บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

พืชทดลองใช้อังกาบ 2 ชนิดคือ *Barleria cristata* Linn. ได้แก่พันธุ์สีม่วง (V) ขาว (W) และขาวแถบม่วง (WV) และอีกชนิดหนึ่งคือ *Barleria repens* Nees. ได้แก่พันธุ์สีแดง (R) (ภาพที่ 1) จากสวนเจ็ดยอด อ. เมือง จ. เชียงใหม่ แล้วทำการขยายพันธุ์โดยการปักชำในวัสดุที่มีส่วนผสมของ แกลบเผาและขุยมะพร้าวในอัตราส่วน 1:1 กิ่งชำจะออกรากหลังจากชำประมาณ 15 วันจึงย้ายออกปลูกในกระถางขนาด 6 นิ้ว วัสดุปลูกมีส่วนผสมของ ดินร่วน ขุยมะพร้าว เปลือกข้าวและเปลือกถั่ว อัตราส่วน 1:1:1:1 โดยปริมาตร

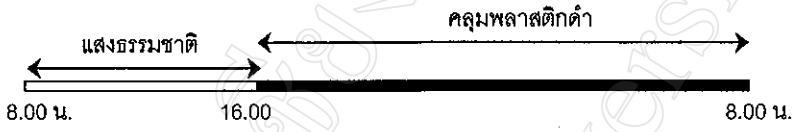
ภาพที่ 1 ลักษณะดอกอังกาบ 4 พันธุ์ ที่ใช้ในการศึกษา
พันธุ์สีม่วง(V) ขาว(W) และ ขาวแถบม่วง (WV) เป็นชนิด *B. cristata* และพันธุ์สีแดง เป็นชนิด *B. repens*

การทดลองที่ 1 ผลของความยาววัน ความเข้มแสงและอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตและการออกดอกของอังกาบ

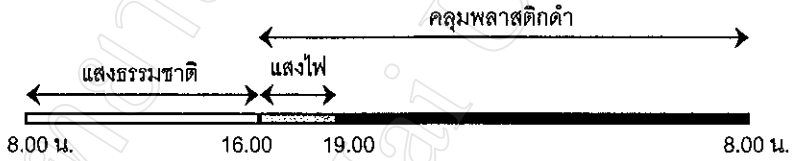
1.1 ผลของความยาววัน

1.1.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ กรรมวิธีการศึกษาแสดงดังภาพที่ 2

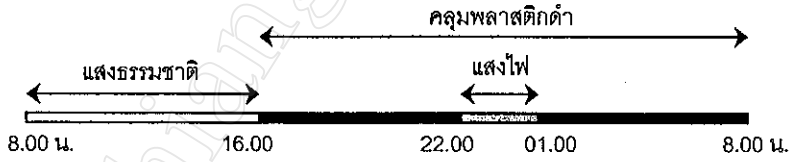
กรรมวิธีที่ 1 ได้รับแสงธรรมชาติ 8 ชั่วโมง ระหว่างเวลา 8.00 น. ถึง 16.00 น.



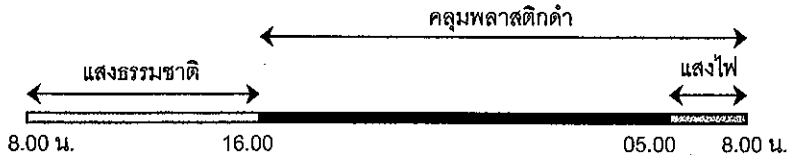
กรรมวิธีที่ 2 ได้รับแสงต่อจากแสงธรรมชาติเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ระหว่าง 16.00 น.-19.00 น.



กรรมวิธีที่ 3 ได้รับแสงตอนกลางของช่วงมืดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ระหว่าง 22.00 น.- 01.00 น.



กรรมวิธีที่ 4 ได้รับแสงก่อนสว่างเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ระหว่าง 05.00 น. - 08.00 น.



ภาพที่ 2 กรรมวิธีการศึกษาผลของความยาววัน

1.1.2 การเตรียมตู้ทดลองควบคุมความยาววัน

การเตรียมตู้ทดลองควบคุมความยาววันทั้ง 4 กรรมวิธี ทำโดยปิดพลาสติกดำคลุมตู้ทดลองพร้อมกันเวลา 16.00 น. และเปิดออกเวลา 8.00 น. โดยแต่ละกรรมวิธีจะแตกต่างกันตรงที่การให้แสงสว่างโดยใช้หลอด incandescent มีความเข้มแสงเฉลี่ย 4,500 ลักซ์ ติดตั้ง Timer เป็นตัวตั้งเวลาเปิด/ปิดไฟตามเวลาที่กำหนดในแต่ละกรรมวิธี เมื่อปิดพลาสติกดำคลุมตู้ทดลองแล้วเปิดพัดลมดูดอากาศเพื่อระบายความร้อน

1.1.3 ขั้นตอนการศึกษา

นำอังกาบที่ปลูกในกระถาง จัดวางในตู้ควบคุมความยาววัน จัดให้ได้รับสภาพวันจำนวน 4 ซ้ำต่อพันธุ์ต่อกรรมวิธี

1.1.4 การบันทึกข้อมูล

บันทึกความสูงต้นทุก 2 สัปดาห์ และเมื่อครบ 12 สัปดาห์ บันทึกจำนวนใบ จำนวนกิ่งแขนง จำนวนวันที่ออกดอก และจำนวนดอก

1.2 ผลของความเข้มแสง

1.2.1วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์

กรรมวิธีที่ 1 ปลูกในโรงเรือนไม่พรางแสง มีความเข้มแสงเฉลี่ย 65,000 ลักซ์

กรรมวิธีที่ 2 ปลูกในโรงเรือนพรางแสง มีความเข้มแสงเฉลี่ย 25,000 ลักซ์

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกในโรงเรือนพรางแสง มีความเข้มแสงเฉลี่ย 5,000 ลักซ์

กรรมวิธีที่ 4 ปลูกในโรงเรือนพรางแสง มีความเข้มแสงเฉลี่ย 1,500 ลักซ์

1.2.2 ขั้นตอนการศึกษา

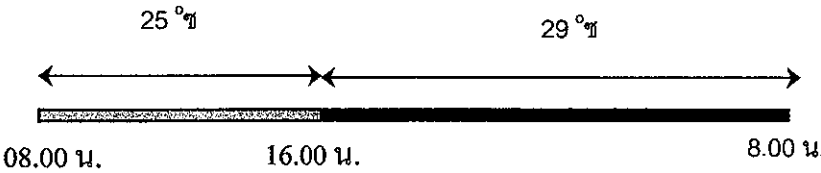
นำต้นอังกาบทั้ง 4 พันธุ์ พันธุ์ละ 10 ต้น ให้ได้รับความเข้มแสงระดับต่างๆ

1.2.3 การบันทึกข้อมูล ความสูงทุกๆ 2 สัปดาห์ เมื่อครบ 14 สัปดาห์ บันทึกจำนวนใบ จำนวนกิ่งแขนง จำนวนวันที่ออกดอก และจำนวนดอก

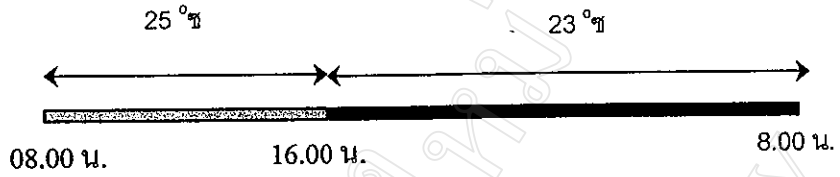
1.3 ผลของอุณหภูมิ

1.3.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ กรรมวิธีการศึกษาแสดงดังภาพที่ 2

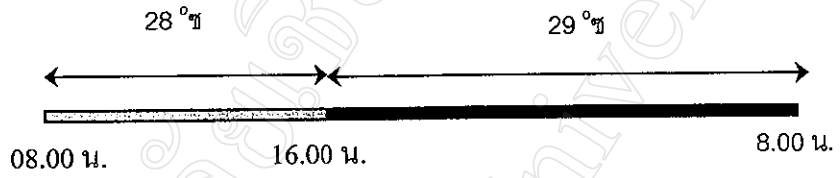
กรรมวิธีที่ 1 ได้รับอุณหภูมิกลางวัน 25°ซ อุณหภูมิกลางคืน 29°ซ



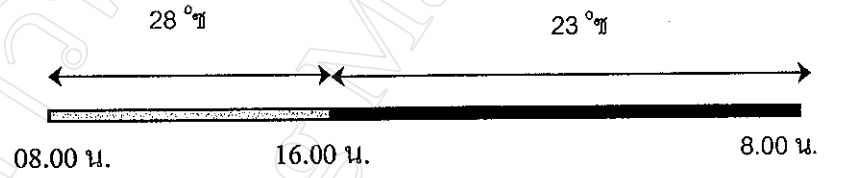
กรรมวิธีที่ 2 ได้รับอุณหภูมิกลางวัน 25°ซ อุณหภูมิกลางคืน 23°ซ



กรรมวิธีที่ 3 ได้รับอุณหภูมิกลางวัน 28°ซ อุณหภูมิกลางคืน 29°ซ



กรรมวิธีที่ 4 ได้รับอุณหภูมิกลางวัน 28°ซ อุณหภูมิกลางคืน 23°ซ



ภาพที่ 3 กรรมวิธีการศึกษาผลของอุณหภูมิ

1.3.2 การเตรียมห้องทดลอง

ห้องทดลองเป็นห้องทึบให้แสงจากหลอด fluorescent และ incandescent ความเข้มแสงเฉลี่ย 6,000 ลักซ์

1.3.3 ขั้นตอนการศึกษา

นำต้นอังกาบทั้ง 4 พันธุ์ที่เตรียมไว้จัดให้ได้รับอุณหภูมิตามกรรมวิธีที่กำหนด พันธุ์ละ 6 ต้น เป็นเวลา 12 สัปดาห์

1.3.4 บันทึกข้อมูล ความสูงทุกๆ 2 สัปดาห์ เมื่อครบ 12 สัปดาห์ บันทึกจำนวนใบ จำนวนวันที่ออกดอก และจำนวนดอก

การทดลองที่ 2 การศึกษาการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมตัวเองและผสมข้าม

2.1 การผสมพันธุ์

2.1.1 การผสมพันธุ์ เลือกดอกที่อยู่ในระยะตูมและพร้อมที่จะบานในวันรุ่งขึ้นเพื่อทำหมันดอกโดยใช้มีดตัดกลีบดอกและใช้คีมคีบเกสรตัวผู้ออกให้เหลือเฉพาะส่วนของเกสรตัวเมีย (ยกเว้นดอกของต้นแม่ที่ใช้ผสมตัวเองซึ่งจะไม่ตัดอับละอองเกสรออก) ใช้ภู่กันรวบรวมละอองเกสรใส่ภาชนะแล้วนำไปแตะบนยอดเกสรตัวเมียของดอกตัวเมียที่พร้อมผสม (ดอกอังกาบพร้อมผสมเวลา 6.00 น.- 10.00 น.) คลุมดอกที่ผสมแล้วด้วยถุงกระดาษติดป้ายที่บันทึกคู่ผสม

2.1.2 ทำการผสมพันธุ์อังกาบทั้ง 4 พันธุ์ ทั้งแบบผสมตัวเองและแบบพบกันหมด (reciprocal crosses) ผสมทั้งหมด 16 คู่ เพื่อสร้างเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 นำเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้จากการผสมเกสรของแต่ละคู่ผสมไปปลูกทดสอบโดยใช้วัสดุปลูกมีส่วนผสมของ ดินร่วน ขุยมะพร้าว เปลือกข้าวและเปลือกถั่ว อัตราส่วน 1:1:1:1 โดยปริมาตร

2.1.3 บันทึกผล จำนวนดอกที่ถ่ายละอองเกสร จำนวนดอกที่ผสมติด จำนวนเมล็ดและเมล็ดที่งอกได้

ในกรณีที่เมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้นำเอมบริโอลูกผสมไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์

2.2 การศึกษาการเพาะเลี้ยงเอมบริโอ

ฝักที่ใช้ในการศึกษานำมาจากการทดลองที่ 2.1 โดยการนำฝักอังกาบลูกผสมพันธุ์ VxR มาแกะเอาส่วนของใบประดับออก ฆ่าเชื้อที่ผิวนอกโดยการเช็ดฝักด้วยแอลกอฮอล์ 70 % จากนั้นนำฝักไปแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 15 % เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ในตู้ปลอดเชื้อ เปิดฝักแล้วแซะเอาเอมบริโอออกจากเมล็ดโดยทำภายใต้กล้อง สเตอริโอ ในสภาพปลอดเชื้อ แล้วจึงนำเอมบริโอมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในหลอดทดลอง (การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอแสดงใน ภาคผนวก ค) นำไปเลี้ยงในภายใต้ความเข้มแสง 1,700 ลักซ์ 16 ชั่วโมง โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 หัวข้อคือ

2.2.1 การเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของเอมบริโอ

วางแผนการทดลองแบบ 2x4 ปัจจัยร่วม 10 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัยคือ

ปัจจัยที่ 1 ธาตุอาหารหลัก มี 2 ชนิด คือ

1.1 ธาตุอาหารหลักสูตร MS (1962)

1.2 ธาตุอาหารหลักสูตร VW (1949) ดัดแปลง

ปัจจัยที่ 2 สารช่วยการเจริญของพืชมี 4 ชนิด คือ

2.1 ไม่ใส่สารช่วยการเจริญของพืช

2.2 ใส่น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์

2.3 ใส่เคซีนไฮโดรไลเสท 500 มก/ล

2.4 ใส่น้ำมะพร้าว10 เปอร์เซ็นต์ และเคซีนไฮโดรไลเซท500 มก/ล

ขั้นตอนการศึกษา

นำเอมบริโอ อายุ 15-20 วัน มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งตามกรรมวิธีดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 กรรมวิธีของการเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของเอมบริโอ

	ไม่ใส่สารช่วยการเจริญของพืช	น้ำมะพร้าว	เคซีนไฮโดรไลเสท	น้ำมะพร้าวและเคซีนไฮโดรไลเสท
MS (1962)	กรรมวิธีที่1	กรรมวิธีที่2	กรรมวิธีที่3	กรรมวิธีที่4
VW (1949)	กรรมวิธีที่5	กรรมวิธีที่6	กรรมวิธีที่7	กรรมวิธีที่8

2.2.2 การศึกษาหาอายุเอมบริโอที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง

ศึกษาหาอายุของเอมบริโอลูกผสม VxR ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร VW (1949) ดัดแปลง ที่เพิ่ม น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ และ เคซีนไฮโดรไลเสท 500 มก/ล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ 10 ซ้ำ มี 4 กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1 เพาะเลี้ยงเอมบริโออายุ 15 วัน

กรรมวิธีที่ 2 เพาะเลี้ยงเอมบริโออายุ 18 วัน

กรรมวิธีที่ 3 เพาะเลี้ยงเอมบริโออายุ 21 วัน

กรรมวิธีที่ 4 เพาะเลี้ยงเอมบริโออายุ 24 วัน

2.2.3 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเอมบริโอลูกผสมพันธุ์ VxR WxR และ WVxR

ศึกษาการเจริญเติบโตของเอมบริโอลูกผสมพันธุ์ VxR WxR และ WVxR โดยนำเอมบริโอ ลูกผสม อายุ 18 วัน ไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร VW (1949) ดัดแปลง เพิ่ม เคซีนไฮโดรไลเสท 500 มก/ล น้ำมะพร้าว 10% น้ำตาล 2% และ วุ้น 0.8% เลี้ยงภายใต้สภาพแสง 1,700 ลักซ์ 16 ชั่วโมง

บันทึกผลการทดลอง การพัฒนาของเอมบริโอ ความสูงต้น ขนาดใบเลี้ยง ขนาดใบจริง จำนวนใบ จำนวนรากและความยาวราก ทุกสัปดาห์ จนครบ 5 สัปดาห์ บันทึก จำนวนเอมบริโอที่ใช้เลี้ยง เอมบริโอที่ไม่งอก และลักษณะผิดปกติของเอมบริโอ

2.3 การถ่ายทอดลักษณะที่ได้จากการผสมพันธุ์

ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะที่ได้จากการผสมตัวเองและต้นที่ได้จากการผสมข้าม เปรียบเทียบลักษณะต่างๆ ของลูกผสมที่ได้กับพ่อแม่ ได้แก่ ลักษณะดอก สีดอก ขนาดดอก การบานดอก ลักษณะใบ เลี้ยง รูปร่างใบ ทรงพุ่ม จำแนกสีดอกโดยใช้พัดสีของ The Royal Horticultural Society ประเทศอังกฤษ

2.4 ศึกษาจำนวนโครโมโซมของอังกาบ

ดัดแปลงจากกรรมวิธีของ รุ่งนภา (2540)

2.4.1 การเตรียมปลายราก ตัดเฉพาะส่วนปลายรากที่กำลังเจริญเติบโต เก็บเวลา 8.30 น. – 10.00 น.

2.4.2 หยุดการเจริญของเส้นใยสปินเดิลของเซลล์โดยการแช่ปลายรากในสารละลาย para– dichlorobenzene เป็นเวลา 3 ชั่วโมงรักษาสภาพเซลล์ โดยนำรากออกมาจากสารละลาย para – dichlorobenzene แล้วล้างปลายรากให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น นำปลายรากไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ (fixative) นาน 5 นาที แล้วล้างปลายรากด้วยน้ำกลั่น

2.4.3 แยกเซลล์โดยการแช่ปลายรากลงในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 N. เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 60°ซ แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น

2.4.4 ย้อมสีเนื้อเยื่อในสีย้อม carbol fuchsin โดยแช่นาน 5 ชั่วโมง

2.4.5 ขยี้เนื้อเยื่อปลายรากบนแผ่นสไลด์ หยดสี lactopropionic orcein 1 หยดตรงบริเวณปรายราก แล้วใช้เข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อปลายรากให้แยกออกเป็นชิ้นเล็กๆ ปิดแผ่นแก้วปิด สไลด์บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ ใช้กระดาษซับวางบนแผ่นสไลด์บริเวณที่ปิดแผ่นสไลด์ กดนิ้วหัวแม่มือลงไปเพื่อให้เซลล์กระจาย และเป็นการซับสีที่มากเกินไปออก

2.4.6 นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟส โดยเลือกเซลล์ที่มีโครโมโซมกระจายไม่ทับกันและจากเซลล์ที่มีผนังเซลล์ไม่แตก นับจำนวนโครโมโซม แล้วบันทึกภาพ

2.5 ศึกษาความสามารถในการงอกของละอองเกสร

2.5.1 เก็บละอองเกสรของดอกอังกาบทั้ง 4 พันธุ์ โดยเก็บละอองเกสรที่แตกเต็มที

2.5.2 นำละอองเกสรที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงละอองเกสรที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสต่างๆ ที่หยดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ สูตรอาหารเหลวเลี้ยงละอองเกสรแสดงดังภาคผนวก ข

2.5.3 นำกระจกสไลด์ไปวางไว้ในจานแก้วที่รองพื้นด้วยกระดาษกรองชุ่มน้ำเพื่อให้ความชื้นแก่ละอองเกสรในอาหารโดยมีแท่งแก้วรองรับกระจกสไลด์อีกครั้งหนึ่ง ปิดฝาจานแก้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชม

2.5.4 บันทึกผลการงอกของละอองเกสรบนแผ่นสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยสุ่มนับจำนวนละอองเกสรที่สามารถงอกท่อละอองเกสรได้ต่อจำนวนละอองเกสรที่เห็นทั้งหมด แผ่นละ 4 ตำแหน่ง นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ย

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของรังสีเอกซ์ต่อการกลายพันธุ์

3.1 นำกิ่งพันธุ์อังกาบ พันธุ์สีม่วง พันธุ์สีขาว พันธุ์สีขาวแถบม่วง และพันธุ์สีแดง ชำให้ออกรากในขี้เถ้าแกลบแล้วคัดเลือกกิ่งชำที่ออกรากแล้วที่มีขนาดเท่ากันไปฉายรังสีเอกซ์ เฉพาะส่วนของยอด โดยใช้ความต่างศักย์ที่ 3 mA 70 kV ได้อัตรารังสี (dose rate) เท่ากับ 1.63 Gy/min

3.2 วางแผนการทดลองแบบ 4x4 ปัจจัยร่วม 10 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัยคือ

ปัจจัยที่ 1 พันธุ์ มี 4 พันธุ์ คือ V W WV และ R

ปัจจัยที่ 2 ปริมาณรังสี มี 4 ระดับ คือ

กรรมวิธีที่ 1 ได้รับปริมาณรังสี 0 Gy

กรรมวิธีที่ 2 ได้รับปริมาณรังสี 5 Gy

กรรมวิธีที่ 3 ได้รับปริมาณรังสี 10 Gy

กรรมวิธีที่ 4 ได้รับปริมาณรังสี 15 Gy

กรรมวิธีที่ 5 ได้รับปริมาณรังสี 20 Gy

3.3 นำกิ่งชำที่ทำการฉายรังสีแล้วไปปลูกในกระถางที่มีวัสดุปลูกคือ ดินร่วน ขุยมะพร้าว เปลือกข้าว เปลือกถั่ว อัตราส่วน 1:1:1 :1 โดยปริมาตร เลี้ยงต้นให้เจริญเติบโต

3.4 บันทึกข้อมูล ความสูงของต้น จำนวนคู่ใบ จำนวนกิ่งแขนง วันที่ออกดอก จำนวนดอกต่อต้น ลักษณะดอกที่ผิดปกติสีของดอก

การทดลองที่ 4 ความสัมพันธุ์ระหว่างพ่อแม่และลูกผสมโดยใช้เทคนิคทางอิเล็กโทรโฟรีซีส

ศึกษาเทคนิกอิเล็กโทโฟรีซีสเพื่อแยกความแตกต่างอังกาบพ่อแม่พันธุ์และลูกผสมชั่วที่ 1 โดยดัดแปลงวิธีการทดลองมาจากวิธีการของ เพิ่มพงษ์และคณะ (2538) โดยเปรียบเทียบอายุใบที่ใช้ศึกษา คือ ใบคู่ที่ 1 2 และ 3 และใช้เอนไซม์ 2 ชนิด คือ esterase และ peroxidase วิธีเตรียมสารเคมีแสดงในภาคผนวก จ

4.1 การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัด การสกัดเอนไซม์โดยการนำใบอังกาบมา หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วสกัดด้วย Tris buffer 0.1M pH 8.2 โดยใช้ตัวอย่าง 1 กรัม ต่อ extraction buffer 3 มิลลิลิตร แล้วบดในโกร่งที่เก็บในที่อุณหภูมิ 4 °ซ แล้วนำไปแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง

ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 30 นาที 2 ครั้ง ดูด supernatant ที่ได้เก็บในหลอด eppendrop เก็บที่อุณหภูมิ –20°ซ จากนั้นรอนำไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

4.2 ประกอบชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้วเติม electrode buffer ลงใน chamber

4.3 เตรียมแผ่นกระจกสำหรับใส่เจล (gel mould) แผ่นกระจกที่ใช้มี 2 แผ่นประกบกันขนาดของทั้ง 2 แผ่นจะมีความสูงไม่เท่ากัน ทำความสะอาดแผ่นกระจกโดยเช็ดด้วย acetone นำแผ่นกระจกทั้งสองแผ่นมาประกบกันแล้วใช้แผ่นยางขั้นระหว่างกระจกทั้งสองข้างของแผ่นกระจก นำไปตั้งบน stand ในแนวตั้งฉากกับฐานของ stand ยึดให้แน่นด้วยตัวยึดเพื่อให้กระจกประกบกันสนิท

4.4 ใส่ running gel ที่เตรียมไว้สูงประมาณ 7 เซนติเมตร แล้วใส่น้ำกลั่นเพื่อให้ผิวหน้าของเจลเรียบ ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อรอให้เกิด polymerization ใส่ comb ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที นำ comb ออกล้างผิวหน้าเจลด้วยน้ำกลั่น

4.5 การหยอดตัวอย่าง นำตัวอย่างที่เก็บไว้ในตู้แช่เย็นมาผสมกับ maker dye ใช้อัตราส่วน ตัวอย่างต่อ maker dye 9:1 ผสมให้เข้ากัน นำมาหยอดลงบนเจลแต่ละช่อง ช่องละหนึ่งตัวอย่าง จำนวน 40 ไมโครลิตร สำหรับการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ETS ส่วน 30 ไมโครลิตร สำหรับการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ PER ระวังอย่าให้ตัวอย่างฟุ้งกระจาย

4.6 ดำเนินการผ่านกระแสไฟ ผ่านกระแสไฟ 30 mA ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 °ซ ตลอดเวลาที่ผ่านกระแส จนกระทั่งระดับของ marker solution อยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่นเจล 0.5 เซนติเมตร

4.7 แกะแผ่นกระจกที่ประกบกันออก ตัดขอบล่างทางซ้ายของแผ่นเจล เพื่อให้ทราบลำดับของหมายเลขตัวอย่างที่หยอด นำเจลลงแช่ในสารละลายที่ประกอบด้วย substrate coenzyme และ dye ที่มีความจำเพาะกับเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบบ่มในที่มืดพร้อมทั้งเขย่าโดยเครื่องเขย่าเพื่อให้ทำปฏิกิริยาดีขึ้น

4.8 หยุดปฏิกิริยา หลังสิ้นสุดปฏิกิริยา นำแผ่นเจลล้างน้ำไหลช้าๆ แช่น้ำสารละลาย acetic acid 7% ที่ผสมด้วย glycerol 10% เพื่อหยุดปฏิกิริยาและละลายสีส่วนเกินออก

4.9 บันทึกการแสดงออกของไอโซไซม์โดยการถ่ายภาพ และวาดภาพไซโมแกรม แสดงตำแหน่ง จำนวน และขนาดของแถบสี วัดค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของแถบสี

$$\text{ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf)} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสี}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของ marker solution}}$$

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

พฤษภาคม 2542 - พฤษภาคม 2544

สถานที่ดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

-โรงเรือนเพาะชำ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

-ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

-ห้องปฏิบัติการชีวเคมี แห่งศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University