บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

พันธุ์เฮลิโคเนีย

พันธุ์ที่ศึกษามี 6 พันธุ์ คือ

1. *Heliconia psittacorum* L.f. x *H. spathocircinata* Aristeguieta cv. Golden Torch
2. *H. psittacorum* L.f. cv. Lady Di
3. *H. psittacorum* L.f. cv. Sassy
4. *H. psittacorum* L.f. cv. Andromeda
5. *H. bihai* cv. Lobster Claw Two
6. *H. rostrata* Ruiz & Pavon

การศึกษาที่ 1 การวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ สรีรวิทยาของเฮลิโคเนีย

การเตรียมแปลง

ดินในแปลงปลูกที่ทำการศึกษาเป็นดินชุดยโสธร เนื้อดินเป็นดินร่วนปนทราย (แร่ธาตุในดินแสดงในตารางผนวกที่ 1) เตรียมแปลงปลูกมีขนาดกว้าง 1 ม. ยาว 6 ม. สูง 0.3 ม. ระยะห่างระหว่างแปลง 0.8 ม. จำนวนทั้งหมด 18 แปลง การทำแปลงจะทำแปลงยาวไปตามแนวทิศตะวันออก-ตก ใส่ปุ๋ยรองพื้นประกอบด้วย มูลวัวอัตรา 2 กก./ตร.ม. ขี้เถ้าแกลบ อัตรา 2 กก./ตร.ม. ใบไม้แห้งบดอัตรา 1 กก./ตร.ม. ขึ้นแปลงสามเหลี่ยม แล้วอบดินด้วยเมธิลโบรไมด์ (methylbromide) นาน 1 สัปดาห์ จึงใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 30 ก./ตร.ม. และปูนมาร์ล 0.4 กก./ตร.ม. คลุกเคล้าให้เข้ากัน วัดค่า pH ดินได้ 5.4 ปลูกเฮลิโคเนียเป็นแถวเดี่ยว โดยให้ระยะห่างระหว่างต้น 1 ม. ปลูก 1 ต้น/หลุม 1 พันธุ์/แปลง จะได้ 6 ต้น/แปลง/พันธุ์ พรางแสงโดยการทำโรงเรือนตาข่าย (saran) สีดำ ที่พรางแสง 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งวัดความเข้มแสงด้วยเครื่อง Hansatech Quantum Sensor QSRED (บริษัท SKYE INSTRUMENTS)

การดูแลรักษา

ให้น้ำทุกวันหลังย้ายปลูกเฮลิโคเนีย เป็นระยะเวลา 1 เดือน จากนั้นให้น้ำวันเว้นวันหรือขึ้นอยู่กับความชื้นในดิน มีการกำจัดวัชพืช ทุก ๆ 2 เดือน พร้อม ๆ กับการพรวนดิน และการใส่ปุ๋ย กำจัดวัชพืชโดยใช้วิธีการถอนด้วยมือในแปลงปลูก และใช้จอบคายหญ้าในร่องระหว่างทางเดิน จากนั้นทำการใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 30 ก./ตร.ม. ทุก ๆ 4 เดือน และ ปุ๋ยสูตร 46-0-0 อัตรา 25 ก./ตร.ม. 2 ครั้ง/ปี

การเก็บรวบรวมข้อมูล

ก. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเฮลิโคเนียทั้ง 6 พันธุ์ จะทำการศึกษาในช่วงอายุ 10, 20 และ 30 วัน โดยนับอายุตั้งแต่หน่อโผล่พ้นดินขึ้นมา ลักษณะที่ศึกษามีดังต่อไปนี้

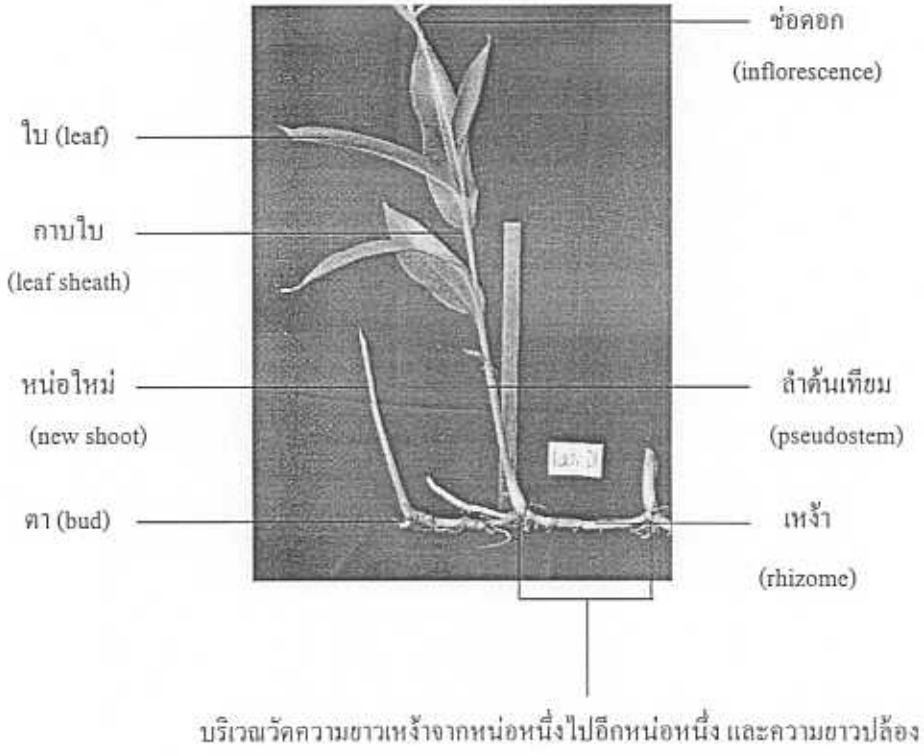
1. ความยาวเหง้า จากหน่อหนึ่งไปยังอีกหน่อหนึ่ง วัดจากบริเวณข้อแรกของหน่อเก่าไปยังข้อแรกของหน่อใหม่ โดยใช้เทปวัดขนาด 150 ซม. (ภาพที่ 1) ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 1 หน่อ

2. เส้นรอบวงเหง้า และเส้นผ่าศูนย์กลางหน่อ วัดบริเวณเหนือโคนหน่อขึ้นมา 0.5 ซม. ดังภาพที่ 2 ด้วยเวอร์เนียร์แคลิเปอร์ ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 1หน่อ

3. จำนวนปล้องต่อเหง้า โดยนับตั้งแต่ปล้องแรกของเหง้าเก่าไปจนถึงปล้องแรกของหน่อใหม่ ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 1 หน่อ

4. เปรียบเทียบสีหน่อ สีลำต้นเทียม และสีใบ โดยใช้กระดาษเทียบสี (R.H.S. Colour Chart in association with the Flower Council of Holland and the Royal Horticulture Society London) ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 1 หน่อ

5. ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะใบ ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 1 หน่อ



ภาพที่ 1 ส่วนประกอบของต้นเฮลิโคเนีย และบริเวณที่วัดความยาวเหง้า และความยาวปล้อง

ภาพที่ 2 ตำแหน่งการวัดเส้นรอบวง และเส้นผ่าศูนย์กลางหน่อ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเฮลิโคเนียในระยะออกดอก ลักษณะที่ศึกษามีดังนี้ คือ

1. ความสูงต้น (ซม.) วัดบริเวณโคนต้นเทียมสูงเหนือพื้นดิน 2 ซม. ซึ่งทำเครื่องหมายไว้จนถึงบริเวณโคนใบสุดท้าย ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้น

2. เส้นผ่าศูนย์กลางต้น และเส้นรอบวงต้น (ซม.) โดยทำการวัดบริเวณโคนต้นสูงเหนือพื้นดิน 2 ซม. ทำการวัด 2 ครั้ง ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้น

3. เปรียบเทียบสีลำต้น โดยใช้กระดาษเทียบสี (R.H.S. Colour Chart in association with the Flower Council of Holland and the Royal Horticulture Society London) ทำการวัด 2 ครั้ง ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้น

4. การจัดเรียงตัวใบ ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้น

5. ลักษณะแผ่นใบ ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้น

6. เปรียบเทียบสีใบ โดยใช้กระดาษเทียบสี (R.H.S. Colour Chart in association with the Flower Council of Holland and the Royal Horticulture Society London) ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้น

7. ขนาดใบ โดยวัดใบในตำแหน่งที่ 3 นับจากบนลงล่าง โดยใช้เทปวัดขนาด 150 ซม. วัดความกว้างใบบริเวณกลางตัวใบส่วนที่กว้างที่สุด วัดความยาวใบตั้งแต่ฐานใบจนถึงปลายสุดของใบ ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้น

8. อัตราส่วนใบ (ความกว้าง:ความยาวใบ)

9. พื้นที่ใบ (ตร.ซม.) วัดใบตำแหน่งที่ 3 นับจากบนลงล่างของต้น โดยใช้เครื่องวัดพื้นที่ใบ AAC-400 (บริษัท HAYASHI DENKOH, JAPAN) ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้น

10. จำนวนใบที่ให้ดอก ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้น

11. อายุออกดอก (วัน) นับตั้งแต่วันที่หน่อโผล่พ้นดินจนถึงวันที่ต้นแทงช่อดอกวันแรก ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้น

12. อายุการบานบนต้น (วัน) นับตั้งแต่วันที่ *H. psittacorum* L.f. cv. Lady Di, Sassy และ Andromeda มีกลีบประดับบาน 1 กลีบ *H. psittacorum* L.f. x *H. spathocircinata* Aristeguieta cv. Golden Torch และ *H. bihai* cv. Lobster Claw Two มีกลีบประดับบาน 2 กลีบ และ *H. rostrata* Ruiz & Pavon กลีบประดับบาน 3 กลีบ จนถึงวันที่กลีบประดับแรกมีสีเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้น

13. อายุตั้งแต่หน่อโผล่พ้นดินจนถึงดอกโรย (วัน) ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้น

14. ลักษณะก้านช่อดอก ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 4 ช่อดอก

15. ความยาวและเส้นผ่าศูนย์กลางก้านช่อดอก วัดเมื่อกลีบประดับบานตามระยะที่ต้องการของตลาด คือ *H. psittacorum* L.f. cv. Lady Di, Sassy และ Andromeda วัดเมื่อกลีบประดับบาน 1 กลีบ *H. psittacorum* L.f. x *H. spathocircinata* Aristeguieta cv. Golden Torch วัดเมื่อกลีบประดับบาน 2 กลีบ *H. bihai* cv. Lobster Claw Two และ *H. rostrata* Ruiz & Pavon วัดเมื่อกลีบประดับบาน 5 กลีบ ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 4 ช่อดอก

16.ขนาดกลีบประดับ (ซม.) วัดความกว้างกลีบประดับบริเวณฐานกลีบประดับ และวัดความยาวกลีบประดับตั้งแต่ฐานกลีบประดับจนถึงปลายสุดของกลีบประดับ

17. เปรียบเทียบสีดอกจริงและสีของกลีบประดับ โดยใช้กระดาษเทียบสี (R.H.S. Colour Chart in association with the Flower Council of Holland and the Royal Horticulture Society London) ทำการวัด 2 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้น

18. จำนวนกลีบประดับ/ช่อดอก ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้น

19. ผลผลิตหน่อ/ตร.ม./ปี โดยเริ่มนับหน่อ ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2538 ถึง กันยายน 2539

20. ผลผลิตดอก/ตร.ม./ปี โดยเริ่มนับดอก ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2538 ถึง กันยายน 2539

21. บันทึกอุณหภูมิภายในและภายนอกโรงเรือน โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ ตลอดงานทดลอง

22. วัดเปอร์เซ็นต์ความชื้นสัมพัทธ์โดยเครื่อง hygrometer (ไม่ระบุชื่อบริษัทผู้ผลิต) ตลอดงานทดลอง

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ให้พันธุ์เป็นทรีทเม้นต์ (treatment) แต่ละทรีทเม้นต์มี 3 ซ้ำ (ปลูก 1 แปลงเท่ากับ 1 ซ้ำ)

ข. ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา

1. ลักษณะการแตกกอของเฮลิโคเนียแต่ละพันธุ์

2. อัตราการเจริญเติบโต โดยทำการศึกษา

ความสูงต้น (ซม.) โดยบันทึกความสูงลำต้นเทียม วัดบริเวณโคนต้นเทียมสูงเหนือพื้นดิน 2 ซม. ซึ่งทำเครื่องหมายไว้จนถึงบริเวณโคนใบสุดท้ายที่เจริญ วัดทุก ๆ 1 สัปดาห์ ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้น

เส้นรอบวง (ซม.) โดยบันทึกเส้นรอบวงต้นบริเวณโคนต้นที่ทำเครื่องหมาย วัดด้วยเทปวัดขนาด 150 ซม. วัดทุก ๆ 1 สัปดาห์ ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้น

นำค่าความสูง และเส้นรอบวงต้น ที่วัดทุก ๆ 1 สัปดาห์ หาค่าอัตราการเจริญเติบโต (K) (Noggle and Fritz, 1976; Combs and Hall, 1982) ดังนี้

$$K = \frac{\ln H_2 - \ln H_1}{t_2 - t_1}$$

ln = natural logarithm

H_1 = ความสูงต้น หรือเส้นรอบวงต้น ในขณะวัดครั้งแรก (t_1)

H_2 = ความสูงต้น หรือเส้นรอบวงต้น ในขณะวัดครั้งหลัง (t_2)

ค. ศึกษาอายุปักแจกัน

โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทรีทเม้นต์ คือ เฮลิโคเนีย 6 พันธุ์ ปักแจกัน ณ ห้องปกติที่เปิดหน้าต่างระบายอากาศ ทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 1 ช่อดอกต่อแจกัน

1. ตัดดอกเฮลิโคเนีย เวลา 16:00 น. โดยตัดชิดโคน ตัดดอกบานตามลักษณะการใช้งาน ดังนี้

H. psittacorum L.f. x *H. spathocircinata* Aristeguieta cv. Golden Torch กลีบประดับบาน 3 กลีบ

H. psittacorum L.f. cv. Lady Di และ Andromeda กลีบประดับบาน 1 กลีบ

H. psittacorum L.f. cv. Sassy กลีบประดับบาน 2 กลีบ

H. bihai cv. Lobster Claw Two กลีบประดับบาน 5 กลีบ

H. rostrata Ruiz & Pavon กลีบประดับบาน 5 กลีบ

2. นำช่อดอกที่ตัดแล้วมาจุ่มน้ำที่ได้จากน้ำดิบธรรมชาติระบบชลประทานของมหาวิทยาลัยขอนแก่น หมวดไม้ดอกไม้ประดับ เพื่อให้ช่อดอกดูดน้ำ นาน 1 ชม. ตัดแต่งใบเหลือ 1 ใบบนสุด

3. นำดอกไม้ปักแจกันซึ่งเป็นขวดน้ำพลาสติก ปากขวดเป็นรูปสี่เหลี่ยม กว้าง 8 ซม. ยาว 8 ซม. ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 750 มล. pH 6.4 จำนวน 1 ดอก/ขวดพลาสติก

4. บันทึกข้อมูล โดยเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงสีกลีบประดับแรก โดยใช้กระดาษสีเทียบ (R.H.S. Colour Chart in association with the Flower Council of Holland and the Royal Horticulture Society London) และให้คะแนนความเหี่ยวของกลีบประดับแรก 1-5 (5 = ดีที่สุด

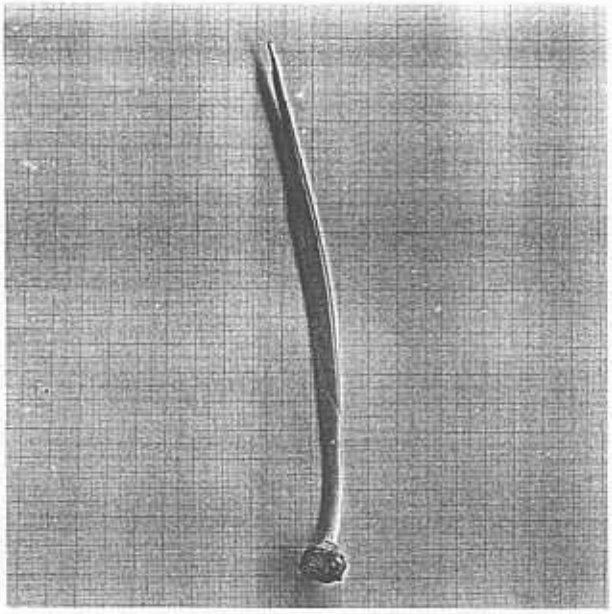
สีกลีบประดับไม่เปลี่ยน; 4 = ดี สีเปลี่ยนเล็กน้อย; 3 = สีเปลี่ยนระดับปานกลาง ; 2 = มีสีน้ำตาลมากขึ้น; 1 = สีเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทั้งหมด) บันทึกผลทุก 3 วัน

5. บันทึกอุณหภูมิและความชื้นห้องโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์และเครื่อง hygrometer (ไม่ระบุชื่อบริษัทผู้ผลิต) ตลอดงานทดลอง

การศึกษาที่ 2 การเตรียมโปรตีนและวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนของเฮลิโคเนีย

เตรียมโปรตีน ตามวิธีของ Steward (1994)

นำหน่อเฮลิโคเนีย อายุ 10, 20, และ 30 วัน มาทำความสะอาดโดยการล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งไว้ในห้อง 1 ชม. ลอกกาบใบออกให้เหลือเฉพาะส่วนยอด (shoot) ตัดส่วนที่พ้นจากหน่อขึ้นมาประมาณ 1 ซม. (ภาพที่ 3) นำมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1 มม. จำนวน 0.5 ก. เทลงในโกร่งที่แช่เย็นและเติมไนโตรเจนเหลวแล้วบดชิ้นส่วนพืชให้ละเอียด นำตัวอย่างที่บดได้ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มล. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีส่วนผสมของ phosphate buffer 0.1 M ที่เติม sucrose 0.025 M และ polyvinyl polypyrrolidone (PVP) 1 % pH 7.2 (ภาคผนวก) 500 µl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer รุ่น K-550-GE ที่ความเร็วสูงสุด นาน 5 วินาที 3 ครั้ง แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที (rpm) เป็นเวลานาน 20 นาที ด้วยเครื่อง microcentrifuge รุ่น centrifuge 5417C (บริษัท Eppendrof Germany) เพื่อให้เศษเซลตกตะกอน ทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค dialysis โดยใช้ dialysis tubing ที่เป็น cellulose membrane (บริษัทSIGMA) สำหรับกั้นโปรตีนโมเลกุลขนาด 12,000 Da (12 kDa) หรือ มากกว่าไม่ให้เคลื่อนที่ออกไป membrane มีขนาดกว้าง 33 มม. (1.3 นิ้ว) และเส้นผ่าศูนย์กลาง 21 มม. (0.8 นิ้ว) โดยดูดสารละลายส่วนบนจากการปั่นใส่ในถุง dialysis ที่มัดปลายข้างหนึ่งทำเป็นก้นถุง เมื่อใส่สารละลายจนหมดมัดปลายอีกด้านให้แน่น ทำ dialysis นานข้ามคืนในสารละลาย 0.05 M Tris-glycine pH 8.3 (ภาคผนวก) 1 ล. ที่อุณหภูมิห้อง (25-30^{o}ซ) จากนั้นนำสารละลายในถุง cellulose membrane (dialysate) ไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เพื่อทำให้เศษพืชที่เหลือตกตะกอนอีกครั้ง แล้วดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอด microcentifuge ขนาด 1.5 มล. เติมซูโครสลงในสารละลายให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 M เก็บสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิ –20^{o}ซ



ภาพที่ 3 ส่วนของยอดที่พ้นขึ้นมาจากหน่อเฮลิโคเนีย 1 ซม. ที่นำมาสกัดโปรตีน

การวิเคราะห์แบบแผนของโปรตีนที่สกัดจากพืช โดยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

1. เตรียมเจล SDS-PAGE โดยใช้ชุด electrophoresis แบบแยกสารแนวดิ่ง (vertical apparatus) รุ่น Mini-Protein II Cell (บริษัท BIO RAD, USA) และใช้ Discontinuous Buffers ที่ประยุกต์จากคู่มือปฏิบัติการของบริษัท LKB Produckter AB (Sweden) โดยเตรียมสารละลายสำหรับเจลชั้นแยกสาร (separating gel หรือ resolving gel) ที่มีความเข้มข้นของ polyacrylamide 13% โดยผสมสารละลายตามตารางภาคผนวกที่ 2 เข้าด้วยกันตามลำดับ (ยกเว้น ammonium persulphate) จากนั้นดูดอากาศออก 5 นาที แล้วจึงเติม ammonium persulphate 0.03% ลงไป ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยเขย่าเบา ๆ นำสารละลายที่ได้ค่อย ๆเทใส่ลงระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ทันที 2 ใน 3 ของปริมาตรกระจก โดยไม่ให้เกิดฟองอากาศ ปรับระดับผิวหน้าเจลให้เรียบด้วยน้ำกลั่น รอให้เจลแข็งตัว (polymerized) นานประมาณ 45-60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (25°ซ) จากนั้นเทน้ำกลั่นออก และซับน้ำกลั่นที่เหลือด้วยกระดาษกรองแล้วเตรียมสารละลายสำหรับเจลชั้นเตรียมตัวอย่าง (stacking gel) ที่มีความเข้มข้นของ polyacrylamide 4% โดยผสมสารละลายตามตารางผนวกที่ 1 เข้าด้วยกันตามลำดับ (ยกเว้น ammonium persulphate) จากนั้นดูดอากาศออก 5 นาที แล้วเติม ammonium persulphate 0.05% ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยเขย่าเบา ๆ นำสารละลายที่ได้เทใส่ระหว่างแผ่นกระจกอันเดิมที่เทเจลชั้นแยกสารไว้แล้วจนเต็มแผ่นกระจกพร้อมทั้งเสียบหวี (comb) ลงไประหว่างกระจก 2 แผ่น โดยไม่ให้เกิดฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว นานประมาณ 30-45

นาที และนำหวีออก ล้างหลุมบนแผ่นเจลด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-glycine electrode buffer pH 8.3 (ภาคผนวก) 2 ครั้ง

2. เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยนำสารละลายโปรตีนตัวอย่างที่สกัดได้ปริมาณ 10 µl ผสมกับ 1X stock sample buffer (ภาคผนวก) ที่มี bromophenol blue เป็นตัวติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีน (tracking dye) ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml เตรียมโปรตีนมาตรฐานชนิด Broad Range (บริษัท BIO RAD, USA) ซึ่งใช้เปรียบเทียบขนาดของโปรตีน โดยใช้โปรตีนมาตรฐาน 36 µg ผสมกับ 1Xstock sample buffer นำสารละลายโปรตีนตัวอย่าง และสารละลายโปรตีนมาตรฐานต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที

3. การแยกโปรตีน โดยเติมสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-glycine pH 8.3 (ภาคผนวก) ซึ่งเป็น electrode buffer ให้ท่วมปากหลุมเจลแล้วปล่อยกระไฟฟ้าที่ตั้งค่ากระแสไฟฟ้าคงที่ 10 mA ต่อเจล 1 แผ่น นาน 15 นาที เพื่อทำความสะอาดหลุมเจล หยุดปล่อยกระแสไฟฟ้า แล้วจึงนำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้ในข้อ 2 หยอดลงในหลุมบนแผ่นเจล 3-10 µl หยอดโปรตีนมาตรฐานที่เตรียมจากข้อ 2 จำนวน 3 µg ไว้ที่หลุมแรกของแผ่นเจล เพื่อเปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ ปล่อยกระแสไฟฟ้าหมุนเวียนในทิศทางจากขั้วลบไปยังขั้วบวก โดยใช้เครื่อง power supply รุ่น POWER PAC 300 (บริษัท BIO RAD, USA) ตั้งค่ากระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 12 mA ต่อเจล 1 แผ่นในชั้นของ stacking gel เมื่อแถบสี bromophenol blue เคลื่อนที่เข้าสู่ชั้น resolving gel เปลี่ยนกระแสไฟฟ้าเป็น 15 mA ต่อเจล 1 แผ่น จนกระทั่งเห็นแถบสี bromophenol blue เคลื่อนที่จนถึงระยะห่างปลายล่างของกระจกประมาณ 1 ซม. ใช้เวลาประมาณ 80-85 นาที จึงหยุดปล่อยกระแสไฟฟ้า

4. นำเจลที่ได้ย้อมด้วยสารละลาย Silver Stain Plus ตามขั้นตอนโดยใช้สารละลายและวิธีการย้อมตามวิธีการแนะนำด้วยบริษัท BIO RAD (USA) ดังนี้

แช่แผ่นเจลใน fixative enhancer solution (ภาคผนวก) นาน 20 นาที โดยเตรียมสารละลายใหม่ทุกครั้งที่ใช้ เขย่าเบา ๆ ล้างแผ่นเจลในน้ำกลั่น 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที โดยการเขย่าเบา ๆ จากนั้นย้อมแผ่นเจลและทำให้แผ่นเจลปรากฏแถบโปรตีน (developing) ใน staining and developing solution (ภาคผนวก) ซึ่งต้องเตรียมสารละลายนี้ก่อนใช้ไม่เกิน 5 นาที เขย่าเบา ๆ นานประมาณ 5-7 นาที หรือจนเกิดแถบโปรตีนชัดเจนที่สุด ถ้าใช้เวลานานเกินไปซิลเวอร์จะตกตะกอน หยุดปฏิกิริยาโดยการนำเจลแช่ในสารละลาย acetic acid 5% เขย่าเบา ๆ นาน 20 นาที แล้วย้ายแผ่นเจลไปแช่ในน้ำกลั่น และทำแผ่นเจลอัดแห้ง

5. นำเจลที่ได้ย้อมด้วย Coomassie Brillant Blue R-250 และ ล้างแผ่นเจล (destain) (ประชุมพร, 2538) ดังนี้

แช่แผ่นเจลในสารละลายสีย้อม Coomassie Brillant Blue R-250 (ภาคผนวก) โดยการเขย่านานข้ามคืน (ประมาณ 15 ชม.) ที่อุณหภูมิห้อง (25-30°ซ) หลังจากนั้นล้างแผ่นเจลในสารละลายที่ประกอบด้วย acetic acid 3% และ ethanol 38% เขย่านาน 20 นาที ตามด้วยการล้างแผ่นเจลในสารละลายที่ประกอบด้วย acetic acid 3.6% และ ethanol 28.5% เขย่านาน 20 นาที 2 ครั้ง และล้างแผ่นเจลขั้นสุดท้ายในสารละลายที่ประกอบด้วย acetic acid 4% และ ethanol 19% เขย่านาน 10 นาที (ขึ้นกับพื้นหลังเจล) แล้วย้ายแผ่นเจลไปแช่ในสารละลายที่มี acetic acid 5% และทำแผ่นเจลอัดแห้ง

6. ทำแผ่นเจลอัดแห้ง โดยเทคนิคของ วัลลา (2539) นำกระดาษแก้วสีขาวใส 2 แผ่นที่มีขนาดใหญ่กว่าแผ่นเจลจุ่มในน้ำกลั่นจนนิ่ม นำกระดาษแก้วแผ่นที่ 1 แผ่กางออกบนวัสดุที่มีพื้นเรียบ วางแผ่นเจลที่แช่อยู่ใน glycerol 3% นาน 1-2 นาที บนกระดาษแก้ว โดยไม่ให้เกิดฟองอากาศ ใช้กระดาษแก้วที่เหลืออีกแผ่นหนึ่งวางทับลงบนแผ่นเจล ให้แผ่นเจลถูกหุ้มอยู่ระหว่างกระดาษแก้ว 2 แผ่น ไล่ฟองอากาศที่อยู่ภายในออกให้หมด นำแผ่นเจลที่ได้มาซึงให้เรียบด้วยสะดึงปักผ้า ทำให้แผ่นเจลแห้งโดยวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-30°ซ) เป็นเวลาข้ามคืน หรือจนแผ่นกระดาษแก้วแห้ง นำแผ่นเจลที่แห้งแล้วมาตัดแต่งกระดาษแก้วส่วนที่เกินออก ให้มีขนาดตามต้องการ และนำไปวิเคราะห์ผลการทดลอง

7. หาน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนบน SDS-PAGE โดยหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility) หรือ *Rf* ซึ่งเป็นค่าการเคลื่อนที่ของโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของ tracking dye (Hames and Rickwood,1990)

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของ dye}}$$

หลังจากแยกโปรตีนโดยเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซิส ก่อนย้อมแถบโปรตีน วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของ tracking dye จากบริเวณเริ่มต้นของชั้น resolving gel หลังจากย้อมแถบโปรตีน วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน และโปรตีนตัวอย่าง โดยใช้จุดกึ่งกลางของแต่ละแถบโปรตีนที่ปรากฏให้เห็น นำระยะการเคลื่อนที่มาคำนวณหาค่า *Rf* แล้วนำค่า *Rf* และ ค่า log มวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด (ตารางผนวกที่ 3) นำมาเขียนกราฟมาตรฐาน ให้ค่า *Rf* เป็นแกน X ค่า log มวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานเป็นแกน Y นำกราฟมาตรฐานที่ได้มาหาตำแหน่งที่ตรงกับค่า *Rf* ของโปรตีนตัวอย่างที่ไม่ทราบค่ามวลโมเลกุล ทำให้ทราบค่ามวลโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่าง (อาภัสรา, 2537; Hames and Rickwood, 1990; Dunn, 1993)

ส
SB
A139

หอสมุดกลาง
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา โดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (anaylsis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ Statical Analysis System (SAS) (1985) และหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา และแบบแผนโปรตีน

สถานที่ทำการทดลอง

1. แปลงทดลอง หมวดไม้ดอกไม้ประดับ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2. ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
3. ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ และ ห้องปฏิบัติการเมล็ดพันธุ์ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ระยะเวลาในการทดลอง

1. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2538 ถึง เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2540 รวมระยะเวลา 1 ปี 10 เดือน
2. ศึกษาอัตราการเจริญเติบโต ตั้งแต่ เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2539 ถึง เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2540 รวมระยะเวลา 1 ปี
3. ศึกษาอายุปักแจกัน ตั้งแต่วันที่ 26 พฤษภาคม พ.ศ. 2540 ถึง 14 มิถุนายน พ.ศ. 2540 รวมระยะเวลา 20 วัน
4. ศึกษาแบบแผนโปรตีน ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2540 ถึง เดือนกันยายน พ.ศ. 2540 รวมระยะเวลา 9 เดือน