ฝ QK
725
ง583ก
2549

สำนักหอสมุด

9 ก.พ. 2550

5040398

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1 ศึกษาด้านสัณฐานวิทยา

รวบรวมกระชายดำเหง้าสดจากแหล่งการค้าและแหล่งเพาะปลูกที่เป็นที่นิยมของเกษตรกรใน จังหวัด พิษณุโลก เพชรบูรณ์และเลย ในเดือน มกราคม พ.ศ. 2547 นำตัวอย่างพืชกระชายดำมาศึกษาในแต่ละส่วนตามระยะการเจริญเติบโต เพื่อสังเกต ระดับสีเนื้อเยื่อในเหง้า โดยการผ่าเหง้า เพื่อวัดระดับสีในแต่ละตัวอย่างเทียบกับสีมาตรฐาน (Hard A., 1975) และนำส่วนหนึ่งของตัวอย่างนี้ไปปลูก เพื่อสังเกตสีใบอ่อน สีใบแก่ สีดอก สีกาบใบ เทียบกับสีมาตรฐาน และวัดความยาวใบ ก้านช่อดอกแต่ละตัวอย่าง

การทดลองที่ 2 ศึกษาองค์ประกอบเคมี

นำตัวอย่างที่ได้จากการทดลองที่ 1ปริมาณ 200 กรัม มาสกัดด้วย ethanol 95% จำนวน 600 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอน 3000 รอบต่อนาที แล้วนำส่วนใส่กรองด้วยกระดาษกรอง (Fumiyuki, 1987) นำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์ต่อโดย

2.1 **วัดการดูดกลืนแสงของสารสกัดกระชายดำ**

วางแผนแต่ละการทดลอง 12 ตัวอย่าง ให้มีตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เตียมตัวอย่างโดยนำเหง้ากระชายดำสด 200 กรัม บดละเอียด ในเอทานอล 95 % 300 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ ห้อง 2 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอน ที่ 3000 rps แยกส่วนใส ปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 50 ml มาตรวจวัดค่าการดูดกลื่นแสงด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer, SHIMADSU รุ่น UV mini 1240.

2.2 **ศึกษาการแยกองค์ประกอบสารฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค HPLC**

วางแผนแต่ละการทดลอง 12 ตัวอย่าง ให้มีตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

นำตัวอย่างจากข้อ 2.1 วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ตามวิธีการ (สุรพจน์ วงศ์ใหญ่, 2548) ที่สภาวะ Column: C18,Flow rate:1 ml/min, Detecter: DAD@264 nm, mobile phase:A 2%v/v Acetic acid in water;B Acetronitrile, Gradient conduction: 0-20 min A:B 0-60% 20.01-30min A:B 60-80% ด้วยเครื่อง HLPC ยี่ห้อ Agilent 1100 series และ DAD Detector

การทดลองที่ 3 ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสายพันธุ์กระชายดำบนพื้นฐานดีเอ็นเอ

3.1 สกัดดีเอ็นเอ

นำเหง้ากระชายดำตัวอย่างจากการทดลองที่ 1 มาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (Murray และคณะ, 1980) (ภาคผนวก ก.)

3.2 การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี

โดยอาศัยหลักการของ Vos *et al.*, (1995) ด้วยชุดวิเคราะห์ AFLP core reagent Kit ตามวิธีการที่ระบุในเอกสาร (Invitrogen, USA) ซึ่งไพรเมอร์ 9 คู่ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

E-AA	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAA 3'
E-AAC	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAAC 3'
E-AAG	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAAG 3'
M-CA	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACA 3'
M-CAA	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACAA 3'
M-CAC	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACAC 3'

ภายหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้มาแยกด้วยสนามไฟฟ้าและย้อมแผ่นเจลด้วย Silver stain (Streiff *et al*, 1998) เพื่อให้แถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้นมา นำแผ่นเจลถ่ายลงในกระดาษ แก้ว ผึ่งให้แห้งแล้วนำไป เคราะห์ข้อมูล (data analysis) ประเมินค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Systems) (Rohlf, 1993) โดยอาศัยค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Nei (Nei' similarity coefficient) จากนั้นนำมาคำนวณหาค่า genetic distance ระหว่าง genotype ของสายพันธุ์ที่นำมาศึกษา สร้างเป็น genetic distance matrix ซึ่งจะใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ cluster analysis เพื่อจัดกลุ่มสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (dendrogram) โดยอาศัยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Unweighted Pair Group method on the basis of Arithmetie averages (UPGMA) (Jneath and Sokal, 1973)

3.3 การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR

ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอส่วน พลาสติดจีโนม โดยการใช้ ไพรเมอร์ *rpl* 16-14 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

rpl 14 5' ATCTGCAGCATTTAAAAGGGTCTGAGGTTGAATCAT 3'

rpl 16 5' AAAGATCTAGATTTCGTAAACAACATAGAGGAAGAA 3'

ศึกษาลำดับนิคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในส่วนของนิวเคลียสจีโนมโดยการใช้ไพรเมอร์ ITS 4-5ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

ITS 4 5' GGA AGT AAA AGT AGT CGT AAC A 3'

ITS 5 5' TCC TCC GCT TAA TGA TAT GCT TAA 3'

ประเมินค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ที่นำมาศึกษา

การทดลองที่ 4 การศึกษาการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4.1 การวางแผนการทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้ เพื่อศึกษาผลของไซโตไคนิน ร่วมกับ ออกซิน วางแผนการทดลองแบบ 5 x 7 Factorial in CRD 12 ซ้ำ ปัจจัยที่ 1 คือ auxin (alpha-Naphthaleneacetic acid; NAA) 5 ระดับความเข้มข้น คือ 0.0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 ppm. ปัจจัยที่ 2 คือ cytokinin (6-Benzylaminopurine; BA) 7 ระดับความเข้มข้น คือ 0.0 1.0 2.0 3.0 4.0 5.0 และ 6.0 ppm. สูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962)

4.2 อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง

สูตรอาหาร Ms ประกอบด้วยน้ำตาลซูโคส 20 เปอร์เซ็นต์ เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.0 1.0 2.0 3.0 4.0 5.0 และ 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 5.7+ 0.1 เติมวุ้น 8 กรัมต่อลิตร นำไปหลอมละลาย**ให้เข้ากันดีแล้วแบ่งใส่ขวด 4 ออนซ์ ขวดละ 20 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที**

4.3 การถ่ายเนื้อเยื่อและสภาพการเลี้ยง

ทำการตัดแยกหน่ออ่อนขนาดความยาว 5-10 มิลลิเมตรวางลงในอาหารในขวดเพาะเลี้ยงในแนวตั้ง นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 3 องศาเซลเซียส ช่วงเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมง ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์

4.4 การเก็บรวบรวมข้อมูล

บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทุก 2 สัปดาห์ โดยนับจำนวนต้น ราก ใบ และวัดความยาวต้น และราก ที่เกิดต่อชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงและในทุกซ้ำของการทดลองหลังการเพาะเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์ ทุก ๆ สัปดาห์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

4.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

หาค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของจำนวนพืชต้นใหม่ที่เกิดต่อชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เติม BA (ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มิลลิกรัมต่อ ลิตร) และ NAA (ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) และในสูตรอาหารที่เติม BA ร่วมกับ NAA ทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยจำนวนพืชต้นใหม่ที่เกิดต่อชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงระหว่างกลุ่มการทดลองในสูตรอาหารที่เติม BA, NAA และ BA ร่วมกับ NAA โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบมี 2 ตัวประกอบ (two-way analysis of variances) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05