การพัฒนาวิธีการย้อมสีเนื้อเยื่อพืชด้วยสีย้อมผ้า

(A Development of Staining Method of Plant Tissue Using Fabric Dyes)

วิศิษฐ์ศรี โตศุกลวรรณ[*] อนิษฐาน ศรีนวล[*,] สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ[*,**]**

*ภาควิชาชีววิทยา และ **หน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา กรุงเทพฯ 10110
ผู้นิพนธ์ประสานงาน (corresponding author), สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ, somkiatp@swu.ac.th

บทคัดย่อ

กายวิภาคศาสตร์ของพืชเป็นการศึกษาโครงสร้างภายในของพืชและมีความเชื่อมโยงกับสัณฐานวิทยาและหน้าที่ของพืช ซึ่งในระดับมัธยมศึกษาตอนปลายยังมีปฏิบัติการเรื่องนี้น้อยและไม่ครอบคลุมส่วนต่าง ๆ ทั้งหมดของพืช งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการย้อมสีเซลล์และเนื้อเยื่อพืชโดยใช้สีย้อมผ้าในความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อร่างกายและสิ่งแวดล้อม ผลการทดลองย้อมสีพืชใบเลี้ยงเดี่ยว 3 ชนิด ได้แก่ ข้าวโพด สาวน้อยประแป้ง และว่านกาบหอย พืชใบเลี้ยงคู่ ได้แก่ ได้แก่ ถั่วเขียว เฟื่องฟ้า และกุหลาบหนู พบว่า สีย้อมผ้าสีเขียวและสีแดงที่ละลายในเอทานอลร้อยละ 70 (แอลกอฮอล์ล้างแผล) เข้มข้นร้อยละ 1.0 ซึ่งย้อมสีนาน 3-5 นาที ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ให้การย้อมติดสีได้ใกล้เคียงกับสีสังเคราะห์ (สีฟาสต์กรีนและสีซาฟรานีนโอ) ($p \geq 0.05$)

คำสำคัญ: การย้อมสี/ กายวิภาคศาสตร์/ สีย้อมผ้า/ พืชใบเลี้ยงเดี่ยว/ พืชใบเลี้ยงคู่

Abstract

Plant Anatomy is a study of internal structures of plants and links to morphology and its functions. There are a few laboratory practicals at the senior secondary level, and the contents are not covered in all plant structures. This research aimed at developing a method to stain plant cells and tissues with fabric dyes that are not toxic to human and environment. Three monocotyledons, maize, dumb cane, and boat-lily, as well as three dicotyledons, green bean, paper flower, and fairy rose were used as samples to study in this research. The results indicated that 1.0% green and red fabric dyes in 70% ethanol (wound cleansing) for 3-5 minutes depending on the plant species were stained as synthetic dyes, i.e., fast green FCF and safranin O ($p \geq 0.05$).

Keywords: Staining/ Anatomy/ Fabric dye/ Monocotyledon/ Dicotyledon

บทนำ

การเรียนรู้วิทยาศาสตร์เป็นการศึกษาสภาพธรรมชาติของชีวิตและสิ่งแวดล้อมที่มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต การบรรยายในห้องเรียนเพียงอย่างเดียวไม่อาจทำให้ผู้เรียนเข้าใจเนื้อหาของวิทยาศาสตร์ดังกล่าวได้ทั้งหมด ปัจจุบันการเรียนการสอนวิทยาศาสตร์ในห้องเรียนยังคงใช้วิธีบรรยายเป็นหลัก โดยเฉพาะเนื้อหาชีววิทยา (Phornphisutthimas, 2007) การเรียนการสอนวิชาชีววิทยายังคงเป็นปัญหาสำคัญเนื่องจากผู้เรียนเข้าใจว่า เป็นการท่องจำเนื้อหามาสอบ แต่แท้จริงแล้ว ผู้สอนควรคำนึงถึงเหตุผลที่ทำให้ผู้เรียนไม่เข้าใจ ได้แก่ วิธีการสอนไม่เชื่อมโยงระหว่างความรู้เดิมของผู้เรียนและความรู้ใหม่ที่ได้รับ ทำให้ผู้เรียนไม่สามารถพัฒนาความคิดทางวิชาการ ขาดแคลนอุปกรณ์และวัสดุที่ใช้สอน (Lazarowitz and Penso, 1992) นอกจากนี้ ผู้เรียนอาจเกิดความเข้าใจคลาดเคลื่อนในความรู้เดิมจนทำให้ความรู้ใหม่ที่ได้รับคลาดเคลื่อนไปด้วย (Kindfield, 1991; Lazarowitz and Lieb, 2006) วิธีการทำให้การสอนวิชาชีววิทยาบรรลุวัตถุประสงค์ คือ ต้องทำให้ผู้เรียนเข้าใจในเนื้อหาด้วยการเตรียมวัสดุอุปกรณ์การสอนอย่างง่าย ให้ผู้เรียนได้รับประสบการณ์ตรงจากการลงมือทำปฏิบัติการด้วยตนเอง และผู้สอนต้องใช้กลวิธีจูงใจให้ผู้เรียนซักถามในประเด็นที่ยังไม่เข้าใจหรือเข้าใจคลาดเคลื่อนไป (Wood, 1996)

การสอนชีววิทยาในระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจำเป็นต้องสอนให้ผู้เรียนเริ่มต้นหาคำตอบจากโจทย์คำถามต่าง ๆ ในการทำปฏิบัติการเพื่อพูนศักยภาพในการเข้าใจเนื้อหาทางชีววิทยาอย่างต่อเนื่อง (Haigh, 1993) และการสอนผู้เรียนโดยให้ผู้เรียนผนวกความรู้เดิมและความรู้ใหม่เข้าด้วยกันจะทำให้ผู้เรียนเข้าใจเนื้อหาชีววิทยาได้ดีขึ้น ลักษณะเรียนการสอนดังกล่าวเป็นวิธีการทำให้ผู้เรียนสร้างความรู้ด้วยตนเอง (constructivist learning) (Resnisk, 1986) ซึ่งการทำปฏิบัติการเป็นวิธีหนึ่งที่จะทำให้ผู้เรียนสร้างความรู้ด้วยตนเอง (Laloknam et al., 2008; Phornphisutthimas et al., 2008; von Glaserfeld, 1989) นอกจากนี้วิธีการสร้างความรู้ด้วยตนเองโดยใช้บริบทแวดล้อมยังช่วยให้ผู้เรียนมีความจำในระยะยาวด้วย (Laloknam et al., 2008; Phornphisutthimas et al., 2007)

จากการสำรวจเบื้องต้นเพื่อเลือกหัวข้อในการทำปฏิบัติการ พบว่า ผู้เรียนระดับมัธยมศึกษาตอนปลายของประเทศไทยมีความเข้าใจเกี่ยวเรื่อง “พืช” น้อยกว่าหัวข้ออื่น ๆ ในทางชีววิทยา (Phornphisutthimas et al., unpublished data) ผู้วิจัยจึงตรวจสอบจากหลักสูตรที่เรียนในระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย พบว่า บทปฏิบัติการด้านกายวิภาคศาสตร์ของพืชในระดับมัธยมศึกษาตอนปลายยังมีน้อย จึงสนใจที่จะทำบทปฏิบัติการเรื่องนี้เพิ่มเติม โดยใช้สีที่หาง่าย มีราคาถูก และใช้ในระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อร่างกายมนุษย์และไม่สร้างมลพิษกับสิ่งแวดล้อม

กายวิภาคศาสตร์ของพืชเป็นการศึกษาโครงสร้างภายในของพืชระดับเซลล์และเนื้อเยื่อ วิธีการศึกษาเซลล์และเนื้อเยื่อพืชนี้ส่วนใหญ่ต้องย้อมสีโดยใช้วิธีทางไมโครเทคนิค (microtechnique) (Fahn, 1990; Esau, 1977) และสีที่ใช้โดยส่วนใหญ่มีราคาแพง เช่น สีซาฟรานีนโอ (Safranin O) และสีฟาสต์กรีน (Fast green FCF) มีราคากรัมละ 400 บาท (Sigma-Aldrich, 2012;

Merck, 2011) นอกจากนี้ยังต้องควบคุมอุณหภูมิในการเก็บรักษา (มานิต คิดอยู่, 2552) และสีสังเคราะห์ดังกล่าวย้อมติดสีพืชบางชนิดได้ยาก และการย้อมสีบางชนิดใช้ระยะเวลานาน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่นำมาย้อม (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2549; สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ, 2545) การดัดแปลงวิธีการย้อมสีพืชเพื่อให้สะดวกและประหยัดอาจใช้สารสกัดจากธรรมชาติ สำหรับงานวิจัยนี้เป็นการดัดแปลงวิธีการย้อมสีพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ด้วยสีย้อมผ้า โดยใช้ความเข้มข้นของสีย้อมผ้าในปริมาณที่ไม่เป็นพิษต่อผู้เรียน และเลือกใช้ตัวทำละลายต่าง ๆ ที่หาได้ตามท้องตลาดทั่วไป เพื่อให้สะดวกและประหยัดงบประมาณในการจัดการเรียนการสอนในสถานศึกษา โดยใช้พืชทดสอบ 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ได้แก่ ข้าวโพด (*Zea mays* L.) สาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbachia seguine* (Jacq.) Schott var. *seguine*) ว่านกาบหอย (*Tradescantia spathacea* Stearn.) และกลุ่มพืชใบเลี้ยงคู่ ได้แก่ ถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) เฟื่องฟ้า (*Bougainvillea spectabilis* Willd) และกุหลาบหนู (*Rosa chinensis* (Jacq.) var. *minima* Voss)

อุปกรณ์และวิธีการ

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย้อมสีเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างระหว่างสีสังเคราะห์และสีย้อมผ้า

การเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างทำได้โดยใช้วิธีการลอกผิวใบ (peeling method) จากนั้นย้อมสีฟาสกรีนต์ (Fluka, USA) เข้มข้นร้อยละ 1.0 และสีซาฟรานีนโอ (Fluka, USA) เข้มข้นร้อยละ 1.0 (สีทั้ง 2 ชนิดละลายนี้ในเอทานอลร้อยละ 95) และศึกษาโครงสร้างต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2551; Ruzin, 1999)

การเตรียมตัวอย่างสำหรับย้อมด้วยสีย้อมผ้านั้นใช้วิธีลอกผิวใบเช่นเดียวกับการย้อมสีสังเคราะห์ และย้อมด้วยสีย้อมผ้า (direct dyes) 3 สี (พรเทพ พนม, ไทย) ได้แก่ สีแดง สีเขียว และสีน้ำเงิน เปรียบเทียบการย้อมติดสีของโครงสร้างพืชที่ย้อมด้วยสีสังเคราะห์และสีย้อมผ้าเพื่อคัดเลือกสีย้อมผ้าที่ติดสีโครงสร้างพืชได้ดีที่สุด เพื่อนำไปทดลองในขั้นตอนถัดไป

ศึกษาตัวทำละลายและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการย้อมสีเนื้อเยื่อชั้นผิวใบด้านล่างด้วยสีย้อมผ้า

เนื่องจากตัวทำละลายเอทานอลมีราคาแพง จึงดัดแปลงเอาตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ น้ำประปา และเอทานอลร้อยละ 70 สำหรับล้างแผล (ศิริบัญชา, ไทย) มาใช้แทนเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ในการละลายสีและล้างสีส่วนเกินออก

แปรผันความเข้มของสีเป็น 5 ระดับ ได้แก่ ร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 เปรียบเทียบการติดสีเนื้อเยื่อชั้นผิวใบด้านล่างเพื่อคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมในการย้อมสีเซลล์และเนื้อเยื่อพืชที่ดีที่สุด

ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการย้อมติดสีเซลล์และเนื้อเยื่อภายในโครงสร้างของพืชที่ย้อมด้วยสีย้อมผ้า

การเตรียมตัวอย่างจากโครงสร้างต่าง ๆ ของพืชใช้วิธีตัดชิ้นตัวอย่างด้วยใบมีดโกน (freehand section) ตามวิธีของ Yeung (1998) และย้อมสีด้วยความเข้มข้นที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 ด้วยระยะเวลาที่แตกต่างกัน 5 ระดับ จาก 1 จนถึง 5 นาที

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการติดสีย้อมเพื่อคัดเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ทดสอบในขั้นตอนถัดไป

การศึกษาประสิทธิภาพการติดสีโครงสร้างพืช

การติดสีและความชัดเจนของเซลล์และเนื้อเยื่อของโครงสร้างราก ลำต้น และใบตัดตามขวาง ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (MX530H, Meiji Techno, Japan) และถ่ายภาพด้วยกล้อง INFINITY 2-3c

การศึกษาประสิทธิภาพการย้อมติดสีทำได้โดยให้กลุ่มนิสิตหลักสูตรการศึกษาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์-ชีววิทยา ชั้นปีที่ 3 ที่ผ่านการเรียนวิชากายวิภาคศาสตร์ของพืช และผ่านการทดสอบเปรียบเทียบความเที่ยงของผู้ประเมินประสิทธิภาพ (inter-rater reliability) แล้ว โดยผู้ประเมิน 1 คน ตรวจประสิทธิภาพของการย้อมสีพืช 5 ฟิลด์ (field) ต่อ 1 ชิ้นตัวอย่าง

การประเมินประสิทธิภาพเพื่อเลือกสีและตัวทำละลายใช้เกณฑ์การย้อมติดสีของเซลล์และเนื้อเยื่อพืช และความชัดเจนของการย้อมติดสีของโครงสร้างภายในเซลล์ จำแนกเป็น 4 ระดับ ดังนี้

ระดับ	ลักษณะที่ใช้ตัดสิน
1	โครงสร้างของเซลล์ย้อมไม่ติดสี
2	ย้อมติดสีโครงสร้างภายในเซลล์แต่เห็นรายละเอียดไม่ชัดเจน
3	ย้อมติดสีโครงสร้างภายในเซลล์และเห็นรายละเอียดค่อนข้างชัดเจน
4	ย้อมติดสีโครงสร้างภายในเซลล์และเห็นรายละเอียดชัดเจน

ส่วนการประเมินประสิทธิภาพเพื่อเลือกความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมในการย้อมสี จำแนกโดยใช้การติดสีโครงสร้างและพื้นหลังและความชัดเจนของโครงสร้างภายในเซลล์ ดังนี้

ระดับ	ลักษณะโครงสร้างและการติดสีพื้นหลัง
1	ย้อมไม่ติดสี
2	ย้อมติดสีเล็กน้อย
3	ย้อมติดสีปานกลาง
4	ย้อมติดสีเข้ม
5	ย้อมติดสีเข้มมาก

ระดับ	ความชัดเจนของโครงสร้าง
1	ไม่เห็นรายละเอียดภายในเซลล์
2	เห็นผนังเซลล์ และรายละเอียดภายในเซลล์เล็กน้อยแต่เห็นไม่ชัดเจน
3	เห็นผนังเซลล์และรายละเอียดภายในเซลล์เพิ่มขึ้นและมีความชัดเจนในระดับปานกลาง
4	เห็นผนังเซลล์และรายละเอียดภายในเซลล์ชัดเจนเกือบทั้งหมด และมีความชัดเจนค่อนข้างมาก
5	เห็นผนังเซลล์และรายละเอียดภายในเซลล์ชัดเจนทุกส่วน

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ประสิทธิภาพการย้อมติดสีโดยใช้สถิติพรรณนา ได้แก่ ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวางแผนการทดลองแบบ factorial design in CRD ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS of Windows รุ่น 21.0

ผลการวิจัย

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย้อมสีเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างระหว่างสีสังเคราะห์และสีย้อมผ้า

จากการตรวจสอบประสิทธิภาพการย้อมติดสีเนื้อเยื่อชั้นผิวใบด้านล่างของสาวน้อยประแป้ง โดยย้อมสีเดียว (simple stain) ได้แก่ สีฟาสต์กรีน และสีซาฟรานีนโอ เพื่อคัดเลือกสีฟาสกรีนต์หรือซาฟรานีนโอสำหรับใช้เปรียบเทียบในขั้นตอนถัดไป ผลการทดลอง (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1) พบว่า สีซาฟรานีนโอมีประสิทธิภาพดีกว่าสีฟาสต์กรีน โดยสามารถย้อมติดนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมของเซลล์เนื้อเยื่อชั้นผิวใบ ได้แก่ เซลล์ผิวใบ (epidermal cell) เซลล์คุม (guard cell) และเซลล์ข้างเซลล์คุม (subsidiary cell)

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการของการย้อมติดสีเนื้อเยื่อชั้นผิวใบด้านล่างด้วยสีย้อมผ้า 3 สี ได้แก่ สีแดง สีเขียว และสีน้ำเงิน พบว่า สีแดงและสีเขียวมีประสิทธิภาพการย้อมสีไม่แตกต่างกัน โดยมีการติดสีย้อมในเนื้อเยื่อ และเห็นรายละเอียดภายในเซลล์ค่อนข้างชัดเจน แต่สีน้ำเงินมีประสิทธิภาพการย้อมสีน้อยกว่าสีแดงและสีเขียว (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2) ($p < 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกสีย้อมผ้าสีแดงและสีย้อมผ้าสีเขียวเพื่อนำไปคัดเลือกตัวทำละลายในขั้นตอนต่อไป

ศึกษาตัวทำละลายและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการย้อมสีเนื้อเยื่อชั้นผิวใบด้านล่างด้วยสีย้อมผ้า

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย้อมสีเนื้อเยื่อชั้นผิวใบด้านล่างของสาวน้อยประแป้งที่ย้อมด้วยสีย้อมผ้าสีแดงและสีเขียว ที่ละลายด้วยน้ำประปาและเอทานอลร้อยละ 70 (แอลกอฮอล์ล้างแผล) (ตารางที่ 3 และภาพที่ 3) พบว่า สีแดงและสีเขียวที่ละลายในเอทานอลร้อยละ 70 ย้อมติดสีได้ดีกว่าสีแดงและสีเขียวที่ละลายในน้ำประปา ($p < 0.05$) โดยย้อมติดผนังเซลล์ นิวเคลียสและไซโทพลาซึมของเซลล์ และเห็นรายละเอียดภายในเซลล์ค่อนข้างชัดเจน ดังนั้นจึงเลือกเอทานอลร้อยละ 70 (แอลกอฮอล์ล้างแผล) เป็นตัวทำละลายในขั้นตอนถัดไป

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพการย้อมสีเนื้อเยื่อชั้นผิวใบด้านล่างของสาวน้อยประแป้งที่ย้อมด้วยสีซาฟรานีนโอและสีฟาสต์กรีน เอฟซีเอฟ

N = 125

สีสังเคราะห์	การติดสีและความชัดเจนของโครงสร้างภายในเซลล์ (mean ± SD)					
	เนื้อเยื่อชั้นผิว		ปากใบ			
			เซลล์คุม		เซลล์ข้างเซลล์คุม	
	นิวเคลียส	ไซโทพลาซึม	นิวเคลียส	ไซโทพลาซึม	นิวเคลียส	ไซโทพลาซึม
สีซาฟรานีน	3.57[a]±0.54	3.54[b]±0.74	3.43[b]±0.74	3.60[b]±0.72	3.44[b]±0.72	3.42[b]±0.74
สีฟาสต์กรีน	3.45[a]±0.77	2.95[a]±1.12	3.02[a]±0.92	2.84[a]±0.99	3.07[a]±0.90	2.84[a]±0.95

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพการย้อมสีเนื้อเยื่อชั้นผิวใบด้านล่างของสาวน้อยประแป้งที่ย้อมด้วยสีย้อมผ้าสีแดง สีเขียว และสีน้ำเงิน

N = 125

สีย้อมผ้า	การติดสีและความชัดเจนของโครงสร้างภายในเซลล์ (mean ± SD)					
	เนื้อเยื่อชั้นผิว		ปากใบ			
			เซลล์คุม		เซลล์ข้างเซลล์คุม	
	นิวเคลียส	ไซโทพลาซึม	นิวเคลียส	ไซโทพลาซึม	นิวเคลียส	ไซโทพลาซึม
สีแดง	3.19^{b}±0.90	3.24^{b} ±0.86	3.15^{b}±0.82	3.16^{b} ±0.83	2.90^{b} ±0.90	3.10^{b} ±0.89
สีเขียว	3.39^{b}±0.77	3.18^{b} ±1.00	3.18^{b}±0.89	3.18 ^{b} ±1.02	3.28^{c} ±0.82	3.18^{b} ±0.98
สีน้ำเงิน	2.90^{a}±0.83	2.88^{a}±1.04	2.85^{a}±0.84	2.74 ^{a}±1.04	2.69^{a}±0.72	2.57^{a}±1.05

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพการย้อมสีเนื้อเยื่อชั้นผิวใบด้านล่างของสาวน้อยประแป้งที่ย้อมด้วยสีย้อมผ้าที่ละลายในเอทานอลร้อยละ 70 และสีย้อมผ้าที่ละลายในน้ำประปา

N = 125

สีย้อม	ตัวทำละลาย	การติดสีและความชัดเจนของโครงสร้างภายในเซลล์ (mean ± SD)					
		เนื้อเยื่อชั้นผิว		ปากใบ			
				เซลล์คุม		เซลล์ข้างเซลล์คุม	
		นิวเคลียส	ไซโทพลาซึม	นิวเคลียส	ไซโทพลาซึม	นิวเคลียส	ไซโทพลาซึม
สีเขียว	เอทานอล	3.39^{b}±0.77	3.18^{b}±1.00	3.18^{b}±0.89	3.18^{b}±1.02	3.28^{b}±0.82	3.18^{b}±0.98
	น้ำประปา	2.52^{a}±0.82	2.72^{a}±1.01	2.50^{a}±0.83	2.64^{a}±0.95	2.54^{a}±0.77	2.50^{a} ±0.96
สีแดง	เอทานอล	3.19^{b}±0.90	3.24^{b}±0.86	3.15^{b}±0.82	3.16^{b}±0.83	2.90^{b}±0.90	3.10^{b}±0.89
	น้ำประปา	3.10^{a}±0.87	2.98^{a}±1.02	2.77^{a}±0.96	2.95^{a}±1.10	2.84^{a}±1.03	2.91^{a}±1.11

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย้อมสีเนื้อเยื่อชั้นผิวใบด้านล่างของสาวน้อยประแป้งที่ย้อมด้วยสีสีอมผ้าสีแดงและสีเขียวที่มีร้อยละความเข้มข้นแตกต่างกันในช่วงร้อยละ 0.5-2.5 ผลการทดลอง (ตารางที่ 4 และ ภาพที่ 4) พบว่า สีเขียวและสีแดงที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 และ 1.5 ติดสีชัดเจนที่สุด ($p < 0.05$) จากการเปรียบเทียบรายละเอียดการย้อมติดสีเขียว พบว่า การติดสีโครงสร้างและพื้นหลังไม่แตกต่างกัน แต่ความโครงสร้างที่ย้อมด้วยสีเขียวเข้มข้นร้อยละ 1.0 (4.49±0.61) ชัดเจนกว่าที่ย้อมด้วยสีเขียวเข้มข้นร้อยละ 1.5 (3.77±0.55) ($p < 0.05$) ส่วนสีแดงทั้ง 2 ความเข้มข้นให้การติดสีพื้นฐาน โครงสร้างและรายละเอียดภายในโครงสร้างไม่ต่างกัน ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นร้อยละ 1.0 สำหรับย้อมโครงสร้างอื่น ๆ ของพืชต่อไป

ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการย้อมติดสีเซลล์และเนื้อเยื่อภายในโครงสร้างของพืชที่ย้อมด้วยสีย้อมผ้า

จากการตรวจสอบประสิทธิภาพการย้อมติดสีเซลล์และเนื้อเยื่อพืชในโครงสร้างตามขวางของราก ลำต้น และใบของพืชตัวอย่าง จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ พืชใบเลี้ยงเดี่ยว 3 ชนิด (ข้าวโพด

สาวน้อยประแป้ง และว่านกาบหอย) และพืชใบเลี้ยงคู่ 3 ชนิด (ถั่วเขียว เฟื่องฟ้า และกุหลาบหนู) ที่ย้อมด้วยสีย้อมผ้าละลายในเอทานอลร้อยละ 70 (แอลกอฮอล์ล้างแผล) เข้มข้นร้อยละ 1.0 (ตารางที่ 5 และภาพที่ 5-6) พบว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมในการย้อมโครงสร้างพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ด้วยสีย้อมผ้าสีเขียวและสีแดง คือ 3-5 นาทีขึ้นไป ($p < 0.05$) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชิ้นตัวอย่างของพืชที่นำมาย้อมสี

การศึกษาประสิทธิภาพการติดสีโครงสร้างพืช

เมื่อศึกษาประสิทธิภาพการย้อมสีเซลล์และเนื้อเยื่อพืชที่ย้อมด้วยสีย้อมผ้า ที่ละลายในเอทานอลร้อยละ 70 (แอลกอฮอล์ล้างแผล) เข้มข้นร้อยละ 1.0 เป็นเวลา 3 นาที พบว่า สามารถสังเกตเห็นโครงสร้างภายในเซลล์ เช่น ผนังเซลล์ ไซโท-พลาซึม และนิวเคลียส ได้ชัดเจน

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการย้อมสีเนื้อเยื่อชั้นผิวใบด้านล่างของสาวน้อยประแป้งที่ย้อมด้วยสีย้อมผ้าที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

N = 35

สีย้อมผ้า	เกณฑ์ในการตัดสิน	ความเข้มข้นของสีย้อมผ้า (mean ± SD)				
		ร้อยละ 0.5	ร้อยละ 1.0	ร้อยละ 1.5	ร้อยละ 2.0	ร้อยละ 2.5
สีเขียว	การติดสีของโครงสร้าง	2.89^{a}±0.87	2.91^{a}±0.45	3.17^{a}±0.62	3.91^{b}±0.56	4.51^{c}±0.61
	การติดสีของพื้นหลัง	1.51^{a}±0.66	2.43^{b}±0.66	2.29^{b}±0.86	2.66^{b}±0.91	3.43^{c}±0.61
	ความชัดเจนของโครงสร้าง	4.06^{b}±1.00	4.49^{c}±0.61	3.77^{a}±0.55	4.49^{c}±0.66	4.11^{b}±0.58
สีแดง	การติดสีของโครงสร้าง	2.06^{a}±0.97	2.51^{b}±0.82	3.03^{c}±0.71	3.74^{d}±0.44	3.77^{d}±0.43
	การติดสีของพื้นหลัง	1.54^{a}±0.61	2.31^{b}±0.53	2.34^{b}±0.77	3.69^{c}±0.58	4.26^{d}±0.56
	ความชัดเจนของโครงสร้าง	3.60^{a}±0.50	4.40^{b}±0.88	4.49^{b}±0.51	4.31^{b}±0.72	4.17^{b}±0.75

อภิปรายและสรุปผล

บทปฏิบัติการ เรื่อง “กายวิภาคศาสตร์ของพืช” ที่สร้างขึ้นโดยใช้สีย้อมผ้าในปริมาณที่ไม่เป็นอันตรายต่อผู้เรียนและสิ่งแวดล้อมนี้พัฒนาขึ้นเพื่อใช้กับผู้เรียนในระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โดยอาจเป็นบทเรียนเสริมหรือแทนที่ปฏิบัติการเดิมที่มีอยู่ซึ่งใช้สีซาฟรานีนหรือน้ำยาอุทัย เข้มข้นร้อยละ 1 ตามบทปฏิบัติการในกิจกรรมเรื่อง “โครงสร้างภายในลำต้น ราก และใบ” ตามหลักสูตรแกนกลางการศึกษาขั้นพื้นฐาน พ.ศ. 2551 (สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2554) การพัฒนาบทปฏิบัติการนี้มีจุดประสงค์สำคัญเพื่อลดการใช้สีสังเคราะห์ที่มีราคาแพง และอาจเป็นอันตรายต่อผู้เรียน การย้อมสีด้วยน้ำยาอุทัยให้ผลการติดสีไม่ชัดเจน ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนมาใช้สีย้อมผ้าในปริมาณต่ำ แทนสีทั้ง 2 ชนิดที่กล่าวข้างต้น

สีย้อมผ้าที่ใช้ในการย้อมสีเซลล์และเนื้อเยื่อพืชนี้เป็นสีย้อมผ้าประเภทไดเร็กต์ (direct dye) มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ย้อมง่าย หาซื้อได้ทั่วไปตามท้องตลาด และมีราคาถูก ส่วนใหญ่สีไดเร็กต์ที่ใช้

ย้อมผ้าเป็นสีประเภทกรด (acid dye) 4 กลุ่ม ได้แก่ เอโซ (azo) แอนทราควิโนน (anthraxquinone) พรี-เมทัลไลซ์ (premetalized) และไตรฟีนิลมีเทน (triphenyl methane) (Drama Trading Co., 2012) และส่วนใหญ่แตกตัวให้ประจุลบกลุ่มซัลโฟเนต (sulfonate group) เมื่อละลายน้ำทำให้สีแตกตัวให้ประจุลบ และเมื่อละลายในเอทานอลร้อยละ 70 พบว่า สีย้อมผ้าสามารถย้อมติดโครงสร้างของเซลล์ที่มีสมบัติเป็นกรด เช่น ผนังเซลล์และนิวเคลียส สีย้อมผ้าไดเร็กต์นี้ย้อมติดสีเส้นใยเซลลูโลสโดยอาศัยแรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals interaction) และพันธะไฮโดรเจน จึงไม่ต้องเติมสารช่วยติดสี (mordant) ดังนั้นเมื่อนำสีเหล่านี้มาใช้ในการย้อมสีเซลล์และเนื้อเยื่อพืช การย้อมติดสีจึงมีลักษณะเช่นเดียวกับการย้อมผ้า โดยใช้แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลของสีย้อมผ้ากับโครงสร้างต่าง ๆ ของเซลล์ (อภิชาติ สนธิสมบัติ, 2545) การย้อมผ้าให้ติดเข้มดี ส่วนใหญ่ใส่สารพวกออกไซด์ของเหล็ก เพื่อช่วยในการติดสีให้เข้มขึ้น ดังนั้นสีไดเร็กซ์บางยี่ห้อจึงเติมพวกออกไซด์ของเหล็กเพื่อช่วยในการติดสีให้ดีขึ้น (สายสุณีย์ ลิ้มชูวงศ์ และคณะ, 2551)

จากทดสอบการย้อมสีโครงสร้างภายในของราก ลำต้น และใบ ด้วยสีไดเร็กซ์ พบว่า สีไดเร็กซ์ย้อมติดนิวเคลียสและผนังเซลล์ทุติยภูมิเช่นเดียวกับสีซาฟรานีนโอ และย้อมติดไซโทพลาสซึมและผนังเซลล์ปฐมภูมิเช่นเดียวกับสีฟาสต์กรีน เอฟซีเอฟ (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2549) เมื่อเปรียบเทียบตัวทำลายสีระหว่างน้ำประปาและเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 (แอลกอฮอล์ล้างแผล) พบว่า สีย้อมผ้าที่ละลายในเอทานอลย้อมติดโครงสร้างของเซลล์ได้ดีกว่าสีย้อมผ้าที่ละลายในน้ำประปา เนื่องจากเอทานอลเป็นสารที่มีสภาพขั้ว (polarity) มากกว่าน้ำ จึงแตกตัวให้หมู่ไฮดรอกซิล (OH^-) จึงทำปฏิกิริยากับสีย้อมผ้าพวกสีกรด (acid dye) ซึ่งเป็นเกลือของกรด เช่น กรดซัลฟิวริก กรดคาร์-บอนิก กรดอินทรีย์ที่มีฟีนอลเป็นองค์ประกอบได้ง่าย นอกจากนี้ขั้วของอะตอมไฮโดรเจนในหมู่ไฮดรอกซิลเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ไฮดรอกซิลของสีย้อมด้วย (Bruice, 2004; Daneshvar, 2003; Horobin, 2002) ดังนั้นเอทานอลจึงละลายสีย้อมได้ดีกว่าน้ำ และทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบของเซลล์พืชที่มีประจุลบได้ดี เช่น สภาพขั้วลบของดีเอ็นเอในนิวเคลียส การใช้สีย้อมผ้าความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ในเอทานอลร้อยละ 70 จึงย้อมติดโครงสร้างภายในเซลล์ได้ชัดเจน ได้ในลักษณะเช่นเดียวกับซาฟรานีน โอและสีฟาสกรีนต์ เอฟซีเซฟ (สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ และคณะ, 2552) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ ประอรจิตนอก (2553) ซึ่งดัดแปลงวิธีการย้อมสีเซลล์และเนื้อเยื่อลำต้นหมอน้อย (*Vernonia cinera* (L.) Less) ใบข้าวโพด (*Zea mays* L.) และใบถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) โดยใช้สีย้อมผ้าสีแดง สีน้ำเงิน และสีชมพู เข้มข้นร้อยละ 1 ในเอทานอล 95% โดยไม่ต้องใส่สารช่วยติดสี แต่เมื่อใส่สารช่วยติดสี สีชมพูสามารถย้อมติดเซลล์และเนื่อเยื่อของพืชดังกล่าวได้ดีที่สุด

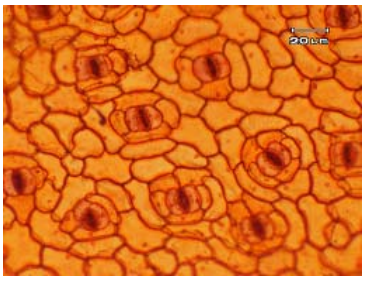
ระยะเวลาในการย้อมสีโครงสร้างต่าง ๆ ของพืชด้วยสีย้อมผ้าแตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช รวมถึงวิธีการเตรียมตัวอย่างพืช เบื้องต้น พืชบางชนิดมียาง เช่น สาวน้อยประแป้ง มะม่วง หรือมีเมือก เช่น ว่านกาบหอย ต้องล้างเมือกหรืออาจแช่ในน้ำอุ่นเพื่อเอาเมือกหรือยางออกก่อนย้อมสี (สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ และ

คณะ, 2545; 2552; Phornphisutthimas et al., 2010) การเรียนการสอนในระดับมัธยมศึกษาควรเลือกชนิดของพืชที่หาง่ายและมีเมือกน้อย เพื่อให้เตรียมตัวอย่างพืชได้ง่ายหรือผู้สอนอาจต้องเตรียมตัวอย่างพืชก่อนจึงจะเรียนรู้ได้ตรงตามแผนการจัดการเรียนรู้ที่คาดหวังไว้ การเตรียมตัวอย่างพืชและย้อมด้วยสีย้อมผ้าสำหรับการเรียนรู้ในห้องเรียนนั้นเป็นการเตรียมสไลด์สด อย่างไรก็ตาม การทำสไลด์ถาวรของพืชชนิดต่าง ๆ เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเรียนการสอนทุกระดับ เพื่อให้ผู้เรียนได้เรียนรู้จากประสบการณ์ตรง มีความจำในระยะยาว (long-termed memory) และเข้าใจในเนื้อหาที่กำลังเรียนรู้ได้มากขึ้นด้วย

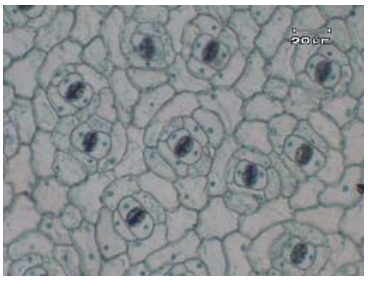
ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพการย้อมสีเนื้อเยื่อภายในโครงสร้างของราก ลำต้น และใบของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่ที่ย้อมด้วยสีย้อมผ้า

N = 30

สีย้อม	ชนิดของพืช	ความชัดเจนและการติดสี	ระยะเวลาในการย้อมสี (mean ± SD)				
			1 นาที	2 นาที	3 นาที	4 นาที	5 นาที
สีเขียว	พืชใบเลี้ยงเดี่ยว	การติดสีของโครงสร้าง	1.90^{a}±0.55	2.67^{b}±0.76	3.28^{c}±0.60	4.03^{d}±0.59	4.36^{e}±0.51
		การติดสีของพื้นหลัง	1.68^{a}±0.60	2.27^{b}±0.50	3.15^{c}±0.87	3.52^{d}±1.01	3.97^{e}±0.95
		ความชัดเจนของโครงสร้าง	3.38^{a}±1.00	3.59^{b}±0.94	4.14^{c}±0.87	4.27^{d}±0.79	4.38^{e}±0.73
	พืชใบเลี้ยงคู่	การติดสีของโครงสร้าง	1.87^{a}±0.37	2.54^{b}±0.61	3.04^{c}±0.75	3.77^{d}±0.81	4.06^{e}±0.80
		การติดสีของพื้นหลัง	1.36^{a}±0.49	2.16^{b}±0.55	3.07^{c}±0.69	3.72^{d}±0.81	4.13^{e}±0.73
		ความชัดเจนของโครงสร้าง	3.61^{a}±1.24	3.94^{b}±1.03	4.40^{c}±0.78	4.47^{d}±0.71	4.75^{e}±0.43
สีแดง	พืชใบเลี้ยงเดี่ยว	การติดสีของโครงสร้าง	1.96^{a}±0.47	2.70^{b}±0.77	3.45^{c}±0.79	4.21^{d}±0.61	4.38^{e}±0.57
		การติดสีของพื้นหลัง	1.80^{a}±0.61	2.50^{b}±0.63	3.19^{c}±0.94	3.71^{d}±0.99	3.96^{e}±0.96
		ความชัดเจนของโครงสร้าง	3.35^{a}±1.16	3.68^{b}±0.97	3.77^{c}±1.00	4.09^{d}±0.88	4.26^{e}±0.88
	พืชใบเลี้ยงคู่	การติดสีของโครงสร้าง	2.21^{a}±0.62	3.03^{b}±0.63	3.65^{c}±0.67	4.01^{d}±0.65	4.38^{e}±0.57
		การติดสีของพื้นหลัง	1.75^{a}±0.82	2.59^{b}±0.74	3.38^{c}±0.75	3.90^{d}±0.86	4.18^{e}±0.72
		ความชัดเจนของโครงสร้าง	3.72^{a}±1.01	3.96^{b}±0.96	4.16^{c}±0.95	4.24^{d}±0.93	4.39^{e}±0.94

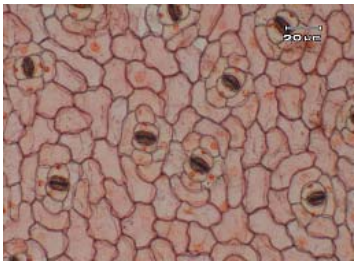


(ก)

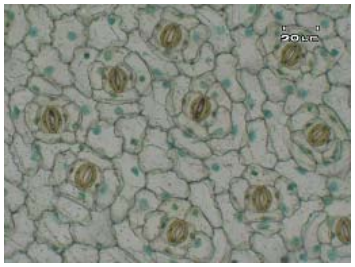


(ข)

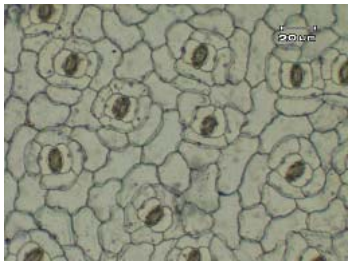
ภาพที่ 1 เนื้อเยื่อชั้นผิวใบด้านล่างของสาวน้อยประแป้งที่ย้อมด้วยสีสังเคราะห์
(ก) ย้อมด้วยสีซาฟรานีน และ (ข) ย้อมด้วยสีฟาสต์กรีน



(ก)

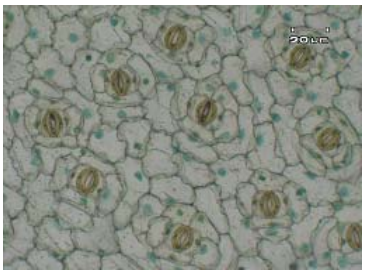


(ข)



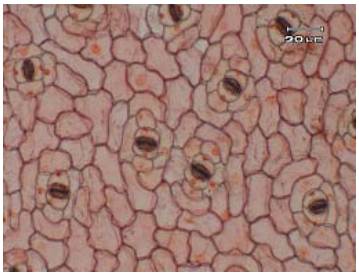
(ค)

ภาพที่ 2 เนื้อเยื่อชั้นผิวใบด้านล่างของสาวน้อยประแป้งที่ย้อมด้วยสีย้อมผ้า
(ก) สีย้อมผ้าสีแดง (ข) สีย้อมผ้าสีเขียว และ (ค) สีย้อมผ้าสีน้ำเงิน

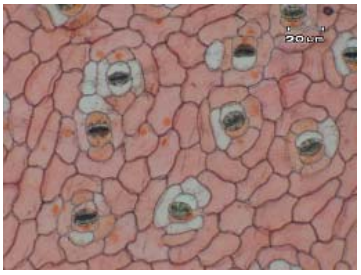


(ก)

(ข)

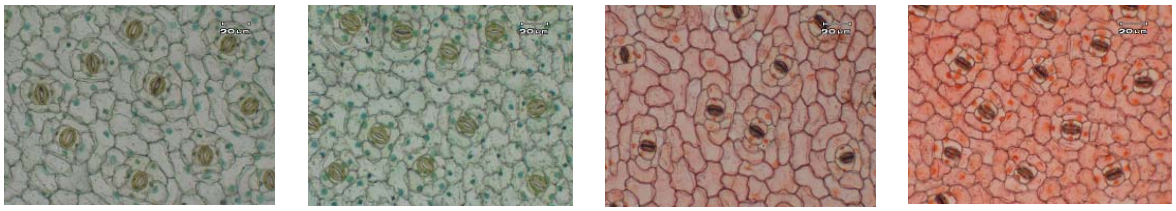


(ค)



(ง)

ภาพที่ 3 เนื้อเยื่อชั้นผิวใบด้านล่างของสาวน้อยประแป้งที่ย้อมด้วยสีย้อมผ้า
(ก) สีย้อมผ้าสีเขียวที่ละลายในเอทานอล (ข) สีย้อมผ้าสีเขียวที่ละลายในน้ำประปา
(ค) สีย้อมผ้าสีแดงที่ละลายในเอทานอล และ (ง) สีย้อมผ้าสีแดงที่ละลายในน้ำประปา

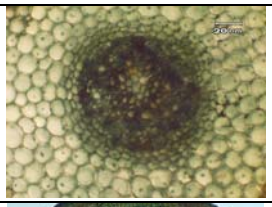
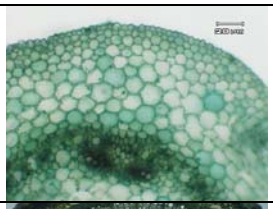
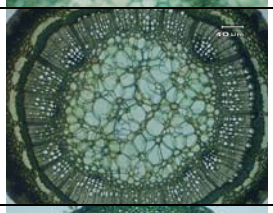
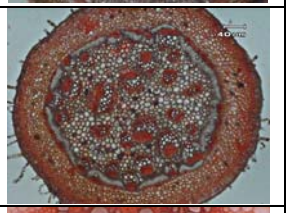
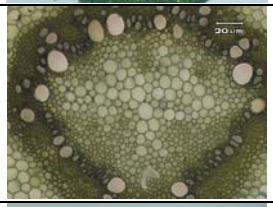
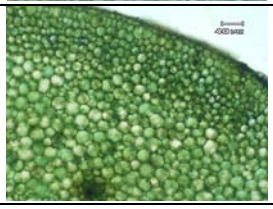
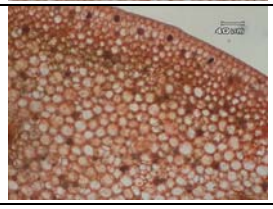


(ก) (ข) (ค) (ง)

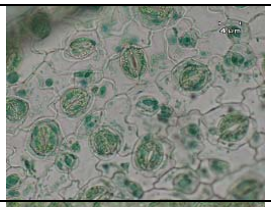
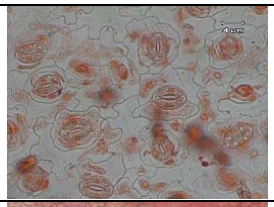
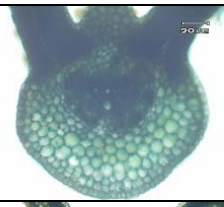
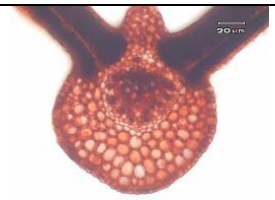
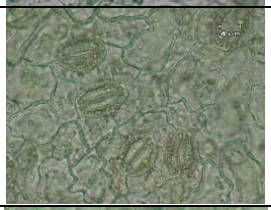
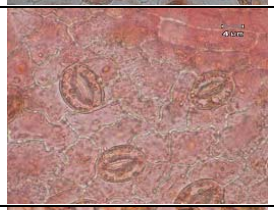
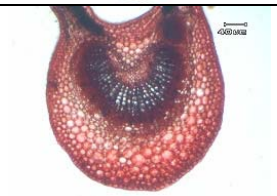
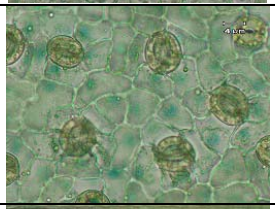
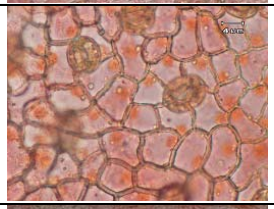
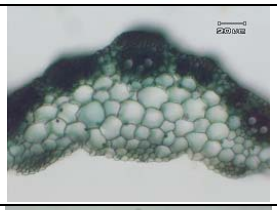
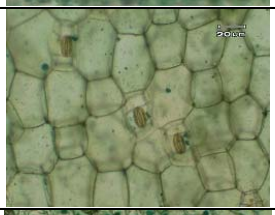
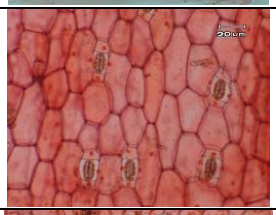
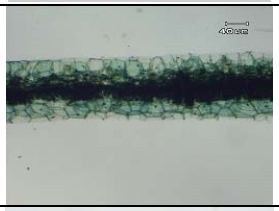
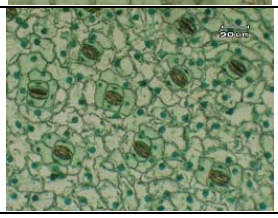
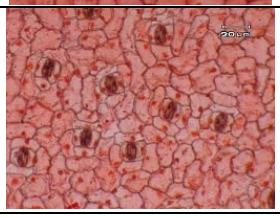
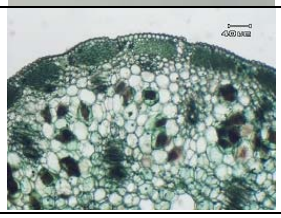
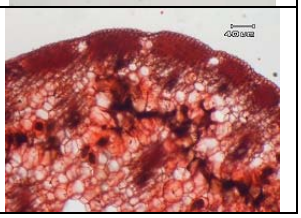
ภาพที่ 4 เนื้อเยื่อชั้นผิวใบด้านล่างของสาวน้อยประแป้งที่ย้อมด้วยสีย้อมผ้า

(ก) สีเขียว เข้มข้นร้อยละ 1.0 (ข) สีเขียว เข้มข้นร้อยละ 1.5

(ค) สีแดง เข้มข้นร้อยละ 1.0 และ (ง) สีแดง เข้มข้นร้อยละ 1.5

ชนิดของพืช	ราก		ลำต้น	
	สีเขียว	สีแดง	สีเขียว	สีแดง
ถั่วเขียว				
กุหลาบ				
เฟื่องฟ้า				
ข้าวโพด				
ว่านกาบหอย				
สาวน้อยประแป้ง				

ภาพที่ 5 โครงสร้างตามขวางของรากและลำต้นของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่ที่ย้อมด้วยสีย้อมผ้า

ชนิดของพืช	แผ่นใบ		ก้านใบ	
	สีเขียว	สีแดง	สีเขียว	สีแดง
ถั่วเขียว				
กุหลาบ				
เฟื่องฟ้า				
ข้าวโพด				
ว่านกาบหอย				
สาวน้อยประแป้ง				

ภาพที่ 6 เนื้อเยื่อชั้นผิวใบและโครงสร้างตามขวางของใบพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่ที่ย้อมด้วยสีย้อมผ้า

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากบัณฑิต-วิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่สัญญา 218/2554

เอกสารอ้างอิง

ประศาสตร์ เกื้อมณี. (2551). **เทคนิคเนื้อเยื่อพืช**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประอร จิตนอก. (2553). **การย้อมเนื้อเยื่อลำต้นและใบพืชด้วยสีย้อมผ้า**. โครงงานวิทยาศาสตร์ หลักสูตรการศึกษาบัณฑิต สาขา

วิชาวิทยาศาสตร์-ชีววิทยา. กรุงเทพฯ:คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

มานิต คิดอยู่. (2552). สีย้อมธรรมชาติจากฝางสำหรับการศึกษาเซลล์และเนื้อเยื่อพืช. **วารสารพฤกษศาสตร์ไทย** 1(2): 61-69.

สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงศึกษาธิการ. (2554). **หนังสือเรียน รายวิชาเพิ่มเติม ชีววิทยา เล่ม 3 กลุ่มสาระการเรียนรู้วิทยาศาสตร์**. กรุงเทพฯ: องค์การค้าของ สกสค.

สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ สถาพร วรรณธนวิจารณ์ รังสรรค์ สุวรรณบุตร และวิราวรรณ บุดดา. (2545). การดัดแปลงการย้อมสีปากใบพืช. **ราชภัฏวิจัยครั้งที่ 4**. ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพฯ.

สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ สายสุณีย์ ลิ้มชูวงศ์ ชนาธิป ไชยเหล็ก และ สมฤทัย หอมชื่น. (2552). การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการย้อมด้วยสีซาฟรานีนโอและฟาสกรีน ซาฟรานีนโอและแอนิลีน และไวเกริท์ฮีมาโทซิลีน สำหรับศึกษาปากใบ. **การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 35**. โรงแรมเดอะไทด์ รีสอร์ท (หาดบางแสน), ชลบุรี.

สายสุณีย์ ลิ้มชูวงศ์ ชาริณี สัมพันธารักษ์ และ สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ. (2551). การย้อมสีโครโมโซมรากหอมแดงด้วยสีสกัดจากพืช. **นเรศวรวิจัย ครั้งที่ 4**. มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก.

อภิชาติ สนธิสมบัติ. (2545). **กระบวนการทางเคมีสิ่งทอ**. กรุงเทพฯ: ซีเอ็ดยูเคชั่น.

Bruice, P. Y. (2004). **Organic Chemistry**. 4th ed. Upper Saddle, NJ: Pearson Education.

Daneshvar, N., Salari, D., and Khataee, A. R. (2003). Photocatalytic degradation of azo dye acid red 14 in water: Investigation of the effect of operational parameters. **J. Photochem. Photobiol. A: Chem.** 157: 111-116.

Drama Trading Co. (2012). **How acid dyes work?** Retrieved October 17, 2012 from http://www.dharmatrading.com/html/eng/9332935-aa.shtml.

Esau, K. (1977). **Anatomy of seed plants**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons.

Fahn, A. (1990). **Plant anatomy**. 3rd ed. Oxford: Pergamon.

Haigh, M. A. (1993). "Hands on - Minds on": Introducing openness into senior biology practical work. **Res. Sci. Educ**. 23: 110-117.

Horobin, R.W. (2002) Theory of staining and its practical implications. In J. D. Bancroft and M. Gamble. **Theory and Practice of Histological Techniques**, 5th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone.

Laloknam, S., Sirisopana, S., and Phornphisutthimas, S. (2010). Learning Retention in Undergraduate Biology using A Hands-on Practical "Enzyme Detection from Vegetables and Fruits". **J. Chem. Chem. Eng.** 4(5): 29-35.

Laloknam, S., Sirisopana, S., Phornphisutthimas, S., Saelim, S., and Pleetangkai, R. (2008). Study on detection of protease activity from vegetables in undergraduate class-room. **The 34th Congress on Science and Technology of Thailand**. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand.

Lazarowitz, R. and Penso, S. (1992). High school student's difficulties in learning biology concepts. **J. Biol. Educ.** 26: 215-223.

Lazarowitz, R., and Lieb, C. (2006). Formative assessment pre-test to identify college students' prior knowledge, misconceptions and learning difficulties in biology. **Inter. J. Sci. Math. Educ.** 4: 741-762.

Phornphisutthimas, S. (2007). **Developing and Evaluating Thai Students' Understandings of Bacterial Conjugation and Protein Puri-fication Using Practical Works**. Ph.D Thesis in Science and Technology Education, Mahidol University.

Phornphisutthimas, S., Leepairotkun, K., Koben, J., Laloknam, S., Limchoowong, S., and Poopitayastaporn, K. (2008, October). Learning biomolecules through an online-learning lesson by constructivism at senior secondary and undergraduate levels, **The 34th Congress on Science and Tech-nology of Thailand**. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand.

Phornphisutthimas, S., Thamchaipenet, A., Panij-pan, B. (2007). Understanding bacterial conjugation through hands-on practical activities. **ICASE Asian Symposium 2007**. Pattaya, Thailand.

Resnick, L. B. (1989). Introduction. In Resnick L. B. (ed), **Knowing, learning, and instruction: Essays in honour of Robert Glaser**. Hullsdale, NJ: Erbrum pp. 1-24.

Ruzin, S. E. (1999). **Plant microtechnique and microscopy**. New York: Oxford University.

von Glaserfeld, E. (1989). Cognition, construction of knowledge, and teaching. **Synthese** 80: 121-140.

Wood, E. J. (1996). Laboratory work in bio-chemical education: Purpose and practice. **Biochem. Educ**. 24: 132-137.

Yeung, C. E. (1998). A beginner's guide to the study of plant structure. **Proceeding of the 19th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE)**. pp. 125-142.

Phornphisutthimas, S., Limchoowong, S., Bura-budtong, P. and Srinual, A. (2010, March). Leaf epidermal anatomy of some plants using Weigert's hematoxylin method. **The 4th Botanical Conference of Thai-land**. Lotus Pang Suan Kaew Hotel, Chiangmai, Thailand.