บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. การศึกษาด้านสัณฐานวิทยา

1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1 พืชทดลอง

พืชสกุลหงส์เหินจำนวน 12 ชนิดจากสถานีวิจัยและฝึกอบรม ศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่ และศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่

1.1.2 ไม้บรรทัด

1.1.3 แว่นขยาย

1.1.4 แผ่นเทียบสี RHS (The Royal Horticultural Society) colour chart

1.1.5 ลวดและป้าย

1.2 วิธีการ

บันทึกข้อมูลด้านสัณฐานวิทยา ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ ดอก ผล และเมล็ด ของพืชสกุลหงส์เหินจำนวน 12 ชนิด โดยศึกษาในขณะที่มีการแทงช่อดอกและดอกจริงบานเต็มที่ เลือกต้นที่มีขนาดใหญ่ ขนาดกลาง และขนาดเล็กเพื่อเป็นตัวแทนของพืชแต่ละชนิดมาอย่างละ 1 ต้น ลักษณะที่ศึกษา คือ

1.2.1 ความสูงของต้นวัดจากโคนต้นเทียมส่วนที่โผล่พ้นดินจนถึงบริเวณโคนก้านใบสุดท้าย

1.2.2 จำนวนหน่อต่อเหง้านับจากใน 1 เหง้า ที่มีการแตกกอเป็นต้นใหม่

1.2.3 จำนวนใบ นับใบทั้งหมดที่อยู่ในต้นเดียวกัน

1.2.4 การจัดเรียงตัวของใบ

1.2.5 ลักษณะใบ เปรียบเทียบ รูปร่างใบ ปลายใบ และฐานใบ

1.2.6 ขนาดใบ วัดความกว้าง ความยาวของใบที่เล็กที่สุด และใบที่ใหญ่ที่สุดของต้นเดียวกัน

1.2.7 ความยาวก้านช่อดอกส่วนที่โผล่พ้นต้น วัดจากโคนก้านใบสุดท้ายจนถึงกลีบประดับแรกที่โคนของช่อดอกนั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.8 ความยาวก้านดอกย่อยยาวสุด โดยวัดก้านดอกย่อยแรกที่โคนช่อดอก และความยาวก้านดอกย่อยสั้นสุด โดยวัดก้านดอกย่อยสุดท้ายที่ปลายช่อดอก

1.2.9 จำนวนก้านกลีบประดับย่อย นับก้านกลีบประดับย่อยทั้งหมดที่อยู่ในช่อดอกเดียวกัน

1.2.10 ความยาวช่อดอก วัดจากกลีบประดับแรกที่อยู่ตรงโคนช่อดอกจนถึงปลายช่อดอก และความกว้างช่อดอก วัดจากปลายดอกย่อยด้านซ้ายถึงปลายดอกย่อยด้านขวาของส่วนช่อดอกที่กว้างที่สุด

1.2.11 ลักษณะกลีบประดับ (bract) เปรียบเทียบ รูปร่างกลีบ ปลายกลีบ และฐานกลีบประดับ

1.2.12 จำนวนกลีบประดับ นับกลีบประดับทั้งหมดที่อยู่ในช่อดอกเดียวกัน

1.2.13 ขนาดกลีบประดับ วัดความกว้าง ความยาวของกลีบประดับแรกที่โคนช่อดอก ซึ่งเป็นกลีบประดับขนาดใหญ่สุด และวัดความกว้าง ความยาวของกลีบประดับสุดท้ายที่ปลายช่อดอกซึ่งเป็นกลีบประดับเล็กที่สุด

1.2.14 ความยาวของกลีบเลี้ยงที่เชื่อมกันเป็นหลอดรูปร่างเป็นถ้วย (calyx tube)

1.2.15 ความยาวกลีบดอก วัดจากส่วนโคนกลีบเชื่อมกันเป็นหลอด (corolla tube)

1.2.16 ลักษณะรูปร่างของเกสรตัวผู้ที่เป็นหมันและลดรูปลักษณะคล้ายกลีบดอก (staminode)

1.2.17 ขนาดของแผ่น staminode วัดความกว้างของแผ่น staminode ในตำแหน่งที่กว้างที่สุด และวัดความยาวของแผ่น staminode

1.2.18 ความยาวแผ่นปากมีลักษณะห้อยลง (lip) โดยวัดจากขอบที่เชื่อมติดกับก้านชูอับละอองเรณูจนถึงปลายขอบของส่วนที่แยกออกจากกันเป็นแฉก

1.2.19 ความยาวก้านชูอับละอองเรณู (filament) วัดตั้งแต่ส่วนที่อยู่เหนือแผ่น staminode ขึ้นไป จนถึงอับละอองเรณู

1.2.20 ขนาดอับละอองเรณู วัดความกว้างและความยาวของอับละอองเรณูทั้ง 2 พู รวมกัน

1.2.21 ความยาวก้านชูเกสรตัวเมีย (style) วัดตั้งแต่ส่วนที่อยู่เหนือแผ่น staminode ขึ้นไปจนถึงอับละอองเรณู

1.2.22 ขนาดของรังไข่ วัดความกว้างและความยาวของรังไข่

1.2.23 เปรียบเทียบ สีกาบใบ สีใบ สีเส้นกลางใบ สีก้านช่อดอก สีก้านดอกย่อย สีกลีบประดับ สีกลีบประดับย่อย สีกลีบเลี้ยง สีกลีบดอก สี staminode สี lip

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สีรยางค์ (triangular appendage) สีก้านชูเกสรตัวเมีย สีอับละอองเรณู และสีรังไข่ โดยเปรียบเทียบสี กับแผ่นเทียบสีของ RHS.

2. การทดลองเกี่ยวกับปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการศึกษารูปแบบไอโซไซม์

แบ่งออกเป็นการทดลองย่อย คือ

การทดลองที่ 2.1 น้ำยาสกัดเอนไซม์

เปรียบเทียบ 2 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 น้ำยาสกัดของ ก่ำปัน (2541)

กรรมวิธีที่ 2 น้ำยาสกัดของ Apavatjrut *et al.* (1999)

กรรมวิธีละ 5 ซ้ำๆละ 1 ต้น

การทดลองที่ 2.2 สาร polyvinylpyrrolidone (PVP) ที่เหมาะสมในน้ำยาสกัดเอนไซม์

เปรียบเทียบส่วนประกอบของน้ำยาสกัดเอนไซม์โดยใช้ PVP ต่างกัน 3 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 PVP 10 เข้มข้น 0.5 % (Apavatjrut *et al.*,1999)

กรรมวิธีที่ 2 PVP 360 เข้มข้น 0.5 %

กรรมวิธีที่ 3 PVP 360 เข้มข้น 1.0 %

กรรมวิธีละ 5 ซ้ำๆละ 1 ต้น

การทดลองที่ 2.3 pH ของน้ำยาสกัดเอนไซม์ที่เหมาะสม

เปรียบเทียบ pH 3 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 pH 7.5

กรรมวิธีที่ 2 pH 8.0

กรรมวิธีที่ 3 pH 8.5

กรรมวิธีละ 5 ซ้ำๆละ 1 ต้น

การทดลองที่ 2.4 ความเข้มข้นของเจล ที่เหมาะสม

เปรียบเทียบความเข้มข้นของเจลที่ใช้เตรียม separating gel 3 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 ระดับความเข้มข้น 8.5 %

กรรมวิธีที่ 2 ระดับความเข้มข้น 10 %

กรรมวิธีที่ 3 ระดับความเข้มข้น 12.5 %

กรรมวิธีละ 5 ซ้ำๆละ 1 ต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2.5 เนื้อเยื่อที่เหมาะสม

เปรียบเทียบแหล่งที่มาของเนื้อเยื่อ 6 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 เนื้อเยื่อหัวในระยะพักตัว

กรรมวิธีที่ 2 เนื้อเยื่อรากจากหัวในระยะพักตัว

กรรมวิธีที่ 3 เนื้อเยื่อหัวในระยะเจริญเติบโต

กรรมวิธีที่ 4 เนื้อเยื่อรากจากหัวในระยะเจริญเติบโต

กรรมวิธีที่ 5 เนื้อเยื่อจากใบแก่ที่เจริญเต็มที่

กรรมวิธีที่ 6 เนื้อเยื่อจากใบอ่อนที่ยังไม่คลี่

กรรมวิธีละ 5 ซ้ำๆละ 1 ต้น

การทดลองที่ 2.6 น้ำหนักพืชที่เหมาะสม

เปรียบเทียบน้ำหนักสดจากเนื้อเยื่อที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2.5 โดยเปรียบเทียบน้ำหนัก 3 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 น้ำหนักสด 0.25 กรัม

กรรมวิธีที่ 2 น้ำหนักสด 0.5 กรัม

กรรมวิธีที่ 3 น้ำหนักสด 0.75 กรัม

กรรมวิธีละ 5 ซ้ำๆละ 1 ต้น

2.1 วัสดุอุปกรณ์

2.1.1 พืชทดลองใช้หงส์เหินช่อทับทิม (*G. rosea* Gagnep.)

การทดลองที่ 2.1-2.4 ใช้ส่วนของใบที่โตเต็มที่ และใช้เนื้อเยื่อส่วนต่างๆ สำหรับการทดลองที่ 2.5

2.1.2 สารเคมี

- acrylamide
- ammoniun persulfate (APS)
- bromophenol blue
- dithiothreitol (DTT)
- ethylenediaminetetraacetate (EDTA)
- glycerol
- glycine
- mercaptoethanol (MSH)
- polyvinylpyrrolidone (PVP)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- sucrose
- TEMED (N,N,N',N'-teramethyl ethylenediamine)
- Tris-HCL

2.1.3 เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.1.4 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

2.1.5 เครื่องหมุนเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็น (refrigerated centrifuge)

2.1.6 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2.1.7 ชุดอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบ slab gel (Mini Protein II ของบริษัท Bio - Rad)

2.1.8 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

2.1.9 ตู้บ่ม (incubator)

2.1.10 เครื่องกวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer)

2.1.11 เครื่องไล่อากาศ (degasser)

2.1.12 เครื่องบดตัวอย่าง (homogenizer)

2.1.13 โกร่งบดตัวอย่างพืช

2.1.14 ไนโตรเจนเหลวและถังบรรจุ

2.1.15 หลอดใส่สารขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Eppendorf tube)

2.1.16 ชุดอ่านเจล (visible light transilluminator)

2.1.17 เครื่องแก้วต่างๆ

2.1.18 อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ช้อนตักสาร ปากคีบ ใบมีดและด้ามมีด ถุงพลาสติก แผ่นอลูมินัมฟอยล์ กระดาษชั่งสาร กระดาษกรอง ถาดพลาสติก กล้องถ่ายรูป ฟิลม์ถ่ายรูป

2.2 วิธีการ

2.2.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

2.2.1.1 ส่วนหัวและรากแยกออกจากเหง้าของหงส์เหิน ในขณะที่หัวและรากอยู่ในระยะพักตัว โดยใช้ตัวอย่างละ 1 หัวต่อ 1 ซ้ำและ 1 รากต่อ 1 ซ้ำ ตามลำดับ

2.2.1.2 ส่วนหัวและรากแยกออกจากเหง้าของหงส์เหิน ในขณะที่หัวและรากอยู่ในระยะเจริญเติบโต ในขณะที่ต้นยังไม่แทงช่อดอก โดยใช้ตัวอย่างละ 1 หัวต่อ 1 ซ้ำ และ 1 รากต่อ 1 ซ้ำ ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.1.3 ส่วนใบแก่ เตรียมจากใบที่มีการแผ่ของใบเต็มที่ และเลือกใบที่ไม่เป็นโรคและไม่มีแมลงกัด โดยใช้ตัวอย่างละ 1 ใบต่อ 1 ซ้ำ

2.2.1.4 ส่วนใบอ่อน เตรียมจากใบอ่อนของต้นที่ใบยังไม่คลี่โดยใช้ตัวอย่างละ 1 ใบต่อ 1 ซ้ำ

2.2.2 การสกัดเอนไซม์

2.2.2.1 นำส่วนหัวและรากของหงส์เหินมาล้างด้วยน้ำให้สะอาดใช้มีดปอกเปลือกด้านนอกออก ล้างด้วยน้ำกลั่น หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำมาบดในโกร่งที่เย็นจัด พร้อมเติมไนโตรเจนเหลว เพื่อให้บดง่ายขึ้น ใช้น้ำหนักพืชที่ได้ผลจากการทดลองที่ 2.6 ต่อน้ำยาสกัดเอนไซม์ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปบดโดยใช้เครื่องบดตัวอย่างพืช เป็นเวลา 2-3 นาที นำตัวอย่างที่สกัดได้ไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที แยกสารละลายใสด้านบนที่ได้ใส่ใน Eppendorf tube เก็บในตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำมาใช้เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่สกัดจากส่วนอื่นของพืช

2.2.2.2 นำส่วนใบแก่ล้างด้วยน้ำให้สะอาด ตัดเส้นกลางใบออก หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใช้วิธีการสกัดวิธีเดียวกับที่กล่าวในข้อ 2.2.2.1

2.2.2.3 นำส่วนใบอ่อนล้างด้วยน้ำให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใช้วิธีการสกัดวิธีเดียวกับที่กล่าวในข้อ 2.2.2.1

2.2.3 การทำโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส

2.2.3.1 ประกอบชุดแผ่นกระจกของ Mini-Protean® 2 Cell Electrophoresis (Bio-Rad) เข้าด้วยกัน จากนั้นเตรียมสารละลายเจล ดังแสดงในตารางภาคผนวก1 นำสารละลาย separating gel มาเทลงระหว่างแผ่นกระจกเหลือระยะจากขอบประมาณ 2 เซนติเมตร ที่เตรียมไว้รอจนเจลแข็งตัวแล้วเติมสารละลาย stacking gel พร้อมกับเสียบหวี (comb) ทิ้งไว้เมื่อเจลแข็งตัว ดึงหวีออกจะเห็นเป็นช่อง (well) จากนั้นประกอบชุดอิเล็กโตรโฟรีซีสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม running buffer ลงใน chamber หยอดตัวอย่างที่ผสมกับ marker dye ในอัตราส่วน 60 : 5 ไมโครลิตร ลงในช่องของ stacking gel ปริมาตร 28 ไมโครลิตร ต่อขั้วบวกและขั้วลบเข้ากับ chamber เปิดสวิตซ์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าโดยใช้กระแสที่ 14 มิลลิแอมแปร์ สำหรับ stacking gel และ 26

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มิลลิแอมแปร์ สำหรับ separating gel เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ทิ้งไว้เมื่อเวลาผ่านไป 2-3 ชั่วโมง รอจนระดับ marker dye อยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่นเจลประมาณ 2-3 มิลลิเมตร จึงหยุดกระแสไฟฟ้านำแผ่นแก้วออกจาก chamber แล้ว นำแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นแก้วออกมาวางบน plate เพื่อย้อมสีเอนไซม์

2.2.3.2 การย้อมสีเอนไซม์

เตรียม staining solution ของเอนไซม์ 4 ชนิด สำหรับการทดลองที่ 2.1-2.6 คือ glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), leucine aminopeptidase (LAP), peroxidase (POX) และ superoxide dismutase (SOD) (ดูรายละเอียดการเตรียมจากภาคผนวกข้อ 6) เทลงบน plate ที่มีเจลอยู่ โดยเอนไซม์ GOT, LAP, และ POX นำไปเก็บในที่มืดอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 3-4 ชั่วโมง และเอนไซม์ SOD นำไปเก็บในที่มืดอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปไว้ที่มีแสงสว่างทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง

2.2.3.3 การบันทึกข้อมูล

เปรียบเทียบจำนวนและความคมชัดของแถบสีในแต่ละกรรมวิธี เพื่อเลือกปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดจากการทดลองที่ 2.1-2.6 สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

3. การทดสอบชนิดของเอนไซม์

3.1 พืชทดลองใช้หงส์เหินช่อทับทิม (*G. rosea* Gagnep.) โดยใช้เนื้อเยื่อที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2.5 ทดลอง 5 ซ้ำๆละ1 ต้นต่อเอนไซม์

3.2 การสกัดเอนไซม์ทำวิธีเดียวกับข้อ 2.2.2

3.3 การทำโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส ทำวิธีเดียวกับข้อ 2.2.3

3.4 การย้อมสีเอนไซม์ ทำโดยเปรียบเทียบการย้อมเอนไซม์ทั้งหมด 18 ชนิด ได้แก่ Acid phosphatase (ACP), Aconitase (ACO), Alcohol dehydrogenase (ADH), Aldehyde oxidase (AOX), Alkaline phosphate (ALP), Diaphorase (DIA), Esterase (EST), Glucose dehydrogenase (GDH), Glutamate dehydrogenase (GLD), Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), Isocitrate dehydrogenase (IDH), Leucine amino peptidase (LAP), Malate dehydrogenase (MDH), Malic enzyme (ME), Peroxidase (POX),

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Phosphoglucoisomerase (PGM), Shikimate dehydrogenase (SKD) และ Superoxide dismutase (SOD) โดยเอนไซม์ EST นำไปเก็บที่มีแสงสว่างอุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ประมาณ 15-60 นาที ส่วนเอนไซม์ชนิดอื่นยกเว้น SOD ให้นำไปเก็บในที่มืดอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3-4 ชั่วโมง

3.5 การบันทึกข้อมูล

ดูการปรากฏของแถบสีไอโซไซม์และความคมชัดของแถบสีบนเจลในแต่ละเอนไซม์เพื่อเลือกเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการทดลองต่อไป

4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชสกุลหงส์เหิน

4.1 เตรียมเนื้อเยื่อทดลองที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2.5 จากพืชสกุลหงส์เหินจำนวน 12 ชนิด ทดลอง 5 ซ้ำต่อเอนไซม์ โดยใช้ซ้ำละ 1 ต้น รวมทั้งหมด 60 ตัวอย่างต่อเอนไซม์

4.2 การสกัดเอนไซม์ทำวิธีเดียวกับข้อ 2.2.2

4.3 การทำโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส ทำวิธีเดียวกับข้อ 2.2.3

4.4 การย้อมสีเอนไซม์ โดยย้อมเอนไซม์ชนิดที่เลือกแล้วจากข้อ 3.5

4.5 การบันทึกข้อมูลนำเจลที่ย้อมแล้วมาศึกษารูปแบบไอโซไซม์จากตำแหน่ง จำนวน และขนาด และคำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) ตามสมการต่อไปนี้

ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) = ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสี / ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบ marker dye

แล้วนำไปเขียนแผนภาพ zymogram

4.6 การวิเคราะห์กลุ่มพืช (cluster analysis) ด้วยรูปแบบไอโซไซม์ กำหนดให้ตัวอย่างพืชเป็น operational taxonomic unit (OTU) และแถบสีเป็นลักษณะ (character) โดยค่าที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้จากการมีแถบสีหรือไม่มีแถบสีของแต่ละตัวอย่าง แล้วแปลงค่าที่มีแถบสีเป็น 1 และค่าไม่มีแถบสีเป็น 0 (Sokal and Sneath, 1973) นำค่าที่ได้นี้มาวิเคราะห์ผลด้วย UPGMA cluster โดยใช้โปรแกรม SPSS release 9.01

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สถานที่ดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

สถานีวิจัยและฝึกอบรมศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ตำบลบ้านแหวน อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์เคมี เรือนเพาะชำ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ห้องปฏิบัติการโครงการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร (CMU-AgBiotech) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

เดือนตุลาคม 2543 – ตุลาคม 2545

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved