บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาลักษณะของกล้วยไม้ว่านจูงนางที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ **การทดลองที่ 1** การสำรวจและการศึกษาการเจริญเติบโต **การทดลองที่ 2** การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาควิทยา การศึกษาเซลล์วิทยา และรูปแบบไอโซไซม์ และ **การทดลองที่ 3** การผสมเกสร

อุปกรณ์และวิธีการทดลองมีดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 การสำรวจและการศึกษาการเจริญเติบโต

การทดลองนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อยดังนี้

การทดลองที่ 1.1 การสำรวจการกระจายพันธุ์ของว่านจูงนาง

การศึกษาทดลองนี้เป็นการสำรวจการกระจายพันธุ์และการรวบรวมพันธุ์ว่านจูงนางที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติในป่าในเขตพื้นที่ของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ บันทึกสภาพทางนิเวศวิทยาของแหล่งเจริญเติบโตและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของว่านจูงนางแต่ละตัวอย่างที่แตกต่างกัน (accession) แล้วนำไปปลูกในแปลงรวบรวมพันธุ์ภายในศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ

1.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1.1 อุปกรณ์ในการสำรวจและเก็บตัวอย่าง ได้แก่ เสียม ถุงพลาสติกสีดำขนาด 20 × 30 นิ้ว แผ่นป้ายพลาสติก สมุดบันทึก ดินสอ ไม้บรรทัด ตลับเมตร และกล้องถ่ายภาพพร้อมฟิล์ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.1.2 วัสดุปลูก ได้แก่ ดิน ขี้เถ้าแกลบ และเปลือกถั่ว ในอัตราส่วน 2:2:1

1.1.2 วิธีการ

สำรวจและรวบรวมต้นว่านจูงนางในพื้นที่เป้าหมาย แล้วบันทึกข้อมูลดังต่อไปนี้

1.1.2.1 สภาพนิเวศวิทยาของพื้นที่ที่พบว่ามีต้นพืชทดลองเจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ

1.1.2.2 ลักษณะเด่นของพืชทดลองแต่ละตัวอย่าง ถ่ายภาพเพื่อประกอบการบันทึกลักษณะภายนอกของต้นพืช ขุดต้นพืชใส่ถุงดำและติดป้ายชื่อสถานที่ที่สำรวจพบไว้บนถุง

1.1.2.3 รวบรวมพืชทดลองจากพื้นที่สำรวจแต่ละแหล่ง แล้วนำไปปลูกในแปลงรวบรวมพันธุ์

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาวงจรการเจริญเติบโต

การทดลองนี้เป็นการศึกษาวงจรการเจริญเติบโตของพืชทดลองจำนวน 2 ตัวอย่างที่แตกต่างกันโดยเลือกตัวอย่างจากกลุ่มต้นที่เก็บรวบรวมพันธุ์ไว้เพียง 2 ตัวอย่าง ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันอย่างเด่นชัดแล้วบันทึกการเจริญเติบโตในวงจรการเจริญเติบโต 1 วงจร คือ 1 ปี ตั้งแต่ช่วงเริ่มแทงช่อดอกและบานดอก ช่วงการเจริญเติบโตของใบและหัวใหม่ไปจนกระทั่งหัวใหม่พักตัว

1.2.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.2.1.1 พืชทดลอง 2 ตัวอย่างที่แตกต่างกัน คือ รหัส GE 001 และ GE 002 ตัวอย่างละ 5 ต้น

1.2.1.2 วัสดุปลูก ได้แก่ ดิน ขี้เถ้าแกลบ และเปลือกถั่ว ในอัตราส่วน 2:2:1

1.2.1.3 วัสดุอื่น ๆ ได้แก่ สมุด ปากกา ดินสอ ไม้บรรทัด แผ่นป้ายพลาสติก เวอร์เนียคาลิปเปอร์ และกล้องถ่ายภาพพร้อมฟิล์ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.2 วิธีการ

ปลูกต้นพืชทดลองทั้ง 2 ตัวอย่าง ในแปลงทดลอง ติดตาม และบันทึกผลการทดลองดังนี้

1.2.2.1 ติดตามการเจริญเติบโตของพืชทดลองจากระยะที่ต้นเริ่มแทงช่อดอกและบานดอก ช่วงการเจริญเติบโตของใบและหัวใหม่ไปจนกระทั่งหัวใหม่พักตัว

1.2.2.2 บันทึกการเจริญเติบโตทางใบ ได้แก่ ความสูงของต้นโดยวัดจากโคนต้นในระดับผิวดินจนถึงปลายใบของใบที่ยาวที่สุด จำนวนใบต่อต้น และขนาดของใบที่ 2 นับจากโคนต้น

1.2.2.3 บันทึกจำนวนหัวใหม่ต่อกอ

1.2.2.4 บันทึกการเจริญเติบโตทางดอก ได้แก่ บริเวณที่เกิดการสร้างดอก ช่วงของการสร้างดอก ความยาวช่อดอก จำนวนดอกต่อช่อ และขนาด (ความยาวจากปลายกลีบเลี้ยงด้านข้างด้านหนึ่งไปยังอีกด้านหนึ่ง × ความยาวจากปลายกลีบเลี้ยงด้านบนไปยังปลายกลีบปาก) ของดอกที่ 2 นับจากโคนช่อดอก

การทดลองที่ 2 การศึกษาลักษณะ

การศึกษาลักษณะของพืชทดลอง แบ่งออกเป็น 4 การทดลองย่อย คือ

การทดลองที่ 2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การทดลองนี้เป็นการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของต้นพืช ได้แก่ ราก หัว ใบ และดอกโดยบันทึกข้อมูลดังกล่าวจากพืชทดลองรหัส GE 001 และ GE 002 ในระยะที่ส่วนต่างๆ ของต้นเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว

2.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1.1 พืชทดลอง คือว่านจูงนาง รหัส GE 001 และ GE 002 รหัสละ 5 ต้น

2.1.1.2 วัสดุอื่น ๆ ได้แก่ สมุด ปากกา ไม้บรรทัด แผ่นป้ายพลาสติกเวอร์เนียคาลิปเปอร์ มีดผ่าตัด ปากคีบ ดินสอดำและกระดาษสำหรับวาดภาพส่วนประกอบของต้นพืช กล้องจุลทรรศน์ และกล้องถ่ายภาพพร้อมฟิล์ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.2 วิธีการ

2.1.2.1 บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของต้นพืชทดลองได้แก่ ราก หัว ใบ ดอก และผล ในระยะที่ต้นและดอกเจริญเติบโตเต็มที่ โดยบันทึกลักษณะจากตัวอย่างรหัสละ 5 ต้น พร้อมทั้งวาดภาพลายเส้นประกอบ

2.1.2.2 บันทึกจำนวนและขนาดของส่วนประกอบของต้นดังนี้

2.1.2.2.1 **หัว** บันทึกจำนวนหัวเก่าและหัวใหม่ต่อกอ จำนวนปล้องต่อหัว ความยาวของหัวใหม่ และเส้นผ่าศูนย์กลางของหัวใหม่ โดยวัดจากฐานของหัวบริเวณที่กว้างที่สุด

2.1.2.2.2 **ใบ** บันทึกความกว้างและความยาวใบ โดยวัดความกว้างของใบจากขอบใบด้านหนึ่งมายังขอบใบอีกด้านหนึ่งที่ตำแหน่งที่กว้างที่สุด และความยาวของใบโดยวัดจากฐานใบถึงปลายใบ บันทึกจำนวนใบต่อต้น จำนวนใบประดับ และความสูงของต้นโดยวัดจากโคนต้นเทียมส่วนที่โผล่พ้นดินจนถึงปลายใบที่ยาวที่สุด

2.1.2.2.3 **ช่อดอก** บันทึกจำนวนช่อดอกต่อต้น ความยาวก้านช่อดอกโดยวัดจากโคนก้านช่อจนถึงก้านดอกย่อยแรกที่โคนของช่อดอก เส้นผ่าศูนย์กลางก้านช่อดอก ความยาวช่อดอกโดยวัดจากก้านดอกย่อยแรกที่โคนช่อดอกจนถึงปลายช่อดอก และความกว้างช่อดอกโดยวัดจากส่วนที่กว้างที่สุดของช่อดอก

2.1.2.2.4 **ดอก** บันทึกจำนวนดอกต่อช่อ ความกว้างและความยาวของกลีบเลี้ยง กลีบดอก และกลีบปากของดอกที่บานเต็มที่ ความกว้างของดอกวัดจากตำแหน่งที่กว้างที่สุดของดอก ความยาวของดอกวัดจากกลีบเลี้ยงด้านบนถึงปลายกลีบปาก ความยาวของก้านดอกย่อยที่ยาวที่สุดโดยวัดก้านดอกย่อยแรกที่โคนช่อดอก และก้านที่สั้นที่สุดโดยวัดก้านดอกย่อยที่ปลายช่อดอก ขนาดของเส้าเกสร จำนวนก้อนเรณู และขนาดฝาอับเรณู

2.1.2.2.5 **ผล** บันทึกความกว้างและความยาวของผล และจำนวนผลต่อช่อ

2.1.2.2.6 **เมล็ด** บันทึกขนาดของเมล็ด

2.1.2.2.7 **ราก** บันทึกเส้นผ่าศูนย์กลางราก และจำนวนรากต่อหัว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2.2 การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยา

การทดลองนี้เป็นการศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของพืชทดลองรหัส GE 001 และ GE 002 โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อที่ตัดตามยาวและตามขวางของอวัยวะที่เป็นส่วนประกอบของ ต้นพืช ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ ดอก และผล ตามวิธีการศึกษาเนื้อเยื่อแบบ paraffin embedding ของ Johansen (1940)

2.2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.2.1.1 พืชทดลอง คือว่านจูงนางรหัส GE 001 และ GE 002

2.2.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.2.1.2.1 เครื่องดูดอากาศ

2.2.1.2.2 ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิเป็น 56 องศาเซลเซียส (° ซ)

2.2.1.2.3 แผ่นให้ความร้อน (hot plate)

2.2.1.2.4 กระดาษปอนด์พับเป็นกระทงสำหรับฝังเนื้อเยื่อ

2.2.1.2.5 แท่งไม้สี่เหลี่ยมขนาด 1.5 × 1.5 × 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่ผ่านการต้มให้อิ่มตัวด้วยพาราฟิน

2.2.1.2.6 เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome)

2.2.1.2.7 กล้องจุลทรรศน์แบบ dissecting microscope และ stereo microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

2.2.1.2.8 เครื่องอุ่นแผ่นสไลด์ที่ปรับอุณหภูมิเป็น 40° ซ

2.2.1.2.9 อุปกรณ์เครื่องแก้วได้แก่ ขวดแก้วสำหรับเก็บตัวอย่างพืช ขวดแก้วพร้อมฝาปิดสำหรับย้อมสี (staining jar) บีกเกอร์ แผ่นกระจกสไลด์ (slide) และแผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover slip)

2.2.1.2.10 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ มีดผ่าตัด พร้อมใบมีด หลอดหยด (dropper) เข็มเขี่ยปลายงอ ปากคีบ ป้ายติดกาว กระดาษกาว และพู่กันขนอ่อน

2.2.1.3 สารเคมี

2.2.1.3.1 น้ำยารักษาสภาพเซลล์ (fixative) ได้แก่ FAA (formalin-acetic acid-alcohol) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสม ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

95% ethyl alcohol	50	มิลลิลิตร (มล)
glacial acetic acid	5	มล
formalin	10	มล
น้ำกลั่น	35	มล

2.2.1.3.2 น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ประกอบด้วยส่วนผสมดังแสดงในตารางที่ 1

2.2.1.3.3 สารตัวกลางที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) ได้แก่ พาราฟินเหลว (paraffin oil) และ Paraplast

2.2.1.3.4 น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive) ได้แก่ albumin ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมในการเตรียม stock solution ดังนี้

ไข่ขาว	1	มล
น้ำกลั่น	49	มล

เมื่อจะใช้นำ stock solution 1 มล มาเติมน้ำกลั่นให้ปริมาณรวมเป็น 50 มล

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์

สารเคมี	ระดับแอลกอฮอล์ (%)				
(มิลลิลิตร)	50	70	85	95	100
น้ำกลั่น	50	30	15	-	-
95% ethyl alcohol	40	50	50	45	-
tertiary butyl alcohol (TBA)	10	20	35	55	75
absolute ethyl alcohol	-	-	-	-	25

2.2.1.3.5 สีย้อมเนื้อเยื่อใช้สี Dalafied's hematoxylin ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

aluminium sulfate [$Al_2(SO_4)_3.16H_2O$]	400	มล
hematoxylin ($C_6H_{14}O_6$)	4	กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

95% ethyl alcohol	25	มล
methyl alcohol	100	มล
glycerol	100	มล

2.2.1.3.6 น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อสะอาด (clearing reagent) คือ xylene

2.2.1.3.7 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ (mounting media) คือ Canada balsam

2.2.2 วิธีการ

นำชิ้นส่วนของอวัยวะพืชทดลองที่จะตัดเนื้อเยื่อไปผ่านขั้นตอนของการทำสไลด์ถาวรโดยวิธีการฝังชิ้นส่วนในพาราฟินซึ่งมีขั้นตอนของวิธีการดังนี้

2.2.2.1 เก็บตัวอย่างชิ้นส่วนของอวัยวะที่เป็นส่วนประกอบของต้นพืชทดลอง ได้แก่ ราก หัว ลำต้น ใบ ดอก และผล แช่ใน FAA ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้ว แล้วนำขวดดังกล่าวไปใส่ในเครื่องดูดอากาศเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนานอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปผ่านขั้นตอนต่อไป

2.2.2.2 นำเนื้อเยื่อมาผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยให้เนื้อเยื่อผ่านน้ำยาจากระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำยาจาก 50% ไปจนถึง 100% จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปผ่าน 100% TBA ตามด้วยน้ำยาที่ประกอบด้วย TBA และพาราฟินเหลวในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำเนื้อเยื่อไปผ่านขั้นตอนของการแทรกพาราฟินเข้าไปในเนื้อเยื่อ (infiltration)

2.2.2.3 ถ่ายเนื้อเยื่อลงไปในขวดแก้วที่บรรจุพาราฟินที่หลอมแล้ว นำขวดแก้วไปเก็บไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 56° ซ นานประมาณ 1 สัปดาห์หรือมากกว่าจนกระทั่งพาราฟินแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อจนเต็มที่

2.2.2.4 นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟิน จัดตำแหน่งของเนื้อเยื่อให้อยู่ในตำแหน่งและระนาบที่ต้องการ

2.2.2.5 นำแท่งพาราฟินที่ตัดแต่งเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีชิ้นส่วนพืชอยู่ตรงกลางมาติดกับแท่งไม้ จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน โดยตัดเนื้อเยื่อตามยาวหรือขวางให้หนา 15-18 ไมครอน

2.2.2.6 ติดแผ่นริบบอน (paraffin ribbon) ของเนื้อเยื่อกับแผ่นสไลด์ด้วย adhesive วางแผ่นสไลด์บนเครื่องอุ่นสไลด์จนแผ่นริบบอนแห้งและติดกับแผ่นสไลด์

2.2.2.7 นำแผ่นสไลด์ที่ละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อแล้วไปย้อมสี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2.8 ปิดแผ่นสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์โดยใช้ Canada balsam ยึด

2.2.2.9 เมื่อแผ่นสไลด์แห้งสนิทนำแผ่นสไลด์ไปศึกษาเนื้อเยื่อใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ

การทดลองที่ 2.3 การศึกษาเซลล์วิทยา

การทดลองนี้เป็นการศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อปลายรากของพืชทดลองรหัส GE 001 และ GE 002 ด้วยวิธี Feulgen's squash ที่ดัดแปลงโดยดวงทิพย์ (2539) และประภัสสร (2543)

2.3.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.3.1.1 ปลายรากของพืชทดลองรหัส GE 001 และ GE 002

2.3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.3.1.2.1 ขวดแก้วขนาดความจุ 15 มล สำหรับเก็บตัวอย่างปลายราก

2.3.1.2.2 แผ่นสไลด์ และแผ่นปิดสไลด์

2.3.1.2.3 กล้องจุลทรรศน์แบบ dissecting microscope และ stereo microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

2.3.1.2.4 ปรอทวัดความร้อน

2.3.1.2.5 อ่างควบคุมอุณหภูมิ

2.3.1.2.6 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ เข็มเขี่ย ปากคีบ มีดผ่าตัด หลอดทดลอง และตะเกียงแอลกอฮอล์

2.3.1.3 สารเคมี

2.3.1.3.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับหยุดวงชีพของเซลล์ (pretreatment solution) ได้แก่ para-dichlorobenzene (PDB)

2.3.1.3.2 สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาในการรักษาสภาพเซลล์ (fixative solution) คือ 95% ethyl alcohol และ glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3 :1

2.3.1.3.3 สารเคมีที่ใช้ย่อยแยกเซลล์ คือ 1 N HCl

2.3.1.3.4 สีที่ใช้ย้อมโครโมโซมคือ carbol fuchsin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.2 วิธีการ

2.3.2.1 เตรียมปลายรากโดยเลือกปลายรากของรากที่กำลังเจริญเติบโตที่บริเวณปลายมีสีขาวขุ่น ใช้ปลายรากที่งอกใหม่และมีความยาว 1 เซนติเมตร (ซม) ตัดมาเฉพาะส่วนปลายให้มีความยาว 1-2 มิลลิเมตร (มม) เก็บตัวอย่างปลายรากในช่วงเวลา 8.00-12.00 น.

2.3.2.2 หยุดวงชีพเซลล์โดยการแช่ปลายรากในสารละลาย PDB เป็นเวลา 1-5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 10° ซ

2.3.2.3 นำปลายรากออกมาจากสารละลาย PDB ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ นาน 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น

2.3.2.4 แยกเซลล์โดยการแช่รากใน 1 N HCl นาน 1-5 นาที ที่อุณหภูมิ 60° ซ แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น

2.3.2.5 ย้อมเนื้อเยื่อปลายรากใน carbol fuchsin แช่ไว้นาน 1, 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นคีบเนื้อเยื่อวางบนแผ่นกระจกสไลด์ ใช้มีดผ่าตัดเขี่ยเนื้อเยื่อที่ห่อหุ้มรากไว้ออกและตัดเฉพาะส่วนปลายรากให้ยาว 1 มม เขี่ยส่วนเกินทิ้งไป หยดสีย้อม 1 หยดตรงบริเวณ ปลายราก ใช้เข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อเบา ๆ เพื่อแยกเนื้อเยื่อออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ และให้เซลล์กระจาย คีบเนื้อเยื่อส่วนเกินทิ้ง ปิดกระจกปิดสไลด์บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ ใช้กระดาษซับวางบนแผ่นสไลด์เพื่อซับสีที่มากเกินไปออก กดนิ้วหัวแม่มือลงไปเพื่อให้เซลล์กระจาย

2.3.2.6 นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟสและมีการกระจายตัวของโครโมโซมดี ไม่ทับกันและสามารถนับจำนวนโครโมโซมได้แม่นยำ เมื่อได้เซลล์ที่ต้องการแล้วกดแผ่นกระจกปิดสไลด์เบา ๆ เพื่อให้เซลล์แบน และอยู่ในระนาบเดียวกัน ใช้น้ำยาเคลือบเล็บทาบริเวณขอบแผ่นกระจกปิดสไลด์เพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อแห้ง นำแผ่นกระจกสไลด์ไปตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อนับจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วบันทึกภาพ

การทดลองที่ 2.4 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์

การทดลองนี้เป็นการศึกษารูปแบบไอโซไซม์จากใบของพืชทดลองรหัส GE 001 และ GE 002 โดยใช้เอนไซม์ 3 ชนิด คือ acid phosphatase (ACP) esterase (EST) และ peroxidase (POX) วิธีการศึกษาใช้เทคนิคการศึกษาโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิสที่ดัดแปลงโดยอาภัสสรา (2537) พสุ (2546) เพิ่มพงษ์ (2531) ชวนพิศ (2538) และ Hiratsuka *et al*. (1986)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.4.1.1 ใบอ่อนและใบที่เจริญเติบโตเต็มที่ของพืชทดลอง

2.4.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.4.1.2.1 กระติกน้ำแข็งที่บรรจุน้ำแข็งสำหรับแช่ตัวอย่างใบที่เก็บจากแปลงทดลอง

2.4.1.2.2 เครื่องชั่งแบบละเอียด ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

2.4.1.2.3 เครื่องชั่งแบบละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.4.1.2.4 โกร่งบดตัวอย่างพืช

2.4.1.2.5 เครื่องหมุนเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็น

2.4.1.2.6 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

2.4.1.2.7 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4° ซ และตู้แช่อุณหภูมิ -20° ซ

2.4.1.2.8 ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ slab gel (Mini-Protean II ของบริษัท Bio-Rad)

2.4.1.2.9 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า รุ่น POWER PAC 1000 (Bio-Rad)

2.4.1.2.10 ไมโครปิเปตชนิดที่ปรับปริมาตรได้

2.4.1.2.11 หลอดทดลอง (eppendrof tube) ขนาด 1.5 มล

2.4.1.2.12 เครื่องแก้วแบบต่าง ๆ

2.4.1.2.13 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น กรรไกร ถุงพลาสติกใส ใบมีดโกน ช้อนตักสาร ปากกาเขียนแก้ว กระดาษกรอง ถาดพลาสติก กล่องพลาสติกใส ป้ายติดกาว ถุงมือ และกล้องถ่ายภาพพร้อมฟิล์ม

2.4.1.3 สารเคมี

2.4.1.3.1 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของสารสกัด (extraction buffer) มีดังนี้

2.4.1.3.1.1 0.2 M Tris-HCl pH 8.4

2.4.1.3.1.2 PVPP (polyvinyl-polypyrrolidone)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.1.3.2 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของเจล มีดังนี้

2.4.1.3.2.1 30% acrylamide stock solution (acrylamide 29.2 กรัม และ N,N-Methylene-bis-acrylamide 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มล เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4° ซ)

2.4.1.3.2.2 1.0 M Tris-HCl pH 8.8

2.4.1.3.2.3 10%ammonium persulfate (APS) เตรียมทันทีก่อนใช้

2.4.1.3.2.4 TEMED (N,N,N',N'–tetramethyl-ethylene-diamine)

2.4.1.3.3 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ Marker dye มีดังนี้

2.4.1.3.3.1 0.5 % bromophenol blue

2.4.1.3.3.2 10 % glycerol

2.4.1.3.3.3 0.1 M Tris buffer pH 6.7

2.4.1.3.4 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ electrode buffer มีดังนี้

2.4.1.3.4.1 0.025 M Tris

2.4.1.3.4.2 0.192 M glycine pH 8.3

2.4.1.3.5 สารเคมีที่ใช้ย้อมเอนไซม์ มีดังนี้

2.4.1.3.5.1 0.1 M Tris-buffer pH 4.0

2.4.1.3.5.2 3-amino-9-ethylcarbazol

2.4.1.3.5.3 β-naphthol

2.4.1.3.5.4 acetone

2.4.1.3.5.5 3% hydrogen peroxide (H_2O_2)

2.4.1.3.5.6 0.2 M phosphate buffer pH 6.0

2.4.1.3.5.7 fast blue B-salt

2.4.1.3.5.8 α-naphthyl acetate

2.4.1.3.5.9 ethanol

2.4.1.3.5.10 0.2 M acetate buffer pH 4.8

2.4.1.3.5.11 fast ganet GBC disodium salt

2.4.1.3.5.12 disodium α - naphthyl phosphate

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.2 วิธีการ

2.4.2.1 การเตรียมตัวอย่างพืช และการสกัดเอนไซม์

นำใบอ่อนและใบที่เจริญเติบโตเต็มที่ของพืชทดลองมาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น และเช็ดให้แห้ง ชั่งใบมาตัวอย่างละ 1 กรัม ในกรรมวิธีที่เป็นใบที่เจริญเติบโตเต็มที่ต้องตัดเส้นกลางใบทิ้งก่อน หั่นใบเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในโกร่งที่เย็นจัด บดให้ละเอียด ใส่ PVPP 0.05 กรัม และ extraction buffer 3 มล เทสารของเหลวที่สกัดได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล แล้วนำไปแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 2° ซ นาน 20 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ด้านบนใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ นำมาเข้าเครื่องเหวี่ยงอีกครั้ง แล้วจึงดูดส่วนที่เป็นของเหลวใสที่ได้ใส่ไว้ในหลอดทดลองอันใหม่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20° ซ เพื่อเตรียมการทำโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิสต่อไป

2.4.2.2 การทำโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

ประกอบชุดแผ่นกระจกของ Mini-Protein® II cell Electrophoresis (Bio-rad) เข้าด้วยกัน จากนั้นเตรียมสารละลาย separating gel ดังแสดงในตารางที่ 2 นำสารละลายเจลมาเทลงระหว่างแผ่นกระจกพร้อมกับเสียบหวี (comb) ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงเพื่อรอให้เจลเกิด polymerization และเมื่อเจลแข็งตัวจึงดึงหวีเสียบออกจะเห็นเป็นช่อง (well) สำหรับหยอดตัวอย่างที่ผสม marker dye แล้ว จากนั้นประกอบชุดอิเล็คโทรโฟรีซิสเข้าด้วยกัน เติม electrode buffer ลงใน chamber หยอดตัวอย่างที่ผสมกับ marker dye ในอัตราส่วน 9:1 ลงในช่องของเจลปริมาตร 20 ไมโครลิตร ต่อขั้วบวกและขั้วลบเข้ากับ chamber เปิดสวิตซ์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าโดยใช้กระแสที่ 20 มิลลิแอมแปร์ ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าเมื่อระดับของ marker dye อยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่นเจล 2-3 มม นำแผ่นกระจกออกจาก chamber แล้วนำเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นกระจกออกมาวางบนจานแก้ว (plate) เพื่อรอการย้อมสีเอนไซม์ต่อไป

2.4.2.3 การย้อมสีเอนไซม์

เตรียม staining solution ของไอโซไซม์ 3 ชนิดคือ ACP, EST และ POX (ดูรายละเอียดการเตรียมจากภาคผนวก) เทลงบนจานแก้วที่มีเจลอยู่ นำกรรมวิธีของเอนไซม์ POX และ EST ไปเก็บในที่มืด ทิ้งไว้ 20-30 นาที ส่วนกรรมวิธีของเอนไซม์ ACP ทิ้งไว้ 2-12 ชั่วโมง เขย่าเจลเป็นระยะ ๆ รอจนเกิดแถบสีแล้วจึงล้างสีส่วนเกินออก หลังจากนั้นแช่เจลด้วย 7% acetic acid เพื่อรักษาสภาพเจล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 ส่วนผสมของสารเคมีในการเตรียม separating gel (สำหรับเจล 4 แผ่น)

stock solution	gel 8.5 %
acrylamide / Bis	5.66 มล
น้ำกลั่น	9.04 มล
1.0 M Tris-HCl pH 8.8	5.00 มล
10% ammonium persulfate (เตรียมโดยชั่งสาร 0.1 กรัมต่อน้ำ 1 มล)	150.00 ไมโครลิตร
TEMED	10.00 ไมโครลิตร

2.4.2.4 การบันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูล

นำเจลที่เกิดแถบสีมาบันทึกค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของ marker dye และแถบสี พร้อมทั้งบันทึกตำแหน่ง ขนาด จำนวนแถบสี และ รูปแบบการเกิดแถบสีของไอโซไซม์แต่ละชนิด ถ่ายภาพเจลและคำนวณค่าระยะทางการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) ตามสมการข้างล่างนี้แล้วนำไปเขียนแผนภาพไซโมแกรม

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของแถบสี}}{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของ marker dye}}$$

การทดลองที่ 3 การผสมเกสร

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการผสมเกสรของพืชทดลอง โดยการถ่ายละอองเกสรด้วยมือเพื่อให้เกิดการผสมเกสรในดอกเดียวกัน

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 พืชทดลองคือว่านจูงนาง 2 รหัส คือ GE 001 และ GE 002

3.1.2 วัสดุและอุปกรณ์ในการผสมเกสร ได้แก่ แท่งไม้ที่เหลาปลายแหลม แผ่นป้ายพลาสติกพร้อมด้าย สมุดและดินสอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 วิธีการ

3.2.1 การผสมเกสร

3.2.1.1 การเตรียมดอกของพืชทดลอง

เลือกต้นพืชที่มีช่อดอกที่ก้านช่อแข็งแรง และมีดอกบานเต็มที่

3.2.1.2 การผสมเกสร

เมื่อเลือกดอกได้แล้วเขี่ยกลุ่มเรณูให้ลงไปในโคนของเส้าเกสรของดอกเดียวกัน จากนั้นเขียนป้ายติดบอกคู่ผสม วันที่ผสม และเวลาที่ผสมไว้ที่ก้านดอกที่ผสมแล้ว ผสมเกสรในช่วงเวลาแตกต่างกัน 8 ช่วง คือ ผสมเกสรทุก ๆ 1 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลา 7.00-11.00 น. และ 17.00-19.00 น. วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ๆ ละ 1 ดอก

3.2.1.3 การบันทึกข้อมูล

3.2.1.3.1 จำนวนดอกที่ผสมติด

3.2.1.3.2 ระยะเวลาในการติดฝักจนถึงระยะฝักแก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved