บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1 วัสดุ

1.1.1 พืชทดลอง

ว่านนางคุ้ม (*Eurycles amboinensis* Lindl.)

ว่านมหาลาภ (*Eucrosia* sp.)

ว่านแสงอาทิตย์ (*Haemanthus multiflorus* Martyn.)

ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมือง สีชมพู (*Hippeastrum* spp.)

ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมือง สีแดง (*Hippeastrum* spp.)

ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมือง สีแสด (*Hippeastrum* spp.)

บัวดินสีชมพูดอกใหญ่ (*Zephyranthes grandiflora* Lindl.)

บัวดินสีชมพูดอกเล็ก (*Zephyranthes rosea* Lindl.)

บัวดินสีเหลือง (*Zephyranthes citrina* Baker.)

บัวดินสีเหลืองอ่อน (*Zephyranthes ajax* Sprenger.)

1.1.2 สารเคมี

1.1.2.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับ fluorescent microscopy

- sodium hydroxide (NaOH) 1 M
- aniline blue 0.1 เปอร์เซ็นต์
  ใน potassium triphosphate (K_3PO_4) 0.1 N

1.1.2.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับการฆ่าเชื้อ

- ethanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์
- คลอร็อกซ์ (clorox) ของบริษัท The Clorox Co. , USA

1.1.2.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง

- เกลือให้ธาตุอาหารหลักต่าง ๆ ตามสูตร MS (1962)
- เกลือให้ธาตุอาหารรองต่าง ๆ ตามสูตร MS (1962)
- วิตามินต่าง ๆ ตามสูตร MS (1962)
- สารละลายเหล็กความเข้มข้นตามสูตร MS (1962)
- casein hydrolysate ของบริษัท Merck
- potassium hydroxide (KOH) 1 N
- hydrochloric acid (HCl) 1 N

1.1.2.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

- ethanol ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์
- glacial acetic acid
- formalin
- TBA (tert-butyl alcohol)
- absolute alcohol
- สี erythrosin
- paraffin
- liquid paraffin
- xylene
- สี haematoxylin
- น้ำยา canada balsum

1.1.2.5 สารเคมีที่ใช้สำหรับการหารูปแบบไอโซไซม์

1.1.2.5.1 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ extraction buffer

- 0.1 M Tris-HCl pH 8.0
- 0.001 M ethylene diamine tetraacetate (EDTA)
- polyvinyl-pyrrolidone (PVP 60) 0.5 เปอร์เซ็นต์
- 2 mM mercaptoethanol (MSH)

1.1.1.5.2 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ gel

- acrylamide stock solution 30 เปอร์เซ็นต์ (acrylamide 30 กรัมและ bis-acrylamide 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณ 100 มิลลิกรัม เก็บในขวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส)
- 0.5 M Tris-HCl pH 6.8
- 3 M Tris-HCl pH 8.8
- ammonium persulfate (APS) 1.5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมทันทีก่อนใช้
- TEMED (N,N,N′,N′- tetramethyl ethylenediamine)

1.1.1.5.3 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ sample buffer

- glycerol 50 เปอร์เซ็นต์
- bromophenol blue 0.5 เปอร์เซ็นต์

1.1.1.5.4 สารเคมีที่ใช้เป็น running buffer

- 0.025 M Tris
- 0.192 M glycine pH 8.3 ต่อน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

1.1.1.5.5 สารเคมีที่ใช้ย้อมเอนไซม์

- 0.1 M Tris-HCl pH 8
- 0.1 M Tris-HCl pH 7
- phenazine methosulfate (PMS) 10 เปอร์เซ็นต์
- nitro blue tetrazolium (NBT) 10 เปอร์เซ็นต์
- β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) 10 เปอร์เซ็นต์
- β-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 10 เปอร์เซ็นต์
- magnesium chloride
- pyridoxal 5P 10 เปอร์เซ็นต์
- 1 N calcium chloride

- 0.2 M sodium phosphate
- 0.1 M sodium phosphate pH 6
- acetone
- α-naphthylacetate
- β- naphthylacetate
- O-dianisidine salt
- α-ketoglutaric acid
- fast blue BB
- aspartic acid
- L-malic acid
- isocitric acid
- ethanol
- L-glutamic acid
- L-leucine β-naphtyl acid
- fructose 1,6 bisphosphate
- arsinic acid

1.2 อุปกรณ์

1.2.1 ปากคีบ

1.2.2 ขวด vial ขนาด 10 มิลลิลิตร

1.2.3 ตู้กรองอากาศบริสุทธิ์

1.2.4 ชั้นวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.2.5 กล้อง stereo microscope

1.2.6 เครื่องชั่งชนิดละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.2.7 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง

1.2.8 ตะแกรงสำหรับวางหลอดเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.2.9 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

1.2.10 หม้อนึ่งความดันไอ

1.2.11 เตาไมโครเวฟ

1.2.12 ขวดรูปชมพู่ (erlenmayer flask) ขนาด 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University

1.2.13 ขวดปรับปริมาตร ขนาด 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

1.2.14 หลอดทดลองขนาด 25 × 100 มิลลิเมตร

1.2.15 ปิเปต ขนาด 1, 2, 5 และ 10 มิลลิลิตร

1.2.16 บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

1.2.17 กระบอกวัดปริมาตรขนาด 10, 25, 50 และ 100 มิลลิลิตร

1.2.18 แท่งแก้วสำหรับคนสาร

1.2.19 ช้อนตักสาร

1.2.20 ด้ามมีดผ่าตัดเบอร์ 3

1.2.21 ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 10, 11 และ 15

1.2.22 ใบมีดโดนที่ตัดเป็นใบมีดเล็กขนาด 2 × 10 มิลลิเมตร

1.2.23 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.2.24 แผ่นพลาสติกตัดเป็นแผ่นสี่เหลี่ยมขนาด 70 x 90 มิลลิเมตร

1.2.25 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3

1.2.26 หลอดทดลองขนาด 25 × 150 มิลลิลิตร สำหรับใส่แอลกอฮอล์

1.2.27 ตู้เย็นและตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

1.2.28 ชุดสำหรับอิเล็คโตรโฟรีซิสแบบ slab gel

1.2.29 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า model 1000/500 ของบริษัท Bio-Rad

1.2.30 เครื่องหมุนเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็นได้ (refrigerated centrifuge)

1.2.31 ตู้บ่ม (incubate)

1.2.32 เครื่องกวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer)

1.2.33 โกร่งบดตัวอย่าง

1.2.34 เครื่องบดตัวอย่าง (homogenizer)

1.2.35 เครื่องดูดอากาศ (degasser)

1.2.36 ไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาตรได้ (ไมโครลิตร)

1.2.37 หลอดใส่สารขนาดเล็ก (Eppendrof tube) ขนาด 1.5 มิลลิเมตร

1.2.38 ชุดอ่านเจล (visible light transilluminator)

1.2.39 หลอดใส่สารปรับปริมาตรได้ (syringe) ขนาด 50 ไมโครลิตร

1.2.40 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น ถุงมือ กระดาษชั่งสาร กล้องถ่ายรูปฟิล์มถ่ายรูป แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ ฯ

1.3 การเตรียมสารเคมี

1.3.1 การเตรียมอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962)

การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)

เตรียมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง วิตามิน และ เหล็กที่ใช้ในอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962) โดยชั่งสารแต่ละชนิดในตารางที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ แล้วละลายสารแต่ละชนิดในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรของสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร เทใส่ในขวด ปิดฝา แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น

สารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก

ตาราง 1 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) มิลลิกรัม/ลิตร	ปริมาณสารในน้ำยาความเข้มข้น 10× (กรัม/ลิตร)
NH_4NO_3	1,650	16.50
KNO_3	1,900	19.00
$CaCl_2.2H_2O$	440	44.00
$MgSO_4.7H_2O$	370	3.70
KH_2PO_4	170	1.70

สารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรอง

ตาราง 2 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นธาตุอาหารรองสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารสูตร MS (1962) (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณสารในน้ำยาความเข้มข้น 100× (มิลลิกรัม/ลิตร)
$CuSO_4 .5H_2O$	0.025	2.5
KI	0.830	83.0
$ZnSO_4 .7H_2O$	8.600	860.0
$MnSO_4 .4H_2O$	22.300	2,230.0
H_3BO_4	6.200	620.0
$Na_2MoO_4 .2H_2O$	0.250	25.0
$CoCl_2 .6H_2o$	0.025	2.5

สารละลายเข้มข้นของวิตามิน

ตาราง 3 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของวิตามินสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารสูตร MS (1962) (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณสารในน้ำยาความเข้มข้น 100× (มิลลิกรัม/ลิตร)
Glycine	2.00	200
Thiamine .HCl	0.25	25
Pyrimidine .HCl	0.25	25
Nicotinic acid	0.25	25
Myo-inosital	100.00	10,000

สารละลายเข้มข้นของเหล็ก

ตาราง 4 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของเหล็กสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณสารในน้ำยาความเข้มข้น 100× (มิลลิกรัม/ลิตร)
$FeSO_4 .7H_2O$	27.8	2.78
Na_2EDTA	37.3	3.73

ขั้นตอนการเตรียมอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962)

ขั้นตอนที่ 1 นำขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 300 มิลลิลิตร เติมสารละลายเข้มข้นของ ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง วิตามิน เหล็ก และ สารละลาย casein hydrolysate ลงไปตามลำดับ จากนั้นเติมน้ำตาลซูโครส ปริมาณ 30 กรัม เขย่าให้เข้ากัน ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น

ขั้นตอนที่ 2 เทสารละลายใส่ในบีกเกอร์ขนาด 2,000 มิลลิลิตร นำสารละลายไปปรับ pH ให้ได้ค่า pH เท่ากับ 5.7 จากนั้นเติมวุ้นลงไป 8 กรัม นำไปต้มให้วุ้นละลาย

ขั้นตอนที่ 3 ตวงอาหารใส่หลอดทดลองขนาด 25 x 150 มิลลิลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร หรือใส่ในขวดรูปรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณ 50 มิลลิลิตร หุ้มปากหลอดหรือขวดด้วยพลาสติก ทับด้วยกระดาษลอกลาย รัดด้วยยางรัด 2 รอบ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

1.3.4 การเตรียม native-PAGE separating gel (Lammli, 1970 อ้างจาก กัญจนา, 2539)

ตาราง 5 ส่วนประกอบของสารที่ใช้เตรียม 10 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel

ส่วนประกอบของสารที่ใช้เตรียม acrylamide gel 10 เปอร์เซ็นต์	
น้ำกลั่น	4.80 มิลลิลิตร
acrylamide gel 30 เปอร์เซ็นต์	3.30 มิลลิลิตร
3M Tris-HCl pH 8.8	1.25 มิลลิลิตร
APS 1.5 เปอร์เซ็นต์	0.50 มิลลิลิตร
TEMED	15.00 ไมโครลิตร

ทำการเตรียมดังนี้

- ผสมน้ำกลั่น acrylamide 30 เปอร์เซ็นต์ และ 0.5 M Tris-HCl pH 8.8 เข้าด้วยกัน
- นำไปดูดอากาศออกจากสารละลายเจล โดยปั๊มความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นนาน 10 นาที
- เติมสารละลาย APS 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ TEMED ลงในเจลที่ดูดอากาศออกแล้ว เทสารละลายเจลลงระหว่างแผ่นแก้วของชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ประกอบไว้แล้ว ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ใช้เวลานานประมาณ 30 นาที จากนั้นล้างด้านบนของเจลด้วยน้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

1.3.5 การเตรียม native-PAGE stacking gel (Lammli, 1970 อ้างจาก กัญจนา, 2539)

ตาราง 6 ส่วนประกอบของสารที่ใช้เตรียม acrylamide gel 7.5 เปอร์เซ็นต์

ส่วนประกอบของสารที่ใช้เตรียม acrylamide gel 7.5 เปอร์เซ็นต์		
น้ำกลั่น	2.70	มิลลิลิตร
acrylamide 30 เปอร์เซ็นต์	0.75	มิลลิลิตร
3M Tris-HCl pH 8.8	1.25	มิลลิลิตร
APS 1.5 เปอร์เซ็นต์	0.25	มิลลิลิตร
TEMED	10.00	ไมโครลิตร

ทำการเตรียมดังนี้

- ผสมน้ำกลั่น acrylamide 30 เปอร์เซ็นต์ และ 3 M Tris-HCl pH 6.8 เข้าด้วยกัน
- นำไปดูดอากาศออกจากสารละลายเจล โดยปั๊มความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นนาน 10 นาที
- เติมสารละลาย APS 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ TEMED ลงในเจลที่ดูดอากาศออกแล้ว เทสารละลายเจล ลงบน separating gel จากนั้นใส่ comb ลงใน gel plate ทิ้งให้เจล แข็งตัวใช้เวลานานประมาณ 30 นาที จากนั้นดึง comb ออกแล้วล้างช่องเจลด้วยน้ำกลั่น ดูดน้ำกลั่นออกจากช่องเจล เพื่อเตรียมหยอดตัวอย่างเอนไซม์ลงไป

วิธีการศึกษา

การหารูปแบบไอโซไซม์ของพืชทดลองโดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส

- นำใบอ่อนของพืชทดลองมาหั่น ใช้ตัวอย่างหนัก 1 กรัม
- เติมสารละลาย extraction buffer 800 ไมโครลิตร บดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบดตัวอย่างพืช บดนาน 2 นาที
- นำตัวอย่างที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แยกเอาสารละลายส่วนที่ใสที่ได้ใส่ใน Eppendorf tube จากนั้นเติม sample buffer 20ไมโครลิตร
- หยอดตัวอย่างเอนไซม์ลงในช่องเจล ที่เตรียมไว้ 25 ไมโครลิตรต่อ 1 ช่องเจล ประกอบ slab gel เข้ากับชุด electrode โดยต่อขั้วบวกเข้ากับ chamber ด้านล่าง และ ขั้วลบเข้ากับ chamber ด้านบน ผ่านกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟฟ้า 14 มิลลิแอมแปร์ สำหรับ stacking gel และ 26 มิลลิแอมแปร์ สำหรับ separating gel
- เมื่อสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่ลงมาถึงปลายด้านล่างของแผ่นเจล ปิดสวิทช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าจากนั้นแกะแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นแก้วออกใส่ plate
- หยุดปฏิกิริยาด้วยการล้างน้ำไหลช้า ๆ แล้วนำไปย้อมสีเอนไซม์ในเจล โดยเตรียม staining solution ของไอโซไซม์แต่ละชนิด เทลงบนเจล นำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยกเว้น EST เก็บในอุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที – 2 ชั่วโมง จนปรากฏแถบสี

การเลี้ยงไข่อ่อน (ovule) ในสภาพปลอดเชื้อ

- ตัดกลีบดอกและเกสรตัวผู้ (emasculate) ของดอกตูมที่จะบานในเช้าของอีกวันด้วยปากคีบ (forcep)
- ครอบดอกที่ตอนแล้วด้วยถุงกระดาษโดยครอบหมดทั้งดอก ปิดถุงกระดาษให้มิดชิดเพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนจากละอองเกสร จากการนำพาของลม หรือ แมลง

- ตัดดอกที่เริ่มบานวันแรก (ใช้เป็นต้นพ่อ) โดยตัดในช่วงเวลาประมาณ 9.00 น. เก็บดอกไว้ในจานแก้วปิดฝา จนกว่าอับละอองเกสรแตก (ใช้เวลาประมาณ 11 ชั่วโมง)
- ในวันที่เกสรตัวเมียพร้อมรับการผสมเกสร ใช้อับละอองเกสรที่ละอองเกสรเริ่มฟูมาแตะเบาๆที่บริเวณยอดเกสรตัวเมีย ครอบดอกที่ได้รับการผสมเกสรแล้วด้วยถุงกระดาษอีกครั้งหลังจากที่ทำการถ่ายละอองเกสรแล้ว
- นำรังไข่ที่มีอายุตามที่กำหนดไว้หลังจากผสม มาล้างด้วยน้ำเปล่าและน้ำยาล้างจาน จากนั้นแช่ในน้ำยาคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที นำเข้าตู้ตัดเนื้อเยื่อ (laminar air flow) ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งครั้งละ 5 นาที
- ผ่ารังไข่ตามรอยตะเข็บ ใช้สันมีดผ่าตัดค่อย ๆ เขี่ยไข่อ่อนออกมา จากนั้นเขี่ยเอา สายรก(placenta) ออกให้หมด ขั้นตอนนี้ทำภายใต้กล้อง stereo microscope
- นำไข่อ่อนมาวางบนอาหารวุ้นที่เตรียมไว้ อย่าให้ไข่อ่อนจมอยู่ใต้อาหารวุ้นทั้งหมด ปิดปากหลอดด้วยพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

วิธีการทดสอบความงอกของหลอดละอองเกสรโดยวิธี fluorescence microscope technique (Kho and Baer, 1968)

- ทำหมันดอกตูมของต้นแม่โดยดึงกลีบดอกและเกสรตัวผู้ออก คลุมดอกที่ตัดเกสรตัวผู้แล้วด้วยถุงกระดาษและปิดปากถุงกระดาษให้แน่นเพื่อป้องกันการปน เปื้อนละอองเกสรอื่น
- ทำการผสมเกสรในวันที่เกสรตัวเมียพร้อมโดยใช้อับละอองเกสรที่ละอองเกสรเริ่มฟูมาแตะเบา ๆบริเวณยอดเกสรตัวเมีย
- ตัดดอกที่ได้รับการผสมเกสรแล้ว มาเก็บไว้ในจานแก้วที่บรรจุสารละลายโปแตสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) อิ่มตัวเพื่อให้บรรยากาศในจานแก้วมีความชื้นสัมพัทธ์ 98 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความชื้นที่เหมาะสมสำหรับการงอกของละอองเรณู เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- จากนั้นนำดอกมาต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 N ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

- เทสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ออกให้หมด ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง จากนั้นนำดอกออกจากสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ มาวางไว้บนแผ่นสไลด์หยดสารละลาย aniline blue 0.2 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายใน K_3PO_4 2 เปอร์เซ็นต์ ปิดสไลด์แล้วกดเบา
- นำสไลด์ที่เตรียมไว้ไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้แสง fluorescence

1.4 วิธีการวิจัย

การทดลองที่ 1 การผสมข้ามสกุลระหว่างว่านนางคุ้มกับไม้ดอกประเภทหัวสี่สกุล
การทดลองนี้แบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย คือ

การทดลองที่ 1.1 รูปแบบของไอโซไซม์ของพืชทดลองโดยใช้เทคนิคทางอิเล็กโตรโฟรีซิส

<u>วัตถุประสงค์ในการทดลอง</u>

เพื่อศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ที่เป็นเอกลักษณ์ของพืชทดลองแต่ละชนิดเพื่อใช้เป็นมาตรฐานการเปรียบเทียบรูปแบบแถบสี

<u>วิธีการทดลอง</u>

หารูปแบบไอโซไซม์ของ ว่านนางคุ้ม ว่านมหาลาภ ว่านแสงอาทิตย์ ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมือง สีชมพู สีแดง สีส้ม บัวดินสีชมพูดอกใหญ่ สีชมพูดอกเล็ก สีเหลือง และ สีเหลืองอ่อน โดยใช้เอนไซม์ 6 ชนิด คือ alcohol dehydrogenase (ADH), aldolase (ALD)), diaphorase (DIP), esterase (EST), glutamate oxaloacetate transminase (GOT) และ malate dehydrogenase (MDH) ทำชนิดละ 5 ต้น และทำการทดลองซ้ำกรรมวิธีละ 2 ครั้ง

<u>การบันทึกผลการทดลอง</u>

1. บันทึกรูปแบบของไอโซไซม์ที่ได้ นำมาประเมินผลโดยวัดระยะทางของแถบสีของไอโซไซม์ และระยะทางสารตัวอย่าง
   Rf = ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสี / ระยะทางการเคลื่อนที่ของ bromophenol blue

2. เขียนแผนภาพไอโซไซม์ (zymogram)

การทดลองที่ 1.2 การผสมข้ามสกุลระหว่างว่านนางคุ้มกับไม้ดอกประเภทหัวสี่สกุล

<u>วัตถุประสงค์ในการทดลอง</u>

เพื่อศึกษาผลของการผสมข้ามสกุลของว่านนางคุ้ม กับ ว่านมหาลาภ ว่านแสงอาทิตย์ ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมืองสีชมพู สีแดง สีส้ม บัวดินสีชมพูดอกใหญ่ สีชมพูดอกเล็ก สีเหลือง และสีเหลืองอ่อน

<u>วิธีการทดลอง</u>

ทำการถ่ายละอองเกสรของไม้ดอกประเภทหัวทั้งห้าสกุล ตามตาราง 7 รวมทั้งหมด 18 คู่ผสม ทำการผสมคู่ผสมละ 15 ดอก (ซ้ำ) นำไข่อ่อน (ovule) อายุ 5 วัน หลังจากผสมเกสร เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม casein hydrolysate 300 มิลลิกรัม/ลิตร

<u>การบันทึกผลการทดลอง</u>

1. บันทึกจำนวนวันที่ดอกบาน ความพร้อมของเกสรตัวผู้เกสรตัวเมีย และอายุฝักหลังการผสม
2. ใช้เทคนิคอิเล็กโตโฟรีซิสยืนยันการเป็นลูกผสมโดย นำรูปแบบไอโซไซม์ของต้นที่ได้จากการผสมและเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เทียบกับรูปแบบไอโซไซม์ของต้นพ่อ แม่

ตาราง 7 แสดงคู่ผสมของไม้ดอกประเภทหัวห้าสกุล

คู่ผสมของไม้ดอกประเภทหัวห้าสกุล		
ว่านนางคุ้ม	×	ว่านมหาลาภ
ว่านมหาลาภ	×	ว่านนางคุ้ม
ว่านนางคุ้ม	×	ว่านแสงอาทิตย์
ว่านแสงอาทิตย์	×	ว่านนางคุ้ม
ว่านนางคุ้ม	×	ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมืองสีชมพู
ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมืองสีชมพู	×	ว่านนางคุ้ม
ว่านนางคุ้ม	×	ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมืองสีแดง
ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมืองสีแดง	×	ว่านนางคุ้ม
ว่านนางคุ้ม	×	ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมืองสีส้ม
ว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมืองสีส้ม	×	ว่านนางคุ้ม
ว่านนางคุ้ม	×	บัวดินสีชมพูดอกใหญ่
บัวดินสีชมพูดอกใหญ่	×	ว่านนางคุ้ม
ว่านนางคุ้ม	×	บัวดินสีชมพูดอกเล็ก
บัวดินสีชมพูดอกเล็ก	×	ว่านนางคุ้ม
ว่านนางคุ้ม	×	บัวดินสีเหลืองอ่อน
บัวดินสีเหลืองอ่อน	×	ว่านนางคุ้ม
ว่านนางคุ้ม	×	บัวดินสีเหลือง
บัวดินสีเหลือง	×	ว่านนางคุ้ม

การทดลองที่ 2 ความเข้มข้นของ casein hydrolysate ที่มีผลต่อการเจริญของไข่อ่อน (ovule) ว่านนางคุ้มเมื่อเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาอิทธิพลของ casein hydrolysate ต่อการเจริญของไข่อ่อนที่ได้รับการผสมแล้วของว่านนางคุ้ม

วิธีการทดลอง

การทดลองนี้วางแผนแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (factorial in CRD) โดยมีปัจจัยทดลอง 2 ปัจจัย คือ casein hydrolysate ที่ระดับความเข้มข้น 0, 100, 250 และ 500 มิลลิกรัม/ลิตร โดยทดลองร่วมกับอายุของไข่อ่อนที่ 3, 5, 7 และ 9 วันหลังจากทำการผสมเกสร รวมเป็น 16 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ การทดลองนี้แยกการทดลองย่อยกับ 4 คู่ผสม คือ ว่านนางคุ้ม กับ ว่านแสงอาทิตย์ และว่านสี่ทิศพันธุ์พื้นเมืองสีชมพู สีแดง สีส้ม

การบันทึกผลการทดลอง

ทำการบันทึกผลดังนี้

1 เปอร์เซ็นต์การรอดตาย จำนวนวันที่เริ่มเกิดการเปลี่ยนแปลง และจำนวนวันที่เริ่มเกิดใบ
2 การเปลี่ยนแปลงภายในของไข่อ่อนจากการนำเนื้อเยื่อตั้งแต่เริ่มเลี้ยงไปศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา
3 เปรียบเทียบรูปแบบไอโซไซม์ จากใบของต้นลูกผสมกับ ต้นพ่อ แม่
4 ศึกษาการงอกของหลอดละอองเกสร ในก้านชูเกสรตัวเมียของดอกที่ได้รับการผสมของแต่ละคู่ผสม ใช้วิธีการตรวจสอบภายใต้กล้อง fluorescence microscope