บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาลักษณะของกล้วยไม้สกุล *Liparis* และสกุล *Malaxis* ที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ **การทดลองที่ 1** การสำรวจและรวบรวมพันธุ์ **การทดลองที่ 2** การศึกษาการเจริญเติบโต และ **การทดลองที่ 3** การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา กายวิภาควิทยา เซลล์วิทยา และรูปแบบไอโซไซม์

อุปกรณ์และวิธีการทดลองมีดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 การสำรวจและรวบรวมพันธุ์

การศึกษาทดลองนี้เป็นการสำรวจการกระจายพันธุ์และการรวบรวมพันธุ์กล้วยไม้สกุล *Liparis* และ *Malaxis* จากพื้นที่ป่าในเขตป่าสงวนแห่งชาติขุนแม่กวง บันทึกสภาพทางนิเวศวิทยาของแหล่งเจริญเติบโตแล้วนำไปปลูกเลี้ยงไว้ในแปลงรวบรวมพันธุ์กล้วยไม้ภายในศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ

1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1 อุปกรณ์ในการสำรวจและเก็บตัวอย่าง ได้แก่ กล้องถ่ายรูป เสียม ป้ายชื่อ ถุงพลาสติกสีดำขนาด 20 x 30 นิ้ว สมุดบันทึก ไม้บรรทัด ดินสอและยางลบ

1.1.2 วัสดุปลูก ได้แก่ ดิน และใบไม้แห้ง ในอัตราส่วน 1:1

1.2 วิธีการ

สำรวจและรวบรวมพันธุ์ *Liparis* และ *Malaxis* ในพื้นที่เป้าหมาย แล้วบันทึกข้อมูลดังต่อไปนี้

1.2.1 สภาพทางนิเวศวิทยาของพื้นที่ที่พบว่ามีต้นพืชทดลองเจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ

1.2.2 ลักษณะเด่นของพืชทดลองแต่ละตัวอย่าง ถ่ายภาพเพื่อประกอบการบันทึกลักษณะภายนอกของต้นพืช ขุดต้นพืชใส่ถุงดำและติดป้ายชื่อสถานที่ที่สำรวจพบไว้บนถุง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.3 รวบรวมพืชทดลองจากพื้นที่สำรวจแต่ละแหล่งแล้วนำไปปลูกในแปลงรวบรวมพันธุ์

การทดลองที่ 2 การศึกษาการเจริญเติบโต

เลือกพืชทดลอง 6 ชนิดจากตัวอย่างที่รวบรวมและปลูกเลี้ยงไว้ นำมาศึกษาวงจรการเจริญเติบโต พืชทดลองที่เลือกศึกษา คือ เอื้องกลีบม้วน (*Liparis paradoxa* (Lindl.) Rchb. f.) เอื้องหางกระรอก (*L. regnieri* Finet) ฉัตรมรกต (*L siamensis* Rolfe ex Downie) หูเสือ (*Malaxis acuminata* D. Don) แห้วหมูป่า (*M. calophylla* (Rchb. f.) Kze.) และ สิกุนคล (*M. latifolia* J. E. Sm.) พืชทดลองเหล่านี้ปลูกเลี้ยงไว้ใต้ต้นไม้ใหญ่ในแปลงรวบรวมพันธุ์ บันทึกการเจริญเติบโตของพืชดังกล่าวใน 1 วงจรปี ครอบคลุมช่วงการเจริญเติบโตของใบและหัว ช่วงการเจริญเติบโตของดอกจนกระทั่งต้นพักตัว

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 พืชทดลอง 6 ชนิด คือ เอื้องกลีบม้วน เอื้องหางกระรอก ฉัตรมรกต หูเสือ แห้วหมูป่าและสิกุนคล ชนิดละ 10 ต้น

2.1.2 วัสดุปลูกได้แก่ ดิน และใบไม้แห้ง อัตราส่วน 1:1

2.1.3 อุปกรณ์ในการบันทึกการเจริญเติบโตของต้นพืชทดลอง คือ สมุดบันทึก เวอร์เนียแคลลิเปอร์ ไม้บรรทัด กล้องถ่ายรูป และ ป้ายชื่อพร้อมไม้ปักป้าย

2.2 วิธีการ

2.2.1 ปลูกต้นพืชในแปลงปลูกที่บรรจุวัสดุปลูกดังแสดงส่วนผสมใน 2.1.2 แปลงปลูกดังกล่าวนี้อยู่ภายใต้ร่มเงาของต้นไม้ใหญ่ในเขตรวบรวมพันธุ์

2.2.2 ติดตามการเจริญเติบโตของพืชทดลองโดยการบันทึกการเจริญเติบโตของต้นพืชตั้งแต่ระยะที่มีการเจริญเติบโตของตาหลังจากที่หัวแม่ผ่านระยะพักตัวแล้ว ตลอดไปจนถึงช่วงการเจริญเติบโตของใบ ช่วงแทงช่อดอกและช่วงบานดอกไปจนถึงช่วงที่หัวใหม่เข้าสู่ระยะพักตัว แล้วแสดงวงจรการเจริญเติบโตใน 1 วงจรปีของต้นพืชแต่ละชนิดในลักษณะของภาพวาด

2.2.3 บันทึกการเจริญเติบโตทางใบในลักษณะของจำนวนใบต่อต้น และขนาดใบ

2.2.4 บันทึกการเจริญเติบโตของดอกโดยการสังเกตการเริ่มเกิดดอก การเจริญเติบโตของดอก และคุณภาพของช่อดอกและดอกในลักษณะของความยาวของช่อดอก จำนวนดอกต่อช่อและขนาดของดอกย่อย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.5 บันทึกการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของหัวตั้งแต่เริ่มต้นการเจริญเติบโตจนถึงช่วงพักตัว และบันทึกการเจริญเติบโตของหัว โดยการวัดความสูงของหัว และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางหัว

การทดลองที่ 3 การศึกษาลักษณะ

การศึกษาลักษณะของพืชทดลองแบ่งออกเป็น 4 การทดลองย่อย โดยมีอุปกรณ์และวิธีการดังนี้

การทดลองที่ 3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะของเอื้องหางกระรอก ฉัตรมรกต และสิกุนคล โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของต้นพืช

3.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1.1 พืชทดลอง ได้แก่ เอื้องหางกระรอก ฉัตรมรกต และสิกุนคล 2 ตัวอย่างที่แตกต่างกัน คือ สิกุนคลต้นสีเขียวดอกสีส้มกำหนดให้เป็นรหัส ML 01 และสิกุนคลต้นสีม่วงดอกสีม่วงแดงกำหนดให้เป็นรหัส ML 02 โดยคัดจากต้นที่ปลูกเลี้ยงไว้ในแปลงรวบรวมพันธุ์ชนิดละ 5 ต้น

3.1.1.2 อุปกรณ์ ได้แก่ ไม้บรรทัด กระดาษสำหรับวาดภาพ สมุด ดินสอ ยางลบ ส่วนประกอบของต้นพืช มีดผ่าตัด ปากคีบ แว่นขยาย และกล้องจุลทรรศน์

3.1.2 วิธีการ

3.1.2.1 บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของพืชทดลองแต่ละชนิด ได้แก่ ต้น หัว ใบ ดอก และฝัก ในระยะที่ส่วนต่าง ๆ ของต้นเจริญเติบโตเต็มที่ โดยบันทึกลักษณะกรรมวิธีละ 5 ต้น พร้อมทั้งวาดภาพทางพฤกษศาสตร์แสดงลักษณะเหล่านั้น

3.1.2.2 บันทึกจำนวนและขนาดของส่วนประกอบของต้นดังนี้

3.1.2.2.1 **หัว** นับจำนวนหัวต่อต้น จำนวนปล้องต่อหัว วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางหัว โดยวัดจากส่วนที่กว้างที่สุด

3.1.2.2.2 **ต้น** วัดความสูงของต้นโดยวัดจากโคนต้นจนถึงปลายใบที่ยาวที่สุด

3.1.2.2.3 **ใบ** นับจำนวนใบต่อต้น และวัดขนาดของใบที่ 3 จากโคนต้น ยกเว้นฉัตรมรกตซึ่งวัดขนาดของใบที่ 2 จากโคนต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.2.2.4 **ช่อดอก** วัดความยาวและความกว้างของก้านช่อดอกโดย สกุล *Liparis* วัดความกว้างที่ตำแหน่ง 10 ซม เหนือผิวดิน ส่วนสกุล *Malaxis* วัดความกว้างที่ตำแหน่ง 20 ซม เหนือผิวดิน วัดความยาวและความกว้างของช่อดอก และนับจำนวนดอกต่อช่อ

3.1.2.2.5 **ดอก** วัดความกว้างจากตำแหน่งที่กว้างที่สุดของดอกและความยาวจากกลีบเลี้ยงด้านบนถึงปลายกลีบปาก ความกว้างและความยาวของกลีบเลี้ยง กลีบดอก และกลีบปากของดอกที่บานเต็มที่ ความยาวของก้านดอกย่อย ความกว้างและความยาวของเส้าเกสร จำนวนก้อนเรณู ความกว้างและความยาวของฝาอับเรณู และนับจำนวนดอกต่อช่อ

3.1.2.2.6 **ฝัก** วัดความกว้างและความยาวของฝักและนับจำนวนฝักต่อต้น

การทดลองที่ 3.2 การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยา

ศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาของเนื้อเยื่อของ ลำต้น ราก ใบ ดอก และฝักของเอื้องหางกระรอก ฉัตรมรกต และสิกุนคลรหัส ML 01 และ ML 02 โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อที่ตัดตามขวางและตามยาวของอวัยวะดังกล่าว ตามวิธีการศึกษาเนื้อเยื่อแบบ paraffin embedding ที่บรรยายไว้โดย Johansen (1940) และ Sass (1966)

3.2.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1.1.1 เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome)

3.2.1.1.2 กล้องจุลทรรศน์แบบ dissecting microscope และ stereo microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

3.2.1.1.3 ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิเป็น 56 ˚ซ

3.2.1.1.4 แผ่นให้ความร้อน (hot plate)

3.2.1.1.5 เครื่องอุ่นสไลด์ที่ปรับอุณหภูมิเป็น 40 ˚ซ

3.2.1.1.6 แท่งไม้สี่เหลี่ยมขนาด 1.5×1.5×1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่ต้มให้อิ่มตัวในพาราฟิน

3.2.1.1.7 แผ่นกระจกสไลด์ (slide) และแผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover slip)

3.2.1.1.8 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดใส่ชิ้นส่วนพืช บีกเกอร์ และขวดย้อมสี

3.2.1.1.9 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ ป้ายติดกาว พู่กันขนอ่อน มีดผ่าตัด และปากคีบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.1.2 สารเคมี

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

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

3.2.1.2.2 น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ประกอบด้วยส่วนผสมดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ในแต่ละขั้นตอน

ขั้นตอน	ปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (%)	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	-

3.2.1.2.3 สารตัวกลางที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) ได้แก่ Paraplast

3.2.1.2.4 น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive)

เตรียมน้ำยาเข้มข้นจากส่วนผสมของ

ไข่ขาว	1	มล
น้ำกลั่น	49	มล

เมื่อจะใช้นำน้ำยาเข้มข้นมาเจือจางโดยใช้น้ำยาเข้มข้น 1 มล มาเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมเป็น 50 มล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.1.2.5 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

3.2.1.2.6 น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อสะอาด (clearing reagent) คือ xylene

3.2.1.2.7 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นกระจกสไลด์ (mounting media) คือ Canada balsam

3.2.2 วิธีการ

การเตรียมสไลด์ถาวรของชิ้นส่วนพืชมีขั้นตอนของวิธีการดังนี้

3.2.2.1 เก็บตัวอย่างของลำต้น ราก ใบ ดอก และฝัก มาแช่ใน FAA ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้ว สังเกตดูเนื้อเยื่อที่แช่อยู่ในขวดถ้าเนื้อเยื่อลอยแสดงว่ามีฟองอากาศอยู่ภายในเนื้อเยื่อมาก ให้นำขวดที่บรรจุเนื้อเยื่อดังกล่าวไปใส่ในเครื่องดูดอากาศเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4-7 วัน ก่อนนำไปผ่านขั้นตอนต่อไป

3.2.2.2 นำเนื้อเยื่อมาผ่านขั้นตอนของการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยให้ผ่านขั้นตอนของน้ำยาจากระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำยา 50%, 70%, 85% และ 90% เรื่อยไปจนถึงระดับ 100% จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปผ่าน 100% TBA ตามด้วยน้ำยาที่ประกอบด้วย TBA และพาราฟินเหลวอัตราส่วน 1:1 แล้วนำเนื้อเยื่อไปผ่านขั้นตอนของการแทรกพาราฟินเข้าไปในเนื้อเยื่อ (infiltration)

3.2.2.3 ถ่ายเนื้อเยื่อลงไปในขวดแก้วที่บรรจุพาราฟินที่หลอมแล้ว นำขวดแก้วไปเก็บไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 56 °ซ นานประมาณ 1 สัปดาห์หรือมากกว่า จนกระทั่งพาราฟินแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อได้เต็มที่

3.2.2.4 นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟิน แล้วจัดตำแหน่งของเนื้อเยื่อให้อยู่ในตำแหน่งและระนาบที่ต้องการ

3.2.2.5 นำแท่งพาราฟินที่ได้ไปตัดแต่งให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าโดยให้มีชิ้นส่วนพืชอยู่ตรงกลาง แล้วนำมาติดกับแท่งไม้จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน โดยตัดเนื้อเยื่อตามยาวหรือตามขวางให้มีความหนา 13-15 ไมครอน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2.6 นำแถบชิ้นส่วนพืช (paraffin ribbon) ติดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ด้วยน้ำยายึดเนื้อเยื่อพืช วางแผ่นสไลด์บนเครื่องอุ่นสไลด์จนแถบชิ้นส่วนพืชแห้งและติดกับแผ่นสไลด์

3.2.2.7 นำแผ่นกระจกสไลด์ที่ละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อแล้วไปย้อมสี

3.2.2.8 ปิดแผ่นกระจกสไลด์ด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์โดยใช้ Canada balsam ยึด

3.2.2.9 เมื่อแผ่นกระจกสไลด์แห้งสนิท นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาเนื้อเยื่อใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ

การทดลองที่ 3.3 การศึกษาเซลล์วิทยา

ศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อปลายรากของเอื้องหางกระรอก ฉัตรมรกต และสิกุนคลรหัส ML 01 และ ML 02 ด้วยวิธี Feulgen's squash ที่ดัดแปลงโดยดวงทิพย์ (2539) และประภัสสร (2543)

3.3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.3.1.1 ปลายรากของเอื้องหางกระรอก ฉัตรมรกต และสิกุนคลรหัส ML 01 และ ML 02

3.3.1.2 ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับเก็บตัวอย่างปลายราก

3.3.1.3 แผ่นกระจกสไลด์ และแผ่นปิดกระจกสไลด์

3.3.1.4 ปรอทวัดความร้อน

3.3.1.5 อ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ

3.3.1.6 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ ปากคีบ เข็มเขี่ย กระบอกตวงสารเคมี และน้ำยาเคลือบเล็บ

3.3.1.7 กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และ photomicroscope

3.3.1.8 สารเคมี

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

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.1.8.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับย่อยแยกเซลล์ (hydrolytic solution) คือ 1 N HCl

3.3.1.8.4 สีที่ใช้ย้อมโครโมโซม คือ carbol fuchsin

3.3.2 วิธีการ

3.3.2.1 เตรียมปลายรากโดยเลือกรากที่กำลังเจริญเติบโต คือ ปลายรากที่เพิ่งงอกออกมายาวประมาณ 1 ซม ตัดมาเฉพาะส่วนปลายเพียง 3-5 มม เก็บตัวอย่างปลายรากในช่วงเวลา 7.00-11.00 น. โดยเก็บทุกชั่วโมงระหว่างเวลาดังกล่าว

3.3.2.2 หยุดวงชีพเซลล์โดยการแช่ปลายรากในสารละลาย PDB เป็นเวลา 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 1 ชั่วโมง 30 นาที, 2, 3 และ 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 10 ˚ซ

3.3.2.3 นำปลายรากออกมาจากสารละลาย PDB ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ (Carnoy's solution) นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง

3.3.2.4 ย่อยเซลล์ให้แยกจากกันโดยการแช่รากใน 1 N HCl นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 60 ˚ซ แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น

3.3.2.5 ย้อมเนื้อเยื่อปลายรากใน carbol fuchsin แล้วแช่ไว้นาน 30 นาที, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นคีบเนื้อเยื่อวางบนแผ่นกระจกสไลด์แล้วใช้มีดผ่าตัดตัดเฉพาะส่วนปลายรากให้ยาว 1 มม เขี่ยส่วนเกินทิ้งไป หยดสี 1 หยดลงบนเนื้อเยื่อแล้วใช้ปลายเข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อเบา ๆ เพื่อให้เซลล์กระจาย คีบเนื้อเยื่อส่วนเกินทิ้งแล้วปิดด้วยแผ่นปิดกระจกสไลด์บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ วางกระดาษซับบนแผ่นกระจกสไลด์ กดด้วยนิ้วหัวแม่มือเพื่อให้เซลล์กระจายและเพื่อซับสีที่มากเกินไปออก

3.3.2.6 นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟสและมีการกระจายตัวของโครโมโซมดี และสามารถนับจำนวนโครโมโซมได้แม่นยำ เมื่อได้เซลล์ที่ต้องการแล้วกดนิ้วลงบนแผ่นกระจกปิดสไลด์เบา ๆ เพื่อให้เซลล์แบน และอยู่ในระนาบเดียวกัน ใช้น้ำยาเคลือบเล็บทาบริเวณขอบแผ่นปิดกระจกสไลด์เพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อแห้ง นำแผ่นกระจกสไลด์ไปตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อนับจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วบันทึกภาพ

การทดลองที่ 3.4 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์

ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเอื้องหางกระรอก ฉัตรมรกต และสิกุนคลรหัส ML 01 และ ML02 โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อของใบและใช้เอนไซม์ 3 ชนิด คือ ACP, EST และ POX โดยดัดแปลงวิธีการศึกษา ACP และ POX จากวิธีของพสุ (2546) และ EST จากวิธีของรัติกาล (2543)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.4.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.4.1.1.1 เนื้อเยื่อใบของพืชทดลอง

3.4.1.1.2 ตู้แช่แข็งที่ปรับอุณหภูมิเป็น -20 ° ซ และตู้เย็น

3.4.1.1.3 ชุดอิเล็คโทรโฟรีซีสแบบ slab gel

3.4.1.1.4 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า Model 1000/500

3.4.1.1.5 เครื่องหมุนเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็นได้

3.4.1.1.6 เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.4.1.1.7 เครื่องวัดความเป็นกรด–ด่างของสารละลาย

3.4.1.1.8 โกร่งบดตัวอย่างพืช

3.4.1.1.9 ไมโครปิเปต

3.4.1.1.10 หลอดใส่สาร (Eppendrof tube) ขนาด 1.5 มล

3.4.1.1.11 ชุดอ่านเจล (visible light transilluminator)

3.4.1.1.12 เครื่องแก้ว

3.4.1.1.13 หลอดใส่สารปรับปริมาตรได้ (syringe) ขนาด 50 ไมโครลิตร

3.4.1.1.14 กล่องพลาสติกใสขนาด 3 x 5 x 1 นิ้ว พร้อมฝาปิด

3.4.1.1.15 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น กล่องโฟม แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ ถุงมือ กระดาษชั่งสาร ปากคีบ ช้อนตักสาร พลาสติกใส ถาดพลาสติก กระดาษติดป้าย กล้องถ่ายรูป

3.4.1.2 สารเคมี

3.4.1.2.1 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ extraction buffer คือ 0.2 M tris-HCl pH 8.4

3.4.1.2.2 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ gel

3.4.1.2.2.1 30 % acrylamide stock solution (acrylation 29.2 กรัม และ bis-acrylamide 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มล เก็บไว้ในขวดสีชาที่ 4 ° ซ)

3.4.1.2.2.2 1.5 M tris-HCl pH 8.8

3.4.1.2.2.3 1.5 % ammonium persulfate (APS) เตรียมทันทีก่อนใช้

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.1.2.2.5 น้ำกลั่น

3.4.1.2.3 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ loading dye

3.4.1.2.3.1 10 % glycerol

3.4.1.2.3.2 0.5 % bromophenol blue

3.4.1.2.4 สารเคมีที่ใช้เป็น running buffer

3.4.1.2.4.1 tris

3.4.1.2.4.2 glycine pH 8.3 ต่อน้ำกลั่น 500 มล

3.4.1.2.5 สารเคมีที่ใช้ย้อมเอนไซม์

3.4.1.2.5.1 0.1 M tris-HCl pH 4.0

3.4.1.2.5.2 3-amino-9-ethylcarbazole

3.4.1.2.5.3 β-naphthol

3.4.1.2.5.4 3 % H_2O_2

3.4.1.2.5.5 0.1 M phosphate buffer pH 6.0

3.4.1.2.5.6 fast blue B-salt

3.4.1.2.5.7 α-naphthyl acetate

3.4.1.2.5.8 0.05 M acetate buffer pH 4.8

3.4.1.2.5.9 fast ganet GBC diasonium salt

3.4.1.2.5.10 disodium α-naphthyl phosphate

3.4.2 วิธีการ

3.4.2.1 การสกัดเอนไซม์

นำใบที่สามจากปลายยอดของพืชทดลองมาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วใช้กระดาษซับเช็ดให้แห้ง ชั่งใบให้ได้น้ำหนัก 1.0 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในโกร่งที่แช่เย็นจัดแล้วบดตัวอย่างจนละเอียด จากนั้นเติม extraction buffer ตามสูตรของ Gottlieb, 1981 (อ้างโดย Kuntapanom and Smitamana, 1997) 3 มล และ PVPP 0.05 กรัม แล้วบดจนตัวอย่างละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทของเหลวที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 2 ˚ซ เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใสใส่หลอดทดลองอันใหม่ แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ˚ซ เพื่อนำไปทำโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซีสต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.2.2 การทำโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซีส

ประกอบชุดแผ่นกระจกของ Mini-Protean®3 Cell Electrophoresis (Bio-Rad) เข้าด้วยกัน จากนั้นเตรียมสารละลายของเจล 6.0 % และ 8.5 % สำหรับ separating gel โดยผสมสารจากส่วนผสมที่แสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนผสมของสารเคมีในการเตรียม separating gel (Kuntapanom and Smitamana, 1997)

สาร	6.0% separating gel	8.5% separating gel
น้ำกลั่น	10.70 มล	5.65 มล
1.5 M tris pH 8.8	5.00 มล	3.13 มล
30% acrylamide	3.13 มล	3.54 มล
10% APS	150.00 ไมโครลิตร	125.00 ไมโครลิตร
TEMED	10.00 ไมโครลิตร	7.50 ไมโครลิตร

เมื่อเตรียมสารละลายเจลเรียบร้อยแล้วนำสารละลายมาเทลงระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ จากนั้นต่อชุดอิเล็คโทรโฟรีซีสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม loading dye ลงใน chamber แล้วหยอดตัวอย่างที่ผสมกับ loading dye ในอัตราส่วน 9:1 ลงในช่องของ stacking gel 20 ไมโครลิตรต่อช่อง โดยไม่ให้ตัวอย่างผสมปนกันในแต่ละช่อง ปิดฝาครอบแล้วต่อขั้วไฟเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เปิดสวิตช์ให้กระแสไฟผ่านโดยใช้กระแสไฟ 20 มิลลิแอมแปร์ ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟเมื่อสีของ loading dye เคลื่อนที่มาถึงปลายล่างของเจล จากนั้นนำแผ่นกระจกออกจาก chamber แล้วแกะเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นกระจกออกมาใส่ไว้ในกล่องพลาสติกใสเพื่อรอย้อมสีเอนไซม์ต่อไป

3.4.2.3 การย้อมสีเอนไซม์ในเจล

นำเจลที่ได้มาย้อมด้วย staining solution ของไอโซไซม์ตามระบบเอนไซม์ 3 ชนิด คือ ACP, EST และ POX (ภาคผนวก)

3.4.2.4 การบันทึกข้อมูล

นำเจลที่ย้อมสีแล้วมาบันทึกค่าการเคลื่อนที่ของแถบสี คำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) บันทึกจำนวนและรูปแบบการเกิดแถบสี วาดไซโมแกรม บันทึกการมีและไม่มีแถบสีในตำแหน่งเดียวกัน โดยคำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ตามสมการดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved