บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 พืชทดลอง

กล้วยไม้ดินใบจีบจำนวน 18 ชนิด ได้แก่ *Phaius tankervilleae* (Banks ex I' Heritier) Blume, *Calanthe rubens* Ridl., *Calanthe vestita* Lindl., *Calanthe masuca* (D. Don) Lindl., *Calanthe cardioglossa* Schltr., *Calanthe rosea* (Lindl.) Benth., *Calanthe triplicata* (Willemet) Ames, *Liparis sutepensis* Rolfe ex Downie, *Arundina graminifolia* (D. Don) Hochr., *Spathoglottis plicata* Blume, *Spathoglottis eburnea* Gagnep., *Spathoglottis affinis* de Vriese, *Eulophia spectabilis* (Dennst.) Suresh., *Eulophia macrobulbon* (Parish. & Rchb. f.) Hook. f., *Eulophia nuda* Lindl., *Eulophia andamanensis* Rchb. f., *Geodorum recurvum* (Roxb.) Alston และ *Geodorum citrinum* Jacks. จากสถานีวิจัยและฝึกอบรม ศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่

1.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

- แว่นขยาย
- แผ่นเทียบสี RHS (The Royal Horticultural Society) colour chart
- ป้ายชื่อและลวด
- กล้องถ่ายรูปและฟิล์ม
- ไม้บรรทัดและตลับเมตร

1.3 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์

1.3.1 สารเคมี

1.3.1.1 ส่วนประกอบน้ำยาสกัด (extraction buffer) มีดังนี้

- Dithiothreitol (DTT)
- Ethylene diamine tetraacetate (EDTA)
- Magnesium chloride ($MgCl_2$)
- Glycerol
- β-Mercaptoethanol (MSH)
- Polyvinylpyrrolidone M.W. 10,000 (PVP-10)
- Polyvinylpyrrolidone M.W. 40,000 (PVP-40)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- KCl
- Tris-HCl Phosphate buffer
- Triton-x
- ส่วนประกอบของเจลมีดังนี้
- Acrylamide
- Ammoniun persulfate (APS)
- β-Mercaptoethanol (MSH)Mercaptoethanol (MSH)
- TEMED (N,N,N',N'-teramethyl ethylenediamine)
- Tris-HCl

1.3.1.2 ส่วนประกอบของ Tracking dye มีดังนี้

- Bromophenol blue
- Glycerol
- Sucrose

1.3.1.3 ส่วนประกอบของ running buffer มีดังนี้

- Glycine
- Tris-HCl

1.3.14 การย้อมเอนไซม์

- 3-Amino-9-ethylcarbazol
- 2, 6-Dichlorophenol-indophenol
- 1 M Calcium chloride
- 1 M Magnesium chloride
- 0.05 M Citric acid pH 6.0
- M Na-acetate pH 5.0
- M Na-phosphate pH 6.0
- M Na-phosphate pH 7.0
- 0.05 M Tris-HCl pH 8.0
- M Tris-HCl pH 7.0, 7.5, 8.0
- Acetaldehyde
- Acetic acid
- Acetone

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- Cis-Aconitic acid
- Arsenic acidk sodium salt
- Dithiothreitol (DTT)
- EDTA
- Ethanol
- Fast Blue BB salt
- Fast Garnet GBG salt
- Formic acid, sodium salt
- Fructose-1,6-bisphosphate
- Fructose-6-phosphate
- Glucose-1-phosphate, disodium salt
- Glucose-6-phosphate, dehydrogenase
- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydogenase
- Hydrogen peroxide
- Isocitric dehydrogenase
- Isocitric acid
- Naphthol AS-BI phosphate, sodium salt
- Nitro blue tetrazolium (NBT)
- Phenazine methosulfate (PMS)
- Riboflavin
- Pyridoxal-5'-phosphate
- Shikimic acid
- 3[4, 5-dimethyphiazol]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)
- Urea
- α-D-Glucose
- α-Ketoglutaric acid
- α- Naphtyl acetate
- β-Naphthol
- β-Naphthyl acetate
- β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β-NADP)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- β- Nicotinamide adenine dinucleotide (β-NAD)
- β- Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form (β-NADH)
- L-Aspartic acid
- L-Glutamic acid
- L-Leucine β-naphthylamide, HCl
- L-Malic acid
- O-Dianisidine salt

1.3.2 เครื่องมือ

- โกร่งบดตัวอย่าง
- กล่องโฟมใส่น้ำแข็ง
- เครื่องชั่งแบบละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- เครื่องหมุนเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็น (Refrigeratedcentrifuge)
- เครื่องทำน้ำแข็ง
- เครื่องดูดอากาศ (degasser)
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- เครื่องกวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer)
- เครื่องบดตัวอย่าง (homogenizer)
- เครื่องแก้วต่างๆ
- ชุดอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบ slab gel (Mini Protein II ของบริษัท Bio - Rad)
- ชุดอ่านเจล (visible light transilluminator)
- ตู้บ่ม (Incubator)
- ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส
- ไนโตรเจนเหลวและถังบรรจุ
- ไมโครปิเปตชนิดที่ปรับปริมาตรได้
- หลอดใส่สารขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Eppendorf tube)
- อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ช้อนตักสาร ปากคีบ ใบมีดและด้ามมีด ถุงพลาสติก แผ่นอลูมินัมฟอยล์ กระดาษชั่งสาร กระดาษกรอง ถาดพลาสติก กล้องถ่ายรูป ฟิลม์ถ่ายรูป ปากกาเขียนแก้ว และ ถุงมือยาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2. วิธีวิจัย

การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของกล้วยไม้ดินใบจีบบางชนิด แบ่งการทดลองดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้ดินใบจีบ 18 ชนิด

บันทึกข้อมูลทางสัณฐานวิทยาที่สังเกตได้ของ ต้น ใบ ดอก ของกล้วยไม้ดินประเภทใบจีบที่ทำการศึกษา ได้แก่ โดยศึกษาในขณะที่มีการแทงช่อดอกและดอกจริงบานเต็มที่ เลือกต้นที่มีขนาดใหญ่ ขนาดกลาง และขนาดเล็กเพื่อเป็นตัวแทนของพืชแต่ละชนิดมาชนิดละ 5 ต้น ลักษณะที่ศึกษา คือ

- ลักษณะหัวและขนาดหัว
- จำนวนใบ นับใบทั้งหมดที่อยู่ในต้นเดียวกัน
- การจัดเรียงตัวของใบ
- ลักษณะใบ
- ขนาดใบ วัดความกว้าง ความยาวของใบที่เล็กที่สุด และใบที่ใหญ่ที่สุดของต้นเดียวกัน
- ลักษณะการเกิดช่อดอก
- ความยาวก้านช่อดอกส่วนที่โผล่พ้นดิน หรือวัดส่วนที่โผล่จากส่วนข้างของลำลูกกล้วยจนถึงกลีบประดับแรกของดอกล่างสุด
- ความยาวช่อดอก วัดจากดอกแรกล่างสุดที่อยู่ตรงโคนช่อดอกจนถึงปลายช่อดอก
- ความยาวก้านดอกย่อยยาวสุด โดยวัดก้านดอกย่อยแรกที่โคนช่อดอก และความยาวก้านดอกย่อยสั้นสุด โดยวัดก้านดอกย่อยสุดท้ายที่ปลายช่อดอก
- จำนวนดอกต่อช่อ
- ขนาดดอก
- ลักษณะดอก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 เปรียบเทียบวิธีการสกัดเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับกล้วยไม้ดินใบจีบ

เปรียบเทียบวิธีการสกัดเอนไซม์ที่เหมาะสมกับกล้วยไม้ดินประเภทใบจีบที่ทำการศึกษาสำหรับหารูปแบบไอโซไซม์ โดยใช้ น้ำยาสกัด 4

กรรมวิธีที่ 1 น้ำยาสกัดเอนไซม์ของ Gottlieb *et al.* (1981)

นำส่วนใบอ่อนของกล้วยไม้ดินใบจีบแต่ละชนิดที่ใบยังไม่คลี่โดยใช้ตัวอย่างละ 1 ใบต่อ 1 ซ้ำล้างด้วยน้ำให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปชั่งให้ได้น้ำหนัก 0.5 ก ผสมกับน้ำยาสกัดเอนไซม์ปริมาตร 1.5 มล ของ Gottlieb *et al.* (1981) ซึ่งประกอบด้วย 0.1 M Tris-buffer pH 8, 1.0% w/v PVP- 40, 0.1% β – ME, 1 mM EDTA, 0.5 mM KCl และ 0.1 M $MgCl_2$. $6H_2O$ นำมาบดในโกร่งที่เย็นจัดที่อยู่ในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งเพื่อรักษาระดับอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พร้อมเติมไนโตรเจนเหลว เพื่อให้บดง่ายขึ้น เมื่อบดละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน นำตัวอย่างที่สกัดได้ไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที จากนั้นแยกสารละลายใสด้านบนที่ได้ใส่ใน Eppendorf tube เก็บในตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำมาใช้เปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่นต่อไป

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

ขั้นตอนการสกัดเหมือนกรรมวิธีที่ 1 แต่เปลี่ยนน้ำยาสกัดเป็นของ Apavatjrut *et al.* (1999) ซึ่งประกอบด้วย 0.1 M Tris-buffer pH 8, 0.5% w/v PVP-10, 10 mM β – ME, 1 mM EDTA และ 2 mM DTT

กรรมวิธีที่ 3 น้ำยาสกัดเอนไซม์ของ Obera-Okeyo *et al.* (1997)

ขั้นตอนการสกัดเหมือนกรรมวิธีที่ 1 แต่เปลี่ยนน้ำยาสกัดเป็นของ Obera-Okeyo *et al.* (1997) ซึ่งประกอบ0.05M Tris-buffer pH 8, 10% w/v PVP-40, 14 mM β – ME, 20% glycerol และ 0.5% Triton –x

กรรมวิธีที่ 4 น้ำยาสกัดเอนไซม์ของ Sharma *et al.* (1999)

ขั้นตอนการสกัดเหมือนกรรมวิธีที่ 1 แต่เปลี่ยนน้ำยาสกัดเป็นของ Sharma *et al.* (1999) ซึ่งประกอบด้วย Phosphate buffer pH 6.9, 20 mg/ l PVP-40 และ DTT 1 mg/ml

ทั้ง 4 กรรมวิธีเปรียบเทียบ จำนวนและความคมชัดของแถบสีในแต่ละกรรมวิธีจากการย้อมเอนไซม์ 4 ชนิด คือ EST, LAP, GOT และ SKD เพื่อเลือกกรรมวิธีที่เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป การทดลองทำ 5 ซ้ำๆ ละ 1 ต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 ทดสอบเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการศึกษารูปแบบไอโซไซม์

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองที่ 2 มาทำการศึกษารูปแบบไอโซไซม์กับกล้วยไม้ดินใบจีบ 18 ชนิดได้แก่ *Phaius tankervilleae* (Banks ex I' Heritier) Blume, *Calanthe rubens* Ridl., *Calanthe vestita* Lindl., *Calanthe masuca* (D. Don) Lindl., *Calanthe cardioglossa* Schltr., *Calanthe rosea* (Lindl.) Benth., *Calanthe triplicata* (Willemet) Ames, *Liparis sutepensis* Rolfe ex Downie, *Arundina graminifolia* (D. Don) Hochr., *Spathoglottis plicata* Blume, *Spathoglottis eburnea* Gagnep., *Spathoglottis affinis* de Vriese, *Eulophia spectabilis* (Dennst.) Suresh., *Eulophia macrobulbon* (Parish. & Rchb. f.) Hook. f., *Eulophia nuda* Lindl., *Eulophia andamanensis* Rchb. f., *Geodorum recurvum* (Roxb.) Alston และ *Geodorum citrinum* Jacks.

วิธีการทดลอง

1. การสกัดเอนไซม์

ทำเหมือนกรรมวิธีที่ 1 โดยเลือกใช้น้ำยาสกัดที่เหมาะสมที่สุดกับตัวอย่างกล้วยไม้ดินแต่ละชนิดจากการทดลองที่ 2

2. การทำโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

2.1 ประกอบชุดแผ่นกระจกของ Mini-Protean® 2 Cell Electrophoresis (Bio-Rad) เข้าด้วยกัน จากนั้นนำสารละลาย separating gel (ตาราง ภาคผนวก1) เทลงระหว่างแผ่นกระจกเหลือระยะจากขอบประมาณ 2 ซม ที่เตรียมไว้รอจนเจลแข็งตัวแล้วเติมสารละลาย stacking gel (ตาราง ภาคผนวก1) พร้อมกับเสียบหวี (comb) ทันที และระวังการเกิดฟองอากาศในช่องที่เสียบหวีซึ่งอาจทำให้เกิดการ contaminate ในการหยอดตัวอย่างที่สกัดได้ ทิ้งไว้เพื่อให้เจลแข็งตัว เมื่อเจลแข็งตัวดึงหวีออกจะเห็นเป็นช่อง (well) แล้วล้างเศษเจลที่ตกค้างในช่องด้วยน้ำกลั่น

2.2 ประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซีสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม running buffer ลงใน chamber ประมาณ 500 มล จากนั้นค่อยๆ หยอดตัวอย่างที่ผสมกับ marker dye ในอัตราส่วน 50 : 1 ไมโครลิตร (มคล) ลงในช่องของ stacking gel ปริมาตร 28 มคล ระวังการฟุ้งกระจายกับช่องอื่น จากนั้นปิดฝาครอบแล้ว ต่อขั้วบวกและขั้วลบเข้ากับ chamber เปิดสวิตซ์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าโดยใช้กระแสที่ 14 มิลลิแอมแปร์ (มลอ) สำหรับ stacking gel และ 26 มลอ สำหรับ separating gel เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ทิ้งไว้รอจนระดับ marker dye เคลื่อนที่อยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่นเจลประมาณ 2-3 มล จึงหยุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กระแสไฟฟ้าจากนั้นนำแผ่นแก้วออกจาก chamber แล้วนำแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นแก้วออกมาวางบนถาด เพื่อย้อมเอนไซม์ต่อไป

3 การย้อมสีเอนไซม์

นำเจลที่ได้มาย้อมด้วยสีเอนไซม์ 20 ระบบ คือ acid phosphatase (ACP), aconitase (ACO), alcohol dehydrogenase (ADH), alkaline phosphatase (ALP), diaphorase (DIA), esterase (EST), formate dehydrogenase (FDH), NAD-glucose dehydrogenase (GDH), glutamate dehydrogenase (GLD), glutamic-oxaloacetate transaminase (GOT), isocitrate dehydrogenase (IDH), malate dehydrogenase (MDH), malic enzyme (ME), peroxidase (POX), phosphogluco isomerase (PGI), phosphoglutamutase (PGM), shikimate dehydrogenase (SKD), superoxide dismutase (SOD), leucine aminopeptidase (LAP) และ urease (URE) การทดลองทำ 5 ซ้ำๆ ละ 1 ต้น

4. การวิเคราะห์ข้อมูลหาความสัมพันธ์และความแตกต่างทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ดินใบจีบ

4.1 นำเจลที่เกิดแถบสีมาบันทึกตำแหน่ง จำนวน ขนาด ของแถบไอโซไซม์ และ ค่าระยะทางของ tracking dye

4.2 นำตำแหน่งระยะการเคลื่อนที่มาวิเคราะห์หาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) ตามสมการต่อไปนี้คือ

ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) = ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสีไอโซไซม์/ ระยะทางการเคลื่อนของแถบสี tracking dye

แล้วนำไปเขียนแผนภาพ zymogram

4.3 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

สถานที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. สถานีวิจัยและฝึกอบรมศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ตำบลบ้านแหวน อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

2. ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์เคมีเรือนเพาะชำ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3. ห้องปฏิบัติการโครงการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร (CMU–AgBiotech) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

เดือนมีนาคม 2545 – มกราคม 2547

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved