บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาลักษณะและการผสมพันธุ์กล้วยไม้ดินว่านจูงนางที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ แบ่งออกเป็น 5 การทดลอง คือ **การทดลองที่ 1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดลองที่ 2 การศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ การทดลองที่ 3 การศึกษาโครโมโซม การทดลองที่ 4 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ และ การทดลองที่ 5 การผสมพันธุ์**

อุปกรณ์และวิธีการทดลองมีดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของว่านจูงนางนี้เป็นการศึกษากับต้นพืชที่เก็บรวบรวมมาจากแหล่งกระจายพันธุ์หลายแหล่งที่มีนิเวศวิทยาแตกต่างกัน ซึ่งแหล่งกระจายพันธุ์ดังกล่าวอยู่ในพื้นที่ป่าประเภทป่าเต็งรัง และป่าผสมผลัดใบ/ไผ่ ในเขตพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ตำบลป่าเมี่ยง อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ โดยพื้นที่ดังกล่าวมีความสูงอยู่ระหว่าง 350-800 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล

ว่านจูงนางที่เป็นพืชทดลองมีทั้งหมดรวม 7 อีโคไทป์ ซึ่งให้รหัสประจำอีโคไทป์เป็น Ec 01 Ec 02 Ec 03 Ec 04 Ec 05 Ec 06 และ Ec 07 ดังแสดงภาพของต้นพืชในแต่ละอีโคไทป์ไว้ในภาพที่ 1-7

บันทึกข้อมูลของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของต้นพืชทดลองอันได้แก่ ราก หัว ใบ และ ดอก ในระยะที่ส่วนต่าง ๆ ของต้นพืชเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว

1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1 พืชทดลอง คือ ต้นว่านจูงนาง 7 อีโคไทป์ ซึ่งคัดเลือกจากต้นพืชที่ปลูกเลี้ยงไว้ในแปลงรวบรวมพันธุ์อีโคไทป์ละ 5 ต้น ติดป้ายประจำต้นในแต่ละรหัสเพื่อการบันทึกข้อมูล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.2 อุปกรณ์ ได้แก่ ดินสอ ปากกา ไม้บรรทัด สมุด กระดาษสำหรับวาดภาพส่วนประกอบของต้นพืช พู่กัน สี มีดผ่าตัด ปากคีบ เวอร์เนียคาลิปเปอร์ และกล้องถ่ายภาพ

1.2 วิธีการ

1.2.1 บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของพืชทดลอง ได้แก่ ราก หัว ใบ ดอก และฝัก ในระยะที่ส่วนต่าง ๆ ของต้นเจริญเติบโตเต็มที่ โดยบันทึกลักษณะดังกล่าวจากต้นพืชอีโคไทป์ละ 5 ต้น พร้อมทั้งวาดภาพเพื่อแสดงลักษณะทางพฤกษศาสตร์โดยละเอียด

1.2.2 บันทึกจำนวนและขนาดของส่วนประกอบของต้นดังนี้

1.2.2.1 **ราก** จำนวนรากต่อหัว และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของราก

1.2.2.2 **หัว** จำนวนหัวต่อกอ จำนวนปล้องต่อหัว ขนาดของหัวใหม่ ซึ่งเกิดขึ้นในปีปัจจุบัน ในลักษณะของความยาวของหัว และเส้นผ่าศูนย์กลางของหัว ซึ่งวัดจากส่วนที่กว้างที่สุดของหัว

1.2.2.3 **ใบ** จำนวนใบต่อต้น ความกว้างของใบจากขอบใบด้านหนึ่งมายังขอบใบอีกด้านหนึ่งในตำแหน่งที่กว้างที่สุดของใบ และ ความยาวใบจากฐานใบถึงปลายใบ

1.2.2.4 **ช่อดอก** จำนวนช่อดอกต่อต้น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของช่อดอก และความยาวของก้านช่อดอก

1.2.2.5 **ดอก** จำนวนดอกต่อช่อ ความกว้างและความยาวของดอก ความกว้างและความยาวของกลีบเลี้ยง กลีบดอก และกลีบปาก

1.2.2.6 **ฝัก** จำนวนฝักต่อช่อ ความกว้างและความยาวของฝัก

การทดลองที่ 2 การศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์

การทดลองนี้เป็นการศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ ที่เป็นส่วนประกอบของต้นพืชทดลอง โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อที่ตัดตามยาวและตัดตามขวางตามวิธี paraffin embedding ที่เสนอไว้โดย Johansen (1940)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 พืชทดลอง

พืชทดลองคือว่านจูงนาง 7 อีโคไทป์ ดังระบุในข้อ 1.1.1

2.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1.2.1 เครื่องดูดอากาศ

2.1.2.2 เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome)

2.1.2.3 กล้องจุลทรรศน์แบบ dissecting microscope และ stereo microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

2.1.2.4 ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิเป็น 56 องศาเซลเซียส (°ซ)

2.1.2.5 แผ่นให้ความร้อน (hot plate)

2.1.2.6 เครื่องอุ่นสไลด์ที่ปรับอุณหภูมิเป็น 40°ซ

2.1.2.7 แท่งไม้สี่เหลี่ยมขนาด 1.5×1.5×1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่ต้มให้อิ่มตัวในพาราฟิน

2.1.2.8 แผ่นกระจกสไลด์ (slide) และแผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover slip)

2.1.2.9 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดใส่ชิ้นส่วนพืช บีกเกอร์ กระบอกตวง กรวยกรอง และ ขวดย้อมสี

2.1.2.10 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ กระดาษสำหรับพับกระทงเพื่อการฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน กระดาษกรอง ตะเกียงแอลกอฮอล์ ป้ายติดกาว พู่กันขนอ่อน มีดผ่าตัด ใบมีดโกน และปากคีบ

2.1.3 สารเคมี

2.1.3.1 น้ำยารักษาสภาพเซลล์ (fixtative) ได้แก่ FAA (formalin-acetic acid-alcohol) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสม ดังนี้

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

2.1.3.2 น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ประกอบด้วยส่วนผสมดังแสดงในตารางที่ 1

2.1.3.3 สารตัวกลางที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) ได้แก่ Paraplast

2.1.3.4 น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive) เตรียมน้ำยาเข้มข้นจากส่วนผสมของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไข่ขาว	1	มล
น้ำกลั่น	49	มล

เมื่อจะใช้จึงนำน้ำยาเข้มข้นมาเจือจางโดยใช้น้ำยาเข้มข้น 1 มล เติมน้ำกลั่นลงไปให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 50 มล

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ในแต่ละขั้นตอน

ขั้นตอน	ปริมาณแอลกอฮอล์ (%)	95 % ethyl alcohol (มล)	100 % ethyl alcohol (มล)	tertiary butyl alcohol (TBA)(มล)	น้ำกลั่น (มล)
1	50	40	-	10	50
2	70	50	-	20	30
3	85	50	-	35	15
4	95	45	-	55	-
5	100	-	25	75	-

2.1.3.5 สีย้อมเนื้อเยื่อใช้สี Delafield's hematoxylin ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

aluminium sulfate $[Al_2(SO_4)_3.16H_2O]$	400	มล
hematoxylin $(C_{16}H_{14}O_6)$	4	กรัม
95% ethyl alcohol	25	มล
methyl alcohol	100	มล
glycerol	100	มล

2.1.3.6 น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อสะอาด (clearing reagent) คือ xylene

2.1.3.7 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นกระจกสไลด์ (mounting media) คือ Canada balsam

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 วิธีการ

การเตรียมสไลด์ถาวรของชิ้นส่วนพืชมีขั้นตอนของวิธีการดังนี้

2.2.1 เก็บตัวอย่างของพืชทดลอง ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของ ราก ลำต้น ใบ ดอก และฝัก นำมาแช่ในน้ำยา FAA ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้ว แล้วนำขวดดังกล่าวไปใส่ในเครื่องดูดอากาศเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนานอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปผ่านขั้นตอนต่อไป

2.2.2 นำเนื้อเยื่อมาผ่านขั้นตอนของการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยให้ผ่านขั้นตอนของน้ำยาที่ใช้ในการดึงน้ำออกจากเซลล์ เริ่มจากระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำยาที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (%) ไปจนถึงระดับ 100 % โดยที่แต่ละขั้นตอนใช้เวลา 6-24 ชั่วโมง จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปผ่าน TBA เข้มข้น 100 % แล้วตามด้วยส่วนผสมของ TBA และพาราฟินเหลวในอัตราส่วน 1:1 ต่อมานำเนื้อเยื่อไปผ่านขั้นตอนของการแทรกพาราฟินเข้าไปในเนื้อเยื่อ (infiltration)

2.2.3 ถ่ายเนื้อเยื่อลงไปในขวดแก้วที่บรรจุพาราฟิน (Paraplast) ที่หลอมแล้ว นำขวดแก้วเหล่านั้นไปเก็บไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 56 ˚ซ นานประมาณ 1 สัปดาห์ หรือมากกว่า จนกระทั่งพาราฟินแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อจนเต็มที่

2.2.4 นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟิน แล้วจัดตำแหน่งของเนื้อเยื่อให้อยู่ในตำแหน่งและระนาบที่ต้องการ

2.2.5 นำแท่งพาราฟินที่ได้ไปตัดแต่งให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าโดยให้มีชิ้นส่วนพืชอยู่ตรงกลาง แล้วนำมาติดกับแท่งไม้ จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน โดยตัดเนื้อเยื่อตามยาวหรือตามขวางให้หนา 13-15 ไมครอน

2.2.6 นำแถบชิ้นส่วนพืช (paraffin ribbon) ที่ได้จากการตัดไปติดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ด้วยน้ำยายึดเนื้อเยื่อพืช วางแผ่นสไลด์บนเครื่องอุ่นสไลด์จนแถบชิ้นส่วนพืชแห้งและติดกับแผ่นสไลด์

2.2.7 นำแผ่นกระจกสไลด์ที่ติดเนื้อเยื่อที่แห้งสนิทแล้วไปละลายพาราฟินออกด้วย xylene แล้วนำไปย้อมสี

2.2.8 ปิดแผ่นกระจกสไลด์ด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์โดยใช้ Canada balsam ยึด

2.2.9 เมื่อแผ่นกระจกสไลด์แห้งสนิท นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาเนื้อเยื่อใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 การศึกษาโครโมโซม

การทดลองนี้เป็นการศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อปลายรากของพืชทดลองด้วยวิธี Feulgen's squash ซึ่งดัดแปลงโดย ศลิษา (2549)

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 วัสดุทดลอง

ปลายรากพืชทดลอง 7 อีโคไทป์ ดังระบุในข้อ 1.1.1

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.2.1 ขวดแก้วขนาด 15 มล สำหรับเก็บตัวอย่างปลายรากพืช

3.1.2.2 แผ่นกระจกสไลด์ และแผ่นกระจกปิดสไลด์

3.1.2.3 ปรอทวัดความร้อน

3.1.2.4 อ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ

3.1.2.5 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ ดินสอ ป้ายติดกาว ปากคีบ เข็มเขี่ย มีดผ่าตัด กระดาษเยื่อ กระดาษกรอง กรวยกรอง กระบอกตวงสารเคมี หลอดทดลอง หลอดดูด และน้ำยาเคลือบเล็บ

3.1.2.6 กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และ photomicroscope

3.1.2.7 สารเคมี

3.1.2.7.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับหยุดวงชีพเซลล์ (pre-treatment) ได้แก่ para-dichlorobenzene (PDB)

3.1.2.7.2 สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาในการรักษาสภาพเซลล์ (fixtative) คือ 95 % ethyl alcohol และ glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3:1 โดยปริมาตร

3.1.2.7.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับย่อยแยกเซลล์ (hydrolytic solution) คือ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 1 นอร์มอล

3.1.2.7.4 สีที่ใช้ย้อมโครโมโซม คือ สารละลายสี carbol fuchsin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 วิธีการ

3.2.1 เตรียมปลายรากของพืชทดลองโดยเลือกรากที่กำลังเจริญเติบโตซึ่งบริเวณปลายมีสีขาวขุ่น ใช้ปลายรากที่งอกใหม่และมีความยาวประมาณ 1 ซม ตัดมาเฉพาะส่วนปลายของรากเพียง 1-2 มิลลิเมตร (มม) โดยเก็บตัวอย่างปลายรากในช่วงเวลา 11.00 น.

3.2.2 หยุดวงชีพเซลล์โดยการแช่ปลายรากในสารละลาย PDB เป็นเวลา 1-6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 10 ˚ซ

3.2.3 นำปลายรากออกมาจากสารละลาย PDB ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง

3.2.4 ย่อยเซลล์ให้แยกจากกันโดยการนำปลายรากไปแช่ในสารละลาย HCl เข้มข้น 1 นอร์มอล นาน 1-5 นาที ที่อุณหภูมิ 60˚ซ แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น

3.2.5 ย้อมเนื้อเยื่อในสี carbol fuchsin โดยแช่เนื้อเยื่อไว้ในสีนาน 6-12 ชั่วโมง หลังจากนั้นคีบเนื้อเยื่อออกวางบนแผ่นกระจกสไลด์ ใช้มีดผ่าตัดตัดเฉพาะส่วนปลายรากให้ยาวประมาณ 1 มม เขี่ยส่วนเกินทิ้งไป หยดสี 1 หยด ลงไปบนเนื้อเยื่อราก ใช้เข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อเบา ๆ เพื่อให้เซลล์กระจาย คีบเนื้อเยื่อส่วนเกินทิ้งแล้วปิดแผ่นกระจกปิดสไลด์บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อวางกระดาษซับบนแผ่นกระจกสไลด์เพื่อซับสีที่มากเกินไปออกพร้อมทั้งกดนิ้วหัวแม่มือลงไปบนแผ่นกระจกสไลด์เพื่อให้เซลล์กระจาย

3.2.6 นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟสและมีการกระจายตัวของโครโมโซมดี สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้อย่างแม่นยำ เมื่อได้เซลล์ที่ต้องการแล้วกดแผ่นกระจกปิดสไลด์เบา ๆ เพื่อให้เซลล์แบน และอยู่ในระนาบเดียวกัน ใช้น้ำยาเคลือบเล็บทาที่บริเวณขอบแผ่นกระจกปิดสไลด์เพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อแห้ง นำแผ่นกระจกสไลด์ไปตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อนับจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งบันทึกภาพ

การทดลองที่ 4 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์

การทดลองนี้เป็นการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของพืชทดลองจากเนื้อเยื่อของใบ โดยใช้เทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ศึกษากับระบบเอนไซม์ 4 ระบบ ได้แก่ ACP, EST, POX และ SOD ตามวิธีการของ พสุ (2546) สุทธินันท์ (2548) และ ศลิษา และ คณะ (2548)

4.1 วัสดุและอุปกรณ์

4.1.1 ใบของพืชทดลองดังระบุในข้อ 1.1.1

4.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

4.1.2.1 กระติกน้ำแข็งสำหรับแช่ตัวอย่างจากแปลงทดลอง

4.1.2.2 เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1.2.3 เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

4.1.2.4 ตู้แช่แข็งที่ปรับอุณหภูมิเป็น -20 ° ซ และตู้เย็น

4.1.2.5 ชุดอิเล็คโตรโฟรีซีสแบบ slab gel

4.1.2.6 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า Model 1000/500

4.1.2.7 เครื่องหมุนเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็นได้ (refrigerated centrifuge)

4.1.2.8 เครื่องวัดความเป็นกรด–ด่างของสารละลาย (pH meter)

4.1.2.9 โกร่งบดตัวอย่างพืช

4.1.2.10 ไมโครปิเปต

4.1.2.11 หลอดใส่สาร (Eppendorf tube) ขนาด 1.5 มล

4.1.2.12 ชุดอ่านเจล (visible light transilluminator)

4.1.2.13 เครื่องแก้ว

4.1.2.14 หลอดใส่สารที่ปรับปริมาตรได้ (syringe) ขนาด 50 ไมโครลิตร

4.1.2.15 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น กล่องโฟม แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ ถุงมือ กรรไกร ใบมีดโกน กระดาษเยื่อ กระดาษชั่งสาร ปากคีบ ช้อนตักสาร ถุงพลาสติกใส กล่องพลาสติกสำหรับใส่เจล ถาดพลาสติก กระดาษติดป้าย แผ่นพลาสติกใส กระดาษ A 4 ไม้บรรทัด ดินสอ สมุดบันทึก และกล้องถ่ายรูป

4.1.3 สารเคมี

4.1.3.1 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ extraction buffer

4.1.3.1.1 0.2 M tris-HCl buffer pH 7 ประมาณ 3 มิลลิลิตร (มล)

4.1.3.1.2 0.5 M ethylene diamine tetraacetate (EDTA) 0.06 มล

4.1.3.1.3 polyvinylpyrolidone-10 (PVP-10) 0.5 กรัม

4.1.3.1.4 0.5 M dithiothreitol (DTT) 0.12 มล

4.1.3.1.5 14.3 M β-mercaptoethanol (MSH) 21 ไมโครลิตร

4.1.3.2 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ gel

4.1.3.2.1 30 % acrylamide stock solution (acrylation 29.2 กรัม และ bis-acrylamide 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มล เก็บไว้ในขวดสีชาที่ 4 ° ซ)

4.1.3.2.2 1.5 M tris-HCl pH 8.8

4.1.3.2.3 1.5 % ammonium persulfate (APS) เตรียมทันทีก่อนใช้

4.1.3.2.4 TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl ethylene-diamine)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1.3.2.5 น้ำกลั่น

4.1.3.3 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ loading dye

4.1.3.3.1 10 % glycerol

4.1.3.3.2 0.5 % bromophenol blue

4.1.3.3.3 0.1 M tris buffer pH 6.7

4.1.3.4 สารเคมีที่ใช้เป็น running buffer

4.1.3.4.1 tris

4.1.3.4.2 glycine

เตรียมโดยใช้ tris 3 กรัม และ glycine 14.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มล pH 8.3 เมื่อจะใช้จึงนำน้ำยาเข้มข้นมาเจือจางโดยใช้น้ำยาเข้มข้น 1 ส่วน ต่อ น้ำกลั่น 4 ส่วน

4.1.3.5 สารเคมีที่ใช้ย้อมเอนไซม์

4.1.3.5.1 0.1 M tris-HCl pH 4.0

4.1.3.5.2 3-amino-9-ethylcarbazole

4.1.3.5.3 β-naphthol

4.1.3.5.4 3 % H_2O_2

4.1.3.5.5 acetone

4.1.3.5.6 0.2 M phosphate buffer pH 6.0

4.1.3.5.7 fast blue B-salt

4.1.3.5.8 α-naphthyl acetate

4.1.3.5.9 ethanol

4.1.3.5.10 0.05 M acetate buffer pH 4.8

4.1.3.5.11 fast ganet GBC diasonium salt

4.1.3.5.12 disodium α-naphthyl phosphate

4.1.3.5.13 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.5

4.1.3.5.14 nitro blue tetrazolium (NBT)

4.1.3.5.15 riboflavin

4.1.3.5.16 TEMED

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 วิธีการ

4.2.1 การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัดเอนไซม์

นำใบของพืชทดลองมาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น เช็ดให้แห้ง ชั่งใบตัวอย่างละ 1.0 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในโกร่งพร้อมทั้งเทไนโตรเจนเหลวใส่แล้วบดตัวอย่างจนละเอียดจากนั้นเติม extraction buffer 3 มล แล้วบดจนตัวอย่างละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทสารของเหลวที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 2 ˚ซ เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ที่อยู่ด้านบนใส่หลอดทดลองอันใหม่นำมาเข้าเครื่องเหวี่ยงอีกครั้ง แล้วดูดส่วนที่เป็นของเหลวใสที่ได้ใส่ไว้ในหลอดทดลองอันใหม่นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 ˚ซ เพื่อเตรียมนำไป ทำ polyacrylamide gel electrophoresis ต่อไป

4.2.2 การทำ polyacrylamide gel electrophoresis

ประกอบชุดแผ่นกระจกของ Mini-Protean® 3 Cell Electrophoresis (Bio-Rad) เข้าด้วยกัน จากนั้นเตรียมสารละลายของเจล 8.5 % สำหรับ separating gel โดยผสมสารจากส่วนผสมที่แสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนผสมของสารเคมีในการเตรียม separating gel (สำหรับเจล 4 แผ่น)

stock solution	8.5 % separating gel	
น้ำกลั่น	9.04	มล
1.0 M tris pH 8.8	5.0	มล
30% acrylamide	5.66	มล
10% APS	150.0	ไมโครลิตร
TEMED	10.0	ไมโครลิตร

เมื่อเตรียมสารละลายเจลเรียบร้อยแล้วนำสารละลายมาเทลงระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ พร้อมกับเสียบหวี (comb) ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อรอให้เจลเกิด polymerization และเมื่อเจลแข็งตัวจึงดึงหวีเสียบออกเห็นเป็นช่อง (well) สำหรับหยอดตัวอย่าง จากนั้นต่อชุดอิเล็คโทรโฟรีซีสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม running buffer ลงใน chamber แล้วหยอดตัวอย่างที่ผสมกับ loading dye ในอัตราส่วน 9:1 ลงในช่องของเจล โดยใช้ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อช่อง ระวังไม่ให้ตัวอย่างผสมปนกันในแต่ละช่อง ปิดฝาครอบแล้วต่อขั้วไฟเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เปิดสวิทช์ให้กระแสไฟผ่านโดยใช้กระแสไฟ 20 มิลลิแอมแปร์ เมื่อสีของ loading dye เคลื่อนที่มาถึงปลายล่างของเจล โดยห่างจากขอบล่าง 2-3 มม ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า จากนั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำแผ่นกระจกออกจาก chamber แล้วแกะเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นกระจกออกมาวางบนจานแก้ว เพื่อย้อมสีเอนไซม์ต่อไป

4.2.3 การย้อมสีเอนไซม์

เตรียม staining solution ของเอนไซม์ตามระบบเอนไซม์ 4 ชนิด คือ ACP, EST, POX และ SOD (รายละเอียดของการเตรียมแสดงไว้ในภาคผนวก) แล้วเทลงบนจานแก้วที่มีเจลอยู่ สำหรับกรรมวิธีของ ACP หลังจากที่เท staining solution แล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2-12 ชั่วโมง ส่วนกรรมวิธีของ EST และ POX เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 20-30 นาที และกรรมวิธี SOD เก็บไว้ในที่มืดที่มีอุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำออกมาเปลี่ยน staining solution แล้วเก็บไว้ในที่มีแสง 4-12 ชั่วโมง

4.2.4 การบันทึกข้อมูล

นำเจลที่ย้อมสีแล้วมาบันทึกค่าการเคลื่อนที่ของแถบสี คำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) บันทึกจำนวนและรูปแบบการเกิดแถบสี วาด schematic zymogram บันทึกการมีและไม่มีแถบสีในตำแหน่งเดียวกัน โดยคำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ตามสมการข้างล่างนี้

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของแถบสี}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของ marker}}$$

แสดงผลในรูปแบบของเดนโดรแกรม โดยวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่าง หาค่าความสัมพันธ์จากแถบสีด้วย UPGMA cluster analysis ตามวิธีการของ Jaccard's similarity coefficient โดยใช้โปรแกรม SPSS

การทดลองที่ 5 การผสมพันธุ์

ศึกษาความเป็นไปได้ของการผสมเกสรแบบผสมตัวเองและผสมข้ามอีโคไทป์ของพืชทดลอง โดยการถ่ายละอองเกสรด้วยมือในระยะที่ดอกพร้อมผสม

5.1 วัสดุและอุปกรณ์

5.1.1 พืชทดลอง คือ ว่านจูงนาง 7 อีโคไทป์ ดังระบุไว้ในข้อ 1.1.1

5.1.2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการผสมเกสร ได้แก่ ไม้ผสมเกสร สมุด ดินสอเข็ม ด้าย และแผ่นป้ายพลาสติก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2 วิธีการ

5.2.1 การผสมเกสร

ทดลองผสมเกสรแบบผสมตัวเองและผสมข้ามอีโคไทป์ให้กับพืชทดลอง โดยการถ่ายละอองเกสรด้วยมือในระยะที่ดอกพร้อมผสม ผสมเกสรในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน 8 ช่วง คือ ผสมเกสรทุก ๆ 1 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลา 7.00-11.00 น. และ 17.00-19.00 น. วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ดอก โดยใช้ไม้ผสมเกสรเขี่ยเกสรเพศผู้ออกมาแล้วนำไปใส่ยอดเกสรเพศเมียแล้วติดป้ายบันทึกข้อมูลการผสม

5.2.2 การบันทึกข้อมูล

บันทึกจำนวนดอกที่ผสมติด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved