บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาลักษณะของกล้วยไม้ช้างผสมโขลงที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ **การทดลองที่ 1** การสำรวจและศึกษาการเจริญเติบโต **การทดลองที่ 2** การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และกายวิภาควิทยา การศึกษาเซลล์วิทยา และ รูปแบบไอโซไซม์ และ **การทดลองที่ 3** การผสมเกสร

อุปกรณ์และวิธีการทดลองมีดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 การสำรวจและการศึกษาการเจริญเติบโต

การทดลองนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อยซึ่งแต่ละการทดลองมีอุปกรณ์และวิธีการดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1.1 การสำรวจการกระจายพันธุ์ของช้างผสมโขลง

การศึกษาทดลองนี้เป็นการสำรวจการกระจายพันธุ์ของช้างผสมโขลงโดยกำหนดพื้นที่สำรวจเป็นรัศมี 500 เมตร จากจุดที่พบว่ามีพืชทดลองเจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติจุดแรกภายในศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ ดังกล่าวไว้ในบทที่ 1 พร้อมทั้งบันทึกสภาพทางนิเวศวิทยาของพื้นที่เจริญเติบโต

1.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

อุปกรณ์ในการสำรวจ คือ ป้ายชื่อ ไม้บรรทัด ตลับเมตร กล้องถ่ายภาพพร้อมฟิล์ม สมุดบันทึก ดินสอ และ ยางลบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.2 วิธีการ

สำรวจพืชทดลองในพื้นที่เป้าหมาย เมื่อพบต้นพืชจึงบันทึกข้อมูลทางนิเวศวิทยาของพื้นที่ที่พบว่ามีต้นพืชทดลองเจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ นับจำนวนต้นที่พบในแต่ละจุดและติดป้ายเพื่อติดตามการเจริญเติบโต และการกระจายพันธุ์ในปีต่อไป

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของพืชทดลอง

ศึกษาวงจรการเจริญเติบโตของพืชทดลองโดยบันทึกการเจริญเติบโตใน 1 วงจร คือ 1 ปี ตั้งแต่ช่วงเริ่มแทงช่อดอกและบานดอก ช่วงการเจริญเติบโตของใบและหัวใหม่ไปจนกระทั่งหัวใหม่พักตัว

1.2.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.2.1.1 พืชทดลองคือ ช้างผสมโขลง จำนวน 10 ต้น

1.2.1.2 อุปกรณ์ในการศึกษาการเจริญเติบโต คือ ป้ายชื่อ ไม้บรรทัด เวอร์เนียคาลิปเปอร์ กล้องถ่ายภาพพร้อมฟิล์ม และ สมุดบันทึก

1.2.1.3 วัสดุปลูก ได้แก่ ดิน และใบไม้แห้ง อัตราส่วน 2 : 1

1.2.2 วิธีการ

1.2.2.1 ติดตามการเจริญเติบโตของพืชทดลองจาก ระยะเริ่มแทงช่อดอกและบานดอก ช่วงการเจริญเติบโตของใบและหัวใหม่ไปจนกระทั่งหัวใหม่พักตัว

1.2.2.2 บันทึกการเจริญเติบโตทางใบ จำนวนใบต่อต้น และขนาดใบ

1.2.2.3 บันทึกการเจริญเติบโตของหัว จำนวนปล้องต่อหัว และเส้นผ่าศูนย์กลางหัว

1.2.2.4 บันทึกการเจริญเติบโต ในช่วงที่มีการเจริญเติบโตของดอก สังเกตบริเวณที่เกิดการสร้างดอก บันทึกช่วงการเริ่มสร้างดอก การเจริญเติบโตของดอก และผลผลิตของดอกในลักษณะของจำนวนช่อดอกต่อต้น

1.2.2.5 บันทึกการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของหัวตลอดช่วงพักตัว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 การศึกษาลักษณะ

การศึกษาลักษณะของพืชทดลองแบ่งออกเป็น 4 การทดลองย่อย โดยมีอุปกรณ์และวิธีการดังนี้

การทดลองที่ 2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานของส่วนประกอบของต้นพืช ได้แก่ ราก หัว ใบ และ ดอก โดยบันทึกข้อมูลดังกล่าวจากต้นพืชทดลอง 5 ต้น ในระยะที่ส่วนต่าง ๆ ของต้นเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว

2.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1.1 พืชทดลอง

คัดเลือกต้นพืชทดลองจากต้นที่เก็บรวบรวมไว้ในแปลงรวบรวมพันธุ์ โดยคัดต้นที่มีขนาดและระยะของการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันมาปลูกเลี้ยงไว้ในแปลงทดลอง 5 ต้น

2.1.1.2 อุปกรณ์ ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ ไม้บรรทัด สมุด ปากกา ดินสอดำ และ กระดาษสำหรับวาดภาพ

2.1.2 วิธีการ

2.1.2.1 บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของส่วนประกอบของต้นพืชทดลองได้แก่ราก หัว ใบ ดอก และ ผล ในระยะที่ต้นและดอกเจริญเติบโตเต็มที่ โดยบันทึกลักษณะจากตัวอย่าง 5 ต้น พร้อมทั้งวาดภาพ

2.1.2.2 บันทึกจำนวนและขนาดของส่วนประกอบของต้นดังนี้

2.1.2.2.1 **หัว** บันทึกจำนวนหัวต่อต้น และ บันทึกขนาดของหัวในลักษณะของเส้นผ่าศูนย์กลางหัว และ นับจำนวนปล้องของหัว

2.1.2.2.2 **ใบ** บันทึกจำนวนใบต่อต้นและวัดขนาดของใบที่ 3 นับจากโคนต้น

2.1.2.2.3 **ช่อดอก** บันทึกขนาดของช่อดอก และ จำนวนดอกต่อช่อ

2.1.2.2.4 **ดอก** บันทึกขนาดของดอก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.2.2.5 **ผล** บันทึกขนาดของผล

การทดลองที่ 2.2 การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยา

ศึกษากายวิภาควิทยาของเนื้อเยื่อของอวัยวะที่เป็นส่วนประกอบของต้นพืชทดลอง โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อที่ตัดตามยาวและตามขวางของราก ลำต้น ใบ ดอก และ ผล ตามวิธีการศึกษาเนื้อเยื่อแบบ paraffin embedding ของ Johansen (1940)

2.2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.2.1.1.1 เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน (rotary-microtome)

2.2.1.1.2 กล้องจุลทรรศน์แบบ dissecting microscope และ stereo-microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

2.2.1.1.3 ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิเป็น 56 ° ซ

2.2.1.1.4 แผ่นให้ความร้อน (hot plate)

2.2.1.1.5 เครื่องอุ่นสไลด์ที่ปรับอุณหภูมิเป็น 40 ° ซ

2.2.1.1.6 แท่งไม้สี่เหลี่ยมขนาด 1.5 × 1.5× 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่ต้มให้อิ่มตัวในพาราฟิน

2.2.1.1.7 แผ่นกระจกสไลด์ (slide) และแผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover slip)

2.2.1.1.8 อุปกรณ์เครื่องแก้วได้แก่ ขวดสำหรับใส่ชิ้นส่วนพืช บีกเกอร์ และ ขวดย้อมสี

2.2.1.1.9 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ พู่กัน ขนอ่อน ปากคีบ และ ป้ายติดกาว

2.2.1.2 สารเคมี

2.2.1.2.1 น้ำยารักษาสภาพเซลล์ (fixative) ได้แก่ FAA (formalin – acetic acid – alcohol) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสม ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

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

2.2.1.2.2 น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ประกอบด้วยส่วนผสมดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ในแต่ละขั้นตอน

ขั้นตอน	ปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (%)	95 % ethyl alcohol (มล)	100 % ethyl alcohol (มล)	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	-

2.2.1.2.3 สารตัวกลางที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) ได้แก่ Paraplast

2.2.1.2.4 น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive) เตรียมน้ำยาเข้มข้นจากส่วนผสมของ

ไข่ขาว	1	มล
น้ำกลั่น	49	มล

เมื่อจะใช้นำน้ำยาเข้มข้นมาเจือจางโดยใช้น้ำยาเข้มข้น 1 มล มาเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมเป็น 50 มล

2.2.1.2.5 สีย้อมเนื้อเยื่อ ใช้สี Dalafield'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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

methyl alcohol	100	มล
glycerol	100	มล

2.2.1.2.6 น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อสะอาด (clearing reagent) คือ xylene

2.2.1.2.7 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นกระจกสไลด์ (mounting media) คือ Canada balsam

2.2.2 วิธีการ

การเตรียมสไลด์ถาวรของชิ้นส่วนพืชมีขั้นตอนของวิธีการดังนี้

2.2.2.1 เก็บตัวอย่างของราก หัว ใบ ดอก และ ผล มาแช่ใน FAA ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้ว แล้วนำขวดดังกล่าวไปใส่ในเครื่องดูดอากาศเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากเนื้อเยื่อหลังจากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนานอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปผ่านขั้นตอนต่อไป

2.2.2.2 นำเนื้อเยื่อมาผ่านขั้นตอนของการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยให้เนื้อเยื่อผ่านขั้นตอนของน้ำยาจากระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำยา 50 เปอร์เซ็นต์ (%) ไปจนถึงระดับ 100 % จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปผ่าน 100 % TBA ตามด้วยน้ำยาที่ประกอบด้วย TBA และพาราฟินเหลวอัตราส่วน 1:1 แล้วนำเนื้อเยื่อไปผ่านขั้นตอนของการแทรกพาราฟินเข้าไปในเนื้อเยื่อ (infiltration)

2.2.2.3 ถ่ายเนื้อเยื่อลงไปในขวดแก้วที่บรรจุพาราฟินที่หลอมแล้ว นำขวดแก้วไปเก็บไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 56 °ซ นานประมาณ 1 สัปดาห์ หรือมากกว่าจนกระทั่งพาราฟินแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อได้เต็มที่

2.2.2.4 นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟิน แล้วจัดตำแหน่งของเนื้อเยื่อให้อยู่ในตำแหน่งและระนาบที่ต้องการ

2.2.2.5 นำแท่งพาราฟินที่ได้ไปตัดแต่งให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าให้ชิ้นส่วนพืชอยู่ตรงกลาง แล้วนำมาติดกับแท่งไม้จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน โดยตัดเนื้อเยื่อตามยาวหรือตามขวางให้หนา 13 – 15 ไมครอน

2.2.2.6 นำแถบชิ้นส่วนพืช (paraffin ribbon) ติดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ด้วยน้ำยายึดเนื้อเยื่อพืช วางแผ่นสไลด์บนเครื่องอุ่นสไลด์จนแถบชิ้นส่วนพืชแห้งและติดกับแผ่นสไลด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2.7 นำแผ่นกระจกสไลด์ที่ละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อแล้วไปย้อมสี

2.2.2.8 ปิดแผ่นกระจกสไลด์ด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์โดยใช้ Canada balsam ยึด

2.2.2.9 เมื่อแผ่นกระจกสไลด์แห้งสนิท นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาเนื้อเยื่อใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ

การทดลองที่ 2.3 การศึกษาเซลล์วิทยา

ศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อปลายรากของพืชทดลองด้วยวิธี Feulgen's squash ที่ดัดแปลงโดย ดวงทิพย์ (2539) และ ประภัสสร (2543)

2.3.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.3.1.1 ปลายรากของพืชทดลอง

2.3.1.2 ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับเก็บตัวอย่างราก

2.3.1.3 แผ่นกระจกสไลด์ และแผ่นกระจกปิดสไลด์

2.3.1.4 ปรอทวัดความร้อน

2.3.1.5 อ่างควบคุมอุณหภูมิ

2.3.1.6 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ ปากคีบ เข็มเขี่ย กระบอกตวงสารเคมี และน้ำยาเคลือบเล็บ

2.3.1.7 กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และ photomicroscope

2.3.1.8 สารเคมี

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

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

2.3.1.8.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับย่อยแยกเซลล์ (hydrolytic solution) คือ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 1 นอร์มอล (N)

2.3.1.8.4 สีที่ใช้ย้อมโครโมโซม คือ carbol fuchsin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.2 วิธีการ

2.3.2.1 เตรียมปลายรากโดยเลือกรากที่งอกใหม่ และมีความยาวประมาณ 1 ซม ตัดมาเฉพาะส่วนปลายเพียง 1-2 มิลลิเมตร (มม) เก็บตัวอย่างปลายรากในช่วงเวลา 8.00 , 9.00, 10.00, 11.00 และ 12.00 น.

2.3.2.2 หยุดวงชีพเซลล์โดยแช่ปลายรากในสารละลาย PDB เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 10 ° ซ

2.3.2.3 นำปลายรากออกมาจากสารละลาย PDB ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์นาน 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น

2.3.2.4 ย่อยแยกเซลล์โดยการแช่รากใน 1 N HCl นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 60 ° ซ แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น

2.3.2.5 ย้อมเนื้อเยื่อปลายรากใน carbol fuchsin แช่ไว้นาน 1 คืน หลังจากนั้นคีบเนื้อเยื่อวางบนแผ่นกระจกสไลด์แล้วใช้มีดผ่าตัดตัดเฉพาะส่วนปลายรากให้ยาว 1 มม เขี่ยส่วนเกินทิ้งไป หยดสีลงไปอีก 1 หยด ใช้เข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อเบา ๆ เพื่อให้เซลล์กระจาย คีบเนื้อเยื่อส่วนเกินทิ้งแล้วปิดแผ่นกระจกปิดสไลด์บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ วางกระดาษซับบนแผ่นกระจกสไลด์เพื่อซับสีที่มากเกินไปออก กดนิ้วหัวแม่มือลงไปเพื่อให้เซลล์กระจาย

2.3.2.6 นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟสและมีการกระจายตัวของโครโมโซมดี เมื่อได้เซลล์ที่ต้องการแล้วกดแผ่นกระจกปิดสไลด์เบาๆ เพื่อให้เซลล์แบน และอยู่ในระนาบเดียวกัน ใช้น้ำยาเคลือบเล็บทาบริเวณขอบแผ่นกระจกปิดสไลด์เพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อแห้ง นำแผ่นกระจกสไลด์ไปตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อนับจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วบันทึกภาพตามความจำเป็น

การทดลองที่ 2.4 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์

ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของพืชทดลองโดยศึกษาจากใบและใช้เอนไซม์ 3 ชนิด คือ esterase (EST) โดยดัดแปลงวิธีการศึกษาจากวิธีของรัติกาล (2543) และ เอนไซม์ peroxidase (POX) และ acid phosphatase (ACP) โดยดัดแปลงวิธีการศึกษาจากวิธีของพสุ (2546)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.4.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.4.1.1.1 ใบพืชทดลองในระยะการเจริญเติบโต 2 ระยะ คือ ใบที่ยังอ่อนอยู่ และ ใบที่เจริญเติบโตเต็มที่

2.4.1.1.2 เครื่องทำความเย็น ตู้เย็น และ ตู้แช่แข็งที่ปรับอุณหภูมิเป็น -20° ซ

2.4.1.1.3 ชุดอิเล็คโตรโฟรีซีสแบบ slab gel

2.4.1.1.4 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า Model 1000/500

2.4.1.1.5 เครื่องหมุนเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็นได้

2.4.1.1.6 เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.4.1.1.7 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย

2.4.1.1.8 โกร่งบดตัวอย่างพืช

2.4.1.1.9 ไมโครปิเปต

2.4.1.1.10 หลอดใส่สาร (Eppendrof tube) ขนาด 1.5 มล

2.4.1.1.11 ชุดอ่านเจล (visible light transilluminator)

2.4.1.1.12 เครื่องแก้ว

2.4.1.1.13 หลอดใส่สารปรับปริมาตรได้ ขนาด 50 ไมโครลิตร

2.4.1.1.14 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น ถุงมือ ปากคีบ กระดาษชั่งสาร ช้อนตักสาร พลาสติกใส ถาดพลาสติก กระดาษติดป้าย แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ กล้องถ่ายรูป ฟิล์มถ่ายรูป กล่องโฟม ฯลฯ

2.4.1.2 สารเคมี

2.4.1.2.1 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ extraction buffer คือ 0.2 M Tris-HCl pH 8.4

2.4.1.2.2 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ gel

2.4.1.2.2.1 30 % acrylamide stock solution (acrylation 29.2 กรัม และ bis-acrylamide 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณ 100 มิลลิกรัม เก็บไว้ในขวดสีชาที่ 4 °ซ)

2.4.1.2.2.2 คือ 1.5 M Tris-HCl pH 8.8

2.4.1.2.2.3 10 % ammonium persulfate (APS) ที่เตรียมทันทีก่อนใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.1.2.2.4 TEMED (N,N,N',N'– tetramethyl ethylenediamine)

2.4.1.2.2.5 น้ำกลั่น

2.4.1.2.3 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ sample buffer

2.4.1.2.3.1 10 % glycerol

2.4.1.2.3.2 0.5 % bromophenol blue

2.4.1.2.4 สารเคมีที่ใช้เป็น electrode buffer pH 8.3

2.4.1.2.4.1 Tris

2.4.1.2.4.2 Glycine

2.4.1.2.5 สารเคมีที่ใช้ย้อมเอนไซม์

2.4.1.2.5.1 0.1 M Tris-HCl pH 4.0

2.4.1.2.5.2 3 - amino - 9 - ethylcarbazole

2.4.1.2.5.3 β - naphthol

2.4.1.2.5.4 3 % H_2O_2

2.4.1.2.5.5 0.2 M phosphate buffer pH 6.0

2.4.1.2.5.6 fast blue B - salt

2.4.1.2.5.7 α - naphthyl acetate

2.4.1.2.5.8 0.05 M acetate buffer pH 5.0

2.4.1.2.5.9 fast garnet GBC diasodium salt

2.4.1.2.5.10 disodium α - naphthyl phosphate

2.4.2 วิธีการ

2.4.2.1 การสกัดเอนไซม์

นำใบพืชทดลองในระยะการเจริญเติบโต 2 ระยะ คือใบที่ยังอ่อนอยู่และใบที่เจริญเติบโตเต็มที่มาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วเช็ดให้แห้ง 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 เทสารของเหลวที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 2 ° ซ เป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เวลา 30 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใสใส่หลอดทดลองอันใหม่ แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 °ซ เพื่อนำไปทำ polyacrylamide gel electrophoresis ต่อไป

2.4.2.2 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 (Kuntapanom and Smitamana , 1997)

Stock solution	8.5 % Separating gel	
น้ำกลั่น	9.7	มล
1.0 M Tris pH 8.8	5.0	มล
30% Acrylamide	5.0	มล
10% APS	200.0	ไมโครลิตร
TEMED	10.0	ไมโครลิตร

เมื่อเตรียมสารละลายเจลเรียบร้อยแล้วนำสารละลายมาเทลงระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ จากนั้นต่อชุดอิเลคโตรโฟรีซีสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม running buffer ลงใน chamber แล้วหยอดตัวอย่างที่ผสมกับ bromophenol blue ในอัตราส่วน 15:1 ลงในช่องของ stacking gel 20 ไมโครลิตรต่อช่อง โดยไม่ให้ตัวอย่างผสมปนกันในแต่ละช่อง ปิดฝาครอบแล้วต่อขั้วไฟเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เปิดสวิทช์ให้กระแสไฟผ่านโดยใช้กระแสไฟ 20 มิลลิแอมแปร์ ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟ เมื่อสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่มาถึงปลายล่างของเจล จากนั้นนำแผ่นกระจกออกจาก chamber แล้วแกะเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นกระจกออกมาวางบนจานแก้ว เพื่อย้อมสีเอนไซม์ต่อไป

2.4.2.3 การย้อมสีเอนไซม์ในเจล

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.2.4 การบันทึกข้อมูล

นำเจลที่ย้อมสีมาบันทึกค่าการเคลื่อนที่ของแถบสี คำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) บันทึกจำนวนและรูปแบบการเกิดแถบสี วาด schematic zymogarm บันทึกการมีและไม่มีแถบสีในตำแหน่งเดียวกัน

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

การทดลองที่ 3 การผสมเกสร

ศึกษาความเป็นไปได้ของการผสมเกสรของพืชทดลองโดยการถ่ายละอองเกสรด้วยมือเพื่อให้เกิดการผสมเกสรในดอกเดียวกัน

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 พืชทดลอง คือ ช้างผสมโขลง

3.1.2 วัสดุที่ใช้ ได้แก่ ไม้ปลายแหลม พู่กัน ดินสอ แผ่นป้ายพลาสติก ลวด และ คลิบหนีบกระดาษ

3.2 วิธีการ

3.2.1 การผสมเกสร

ทดลองผสมเกสรในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน 8 ช่วง คือ ผสมเกสรทุก ๆ 1 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลา 7.00 – 11.00 น. และ 17.00 – 19.00 น. วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ดอก ผสมเกสรให้ดอกที่บานได้ 2 วัน โดยใช้ไม้ปลายแหลมที่สะอาดเขี่ยเกสรตัวเพศผู้ออกมา แล้วนำไปใส่ยอดเกสรเพศเมียซึ่งเป็นแอ่งที่มีน้ำเมือกเหนียว ใสคล้ายแป้งเปียก แล้วติดป้ายบันทึกข้อมูลการผสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2 การบันทึกข้อมูล

บันทึกจำนวนดอกที่ผสมเกสร จำนวนที่ผสมติด และบันทึกขนาดของฝัก ตั้งแต่ระยะติดฝักจนถึงระยะฝักแก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved