

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 พืชที่ใช้ในการวิจัย

หนอนตายหยาก (*Stemona* sp.) วงศ์ Stemonaceae

ส่วนที่ใช้ ราก ใบ ดอก ผล เมล็ด

3.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในแปลงทดลอง

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในแปลงทดลอง

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำแปลงทดลอง ได้แก่ ไม้ไผ่ ลวด ตะปู จอบ ค้อน
2. ดิน
3. สายยางสำหรับรดน้ำ
4. ตาข่าย
5. ตาข่ายกันแดด
6. ตลับเมตร

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในแปลงทดลอง

1. ปุ๋ยคอก
2. ปุ๋ยสูตร 16-16-16
3. ปูนขาว
4. สารกำจัดศัตรูพืช

3.3 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

3.3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

1. Rotary evaporator รุ่น R-124 ของ BUCHI Switzerland พร้อม water bath รุ่น B-480
2. Ultrasonic bath รุ่น super RX 510 H ของ Bandelin Electronic Germany
3. TLC plates ขนาด 20x20 ซม. เคลือบด้วย silica gel 60 G หนา 1 มม.
4. เครื่อง coat plate

5. TLC tank ขนาด 10x23x23 ซม.
6. Iodine tank ขนาด 10x30x28 ซม.
7. Capillary tube ขนาด 100 pcs
8. กระดาษกรอง whatman เบอร์ 30
9. กล้องจุลทรรศน์
10. slide , cover glass
11. ใบมีด
12. เข็มเย็บ
13. ตะเกียงแอลกอฮอล์
14. ตู้อบ
15. เครื่องแก้วต่างๆ เช่น beaker , pitri dish , flask , slender , dropper
16. กล้องถ่ายรูป ฟลิ้ม
17. กระดาษ label
18. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น mettler AJ50
17. อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ถุงมือ กระดาษทิชชู ปากคีบ ดินสอ ไม้บรรทัด กรวยกรอง

3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

1. Acetic orcein
2. Acetone
3. Chloroform
4. Dichloromethane
5. Ethyl acetate
6. Ethanol 95 % , 70 %
7. Glacial acetic acid
8. Hydrochloric acid
9. 8-Hydroxyquinoline 0.002 M
10. เก็ด Iodine
11. Silica gel 60 G ของ MERK ประเทศ Germany
12. Sodium sulfate anhydrous
13. Toluene
14. น้ำกลั่น

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองตอนที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โดยการรวบรวมพันธุ์ต้นหนอนตายหายาก ซึ่งรวบรวมได้ 6 พันธุ์ เป็นพันธุ์จากภาคเหนือ 3 พันธุ์ จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2 พันธุ์ และจากภาคใต้ 1 พันธุ์ นำพันธุ์ต่างๆที่ได้มาปลูกเพื่อจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยดูจากลักษณะและขนาดของ ลำต้น ราก ใบ ดอก ผล และเมล็ด ดังนี้

1. สังเกตลักษณะของลำต้น และวัดความสูงของลำต้น
2. สังเกตลักษณะของใบ และวัดขนาดความกว้าง ความยาวของใบ
3. สังเกตลักษณะสีของกลีบดอก และวัดขนาดของกลีบดอก
4. วัดขนาดของเกสรตัวผู้ อับเรณู และรังไข่
5. วัดขนาดของผลและเมล็ด

เก็บตัวอย่างต้นหนอนตายหายากที่สมบูรณ์ทุกพันธุ์มาจัดทำตัวอย่างแห้ง(herbarium specimen)เพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิดของต้นหนอนตายหายาก พร้อมทั้งจัดทำเอกสารรูปวิธาน (key)

การทดลองตอนที่ 2 การเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์

2.1 การเจริญเติบโตจากการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual propagation)

การเตรียมพืช

เก็บรวบรวมพันธุ์ต้นหนอนตายหายากแต่ละชนิดดังนี้คือ *Stemona curtisii* Hk.f. และ *Stemona kerrii* Craib เก็บได้ในช่วงเดือนธันวาคม 2542 *Stemona curtisii* Hk.f., *Stemona burkillii* Prain และ *Stemona tuberosa* Lour. var. *tuberosa* เก็บได้ในช่วงเดือนมกราคม 2543 *Stemona* sp.# 4 และ *Stemona* sp.# 5 เก็บได้ในช่วงเดือนเมษายน 2543 และนำมาทำการปลูกโดย

1. นำรากแต่ละพันธุ์มาตัดแบ่งตามจำนวนตาที่ติดมากับราก นับจำนวนรากและชั่งน้ำหนัก แต่ละรากที่ตัดแบ่งก่อนปลูก แล้วจุ่มขี้เถ้าขี้มูล
2. นำรากที่ตัดแบ่งลงปลูกในแปลงทดลอง สังเกตการเจริญเติบโตทุกเดือนจนถึงระยะต้น ขุดตัวลงโดยที่

2.1 เปรียบเทียบระหว่าง *Stemona curtisii* Hk.f. และ *Stemona kerrii* Craib จำนวน 3 ซ้ำ เป็น *Stemona curtisii* Hk.f. 9 ต้น และ *Stemona kerrii* Craib 16 ต้น

2.2 เปรียบเทียบระหว่าง *Stemona curtisii* Hk.f., *Stemona burkillii* Prain และ *Stemona tuberosa* Lour. var. *tuberosa* จำนวน 3 ซ้ำ เป็น *Stemona curtisii* Hk.f., 40 ต้น *Stemona burkillii* Prain 66 ต้น และ *Stemona tuberosa* Lour. var. *tuberosa* 8 ต้น

2.3 เปรียบเทียบระหว่าง *Stemona* sp.# 4 และ *Stemona* sp.# 5 จำนวน 3 ซ้ำ เป็น *Stemona* sp.# 4 (พันธุ์ที่ 4) 261 ต้นและ *Stemona* sp.# 5 (พันธุ์ที่ 5) 21 ต้น

ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design : RCB) ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Statistic Packages for the Social Science (SPSS) โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance :ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Least Significant Difference (LSD)

การเก็บข้อมูล

1. วัดความสูงของต้นและนับจำนวนใบทุกเดือน จนถึงระยะต้นช่อดอก
2. วัดความกว้าง ความยาวของใบ โดยวัดจากใบที่ 3 ของแต่ละต้น
3. สังเกตระยะเวลาที่มีการติดดอก อายุของดอก ระยะเวลาในการติดผล
4. เมื่อต้นหนอนตายหยากที่ปลูกเริ่มช่อดอก ให้ชั่งน้ำหนักช่อดอกขึ้นมานับจำนวนรากและชั่งน้ำหนักรากที่ได้ต่อต้นหลังการปลูก บันทึกข้อมูล

2.2 การเจริญเติบโตจากการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Sexual propagation)

การเตรียมเมล็ดพันธุ์

1. ทำการรวบรวมเมล็ดได้พันธุ์ *Stemona curtisii* Hk.f., *Stemona kerrii* Craib *Stemona burkillii* Prain *Stemona* sp.# 4, และ *Stemona tuberosa* Lour. var. *tuberosa*
2. นำเมล็ดพันธุ์ที่ได้แช่น้ำ 1 คืน นำลงปลูกในกระบะเพาะเมล็ด

การเก็บข้อมูล

1. วัดเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดโดยเทียบต่อร้อยละของจำนวนเมล็ดที่เพาะ
2. หาระยะเวลาที่ใช้ในการงอกของเมล็ด โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{จำนวนวันโดยเฉลี่ย} = \frac{N_1T_1 + N_2T_2 + \dots + N_xT_x}{\text{จำนวนต้นทั้งหมดที่งอก}}$$

N คือ จำนวนเมล็ดที่งอกในแต่ละวัน

N_1 คือ จำนวนเมล็ดที่งอกครั้งแรก

N_x คือ จำนวนเมล็ดที่งอกสุดท้าย

T คือ เวลาจากเริ่มทดลองจนถึงแต่ละวันที่นับเมล็ดงอก

3. หาสัมประสิทธิ์ความเร็วในการงอก โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{สัมประสิทธิ์ความเร็วในการงอก} = \frac{\text{จำนวนต้นทั้งหมดที่งอก}}{N_1T_1 + N_2T_2 + \dots N_xT_x} \times 100$$

4. วัดความสูงของต้นและนับจำนวนใบทุกเดือน

5. วัดขนาดความกว้าง ความยาวของใบ โดยวัดจากใบแรกหลังจากใบมีอายุได้ประมาณ 1 สัปดาห์

6. บุคต้นขึ้นมานับจำนวนรากและชั่งน้ำหนัก

การทดลองตอนที่ 3 การศึกษาจำนวนโครโมโซมของต้นหนอนตายหยาก (Darlington and La Cour, 1970 ; Sheppard 1973 ; อัมพิกา ปูนนิจ, 2526)

1. การเตรียมเนื้อเยื่อ

1.1 นำปลายรากของต้นหนอนตายหยากล้างทำความสะอาด ทำ pretreatment โดยแช่ในสารละลาย 8-hydroxyquinoline 0.002 M เก็บไว้ในตู้เย็นประมาณ 4-6 ชั่วโมง

1.2 นำเนื้อเยื่อไปดองสภาพ (fix) ในสารละลาย Carnoy's solution ซึ่งประกอบด้วย ethanol 95 % : glacial acetic acid : chloroform ในอัตราส่วน 1:2:1 เก็บไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง

1.3 นำเนื้อเยื่อไปเก็บไว้ใน ethanol 70 % แล้วแช่ในตู้เย็น(สามารถเก็บเนื้อเยื่อไว้ได้นานขึ้น)

2. การเตรียมสีย้อม Acetic-orcein 2 %

เทผงสี orcein 2 กรัม ลงใน glacial acetic acid 45 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 55 มิลลิลิตร ตั้งไฟอ่อน คนให้ละลาย ทิ้งไว้ให้เย็น กรองใส่ขวดไว้ใช้

3. การย้อมสีเนื้อเยื่อ

3.1 หยด 1 N HCl ลงบนสไลด์ที่สะอาด

3.2 หยิบเนื้อเยื่อที่เก็บไว้ใน ethanol 70 % วางลงใน 1N HCl ผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที กระบวนการนี้จะช่วยละลายสารเพคติน ทำให้เนื้อเยื่อกระจายจากกันได้ง่ายเมื่อ squash

3.3 ล้าง HCl ด้วยน้ำกลั่น ซับด้วยกระดาษ tissue หยดสี acetic-orcein ลงบนเนื้อเยื่อ ใช้เข็มเขี่ยให้เนื้อเยื่อแตกกระจาย ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที

3.4 วางกระจกปิดสไลด์ลงบนเนื้อเยื่อ กดเบาๆ แล้วนำมาศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์

3.5 นำสไลด์ที่ได้ไปถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การทดลองตอนที่ 4 การเตรียมสารสกัดและแยกองค์ประกอบของสารจากต้นหนอนตายหายาก โดยวิธี โครมาโตกราฟีผิวบาง (TLC)

1. การเตรียมสารสกัดจากต้นหนอนตายหายาก

1.1 นำรากของต้นหนอนตายหายากจำนวน 6 ชนิด มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ แล้วผึ่งทิ้งไว้ให้แห้ง

1.2 นำรากมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50-55° c จนแห้งสนิท

1.3 นำรากต้นหนอนตายหายากทั้ง 6 ชนิดมาชั่งน้ำหนักให้ได้ 10 กรัม ใส่ใน บีกเกอร์ขนาด 250 ml แบ่งออกเป็น 2 ชุด

ชุดที่ 1 เติม dichloromethane 100 ml นำไปเขย่าด้วย ultrasonic bath ที่อุณหภูมิ 40°c เป็นเวลา 30 นาที

ชุดที่ 2 เติม ethanol 95% 100 ml นำไปเขย่าด้วย ultrasonic bath ที่อุณหภูมิ 65°c เป็นเวลา 30 นาที

1.4 นำสารสกัดที่ได้กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำไปกลั่นด้วย rotary evaporator จนสารสกัดที่ได้เกือบแห้งสนิท เทลงขวดขนาดเล็ก ตั้งทิ้งไว้ให้ dichloromethane และ ethanol 95% ระเหยที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารสกัดที่มีลักษณะขุ่นหนืด

2. การเตรียม TLC plate โดยใช้ silica gel เป็น stationary phase

2.1 นำกระจกขนาด 20x20 cm วางบนที่รองเพลท

2.2 ใช้กระดาษทิชชูรูป acetone เช็ดทำความสะอาดกระจก

2.3 ชั่ง silica gel ใส่ลงในขวดรูปชมพู่(flask) ขนาด 500 ml ในอัตราส่วน silica gel ต่อ น้ำกลั่น 1 : 2 w/v ปิดด้วยจุกยาง เขย่าให้เข้ากันจนกระทั่งได้สารแขวนลอย(suspension) ที่เหมาะสม

2.4 นำบล็อควางบนกระจก ให้ silica gel มีความหนา 1.0 มม. เท silica gel ลงบนบล็อก แล้วลากบล็อกไปจนสุดกระจกในลักษณะที่ทำให้ชั้นฟิล์มแห้งสนิท เติมน้ำลงบนกระจกอย่างสม่ำเสมอ

2.5 รอให้ silica gel ที่เคลือบอยู่บนกระจกแห้งพอสมควร

2.6 นำกระจกที่เคลือบแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 80° 100° 120° อย่างละ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ

3. การหยดสารที่เตรียมได้จากข้อ 1 บน thin layer chromatography

3.1 นำ TLC plate มาวัดขนาดให้ด้านบนและด้านล่างห่างจากขอบด้านละ 2 ซม.

3.2 นำหลอด capillary ขนาด 100 pcs ดูดสารที่เตรียมได้จากข้อ 1 แต่ละตัวอย่างลงในขวดขนาดเล็ก

3.3 เติม dichloromethane และ ethanol 95% เล็กน้อยพอให้สารสกัดละลาย

3.4 นำไปหยดลงแผ่น TLC ที่เตรียมไว้ ป้อยทิ้ง ไว้ให้แห้ง

3.5 หยดซ้ำอีก 3-5 ครั้ง

4. การเตรียมตัวทำละลายเคลื่อนที่ (developing solvent)

ใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ของสารละลาย 2 ชนิดผสมกัน เพื่อใช้เป็น mobile phase คือ toluene และ ethyl acetate โดยที่

ชุดที่ 1 ใช้ toluene : ethyl acetate ในอัตราส่วน 80:20 v/v

ชุดที่ 2 ใช้ toluene : ethyl acetate ในอัตราส่วน 20:80 v/v

5. การเตรียมแท่ง(tank) สำหรับการทำ thin layer chromatography

นำตัวทำละลายที่เตรียมไว้ในข้อ 4 ใส่ลงในแท่งขนาด 10x23x23 ซม. เขย่าให้เข้ากันแล้ว ใส่กระดาษกรองเบอร์ 30 ไว้ในแท่งข้างละ 1 แผ่น โดยให้กระดาษกรองจุ่มอยู่ในสารละลายเพื่อให้ไอของสารละลายเคลื่อนที่ในแท่งมีความอึดตัว ปิดฝาให้สนิท ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง

6. นำ plate ที่หยดสารแล้วในข้อ 3 ใส่ลงใน developing solvent ที่เตรียมไว้ในข้อ 5 โดยใส่แผ่น TLC ลงในแนวตั้ง ปิดฝาแท่งให้สนิททิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงระดับ solvent front (ระยะห่างจากจุดเริ่มต้นขึ้นมาด้านบน 16 ซม.) นำ plate ออกจากแท่ง ตั้งทิ้งไว้จนแห้งสนิท

7. นำ plate ที่แห้งสนิทแล้วใส่ในแท่งไอโอดีน ขนาด 10x30x28 ซม. ที่มีเกล็ดไอโอดีนใส่อยู่ ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเห็นแถบสีที่เกิดขึ้น

8. นำ plate ออกจากแท่งไอโอดีน วงแถบสีที่เกิดขึ้นด้วยดินสอ แล้วคำนวณหาค่า R_f value จาก

$$R_f \text{ value} = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

เปรียบเทียบแถบสีที่เกิดขึ้นในแต่ละตัวอย่าง