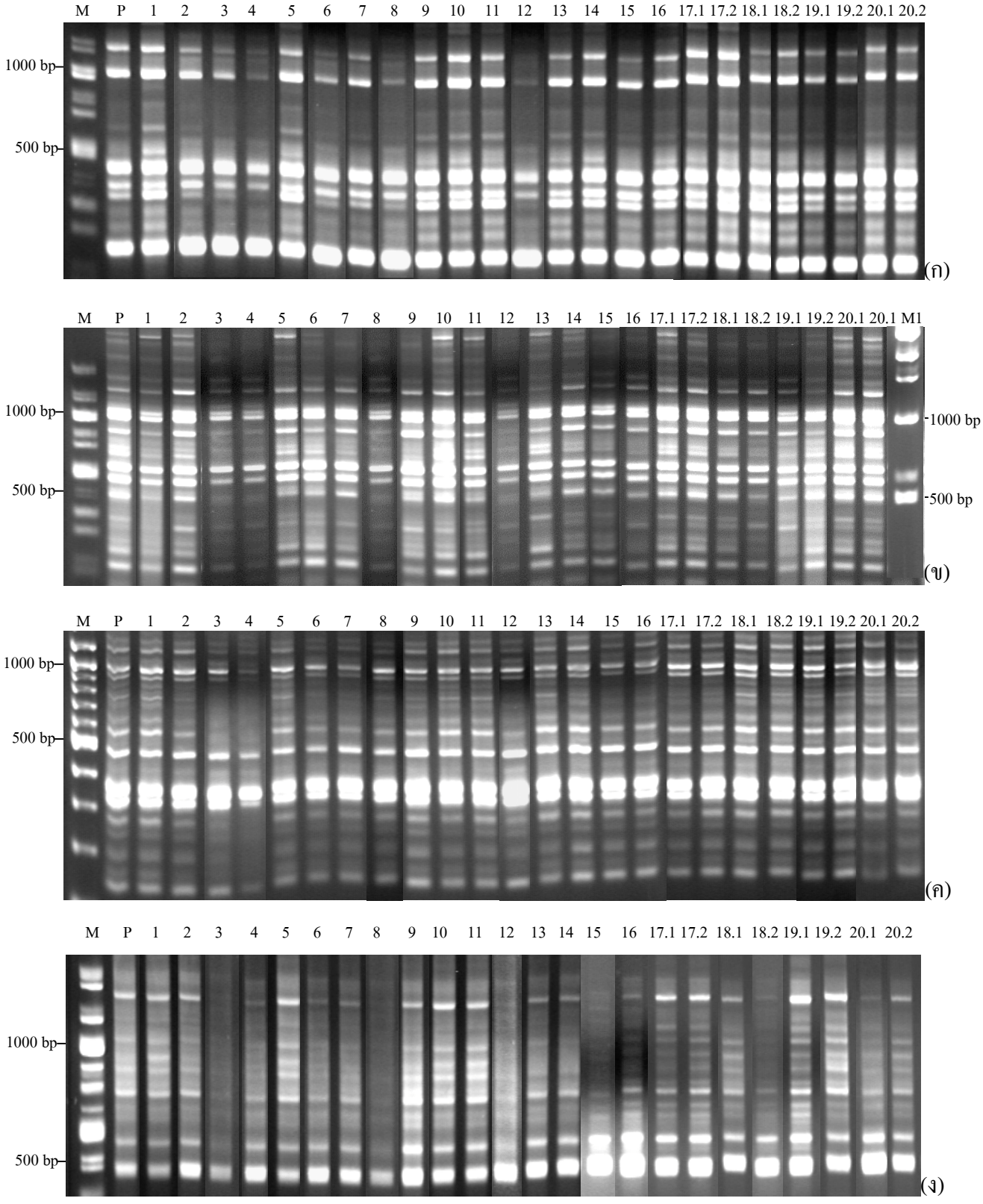


ภาพที่ 8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นกล้าลองกองและต้นแม่ที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้ไพรเมอร์ OPA-10 (ก) OPB-04 (ข) OPB-07 (ค) และ OPC-04 (ง) M และ M1 คือ DNA Ladder ขนาด 100 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ P คือ ต้นแม่

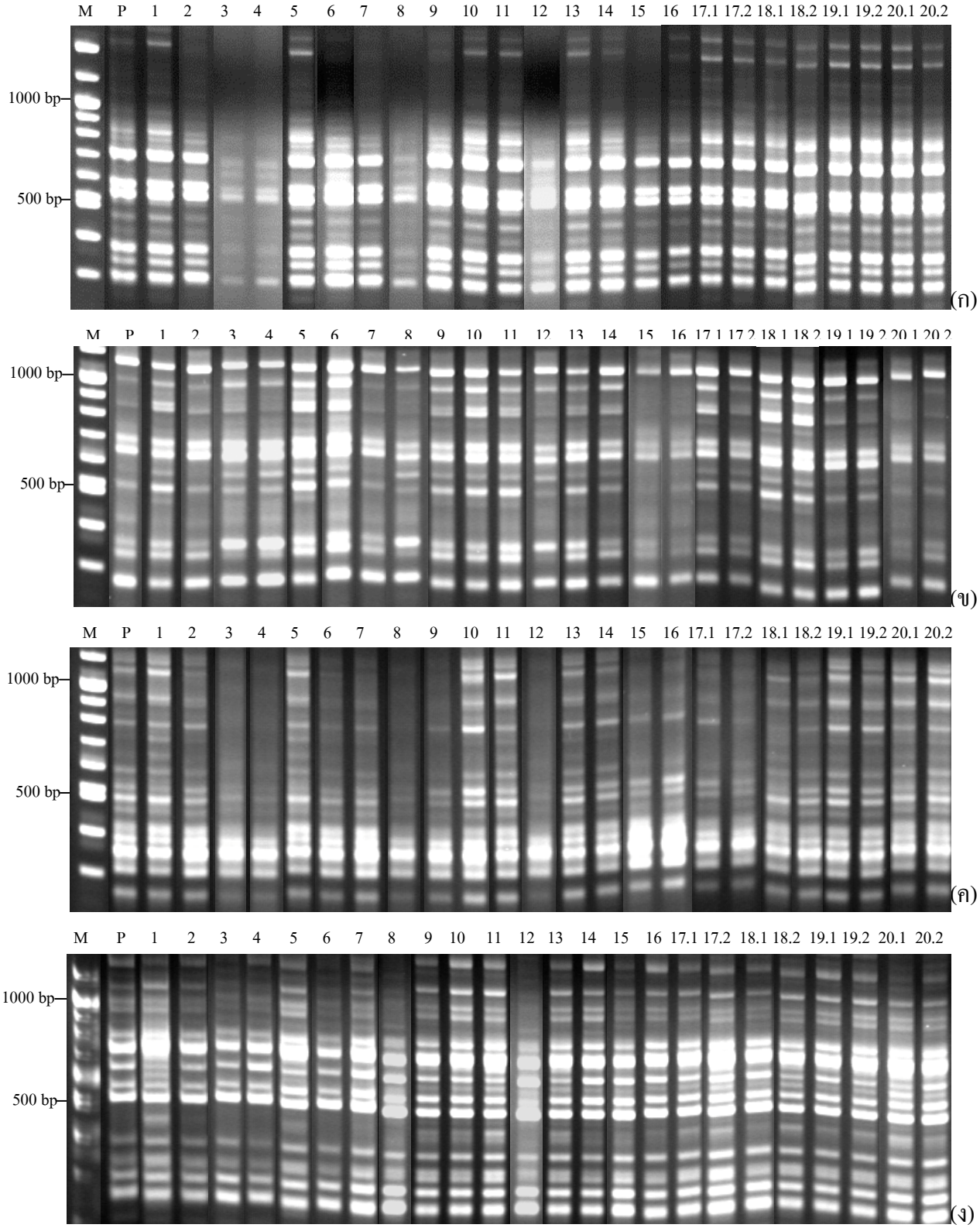
หมายเหตุ หมายเลขต้นที่อักษรตัวแรกซ้ำกัน หมายถึง ต้นกล้าที่ได้จากเมล็ดเดียวกัน (polyembryony) เช่น 3.1, 3.2, 3.3 หมายถึง 1 เมล็ดให้ต้นกล้า 3 ต้น



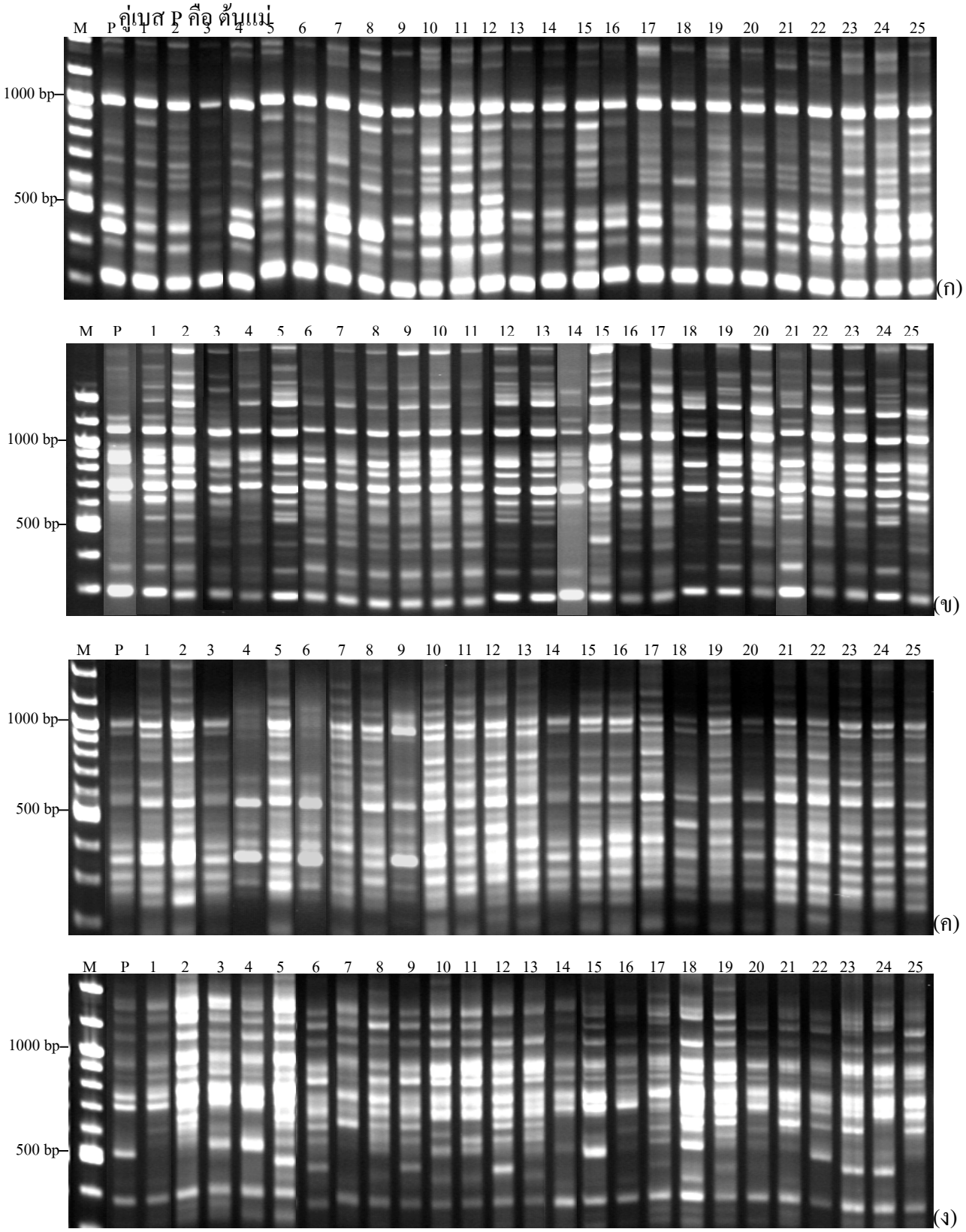
ภาพที่ 9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นกล้าลองกองและต้นแม่ที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้ไพรเมอร์ OPC-05 (ก) OPD-03 (ข) OPT-01 (ค) และ OPT-08 (ง) M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส P คือ ต้นแม่



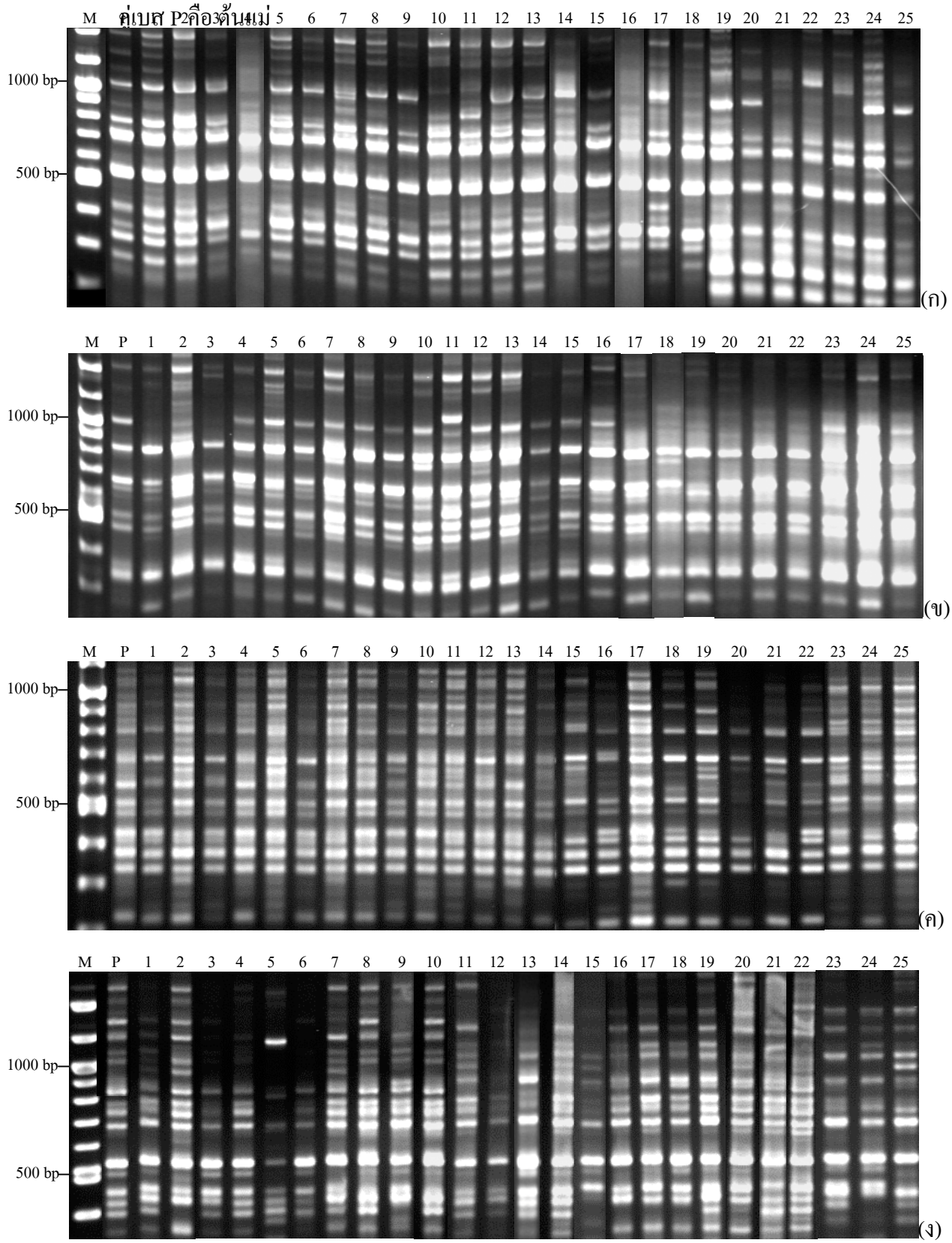
ภาพที่ 10 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นกล้าลางสาดและต้นแม่ที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้ไพรเมอร์ OPA-10 (ก) OPB-04 (ข) OPB-07 (ค) และ OPC-04 (ง) M และ M1 คือ DNA Ladder ขนาด 100 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ P คือ ต้นแม่


M P 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17.1 17.2 18.1 18.2 19.1 19.2 20.1 20.2
1000 bp
500 bp
(ก)
M P 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17.1 17.2 18.1 18.2 19.1 19.2 20.1 20.2
1000 bp
500 bp
(ข)
M P 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17.1 17.2 18.1 18.2 19.1 19.2 20.1 20.2
1000 bp
500 bp
(ค)
M P 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17.1 17.2 18.1 18.2 19.1 19.2 20.1 20.2
1000 bp
500 bp
(ง)

ภาพที่ 11 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นกล้าลางสาดและต้นแม่ที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้ไพรเมอร์ OPC-05 (ก) OPD-03 (ข) OPT-01 (ค) และ OPT-08 (ง) M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส P คือ ต้นแม่



ภาพที่ 12 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นกล้าดูกูและต้นแม่ที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้ไพรเมอร์ OPA-10 (ก) OPB-04 (ข) OPB-07 (ค) และ OPC-04 (ง) M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส P คือ ต้นแม่



ภาพที่ 13 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นกล้าดูกูและต้นแม่ที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้ไพรเมอร์ OPC-05 (ก) OPD-03 (ข) OPT-01 (ค) และ OPT-08 (ง) M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส P คือ ต้นแม่

ตารางที่ 4 ชนิดของไพรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน และเปอร์เซ็นต์จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากต้นแม่ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในกลุ่มต้นกล้าลางสาด

ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน	% จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง
OPA-10	8	2	6	25.00
OPB-04	11	2	9	18.18
OPB-07	12	2	10	16.67
OPC-04	12	2	10	16.67
OPC-05	14	4	10	28.57
OPD-03	13	3	10	23.08
OPT-01	16	3	13	18.75
OPT-08	17	3	14	17.65
รวม	103	21	82	20.57

ตารางที่ 5 ชนิดของไพรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน และเปอร์เซ็นต์จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากต้นแม่ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในกลุ่มต้นกล้าดูกู

ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน	% จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง
OPA-10	12	6	6	50.00
OPB-04	17	7	10	41.18
OPB-07	16	9	7	56.25
OPC-04	16	10	6	62.50
OPC-05	13	7	6	53.85
OPD-03	15	10	5	66.67
OPT-01	18	9	9	50.00
OPT-08	17	11	6	64.71
รวม	124	69	55	55.65

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนต้นแม่ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในต้นกล้าลางสาด และดูกู

ไพรเมอร์	% รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนต้นแม่	
	ลางสาด	ดูกู
OPA-10	77.01	17.78
OPB-04	81.51	18.89
OPB-07	81.13	13.33
OPC-04	75.68	8.89
OPC-05	71.55	15.56
OPD-03	62.36	13.34
OPT-01	56.64	10.00
OPT-08	65.05	4.44
เฉลี่ย	71.37	12.78

ตารางที่ 7 จำนวนรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากต้นแม่ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในต้นกล้าลางสาด และดูกู

ไพรเมอร์	จำนวนจีโนไทป์	
	ลางสาด	ดูกู
OPA-10	2	11
OPB-04	2	12
OPB-07	2	15
OPC-04	2	21
OPC-05	4	13
OPD-03	4	19
OPT-01	2	16
OPT-08	3	24