บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาลักษณะของแผ่นดินเย็น (*Nervilia aragoana* Gaud.) ที่กระจายพันธุ์ในพื้นที่ป่าของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ แบ่งออกเป็น 5 การทดลอง คือ **การทดลองที่ 1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดลองที่ 2 การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยา การทดลองที่ 3 การศึกษาเซลล์วิทยา การทดลองที่ 4 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์** และ **การทดลองที่ 5 การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโต**

การทดลองที่ 1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของต้นพืช ได้แก่ หัว ใบ ดอก ฝัก ไหล และ ราก มีอุปกรณ์และวิธีการดังนี้

1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1 พืชทดลอง ได้แก่แผ่นดินเย็นซึ่งเป็นต้นที่นำมาจากแหล่งกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติในพื้นที่ป่าของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ แล้วรวบรวมมาปลูกเลี้ยงในแปลงรวบรวมพันธุ์กล้วยไม้ป่าภายในศูนย์ฯ แผ่นดินเย็นเหล่านี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มของตัวอย่างที่แตกต่างกัน ให้รหัส ประจำกลุ่มเป็น N 01, N 02 และ N 03 ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาใช้ตัวแทนจากต้นพืชใน 3 กลุ่มดังกล่าว จำนวนกลุ่มละ 5 ต้น เพื่อนำมาบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของต้น

1.1.2 อุปกรณ์ ได้แก่ ไม้บรรทัด สมุด ดินสอ ปากกา ยางลบ แผ่นป้ายพลาสติก แว่นขยาย มีดผ่าตัด ปากคีบ กล้องถ่ายภาพพร้อมฟิล์ม แผ่นรองกระดาษ และ กระดาษสำหรับวาดภาพส่วนประกอบของต้นพืช

1.2 วิธีการ

1.2.1 บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของต้นพืชซึ่งได้แก่ลักษณะของหัว ใบ ช่อดอก ดอก ฝัก ไหล และ ราก ของพืชทดลองดังระบุไว้ในข้อ 1.1.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การบันทึกกระทำในระยะที่ส่วนต่าง ๆ ดังกล่าวเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว พร้อมทั้งวาดภาพทางพฤกษศาสตร์แสดงส่วนประกอบของต้นพืชทั้ง 3 รหัสโดยละเอียด

1.2.2 บันทึกจำนวนและขนาดของส่วนประกอบของต้นดังนี้

1.2.2.1 **หัว** จำนวนหัวต่อต้น จำนวนปล้องต่อหัว ขนาดความกว้าง ความยาว และ ความสูงของหัว โดยวัดจากส่วนที่กว้างที่สุด

1.2.2.2 **ต้น** ความสูงของต้นโดยวัดจากโคนต้นจนถึงปลายก้านใบ

1.2.2.3 **ใบ** ความกว้าง และ ความยาวของใบ

1.2.2.4 **ช่อดอก** ความกว้างและความยาวของก้านช่อดอก และ จำนวนดอกต่อช่อ

1.2.2.5 **ดอก** ขนาดของดอกโดยวัดความยาวจากปลายของกลีบเลี้ยงด้านบนถึงปลายกลีบปาก ความกว้างและความยาวของกลีบเลี้ยง กลีบดอก และ กลีบปากของดอกที่บานเต็มที่ ความยาวของก้านดอกย่อย ความกว้างและความยาวของเส้าเกสร จำนวนก้อนเรณู และ ความกว้างและความยาวของฝาอับเรณู

1.2.2.6 **ฝัก** ความกว้างและความยาวของฝัก และ จำนวนฝักต่อช่อ

1.2.2.7 **ไหล** จำนวนและขนาดของไหล

1.2.2.8 **ราก** จำนวนและขนาดของราก

การทดลองที่ 2 การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยา

ศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาของเนื้อเยื่อของ ราก ลำต้น ใบ ดอก ฝัก และไหล ของพืชทดลองโดยศึกษาจากเนื้อเยื่อที่ตัดตามขวางและตามยาวของอวัยวะดังกล่าว ตามวิธีการศึกษาเนื้อเยื่อแบบการฝังเนื้อเยื่อลงในพาราฟิน (paraffin embedding) ที่เสนอไว้ โดย Johansen (1940) การทดลองมีอุปกรณ์และวิธีการดังนี้

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1.1.1 กล้องจุลทรรศน์แบบ dissecting microscope และ stereo microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

2.1.1.2 เครื่องดูดอากาศ

2.1.1.3 เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน พร้อมใบมีด

2.1.1.4 เครื่องอุ่นสไลด์ที่ปรับอุณหภูมิเป็น 40 ˚ซ โดยประมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.1.5 แท่งไม้สี่เหลี่ยมขนาด 1.5×1.5×1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มให้อิ่มตัวในพาราฟิน

2.1.1.6 แผ่นให้ความร้อน

2.1.1.7 ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิเป็น 58-60 ˚ซ

2.1.1.8 แผ่นกระจกสไลด์ (slide) และ แผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover slip)

2.1.1.9 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดแก้วขนาดเล็กพร้อมฝา บีกเกอร์ กระบอกตวงสารเคมี ขวดย้อมสี และ หลอดหยด

2.1.1.10 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ กระดาษกาว ป้ายติดกาว ตะเกียงแอลกอฮอล์ เข็มเขี่ยปลายงอ ปากคีบ มีดผ่าตัด พู่กันขนอ่อน กระดาษพับแม่พิมพ์ และ กระดาษเยื่อ

2.1.2 สารเคมีและส่วนผสมของน้ำยาต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง

2.1.2.1 น้ำยารักษาสภาพเซลล์ (fixtative) ได้แก่ FAA (formalin-acetic acid-alcohol) มีสารเคมีที่ใช้เป็นส่วนผสม ดังนี้

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

2.1.2.2 น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) มีส่วนผสมของสารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาในขั้นตอนต่าง ๆ เพื่อการดึงน้ำออกจากเซลล์ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์

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

2.1.2.3 สารตัวกลางที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ ได้แก่ Paraplast

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.2.4 น้ำยายึดแผ่นเนื้อเยื่อพืชให้ติดกับแผ่นกระจกสไลด์ (adhesive) ได้แก่ น้ำยาเข้มข้นจากไข่ขาวที่ตีจนข้น ตักฟองอากาศออกให้หมด แล้วเก็บน้ำยาเข้มข้น ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15˚ซ เมื่อจะใช้จึงนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:49

2.1.2.5 สีย้อมเนื้อเยื่อคือ Delafield's hematoxylin มีส่วนผสมดังนี้

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

2.1.2.6 น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อสะอาด คือ xylene

2.1.2.7 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นกระจกสไลด์คือ Canada balsam

2.2 วิธีการ

การเตรียมสไลด์ถาวรของชิ้นส่วนพืชมีขั้นตอนของวิธีการดังนี้

2.2.1 เก็บตัวอย่างชิ้นส่วนของส่วนประกอบของต้นพืชทดลองซึ่ง ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ ดอก และ ฝัก มาใส่ในน้ำยา FAA ที่ บรรจุอยู่ภายในขวดแก้วสำหรับเก็บตัวอย่าง แล้วนำขวดแก้วดังกล่าวใส่ในเครื่องดูดอากาศเพื่อดูดเอาอากาศออกจากเนื้อเยื่อ ให้ขวดแก้วอยู่ในเครื่องจนกระทั่งตัวอย่างเนื้อเยื่อจมในน้ำยา จากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมงเป็นอย่างต่ำ

2.2.2 นำชิ้นส่วนมาผ่านขั้นตอนของการดึงน้ำออกจากเซลล์โดยให้ผ่านน้ำยาที่มีระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์จาก 50%, 70%, 85%, 95% ไปจนถึง100% ตามลำดับ โดยให้เนื้อเยื่ออยู่ในน้ำยาในแต่ละขั้นตอนนาน 6-12 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชไปผ่าน 100% TBA นาน 6-24 ชั่วโมง 3 ครั้ง ตามด้วยน้ำยาที่ประกอบด้วย TBA และพาราฟินเหลวอัตราส่วน 1:1 นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำเนื้อเยื่อไปผ่านขั้นตอนของการแทรกพาราฟินเข้าไปในเนื้อเยื่อ

2.2.3 เทน้ำยา TBA และ พาราฟินเหลวออก แล้วเติมพาราฟินที่หลอมแล้วใส่ลงไปแทนที่ จากนั้นนำขวดแก้วไปเก็บไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 58-60 ˚ซ นานประมาณ 1 สัปดาห์หรือมากกว่า จนกระทั่งพาราฟินแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อได้เต็มที่

2.2.4 นำกระดาษที่พับเป็นถ้วยแม่พิมพ์มาวางบนแผ่นให้ความร้อนจากนั้นเทพาราฟินที่หลอมแล้วหล่อลงในแม่พิมพ์ นำชิ้นส่วนพืชลงฝังในพาราฟิน ใช้เข็มเขี่ยลนไฟไล่ฟองอากาศออกให้หมด และจัดเนื้อเยื่อให้อยู่ในตำแหน่งและระนาบที่ต้องการก่อนที่จะปล่อยให้พาราฟินแข็งตัว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.5 นำแท่งพาราฟินมาตัดแต่งให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมโดยมีชิ้นส่วนพืชอยู่ตรงกลางแล้วนำมาติดกับแท่งไม้ จากนั้นนำไปยึดติดกับตัวเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน ปรับตำแหน่งของแท่งพาราฟินตามต้องการ ตัดเนื้อเยื่อตามยาวหรือตามขวางให้หนา 10-15 ไมครอน

2.2.6 นำแถบชิ้นส่วนพืช (paraffin ribbon) ที่ได้จากการตัด ติดเข้ากับแผ่นกระจกสไลด์ด้วยน้ำยายึดเนื้อเยื่อพืช แล้วนำแผ่นกระจกสไลด์นั้นไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์เพื่อให้แถบชิ้นส่วนพืชแห้งและติดแน่นกับแผ่นกระจกสไลด์

2.2.7 นำแผ่นกระจกสไลด์ที่มีแถบชิ้นส่วนพืชติดแน่นแล้วนั้น ไปย้อมสี โดยเริ่มจากการละลายพาราฟินออกด้วย xylene ตามด้วยส่วนผสมของ xylene กับ 100% ethyl alcohol ในอัตราส่วน 1:1 นำไปผ่านน้ำยาที่มีระดับความเข้มข้นของ ethyl alcohol จาก 95%, 70%, 50% ไปจนถึง 30% แล้วย้อมเนื้อเยื่อด้วยสารละลายสี hematoxylin ล้างแผ่นกระจกสไลด์ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง จากนั้นนำมาผ่าน ethyl alcohol จากระดับความเข้มข้น 30%, 50%, 70% ไปจนถึง 95% แล้วผ่านน้ำยาที่เป็นส่วนผสมของ xylene กับ 100% ethyl alcohol ในอัตราส่วน 1:1 สิ้นสุดด้วยการแช่แผ่นกระจกสไลด์ใน xylene โดยแต่ละขั้นตอนของการแช่แผ่นกระจกสไลด์ในน้ำยาใช้เวลา 3-5 นาที

2.2.8 ปิดแผ่นกระจกสไลด์ ด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์ลงบนแถบชิ้นส่วนพืชที่ย้อมสีและทำความสะอาดแล้ว โดยใช้ Canada balsam เป็นตัวยึด

2.2.9 เมื่อแผ่นกระจกสไลด์และน้ำยายึดแห้งสนิท นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาเนื้อเยื่อใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ

การทดลองที่ 3 การศึกษาเซลล์วิทยา

ศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อปลายรากของพืชทดลอง ด้วยวิธียี้เซลล์ตามเทคนิคของ Feulgen ที่ดัดแปลงโดยศลิษา (2549)

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 วัสดุทดลองคือปลายรากหรือปลายไหลของพืชทดลอง

3.1.2 กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

3.1.3 ปรอทวัดความร้อน

3.1.4 อ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ

3.1.5 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดแก้วขนาดเล็ก แผ่นกระจกสไลด์ แผ่นกระจกปิดสไลด์ หลอดหยด กระบอกตวงสารเคมี และ บีกเกอร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.6 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ ปากคีบ มีดผ่าตัด เข็มเขี่ย ป้ายติดกาว กระดาษเยื่อ ปากกาเขียนสไลด์ และ น้ำยาเคลือบเล็บ

3.1.7 สารเคมี

3.1.7.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับหยุดวงชีพเซลล์ ได้แก่ para-dichlorobenzene (PDB)

3.1.7.2 สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาในการรักษาสภาพเซลล์ คือ 95% ethyl alcohol และ glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3:1

3.1.7.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับย่อยแยกเซลล์ คือ hydrochloric acid (HCl) เข้มข้น 1 นอร์มอล (N)

3.1.2.4 สีที่ใช้ย้อมโครโมโซม คือ carbol fuchsin

3.2 วิธีการ

3.2.1 เตรียมปลายรากหรือปลายไหล โดยเลือกรากหรือไหลที่กำลังเจริญเติบโต คือ รากที่เพิ่งงอกออกมายาวประมาณ 1 ซม และ มีส่วนของปลายรากเป็นสีขาวขุ่น หรือไหลที่กำลังแทงออกมายาวประมาณ 3 ซม ตัดมาเฉพาะส่วนปลายเพียง 3 - 5 มม โดยเลือกเก็บตัวอย่างในช่วงเวลา 7.00, 8.00, 9.00, 10.00 และ11.00 น.

3.2.2 แช่ตัวอย่างในสารละลาย PDB เพื่อหยุดวงชีพเซลล์ แล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิ 10-15 ˚ซ เป็นเวลา 0, 30, 60, และ 90 นาที

3.2.3 นำตัวอย่างออกมาจากสารละลาย PDB ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้ววางบนกระดาษเยื่อเพื่อซับน้ำ จากนั้นนำไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ เพื่อหยุดการทำงานของเซลล์ นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งแล้วซับน้ำออก

3.2.4 ย่อยเซลล์ให้แยกจากกันโดยการแช่ตัวอย่างใน 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 60 ˚ซ นาน 5 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น ซับน้ำก่อนผ่านไปย้อมสี

3.2.5 ย้อมเนื้อเยื่อตัวอย่างในสารละลายสี carbol fuchsin แช่ไว้นาน 30, 60, และ 90 นาที จากนั้นคีบเนื้อเยื่อวางบนแผ่นกระจกสไลด์ ตัดหมวกรากหรือปลายไหลทิ้งไป เหลือไว้เฉพาะส่วนปลายของตัวอย่างเพียง 1 มม ขยี้ด้วยเข็มเขี่ยแล้วหยดสี 1 หยด ลงบนเนื้อเยื่อ เกลี่ยเนื้อเยื่อเบา ๆ เพื่อให้เซลล์กระจาย คีบเนื้อเยื่อส่วนที่ไม่ต้องการออก แล้วปิดแผ่นกระจกปิดสไลด์บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ วางกระดาษซับบนแผ่นกระจกสไลด์แล้วกดแผ่นกระจกปิดสไลด์ด้วยนิ้วหัวแม่มือ เพื่อให้เซลล์กระจาย และซับสีส่วนเกินออก

3.2.6 นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟส ที่เห็นโครโมโซมขดแน่นและมีการกระจายตัวดี สามารถนับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จำนวนโครโมโซมได้ เมื่อได้เซลล์ที่ต้องการแล้วใช้นิ้วหัวแม่มือกดลงบนแผ่นกระจกปิดสไลด์เบา ๆ เพื่อให้โครโมโซมทั้งหมดอยู่ในระนาบเดียวกันและไม่ซ้อนทับกัน เป็นการกดไล่อากาศออกจากแผ่นกระจกปิดสไลด์ได้อีกด้วย จากนั้นใช้น้ำยาเคลือบเล็บทาบริเวณขอบแผ่นกระจกปิดสไลด์ นำแผ่นกระจกสไลด์ไปตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อนับจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำเครื่องหมายบริเวณที่พบเพื่อให้ง่ายต่อการนำไปบันทึกภาพใต้กล้องจุลทรรศน์

การทดลองที่ 4 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์

ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของพืชทดลอง 3 รหัสโดยศึกษาจากเนื้อเยื่อของใบ ใช้เอนไซม์ 10 ชนิด คือ ACP, DIA, EST, GDH, GOT, LAP, MDH, POX, SKD และ SOD ตามวิธีการของพสุ (2546)

4.1 วัสดุและอุปกรณ์

4.1.1 ใบของพืชทดลอง

4.1.2 ชุดอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบ slab gel (Mini Protein II ของบริษัท Bio-Rad)

4.1.3 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4° ซ และตู้แช่แข็งที่ปรับอุณหภูมิเป็น -20° ซ

4.1.4 หลอดใส่สาร ขนาด 1.5 มล

4.1.5 โกร่งบดตัวอย่างพืช

4.1.6 ไมโครปิเปตที่ปรับปริมาตรได้

4.1.7 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า Model 1,000 / 500

4.1.8 เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง

4.1.9 เครื่องเขย่าสารให้รวมเป็นเนื้อเดียว

4.1.10 เครื่องวัดความเป็นกรด / ด่างของสารละลาย

4.1.11 เครื่องหมุนเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็นได้

4.1.12 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ ปิเปต แท่งแก้ว กระบอกตวงสารเคมี และ ขวดสีชา

4.1.13 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น กระติกน้ำแข็ง กรรไกร ถุงพลาสติก ช้อนตักสาร แผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์ ถุงมือยาง กระดาษชั่งสาร แผ่นพลาสติกใส ถาดพลาสติก กล่องพลาสติกใส ป้ายติดกาว ปากกา สมุด ไม้บรรทัด กระดาษเยื่อ และกล้องถ่ายรูป

4.1.14 สารเคมี

4.1.14.1 สารที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ extraction buffer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1.14.1.1 0.5 M ethylene diamine tetraacetate (EDTA)

4.1.14.1.2 14.3 M β-mercaptoethanol (MSH)

4.1.14.1.3 polyvinylpyrrolidone (PVP-10)

4.1.14.1.4 0.5 M dithiothreitol (DTT)

4.1.14.1.5 1.0 M tris-HCl pH 7

4.1.14.2 สารที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ gel

4.1.14.2.1 30 % acrylamide stock solution (acrylation 29.2 กรัม และ bis-acrylamide 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มล เก็บไว้ในขวดสีชาที่ 4 °ซ)

4.1.14.2.2 1.5 M tris-HCl pH 8.8

4.1.14.2.3 10 % ammonium persulfate (APS) เตรียมทันทีก่อนใช้

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

4.1.14.2.5 น้ำกลั่น

4.1.15.3 สารที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ loading dye

4.1.14.3.1 10 % glycerol

4.1.14.3.2 0.5 % bromophenol blue

4.1.14.4 สารที่ใช้เป็น running buffer

4.1.14.4.1 tris

4.1.14.4.2 glycine pH 8.3

4.1.14.5 สารที่ใช้ย้อมเอนไซม์

4.1.14.5.1 0.05 M acetate buffer pH 4.8

4.1.14.5.2 fast ganet GBC diasonium salt

4.1.14.5.3 disodium α-naphthyl phosphate

4.1.14.5.4 $MgCl_2$

4.1.14.5.5 0.1 M tris-HCl pH 8.0

4.1.14.5.6 β-nicotinamide adenine dinucleotide; reduced form (β-NADH)

4.1.14..5.7 2, 6-dichloroindophenol sodium (DCIP)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1.14.5.8 3[4,5-dimethyphiazol] 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

4.1.14.5.9 0.2 M phosphate buffer pH 6.0

4.1.14.5.10 fast blue B-salt

4.1.14.5.11 α-naphthyl acetate

4.1.14.5.12 0.1 M tris-HCl pH 7.5

4.1.14.5.13 α-D glucose

4.1.14.5.14 β-nicotinamide adenine dinucleotide (β-NAD)

4.1.14.5.15 nitro blue tetrazolium (NBT)

4.1.14.5.16 phenazine methosulfate (PMS)

4.1.14.5.17 0.1 M tris-HCl pH 7.4

4.1.14.5.18 α-ketoglutaric acid

4.1.14.5.19 aspartic acid

4.1.14.5.20 pyridoxal-5'-phosphate

4.1.14.5.21 fast blue BB salt

4.1.14.5.22 0.1 M sodium phosphate buffer pH 6

4.1.14.5.23 L-leucine β–naphthylamide, HCl

4.1.14.5.24 O-dianisidine salt

4.1.14.5.25 L-malic acid

4.1.14.5.26 shikimic acid

4.1.14.5.27 β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β-NADP)

4.1.14.5.28 0.1 M tris-HCl pH 4.0

4.1.14.5.29 3-amino-9-ethylcarbazole

4.1.14.5.30 β-naphthol

4.1.14.5.31 3 % H_2O_2

4.1.14.5.32 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.5

4.1.14.5.33 TEMED

4.1.14.5.34 riboflavin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 วิธีการ

4.2.1 การสกัดเอนไซม์

นำใบที่เจริญเติบโตเต็มที่ของพืชทดลองมาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วเช็ดให้แห้ง ชั่งตัวอย่างใบมาตัวอย่างละ 1 กรัม ตัดออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วใส่ลงในโกร่งที่เย็นจัด บดตัวอย่างจนละเอียด ใส่ PVPP ลงไป 0.05 กรัม จากนั้นเติม extraction buffer ปริมาณ 3 มล ตามสูตรดัดแปลงของพสุ (2546) แล้วบดจนตัวอย่างละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทของเหลวที่สกัดได้ลงในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 1.5 มล ที่มีฝาปิด แล้วนำไปแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 2 ˚ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดส่วนที่เป็นของเหลวใสด้านบนใส่หลอดทดลองอันใหม่ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20˚ซ เพื่อนำไปทำโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในขั้นตอนต่อไป

4.2.2 การทำโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ประกอบชุดแผ่นกระจกของ Mini-Protean®3 Cell Electrophoresis (Bio-Rad) เข้าด้วยกัน จากนั้นเตรียมสารละลาย separating gel โดยผสมสารจากส่วนผสมที่แสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณของสารเคมีในการเตรียม separating gel สำหรับเจล 1 แผ่น (Kuntapanom and Smitamana, 1997)

สารเคมี	7.5% separating gel
1.5 M tris pH 8.8	1.25 มล
30% acrylamide	1.25 มล
10% APS	50 ไมโครลิตร
TEMED	2.5 ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	2.425 มล

เมื่อเตรียมสารละลายเจลเรียบร้อยแล้วนำสารละลายมาเทอย่างระมัดระวังลงระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ แล้วเสียบหวีทันที เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดฟองอากาศในช่องหวี เสียบทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว จากนั้นประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม running buffer ลงใน chamber

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประมาณ 500 มล จากนั้นค่อย ๆ หยอดตัวอย่างที่ผสมกับ loading dye ในอัตราส่วน 9:1 ลงในช่อง ใส่เจลในปริมาณ 20 ไมโครลิตรต่อช่อง โดยไม่ให้ตัวอย่างปนกันในแต่ละช่อง ปิดฝาครอบแล้วต่อขั้วบวกและขั้วลบเข้ากับ chamber เปิดสวิตช์ เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ให้กระแสไฟผ่านที่ 20 มิลลิแอมแปร์ ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟเมื่อ loading dye เคลื่อนที่อยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่นเจล ประมาณ 1 ซม จากนั้นนำแผ่นกระจกออกจาก chamber แล้วแกะเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นกระจกออกมาวางในกล่องพลาสติกใสพร้อมฝาปิดเพื่อย้อมสีเอนไซม์ต่อไป

4.2.3 การย้อมสีเอนไซม์ในเจล

นำเจลที่ได้มาย้อมด้วย staining solution ของไอโซไซม์ตามระบบเอนไซม์ 10 ชนิด คือ ACP, DIA, EST, GDH, GOT, LAP, MDH, POX, SKD และ SOD (ภาคผนวก)

4.2.4 การบันทึกข้อมูล

นำเจลที่ย้อมสีแล้วมาบันทึกค่าการเคลื่อนที่ของแถบสี คำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) บันทึกจำนวนและรูปแบบการเกิดแถบสี เขียนไซโมแกรม บันทึกการมีและไม่มีแถบสีในตำแหน่งเดียวกัน โดยคำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ดังนี้

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

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

การทดลองที่ 5 การศึกษาการเจริญเติบโต

การทดลองนี้เป็นการศึกษาวงจรการเจริญเติบโตของพืชทดลอง 3 รหัสดังกล่าวแล้วข้างต้น โดยเลือกตัวอย่างเพื่อเป็นตัวแทนของกลุ่มจากต้นพืชที่เก็บรวมและปลูกเลี้ยงไว้ในแปลงศึกษาทดลอง บันทึกการเจริญเติบโตของพืชตัวแทนแต่ละรหัสในช่วงเวลาของวงจรการเจริญเติบโต 1 วงจร คือ 1 ปี ตั้งแต่ช่วงที่ต้นพืชเริ่มการเจริญหลังจากผ่านระยะพักตัวโดยการแทงช่อดอกขึ้นมาจากดิน ดอกบานในเวลาต่อมา ตามด้วยช่วงการเจริญเติบโตของใบและหัวใหม่ ไปจนกระทั่งหัวใหม่พักตัว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.1 วัสดุและอุปกรณ์

5.1.1 พืชทดลอง รหัส N 01, N 02 และ N 03 รหัสละ 5 ต้น

5.1.2 วัสดุปลูก ได้แก่ ดิน ขี้เถ้าแกลบ และเปลือกถั่ว ใน อัตราส่วน 2:2:1

5.1.3 กระถางพลาสติก ขนาด 6 นิ้ว

5.1.4 วัสดุอื่น ๆ ได้แก่ สมุด ปากกา ดินสอ ไม้บรรทัด แผ่นป้ายพลาสติก เวอร์เนียคาลิปเปอร์ และกล้องถ่ายภาพ

5.2 วิธีการ

ปลูกต้นพืชทดลองทั้งหมดในกระถางแล้วนำไปไว้ใต้โรงเรือนกรองแสงที่กรองแสงได้ประมาณ 50% ติดตาม และบันทึกผลการทดลองดังนี้

5.2.1 ติดตามการเจริญเติบโตของพืชทดลอง จากระยะที่ต้นเริ่มการเจริญเติบโตจนกระทั่งหัวใหม่พักตัว

5.2.2 บันทึกการเจริญเติบโตทางใบ ได้แก่ ความสูงของต้นโดยวัดจากโคนต้นในระดับผิวดินจนถึงโคนใบ

5.2.3 บันทึกการเจริญเติบโตทางดอก ได้แก่ ตำแหน่งของตาดอก ช่วงเวลาที่เกิดการสร้างดอก ขนาดของช่อดอก จำนวนดอกต่อช่อ และ ขนาดของดอกในตำแหน่ง ดอกที่ 4 นับจากโคนช่อดอก

5.2.4 บันทึกจำนวนหัวใหม่ต่อต้น

5.2.5 วาดภาพทางพฤกษศาสตร์ แสดงส่วนประกอบทางสัณฐานวิทยาของต้นพืชทดลองในแต่ละรหัส อันได้แก่ลักษณะของ หัว ใบ ช่อดอก ดอก ฝัก ไหล และ ราก ในระยะที่ส่วนประกอบดังกล่าวเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved