บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

ตัวอย่างพืชที่นำมาศึกษา

ต้นพันธุ์กล้วยไม้เอื้องดินใบไผ่ และต้นพันธุ์กล้วยไม้เอื้องดินใบหมากที่มีดอกสมบูรณ์มาใช้เป็นวัสดุเริ่มต้นในการทดลอง และใช้ต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพเพาะเลี้ยงของกล้วยไม้เอื้องดินใบไผ่ และเอื้องดินใบหมาก ที่มีอายุเฉลี่ย 16 สัปดาห์

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง เครื่องมือทั่วไป เช่น เวอร์เนียร์ (Vernier Calipers) ปิเปต (pipette) ช้อนตักสาร (spatula) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytical balance) แท่งแก้วคนสาร บีกเกอร์ (beaker) เครื่องกวนสารแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) เตาให้ความร้อน (hot plate) กระบอกตวง (cylinder) ขวดรูปชมพู่ (flask) ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขนาด 4 ออนซ์

2. เครื่องมือและอุปกรณ์ในการย้ายเนื้อเยื่อ ได้แก่ ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet) จานแก้ว (Petri dish) มีดผ่าตัด (knives and scapel) ปากคีบขนาดต่างๆ (forceps) ตะแกรงวางเครื่องมือตะเกียงแอลกอฮอล์ขวดแอลกอฮอล์สำหรับจุ่มเครื่องมือ แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์

3. สารประกอบอินทรีย์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเมล็ดและใช้ในการเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้ดิน ได้แก่ น้ำมะพร้าว มันฝรั่ง เป็นต้น

4. สารเคมีที่ใช้ในอาหารสูตรดัดแปลง Vacin and Went: VW, (1949)

5. สารเคมีและสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ BA (6-benzylaminopurine), TDZ (thidiazuron), NAA (1-naphthaleneacetic acid), 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid), IAA (Indole-2-acetic acid), Kinetin และ IBA (Indolebutyric acid)

6. สารเคมีที่ใช้สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypoclorite, NaOCl)

7. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

8. อุปกรณ์ในการถ่ายภาพเมล็ดกล้วยไม้ดินและต้นอ่อนกล้วยไม้ดินที่ได้จากการทดลอง ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์แบบสามมิติ (stereo microscope) กล้องถ่ายรูปแบบดิจิตอล

9. วัสดุปลูก ได้แก่ กาบมะพร้าวสับ ดินร่วน ทราย แกลบดิบ พีทมอส เปลือกถั่ว

10. เครื่องมือที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ ตู้เก็บรักษาตัวอย่าง (deep freezer -20 องศาเซลเซียส) ตู้บ่มเชื้อ (incubator) เครื่องหมุนเหวี่ยงแรงหนีศูนย์กลาง (centrifuge) ชุดอิเล็กโทรโฟรีซีส (electrophoresis set) หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง เตาอบไมโครเวฟ (microwave oven) เครื่องถ่ายภาพเจล (gel documentation) โกร่งบดตัวอย่าง เครื่องผสมสาร (vortex mixer) Disposable tips สำหรับ 1000 200 และ 10 ไมโครลิตร หลอดเซนตริฟิวส์ (microcentrifuge) ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตรไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาตรได้อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ถุงมือ ปากคีบ กระดาษชั่งสาร ถาดพลาสติก เป็นต้น

11. สารเคมีที่ใช้สำหรับการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ Cethyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) 2-mercaptoethanol chloroformphenol: chloroform : isoamylalcohol (24:1) RNase A (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 70 เปอร์เซ็นต์ absolute ethanol 3M Sodium acetate pH 5.5

12. สารเคมีสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction : PCR) ได้แก่ น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ master Mix (Fermentas) ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS

13. สารเคมีสำหรับการทำวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสได้แก่ agarose powder Gene Ruler™ 100 bp Ladder (Fermentas) Ethidium bromide (0.3 ไมโครกรัมต่อลิตร) 6X DNA Loading Dye (Fermentas)

วิธีดำเนินการทดลอง

การศึกษามีทั้งหมด 8 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาลักษณะต่างๆ บางประการทางชีววิทยา และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเอื้องดินใบไผ่ และเอื้องดินใบหมาก

เพื่อใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบกับกล้วยไม้ดินลูกผสมที่สร้างขึ้น ตัวอย่างกล้วยไม้ที่นำมาศึกษามี 2 ชนิด ชนิดละ 3 กระถาง และทำการเก็บข้อมูลเชิงคุณภาพ 7 ลักษณะได้แก่ สีของดอก สีกลีบเลี้ยง สีกลีบดอก สีกลีบปาก รวมถึงลักษณะของใบ ลักษณะของช่อดอก และลักษณะของลำต้น และทำการเก็บข้อมูลเชิงปริมาณ 18 ลักษณะได้แก่ จำนวนต้นต่อกอ จำนวนใบต่อต้น ความยาวใบต่อต้น เส้นผ่านศูนย์กลางใบ จำนวนดอกต่อต้น ความยาวของของดอก ความกว้างของดอก ขนาดของกลีบเลี้ยง ขนาดกลีบดอก ขนาดกลีบปาก รวมถึงจำนวนช่อดอกต่อกอ และความยาวของช่อดอก เป็นต้น

การทดลองที่ 2 ศึกษาการผสมเกสรกล้วยไม้เอื้องดินใบไผ่ และเอื้องดินใบหมาก โดยศึกษาการผสมเกสรระหว่างกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด ในรูปแบบต่างๆ มีทั้งหมด 6 รูปแบบ ได้แก่

1. ผสมตัวเอง (Self pollination) ของเอื้องดินใบไผ่
2. ผสมตัวเอง (Self pollination) ของเอื้องดินใบหมาก
3. ผสมข้าม (Cross pollination) โดยให้เอื้องดินใบไผ่เป็นแม่
4. ผสมข้าม (Cross pollination) โดยให้เอื้องดินใบหมากเป็นแม่
5. ผสมข้าม (Deposit cross pollination) โดยมีการฝากผสมเกสรต้นเดิมไปด้วยโดยให้เอื้องดินใบไผ่เป็นแม่
6. ผสมข้าม (Deposit cross pollination) โดยมีการฝากผสมเกสรต้นเดิมไปด้วยโดยให้เอื้องดินใบหมากเป็นแม่

โดยทำการผสมรูปแบบละ 5 ดอก ผสมเกสรในช่วงเวลา 07.00 – 09.00 น. จากนั้นทำการบันทึกการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของฝักกล้วยไม้ดิน ดังนี้ ความยาวฝัก ความยาวรังไข่ และเส้นผ่านศูนย์กลางฝัก โดยทำการบันทึกข้อมูลเป็นระยะเวลา 30 วัน โดยทำการบันทึกข้อมูลการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของฝักกล้วยไม้ทุกๆ 3 วัน หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติ

การทดลองที่ 3 ศึกษากระบวนการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดินในสภาพปลอดเชื้อ (Asymbiotic seed germination)

โดยนำเมล็ดจากฝักกล้วยไม้ที่ได้จากการผสมเกสรรูปแบบต่างๆ อายุ 4 สัปดาห์ ล้างฝักด้วยน้ำสะอาด จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย NaOCl ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง และนำมาเพาะลงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร Vacin and Went (1949) ที่เติมน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร และมันฝรั่งต้มที่เอาแต่น้ำ 50 กรัมต่อลิตร มีค่า pH 5.2 ศึกษาการพัฒนาการ และกระบวนการงอกของเมล็ด จนเป็นต้นอ่อน เลี้ยงไว้ในที่ได้รับแสงแตกต่างกัน ดังตาราง 1 เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

ตาราง 1 ทรีทเมนต์ต่างๆ ที่ศึกษาถึงผลของแสงต่อการงอก และพัฒนาการของเมล็ดกล้วยไม้

ทรีทเมนต์ที่	ปัจจัยแสงที่ได้รับ
1	เลี้ยงไว้ในที่มืดตลอด 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 16 สัปดาห์
2	เลี้ยงไว้ในที่มืดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ย้ายออกที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน อีก 12 สัปดาห์
3	เลี้ยงไว้ในที่มืดเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ย้ายออกที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน อีก 8 สัปดาห์
4	เลี้ยงไว้ในที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 16 สัปดาห์
5	เลี้ยงไว้ที่มีแสงตลอด 24 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 16 สัปดาห์

เมื่อเพาะเลี้ยงครบอายุ 16 สัปดาห์ ทำการสุ่มนับเมล็ดในแต่ละทรีทเมนต์ ซึ่งแต่ละทรีทเมนต์มีทั้งหมด 5 ซ้ำ นับเพลทละ 4 ซ้ำ บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด และระยะพัฒนาการของเอมบริโอ โดยแบ่งระยะพัฒนาการของเมล็ดออกเป็นระยะต่างๆ (ดัดแปลงจาก Arditti, 1979) ดังตาราง 2 จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติและตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

ตาราง 2 ระยะพัฒนาการของเมล็ดกล้วยไม้ดิน (ดัดแปลงจาก Arditti, 1979)

ระยะการพัฒนา	ลักษณะของเมล็ดและต้นอ่อน
0	เมล็ดสมบูรณ์ แต่ไม่งอก
1	เมล็ดขยายขนาดจากเดิม 5 - 10 เท่า มีหรือไม่มีสีเขียว
2	เอมบริโอมีขนาดเพิ่มขึ้น มีหรือไม่มีสีเขียวของคลอโรฟิลล์ และจะดันเปลือกหุ้มเมล็ดแตกออก (เป็นระยะที่นับว่ามีการงอกของเมล็ดเกิดขึ้น)
3	เอมบริโอเจริญเป็นลูกกลมปลายแหลมเรียกว่า โปรโตคอร์ม มีหรือไม่มีไรซอยด์
4	ต้นอ่อนมีใบยอดเห็นได้จัดเจน 1 - 2 ใบ งอกขึ้นมาด้านบนของโปรโตคอร์ม
5	ต้นอ่อนมียอด อย่างน้อย 1 ยอด และมีใบ 3 - 4 ใบ และมีรากอย่างน้อย 1 ราก

การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อน ได้แก่ น้ำมะพร้าว และน้ำต้มมันฝรั่ง ต่อการเจริญและการพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้ดินลูกผสมระหว่างเอื้องดินใบไผ่ และเอื้องดินใบหมากในสภาพปลอดเชื้อ

ใช้ต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดที่มีความยาวประมาณ 2 - 3 เซนติเมตร ตัดรากออกเหลือประมาณ 0.5 เซนติเมตร เลี้ยงลงในอาหารกึ่งแข็งสูตร Vacin and Went (1949) ที่เติมน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว และมันฝรั่งต้มที่เอาแต่น้ำโดยมีความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ดังตาราง 3 ทำการปรับค่า pH ของอาหารให้เป็น 5.2 โดยใช้ต้นอ่อนที่มีความสูงเฉลี่ย 2 - 3 เซนติเมตรเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น เลี้ยงในขวดขนาด 4 ออนซ์ 1 ต้นต่อขวด วางเลี้ยงภายใต้แสงไฟฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์จากนั้นทำการบันทึกผลการทดลองโดยบันทึกข้อมูล จำนวนพืชต้นใหม่ที่เกิดขึ้นต่อชิ้นส่วน ความสูงของต้นอ่อนที่แตกใหม่ต่อชิ้นส่วน เปอร์เซ็นต์ความยาวลำต้นที่เพิ่มขึ้นต่อชิ้นส่วน จำนวนยอดใหม่ที่เกิดขึ้นต่อชิ้นส่วน เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่ จำนวนใบที่สร้างขึ้นบนยอดต่อชิ้นส่วน เปอร์เซ็นต์การเกิดโปรโตคอร์ม และเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

การทดลองที่ 5 ศึกษาผลของฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ฮอร์โมน BA Kinetin และ TDZ ต่อการเจริญและการพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้ดินลูกผสมระหว่างเอื้องดินใบไผ่ และเอื้องดินใบหมากในสภาพปลอดเชื้อ

ใช้ต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดที่มีความยาวประมาณ 2 - 3 เซนติเมตร ตัดรากออกเหลือประมาณ 0.5 เซนติเมตร เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร Vacin and Went (1949) ที่เติมน้ำตาล น้ำมะพร้าว และมันฝรั่งต้มที่เอาแต่น้ำ ความเข้มข้นต่างๆ ที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 4 ดังนี้ น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตรต่อลิตร มันฝรั่งต้มที่เอาแต่น้ำ 25 กรัมต่อลิตร และเติมฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนินได้แก่ BA Kinetin และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตาราง 4 จากนั้นปรับค่า pH ให้เป็น 5.2 ใช้ต้นอ่อนที่มีความสูงเฉลี่ย 2 - 3 เซนติเมตรเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น เลี้ยงในขวดขนาด 4 ออนซ์ 1 ต้นต่อขวด วางเลี้ยงภายใต้แสงไฟฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

จากนั้นบันทึกผลการทดลองโดยบันทึกข้อมูล จำนวนพืชต้นใหม่ที่เกิดขึ้นต่อชิ้นส่วน ความสูงของต้นอ่อนที่แตกใหม่ต่อชิ้นส่วน เปอร์เซ็นต์ความยาวลำต้นที่เพิ่มขึ้นต่อชิ้นส่วน จำนวนยอดใหม่ที่เกิดขึ้นต่อชิ้นส่วน เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่ จำนวนใบที่สร้างขึ้นบนยอดต่อชิ้นส่วน จำนวนราก และความยาวรากเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์การเกิดโปรโตคอร์ม และเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

ตาราง 3 ปริมาณน้ำมะพร้าว และน้ำต้มมันฝรั่ง

สูตรที่	น้ำมะพร้าว (ml)	มันฝรั่ง (g/l)
1	50	25
2	50	50
3	50	75
4	50	100
5	100	25
6	100	50
7	100	75
8	100	100
9	150	25
10	150	50
11	150	75
12	150	100
13	200	25
14	200	50
15	200	75
16	200	100
Control	-	-

ตาราง 4 ความเข้มข้นของฮอร์โมนไซโตไคนินที่ใส่ลงในอาหาร

สูตรที่	ฮอร์โมน	ความเข้มข้น (mg/l)
1	BA	0.5
2	BA	1.0
3	BA	2.0
4	BA	4.0
5	Kinetin	0.5
6	Kinetin	1.0
7	Kinetin	2.0
8	Kinetin	4.0
9	TDZ	0.5
10	TDZ	1.0
11	TDZ	2.0
12	TDZ	4.0
Control	-	-

การทดลองที่ 6 ศึกษาผลของฮอร์โมนกลุ่มออกซิน ได้แก่ฮอร์โมน NAA IAA IBA และ 2, 4-D ต่อการเจริญและการพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้ดินลูกผสมระหว่างเอื้องดินใบไผ่ **และเอื้องดิน**ใบหมากในสภาพปลอดเชื้อ

ใช้ต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดที่มีความยาวประมาณ 2 - 3 เซนติเมตร **ตัดรากออกเหลือ**ประมาณ 0.5 เซนติเมตร เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร Vacin and Went (1949) **โดยเติมน้ำตาล น้ำมะพร้าว และมันฝรั่งต้มที่เอาแต่น้ำ ที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่** 4 **ดังนี้ น้ำตาล** 20 **กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว** 100 **มิลลิลิตรต่อลิตร มันฝรั่งต้มที่เอาแต่น้ำ** 25 **กรัมต่อลิตร และเติมฮอร์โมนในกลุ่มออกซินได้แก่** NAA IAA IBA **และ** 2, 4-D **ความเข้มข้นต่างๆ ดังตาราง** 5 **และปรับค่า** pH **ให้เป็น** 5.2 **ใช้ต้นอ่อนที่มีความสูงเฉลี่ย** 2 - 3 **เซนติเมตรเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น เลี้ยงในขวดขนาด** 4 **ออนซ์** 1 **ต้นต่อขวด วางเลี้ยงภายใต้แสงไฟฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง** 40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ **ให้แสง** 12 **ชั่วโมงต่อวัน ในห้องที่มีอุณหภูมิ** 25 ± 2 **องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา** 8 **สัปดาห์ จากนั้นทำการบันทึกผลการทดลองโดยบันทึกข้อมูล จำนวนพืชต้นใหม่ที่เกิดขึ้นต่อชิ้นส่วน**

ความสูงของต้นอ่อนที่แตกใหม่ต่อชิ้นส่วน เปอร์เซ็นต์ความยาวลำต้นที่เพิ่มขึ้นต่อชิ้นส่วน จำนวนยอดใหม่ที่เกิดขึ้นต่อชิ้นส่วน เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่ จำนวนใบที่สร้างขึ้นบนยอดต่อชิ้นส่วน จำนวนราก และความยาวรากเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์การเกิดโปรโตคอร์ม และเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

ตาราง 5 ความเข้มข้นของฮอร์โมนออกซินที่ใส่ลงในอาหาร

สูตรที่	ฮอร์โมน	ความเข้มข้น (mg/l)
1	NAA	0.5
2	NAA	1.0
3	NAA	2.0
4	NAA	4.0
5	IAA	0.5
6	IAA	1.0
7	IAA	2.0
8	IAA	4.0
9	IBA	0.5
10	IBA	1.0
11	IBA	2.0
12	IBA	4.0
13	2, 4-D	0.5
14	2, 4-D	1.0
15	2, 4-D	2.0
16	2, 4-D	4.0
Control	-	-

การทดลองที่ 7 ศึกษาวัสดุปลูกที่เหมาะสมสำหรับการย้ายปลูกต้นกล้ากล้วยไม้ดินที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในเรือนเพาะชำโดยนำต้นอ่อนที่สมบูรณ์ขนาดความสูงประมาณ 4 - 5 เซนติเมตร มีใบ 2 - 3 ใบ และราก 2 - 3 ราก ย้ายปลูกในวัสดุปลูกสูตรต่างๆ ดังตาราง 6 จากนั้นรดน้ำและให้ปุ๋ยสูตรเสมอ 21 – 21 – 21 อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ทุกๆ 2 สัปดาห์ ปลูกเลี้ยงจน

ครบ 4 สัปดาห์ แล้วบันทึกอัตราการเจริญและการรอดชีวิต จากนั้นนำไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

ตาราง 6 อัตราส่วนและวัสดุปลูกกล้วยไม้ดินสูตรต่างๆ

สูตรผสม	วัสดุปลูก	อัตราส่วน
1	กาบมะพร้าว สับพีทมอส ทราย	1:1:1
2	กาบมะพร้าวสับ ดินร่วน แกลบดิบ	1:1:1
3	เปลือกถั่ว ดินร่วน แกลบดิบ	1:1:1

การทดลองที่ 8 การตรวจสอบลูกผสมข้ามสกุลระหว่างเอื้องดินใบไผ่กับเอื้องดินใบหมากด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพี

1. **ตัวอย่างที่นำมาศึกษามี 5 กลุ่ม ดังนี้**

1.1 Cross pollination โดยให้เอื้องดินใบหมากเป็นแม่ จำนวน 20 ตัวอย่าง

1.2 Deposit cross pollination โดยมีการฝากผสมเกสรต้นเดิมไปด้วยโดยให้เอื้องดินใบไผ่เป็นแม่จำนวน 48 ตัวอย่าง

1.3 Deposit cross pollination โดยมีการฝากผสมเกสรต้นเดิมไปด้วยโดยให้เอื้องดินใบหมากเป็นแม่จำนวน 52 ตัวอย่าง

1.4 ต้นพันธุ์เอื้องดินใบไผ่จากธรรมชาติ จำนวน 3 ตัวอย่าง (ต้นพันธุ์)

1.5 ต้นพันธุ์เอื้องดินใบหมากจากธรรมชาติ จำนวน 3 ตัวอย่าง (ต้นพันธุ์)

หมายเหตุ ไม่มีลูกผสมที่ได้จากการใช้เอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ เนื่องจากไม่สามารถผสมติดได้

2. **วิธีการสกัดดีเอ็นเอ**

นำใบอ่อนกล้วยไม้เอื้องดินใบไผ่ และเอื้องดินใบหมาก รวมทั้งต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อจากลูกผสมของกล้วยไม้ดินทั้งสองสกุลมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยวิธีดัดแปลง CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) method จากวิธีดัดแปลงของ Doyle และ Doyle (1978) โดยมีขั้นตอนในการสกัดดีเอ็นเอ ดังนี้

1. นำใบกล้วยไม้ดินทุกกลุ่มประมาณ 0.1 กรัม มาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวและถ่ายใส่หลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่เติม CTAB extraction buffer ปริมาตร 600 มิลลิตร ที่เติม 2-mercaptoethanol 10 ไมโครลิตร

2. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ผสมโดยกลับหลอดไปมาทุกๆ 10 นาที

3. เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้าโดยการกลับหลอดไปมาเบาๆ

4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

5. ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

6. เติม RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

7. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

8. เติม Phenol:chloroform (1:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรผสมโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ

9. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

10. ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

11. เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการสลับหลอดไปมาเบาๆ

12. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

13. เติม 3M Sodium acetate pH 5.5 ปริมาตร 1/10 ของสารที่มี และเติม Absolute ethanol ปริมาณ 2 เท่าของสารที่มีแล้วผสมให้เข้ากัน

14. บ่มไว้ที่อุณหภูมิลบ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที

15. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

16. ล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

17. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

18. ทิ้งตะกอนให้แห้งในอากาศที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

19. ละลายตะกอนด้วย TE buffer (0.01 M Tris pH 8.0, 0.001 M EDTA pH 8.0) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

20. เก็บไว้ที่อุณหภูมิลบ 20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งานต่อไป

3. การตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดมาผสมกับ 6X loading dye ซึ่งประกอบด้วยสี bromophenol blue และ sucrose สีจะเป็นตัวติดตามการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ แล้วนำมาแยกโดยให้เคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าในตัวกลางที่เป็นอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ใน 1X TAE buffer ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จากนั้นนำไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) เพื่อให้เกิดการเรืองแสงเมื่อนำไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตในเครื่องถ่ายภาพเจล (gel documentation) เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้ว จะสามารถบอกปริมาณของดีเอ็นเอได้โดยประมาณ รวมถึงสามารถบอกคุณภาพของดีเอ็นเอได้ว่ามีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอและโปรตีนอยู่ด้วยหรือไม่และมากน้อยเพียงใด นอกจากนี้ยังทราบขนาดและการแตกหักของดีเอ็นเอที่สกัดได้อีกด้วยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยอิเล็กโทรโฟรีซิส มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมถาดสำหรับเทเจล (tray) และหวีเจล (comb) ให้เรียบร้อย

2. ชั่งผงอะกาโรสเจล 0.8 กรัม และเติม 1X TAE buffer ที่เตรียมจาก 50X TAE (243.0 g Tris-acetate, 57.1 ml Glacial acetic acid, 100 ml 0.5 M EDTA pH 8.0) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3. หลอมอะกาโรสเจลให้ละลายโดยใช้ไมโครเวฟตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในถาดที่เตรียมไว้ให้หนาประมาณ 4 - 5 มิลลิเมตร แล้วปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

4. เมื่ออะกาโรสเจลแข็งตัวให้ดึงหวีออก แล้วนำไปวางในชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่มี 1X TAE buffer

5. ดูดสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร หยอดลงในช่องแผ่นเจลที่เตรียมไว้

6. ต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วเปิดกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์

7. ปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปเป็นระยะทางประมาณ 3 ใน 4 ของอะกาโรสเจล แล้วจึงปิดเครื่อง

8. นำอะกาโรสเจลมาย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที

9. จากนั้นนำอะกาโรสเจลมาล้างเอธิเดียมโบรไมส่วนเกินออกโดยแช่ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที

10. นำอะกาโรสเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (Gel documentation) และบันทึกภาพ

4. การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการในหลอดทดลองโดยอาศัยหลักการการจำลองตัวของดีเอ็นเอ (DNA Replication) ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ของดีเอ็นเอต้นแบบอย่างเฉพาะเจาะจงในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้น และได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นจำนวนมาก ปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

ขั้นแรก เรียกว่า Denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92 - 95 องศาเซลเซียส

ขั้นที่สอง เรียกว่า Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงให้เหมาะสมกับไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อให้เข้ามาจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37 - 60 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับค่า melting temperature (Tm) ซึ่งคำนวนได้จากลำดับเบสของไพรเมอร์

ขั้นที่สาม เรียกว่า Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยสังเคราะห์จากส่วนปลาย 3' ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบนสายดีเอ็นเอต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ nrITS ในการศึกษาครั้งนี้โดยใช้ไพรเมอร์จากการศึกษาของ Kishor, et al. (2009) โดยมีลำดับเบสดังนี้

17SE Primer 5' ATG GTC CGG TGA AGT GTT CG 3'

26SE Primer 5' CCC GGT TCG CTC GCC GTT AC 3'

จากนั้นทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Gene Amp* PCR System 9700 (Applied Biosystems)

ซึ่งในปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้น จำเป็นต้องมีสารเคมีต่างๆ เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณ โดยสารแต่ละชนิดจะต้องมีการปรับสภาพให้เหมาะสมกับไพรเมอร์ที่ใช้ รวมถึงระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เช่นกัน ที่ต้องมีความเหมาะสมกับไพรเมอร์ที่ใช้ (ตาราง 7) และมีการเพิ่มปริมาณโดยใช้อุณหภูมิดัง (ตาราง 8)

ตาราง 7 ความเข้มข้นของสารต่างๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา
5X buffer (Fermentas)	10	1X
25 mM $MgCl_2$	4	1.5 mM
10 mM dNTP	1	0.2 mM
10 mM 17SE Primer	1	0.2 mM
10 mM 26SE Primer	1	0.2 mM
Taq DNA polymerase (5 Unit/µl)	0.2	1 Unit/µl
DNA Template	1	50 - 100 ng
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	31.8	
Total	50	

ตาราง 8 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	
Pre-denaturation	94°C	4	
Denaturing	94°C	1	35 รอบ
Annealing	59°C	1	
Extension	72°C	1	
Final-extension	72°C	5	

5. การทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้มีความบริสุทธิ์

เมื่อได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการจะนำมาทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอนั้นให้บริสุทธิ์ ตามขั้นตอนพื้นฐานของบริษัท RBC Bioscience ดังนี้

1. จากนั้นจึงนำผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์มาโหลดในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสด้วย 1X TAE buffer ที่เตรียมใหม่ เพื่อไม่ให้เกิดการปนเปื้อน

2. เมื่อครบกำหนดระยะเวลานำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต บันทึกภาพ แล้วตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้โดยชั่งน้ำหนักหลอดก่อนใช้จากนั้นเมื่อใส่เจลแล้วนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักเจล

3. จากนั้นเติม DF buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ต่อ 300 ไมโครกรัมของเจล

4. แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายหมด

5. นำ column tube ใส่ใน collection tube แล้วดูดสารละลายที่ได้ทั้งหมดใส่ใน column tube

6. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน collection tube ทิ้ง

7. จากนั้นเติม wash buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน collection tube ทิ้งแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ให้หมดไป

8. ย้าย column tube ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Elution buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงตรงกลางแผ่นเมมเบรน

9. ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

10. จากนั้นตรวจสอบผลผลิตที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ 1X TAE buffer ปริมาตร 3 ไมโครลิตร แล้วนำไปโหลดบน 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่แรงดัน 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต บันทึกภาพ

6. การตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอที่ใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

เอ็นไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ จะมีความจำเพาะต่อลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ ซึ่งเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาแยกตามขนาดบนแผ่นวุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า เพื่อตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในแต่ละตัวอย่าง โดยในแต่ละปฏิกิริยามีสารที่ใช้ (ตาราง 9)

ตาราง 9 สารที่ใช้ในการตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Purified DNA	10
Water sterile	3.7
Buffer	1
Restriction enzyme	0.3
Total	15

โดยทำการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ nrITS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่แตกต่างกันทั้งหมด 7 ชนิด (ตาราง 10)

ตาราง 10 เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอ อุณหภูมิและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา

ชนิดเอนไซม์	ตำแหน่งจดจำ	อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)
*Alu*I	AG^CT	37	4
*Eco*RV	GAT^ATC	37	3
*Hae*III	GG^CC	37	3
*Hind*III	A^AGCTT	37	3
*Msp*I	C^CGG	37	3
*Rsa*I	GT^AC	37	3
*Taq*I	T^CGA	65	4

จากนั้นวิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 2 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้าที่แรงดัน 50 โวลต์ ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต บันทึกภาพ

การวิเคราะห์ข้อมูล

การบันทึกข้อมูลมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มโดยตลอด และมีการจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียล และข้อมูลที่ได้จากการทดลองจะนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan New's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$)

สถานที่ทำวิจัย

หน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

หน่วยวิจัยพันธุศาสตร์และโมเลกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

เรืองเพาะชำ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ระยะเวลาการทำวิจัย

การทดลองเริ่มต้นเดือนมกราคม 2555 สิ้นสุดการทดลองเดือนเมษายน 2557