บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. วัสดุอุปกรณ์สำหรับการเก็บตัวอย่างพันธุ์ไม้ในภาคสนาม

1.1 แผงอัดพรรณไม้ ขนาด 30 x 45 ตารางเซนติเมตร
1.2 กระดาษหนังสือพิมพ์
1.3 กระดาษลูกฟูก
1.4 กรรไกรตัดกิ่งไม้และกรรไกรซัก
1.5 ถุงพลาสติกขนาด 18 x 28 ตารางเซนติเมตร
1.6 ขวดเก็บตัวอย่างดอง ขนาด 800 ลูกบาศก์เซนติเมตร
1.7 สมุดบันทึกข้อมูลพรรณไม้ในภาคสนาม
1.8 กระดาษแข็งสำหรับติดตัวอย่าง ขนาด 20 x 35 ตารางเซนติเมตร
1.9 แผ่นป้ายหมายเลขพันธุ์ไม้
1.10 อัลติมิเตอร์
1.11 กล้องถ่ายรูป
1.12 ฟิล์มสี
1.13 แว่นขยาย
1.14 ไม้บรรทัด
1.15 เทปใส
1.16 ยางรัด

2. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการเก็บรักษาตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้งในพิพิธภัณฑ์พืช

2.1 น้ำยาอาบพันธุ์ไม้เพื่อกันแมลงและเชื้อรา ประกอบด้วย

95% ethyl alcohol 1 ลิตร
mercuric chloride 15 กรัม

2.2 กาวสำหรับติดตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้ง ประกอบด้วย
กาวลาเท็กซ์ ต่อ กาวน้ำ อัตราส่วน 1 : 1

2.3 กระดาษแข็งสีขาวสำหรับติดตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้ง
ขนาด 30 x 42 ตารางเซนติเมตร

2.4 กระดาษปกสีขาว ขนาด 30 x 42 ตารางเซนติเมตร

2.5 กระดาษปกสีน้ำตาล ขนาด 30 x 42 ตารางเซนติเมตร

2.6 แผ่นป้ายบันทึกข้อมูล

2.7 เข็ม

2.8 ด้ายสีขาว

2.9 ถุงทราย

3. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการ

3.1 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ Nikon SMZ-1B

3.2 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง Nikon AFX 35

3.3 กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด JEOL JSM-5410 LV

3.4 ตู้เย็น

3.5 เครื่องทำให้ตัวอย่างแห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point dryer)

3.6 เครื่องฉาบทอง (bazer sputter coater)

3.7 สไลด์และกระจกปิดสไลด์

3.8 เข็มเขี่ย

3.9 ใบมีดโกน

3.10 หลอดหยด

3.11 ปากคีบ

3.12 น้ำกลั่น

3.13 ethanol

3.14 2.5% glutaraldehyde

3.15 0.1 M phosphate buffer pH 7.2

3.16 1% OsO_4

3.17 stub

3.18 เทปใสสองหน้า

3.19 ตัวอย่างพันธุ์ไม้สดและตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้ง (herbarium specimen) ที่เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช กรมวิชาการเกษตร (BK) หอพรรณไม้ ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้ (BKF) และพิพิธภัณฑ์พืชศาสตราจารย์กสิน สุวตะพันธุ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (BCU)

3.20 เอกสารทางพฤกษอนุกรมวิธานที่เกี่ยวข้อง

4. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเรณู

4.1 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง Nikon AFX 35

4.2 กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด JEOL JSM-5410 LV

4.3 เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง Microcen 13

4.4 ตู้อบ

4.5 เครื่องฉาบทอง (bazer sputter coater)

4.6 สไลด์และกระจกปิดสไลด์

4.7 ขวดเก็บเรณู

4.8 หลอดทดลอง

4.9 บิกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิลิตร

4.10 หลอดหยด

4.11 ปากคีบ

4.12 เข็มเขี่ย

4.13 น้ำกลั่น

4.14 เทปใสสองหน้า

4.15 stub

4.16 acetic anhydride

4.17 benzene

4.18 ethyl alcohol

4.19 glacial acetic acid

4.20 paraffin

4.21 10% potassium hydroxide

4.22 silicone oil AK 2000

4.23 sulfuric acid

4.24 xylene

5. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการศึกษาไอโซไซม์

5.1 เครื่องอิเลคโทรโฟรีซิส Mini – PROTEAN II

5.2 เครื่องป้อนพลังงาน Power Pac 3000

5.3 เครื่องชั่ง KERN

5.4 เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง Microcen 13

5.5 เครื่องวัด pH

5.6 ตู้เย็น

5.7 medical freezer

5.8 water bath

5.9 magnetic stirrer hotplate

5.10 กล้องถ่ายรูป

5.11 ฟิล์มสี

5.12 ไม้บรรทัด

5.13 หลอดหยด

5.14 หลอดฉีดยา

5.15 แท่งแก้วคนสาร

5.16 กรวยแก้ว

5.17 ช้อนตักสาร

5.18 เทอร์มอมิเตอร์

5.19 ถุงมือยาง

5.20 กล่องพลาสติก ขนาด 11 x 11 ตารางเซนติเมตร

5.21 แผ่นแก้ว ขนาด 10 x 10 ตารางเซนติเมตร

5.22 กระดาษแก้วใส

5.23 โกร่งบดยา

5.24 ปิเปต

5.25 บิกเกอร์

5.26 หลอดทดลอง

5.27 nalgene filter (0.45 ไมครอน)

5.28 หลอด appendorf

5.29 acetic acid glacial

5.30 acetone

5.31 acrylamide A.R.

5.32 aldolase A.R.

5.33 3–amino–9–ethylcarbazole A.R.

5.34 ammonium persulfate A.R.

5.35 arsenic acid, sodium salt A.R.

5.36 L–aspartic acid A.R.

5.37 bromophenol blue (BPB)

5.38 butanol

5.39 calcium chloride A.R.

5.40 coomassie brilliant blue R-250

5.41 2,6–dichlorophenolindophenol A.R.

5.42 3–(4,5–dimethylthiazol-2-yl)–2,5 diphenyl–tetrazolium bromide (MTT) A.R.

5.43 DL– dithiothreitol (DTT) A.R.

5.44 ethyl alcohol

5.45 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) A.R.

5.46 fast black K salt

5.47 fast blue BB salt

5.48 formic acid, sodium salt A.R.

5.49 fructose–1,6–diphosphate A.R.

5.50 D–fructose–6–phosphate, disodium Salt A.R.

5.51 glucose–1–phosphate, sodium salt A.R.

5.52 D–glucose–6–phosphate A.R.

5.53 glucose–6–phosphate dehydrogenase A.R.

5.54 L–glutamate, sodium salt A.R.

5.55 glycerol

5.56 glycine A.R.

5.57 hydrochloric acid

5.58 hydrogen peroxide

5.59 hypoxanthine A.R.

5.60 DL–isocitric acid A.R.

5.61 α-ketoglutaric acid, monosodium Salt A.R.

5.62 magnesium chloride A.R.

5.63 DL–malic acid A.R.

5.64 mercaptoethanol A.R.

5.65 N, N-methylene–bis–acrylamide (BIS) A.R.

5.66 β-naphthol A.R.

5.67 α-naphthyl acetate A.R.

5.68 α-napthyl acid phosphate A.R.

5.69 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) A.R.

5.70 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) A.R.

5.71 nitro blue tetrazolium (NBT) A.R.

5.72 phenazine methosulfate (PMS) A.R.

5.73 6–phosphogluconic acid, sodium salt A.R.

5.74 polyvinylpyrolidone (PVP) A.R.

5.75 potassium hydroxide

5.76 potassium iodide

5.77 potassium phosphate, dibasic A.R.

5.78 potassium phosphate, monobasic A.R.

5.79 pyridoxal–5–phosphate, monohydrate A.R.

5.80 riboflavin A.R.

5.81 sea sand

5.82 shikimic acid A.R.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.83 sodium acetate anhydrous A.R.

5.84 sodium hydroxide

5.85 sodium phosphate, dibasic A.R.

5.86 sodium phosphate, monobasic A.R.

5.87 sucrose

5.88 TEMED A.R.

5.89 tris (hydroxymethyl) aminomethane A.R.

5.90 triton X-100 A.R.

5.91 tween 80

6. วัสดุอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลโดยเทคนิค numerical taxonomy

6.1 เครื่องคอมพิวเตอร์แบบตั้งโต๊ะ Belta XJ700T

6.2 ชุดโปรแกรมวิเคราะห์สถิติ SPSS 7.5 for Windows

6.3 micro floppy diskette 1.44 MB

6.4 สมุดบันทึกข้อมูล

6.5 ไม้บรรทัด

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาภาคสนาม

1.1 การกำหนดพื้นที่สำหรับเก็บตัวอย่าง

ศึกษาค้นหาแหล่งที่อยู่ของชงโคดำในประเทศไทยจากหนังสือ Flora of Thailand volume 4 part 1 และจากตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้งซึ่งเก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชในประเทศไทย ดังนี้

- พิพิธภัณฑ์พืช กรมวิชาการเกษตร (BK)
- หอพรรณไม้ กรมป่าไม้ (BKF)
- พิพิธภัณฑ์พืชศาสตราจารย์กสิน สุวดะพันธุ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (BCU)

สำรวจชนิด ปริมาณ การกระจายพันธุ์และแหล่งที่อยู่ของชงโคดำจากการศึกษาข้อมูลทั่วประเทศไทย แล้วกำหนดแหล่งเก็บตัวอย่างชงโคดำให้ครบทุกพันธุ์ (variety) รวมทั้งกำหนดแหล่งเก็บตัวอย่างประชากรชงโค (*B. purpurea*) และกาหลง (*B. acuminata*) เพื่อใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบสถานะทางอนุกรมวิธาน ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แหล่งเก็บตัวอย่างชงโคดำ ชงโค และกาหลงในประเทศไทย

ประชากรที่	ชนิดพืช	แหล่งเก็บตัวอย่าง
1	*B. pottsii* var. *subsessilis*	อ.บ่อไร่ จ.ตราด
2	*B. pottsii* var. *subsessilis*	อ.วังจันทน์ จ.ระยอง
3	*B. pottsii* var. *subsessilis*	อ.ท่าฉาง จ.สุราษฎร์ธานี
4	*B. pottsii* var. *pottsii*	อ.นบพิตำ จ.นครศรีธรรมราช
5	*B. pottsii* var. *pottsii*	อ.โคกโพธิ์ จ.ปัตตานี
6	*B. pottsii* var. *mollissima*	อ.นาโยง จ.ตรัง
7	*B. pottsii* var. *mollissima*	อ.ตะกั่วป่า จ.พังงา
8	*B. pottsii* var. *velutina*	อ.พะโต๊ะ จ.ชุมพร
9	*B. pottsii* var. *velutina*	อ.เมือง จ.ระนอง
10	*B. purpurea*	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
11	*B. acuminata*	คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การกระจายพันธุ์ แหล่งเก็บตัวอย่าง

- *Bauhinia pottsii* var. *pottsii*
- *Bauhinia pottsii* var. *subsessilis*
- *Bauhinia pottsii* var. *mollissima*
- *Bauhinia pottsii* var. *velutinai*

แผนภาพที่ 3.1 แสดงการกระจายพันธุ์และแหล่งเก็บตัวอย่างประชากรซงโคดำในประเทศไทย

1.2 การเก็บตัวอย่าง

1.2.1 เก็บกิ่งชงโคดำ ชงโคและกาหลงที่มีใบและดอกสมบูรณ์ประชากรละ 3 กิ่ง นำมาอัดในแผงอัดพรรณไม้พร้อมติดป้ายบอกรายละเอียดของตัวอย่าง เพื่อนำไปทำตัวอย่างแห้งเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชศาสตราจารย์กสิน สุวดะพันธุ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2.2 เก็บใบที่สมบูรณ์ลำดับที่ 3 นับจากปลายกิ่งของชงโคดำ ชงโคและกาหลง จำนวน 1 ใบ ต่อ 1 กิ่ง รวมทั้งสิ้น 50 ใบต่อประชากรแต่ละประชากรที่ศึกษา เก็บดอกที่บานเต็มที่และดอกตูมที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในช่อดอกนั้นอย่างละ 1 ดอก ต่อ 1 ช่อดอก ต่อ 1 กิ่ง รวมทั้งสิ้นอย่างละ 50 ดอกต่อประชากรแต่ละประชากรที่ศึกษาและเก็บฝักที่แก่เต็มที่ 1 ฝัก ต่อ 1 กิ่งรวมทั้งสิ้น 50 ฝักต่อประชากรแต่ละประชากรที่ศึกษา เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดและการศึกษาด้าน numerical taxonomy

1.2.3 ตัดกิ่งชงโคดำที่มีขนาดเหมาะสม จำนวน 50 กิ่ง ต่อประชากรแต่ละประชากรที่ศึกษา นำมาปักชำในกระถางที่เรือนเพาะชำ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อนำใบอ่อนที่เกิดจากกิ่งปักชำมาใช้ในการศึกษาแบบแผนไอโซไซม์

1.2.4 เก็บดอกชงโคดำ ชงโค และกาหลงที่เริ่มบานเพียงเล็กน้อย จำนวน 30 ดอกจากแต่ละประชากรที่ศึกษา นำมาผึ่งลมให้แห้งแล้วแยกเฉพาะส่วนอับเรณูใส่ซองกระดาษและตากให้แห้งเพื่อนำมาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเรณู

2. การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

2.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของกิ่ง ใบ และดอกชงโคดำ ชงโค และกาหลง

2.1.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

นำตัวอย่างชงโคดำ ชงโค และกาหลงที่มีใบและดอกสมบูรณ์ทั้งที่เก็บใหม่ๆ และตัวอย่างที่อัดแห้งไว้ทุกประชากร มาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของกิ่ง ใบ ดอก ฝักและเมล็ด โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์และชื่อพื้นเมือง การกระจายพันธุ์ในประเทศไทยและต่างประเทศ รวมทั้งการใช้ประโยชน์ โดยตรวจสอบและเปรียบเทียบกับตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้งในพิพิธภัณฑ์พืชศาสตราจารย์กสิน สุวดะพันธุ์ พิพิธภัณฑ์พืชกรมวิชาการเกษตร หอพรรณไม้ กรมป่าไม้ และตรวจสอบจากเอกสารทางพฤกษอนุกรมวิธาน พร้อมทั้งจัดทำคำบรรยายลักษณะอย่างละเอียด บันทึกภาพและทำรูปวิธานไว้

2.1.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

2.1.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างใบ กลีบเลี้ยง กลีบดอก เกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียของชงโคดำทุกพันธุ์ มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น และ 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 จากนั้นจึงตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กๆขนาดกว้างและยาว 0.5 เซนติเมตร นำตัวอย่างที่ตัดเป็นชิ้นแล้วมาแช่ (pre-fix) ใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1M phosphate buffer pH 7.2 นาน 1 ชั่วโมงในตู้เย็น อุณหภูมิ 15-20 °C แล้วล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 3 ครั้งครั้งละ 10 นาที จากนั้นจึงแช่ (post-fix) ใน 1% OsO_4 ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วย phosphate buffer เหมือนเดิม 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที นำตัวอย่างที่ fix แล้วมา dehydrate ด้วย ethanol ความเข้มข้น 30%, 50%, 70%, 90% และ 100% ตามลำดับขั้นตอนละ 10 นาที จากนั้นทำตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤติ ด้วยเครื่อง critical point dryer ซึ่งทำให้ตัวอย่างแห้งและคงสภาพเดิมได้

2.1.2.2 การติดตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้งแล้วมาติดบน stub ด้วยเทปใสสองหน้า แล้วนำมาฉาบทองคำหนา 10 nm ภายใต้สภาวะสูญญากาศ ด้วยเครื่อง bazer sputter coater นานประมาณ 5 นาที จากนั้นจึงนำตัวอย่างทั้งหมดมาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด JEOL JSM-5410 LV โดยใช้กำลังขยายตั้งแต่ 75 เท่า ถึง 7,500 เท่า ที่ 15 kV.

2.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเรณูชงโคดำ ชงโค และกาหลง

2.2.1 การเตรียมเรณู

นำอับเรณูชงโคดำ ชงโคและกาหลงจากทุกประชากรที่เก็บไว้มาเตรียมเรณูโดยวิธี acetolysis ตามแนวของโกสุม พีระมาน (2522) ดังนี้

- นำอับเรณูมาต้มใน 10% KOH จนเดือด นาน 1 นาที แล้วกรองเรณูไว้ ส่วนกากทิ้งไป
- นำสารละลายที่กรองได้มาปั่นด้วยเครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จนเรณูตกตะกอน แล้วรินสารละลายส่วนบนทิ้ง
- เติมน้ำกลั่นล้างเรณู แล้วปั่นให้ตกตะกอนนาน 1 นาที และรินสารละลายส่วนบนทิ้งเหมือนเดิม ทำซ้ำเช่นนี้ 3 ครั้ง
- เติม glacial acetic acid ปั่นให้ตกตะกอนนาน 1 นาที แล้วรินสารละลายส่วนบนทิ้ง
- เติม acetolysis mixture (ประกอบด้วย acetic anhydride : conc. sulfuric acid = 9:1) ที่เตรียมใหม่ๆลงไป นำไปแช่ในน้ำเดือดนาน 1 นาที ปั่นให้ตกตะกอนนาน 1 นาที แล้วรินสารละลายส่วนบนทิ้ง
- เติม glacial acetic acid ปั่นให้ตกตะกอนนาน 1 นาที แล้วรินสารละลายส่วนบนทิ้ง
- เติมน้ำกลั่นล้างเรณู ปั่นให้ตกตะกอนนาน 1 นาที แล้วรินสารละลายส่วนบนทิ้ง ทำซ้ำเช่นนี้ 3 ครั้ง

- เติม 70% ethyl alcohol ปั่นให้ตกตะกอนนาน 1 นาที แล้วรินสารละลายส่วนบนทิ้ง จากนั้นเติม 95% และ 100% ethyl alcohol แล้วทำซ้ำเช่นเดิมตามลำดับ

- ล้างหลอดเซนตริฟิวส์จน ethyl alcohol ระเหยหมดแล้วเติม benzene ลงไป เขย่าจนเรณูกระจายดี จึงเทเรณูใส่ขวดเก็บเรณู

- หยด silicone oil AK 2000 (Anderson, 1960) ลงไป 3-4 หยด และนำเข้าตู้อบที่ 50°C นาน 30 นาที แล้วปิดฝาให้สนิทเก็บไว้ศึกษาต่อไป

2.2.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเรณูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

นำเรณูที่ผ่านการทำ acetolysis แล้วมาเตรียมสไลด์ถาวร ดังนี้

- ใช้เข็มเขี่ยแตะ silicone oil ที่มีเรณูกระจายอยู่ หยดบนสไลด์ 1 หยด แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

- ใช้เข็มเขี่ยแตะ paraffin ซึ่งขูดเป็นชิ้นเล็กๆบางๆวางไว้ที่ขอบกระจกปิดสไลด์ แล้วนำสไลด์วางบน warm plate ที่อุณหภูมิ 50°C จน paraffin ละลายแทรกเข้าไปใต้กระจกปิดสไลด์จนเต็ม จึงนำสไลด์ออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องจน paraffin แข็งตัว แล้วใช้ xylene เช็ดสไลด์จนสะอาด

- นำสไลด์ถาวรมาศึกษารูปร่างลักษณะ ช่องเปิด ขั้วและลวดลายผิวของเรณู โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง Nikon AFX 35 กำลังขยายของเลนส์ตา 10 เท่าและกำลังขยายของเลนส์วัตถุ 40 เท่า

- วัดขนาดเรณูตามแนว polar axis และ equatorial axis ความกว้างและความยาวของช่องเปิด ขนาด apocolpium และ polar field index ของเรณูประชากรละ 50 เรณู โดยใช้ eyepiece micrometer ที่เทียบค่าจาก stage micrometer แล้ว

2.2.3 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเรณูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

นำเรณูที่ผ่านการทำ acetolysis แล้วมาเตรียมเพื่อศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนแบบส่องกราด ดังนี้

- หยดเรณูลงบน stub ทองเหลืองซึ่งติดด้วยเทปใสสองหน้า

- นำ stub ที่มีเรณูไปฉาบผิวด้วยทองคำโดยใช้เครื่อง bazer sputter coater ภายใต้สภาวะสูญญากาศ นาน 5 นาที

- นำเรณูที่ฉาบผิวแล้วไปศึกษาลักษณะรูปร่าง ช่องเปิด ขั้วและลวดลายผิวของเรณู โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด JEOL JSM-5410 LV กำลังขยายตั้งแต่ 750 ถึง 7,500 เท่า ที่ 15 kV

2.3 การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ของซงโคดำ

การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ของซงโคดำ โดยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis ใช้เครื่องอิเลคโทรโฟรีซิส Mini – PROTEAN II กับเครื่องป้อนพลังงาน Power Pac 3000 มีขั้นตอนดังนี้

2.3.1 การเตรียมสารละลายสำหรับทำ polyacrylamide gel

การเตรียมสารละลายสำหรับทำ stacking gel 5% และ separating gel 7.5%, 8%, และ 8.5% ตามแนวของ Sambrook, Fritsch และ Maniatis (1989) มีส่วนผสมดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการเตรียม polyacrylamide gel

สารเคมี	ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในแต่ละ gel (มล.)			
	stacking gel	separating gel		
	5%	7.5%	8%	8.5%
30% acrylamide mix	4.16	25.00	26.65	28.25
1.0 M Tris-HCl pH 6.8	2.50	-	-	-
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	-	25.00	25.00	25.00
10% ammonium persulfate	0.10	1.00	1.20	1.20
TEMED	0.01	0.05	0.05	0.05
น้ำ	18.23	18.95	47.10	45.50
ปริมาณที่ใช้ต่อ gel 10 แผ่น	25	100	100	100

2.3.2 การเตรียม polyacrylamide gel

2.3.2.1 การเตรียมแผ่นกระจก

ใช้แอลกอฮอล์เช็ดทำความสะอาดแผ่นกระจกรอจนแห้งจึงนำแผ่นกระจกแผ่นเล็กและแผ่นใหญ่มาวางประกบกัน โดยมีแผ่น spacer หนา 0.75 มิลลิเมตรวางที่ขอบกระจกทั้ง 2 ข้างและมี alignment card แทรกตรงกลางระหว่าง spacer นำแผ่นกระจกทั้งชุดใส่ลงใน multi-casting chamber ทำเช่นนี้ 10 ชุด โดยแต่ละชุดมีแผ่นพลาสติกกั้นไว้ จากนั้นนำหวี (telflon comb) หนา 0.75 มิลลิเมตร มาใส่ลงไประหว่างแผ่นกระจก ใช้ปากกาทำเครื่องหมายบอกระดับที่จะใส่ separating gel ลงไปให้ห่างจากหวีประมาณ 5 มิลลิเมตร

2.3.2.2 การเตรียม separating gel

ผสมสารละลายสำหรับทำ separating gel ตามอัตราส่วนในตารางที่ 3.2 โดยเติม 10% ammonium persulfate และ TEMED หลังสุด คนให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว แล้วเทสารละลายลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกจนถึงระดับที่ทำเครื่องหมายไว้ แล้วใช้ปิเปตดูด butanol ที่อิ่มตัวด้วยน้ำหยดลงคลุมผิว separating gel ระหว่างกระจกทุกแผ่น ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้เกิด polymerization จน gel แข็งตัวจึงริน butanol ออกแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้งและซับน้ำที่เหลือออกให้หมดด้วยกระดาษซับ

2.3.2.3 การเตรียม stacking gel

ผสมสารละลายสำหรับทำ stacking gel ตามอัตราส่วนในตารางที่ 3.2 โดยเติม 10% ammonium persulfate และ TEMED หลังสุด คนให้เข้ากันอย่างรวดเร็วแล้วเทสารละลายในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกทุกชุดจนเต็มจากนั้นใช้หวีเสียบลงไปในช่องว่างระหว่างกระจก ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยทิ้งไว้ให้เกิด polymerization ประมาณ 30 นาที จน gel แข็งตัว

2.3.3 การเตรียมเครื่องมืออิเลคโตรโฟรีซิส

นำ Tris-glycine electrophoresis buffer pH 8.3 ผสมน้ำกลั่น อัตราส่วน 1:1 แล้วเติมลงใน lower buffer chamber ประมาณ 300 มิลลิลิตร จากนั้นนำชุดแผ่นกระจกซึ่งเตรียม gel ไว้แล้วออกจาก multi-casting chamber นำมาใส่ใน sandwich clamp assemblies จำนวน 2 ชุด แล้วนำไปประกอบติดกับ inner cooling core จากนั้นจึงนำไปใส่ใน lower buffer chamber เติม Tris-glycine electrophoresis buffer pH 8.3 ลงใน upper chamber จนท่วม gel แล้วค่อยๆ ใช้มือดึงเอาหวีออก ระวังอย่าให้มีฟองอากาศใน well

2.3.4 การสกัดไอโซไซม์จากใบชงโคดำ

2.3.4.1 การเตรียมสารละลาย extraction buffer

สารละลาย extraction buffer ที่ใช้ในการสกัดไอโซไซม์จากใบชงโคดำ มี 3 สูตร ดังนี้

สูตร 1 ดามแนวของสุจิตรา จางตระกูล และคณะ (2534)

สูตร 2 ดัดแปลงจากแนวของสุจิตรา จางตระกูล และคณะ (2534)

สูตร 3 ดามแนวของชวนพิศ อรุณรังสิกุล (2538)

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของ extraction buffer

สารเคมี	ปริมาณสารเคมีที่ใช้ใน extraction buffer (ml)		
	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3
0.2 M Tris-HCl pH 7.5	5.00	5.00	-
0.1 M Tris-HCl pH 8.2	-	-	5.00
100 mM DTT	0.50	-	-
45 mM EDTA	-	1.00	1.00
2% mercaptoethanol	-	0.50	0.50
3% tween 80	3.50	3.50	-
0.5% Triton X-100	-	-	2.00
10% sucrose	-	-	0.50
H_2O	1.00	-	1.00
ปริมาตรรวม	**10**	**10**	**10**

2.3.4.2 การสกัดไอโซไซม์

นำใบชงโคดำใบที่ 3 นับจากปลายยอดมาชั่งหนักเท่ากับ 200 มิลลิกรัม จากนั้นนำมาใส่ในโกร่ง (mortar) ที่สะอาดและเย็นจัด เติม extraction buffer สูตร 1, 2 หรือ 3 ลงไป 1 มิลลิลิตร เติม PVP 50 mg และ sea sand 10 mg บดด้วย pestle ในที่เย็นจัดจนใบละเอียดเป็นเนื้อเดียว จึงเทใส่หลอด appendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงที่ 0°C ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนใสด้านบน (supernatant) เก็บไว้ในหลอด appendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แช่ในตู้ medical freezer ที่อุณหภูมิ -40°C ทำการเตรียมสารสกัดไอโซไซม์ของชงโคดำทุกพันธุ์โดยวิธีดังกล่าวนี้ พันธุ์ละ 30 ตัวอย่าง

2.3.5 การหาปริมาณตัวอย่างที่เหมาะสม

ทำการตรวจสอบปริมาณตัวอย่างสารสกัดไอโซไซม์ที่เหมาะสมของชงโคดำทุกพันธุ์ในการศึกษาไอโซไซม์ทุกระบบ โดยใช้ gel หนา 0.75 มิลลิเมตร stacking gel 5% และ separating gel 7.5%, 8% และ 8.5% ตามลำดับ โดยใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย BPB-Tris-glycine ซึ่งใช้เป็น dye marker ปริมาณ 10 ไมโครลิตร เติมลงใน well ช่องซ้ายสุดของ stacking gel 5% ซึ่งเตรียมไว้แล้ว จากนั้นจึงใช้ไมโครปิเปตดูดสารสกัดไอโซไซม์ของชงโคดำทุกพันธุ์ที่เตรียมไว้หลายปริมาตรตั้งแต่ 5 ไมโครลิตร ถึง 20 ไมโครลิตร เติมลงใน well ช่องถัดมา ช่องละ 1 ตัวอย่างจนครบทุกช่อง แล้วต่อเครื่องป้อนพลังงานเข้ากับเครื่องอิเลคโตรโฟรีซิส ควบคุมกระแสไฟฟ้าให้คงที่ที่ 60 มิลลิแอมแปร์ ภายใต้อุณหภูมิ 0-4°C เปิดสวิตซ์แล้วสังเกตการเคลื่อนที่ของ dye marker จนห่างจากขอบ gel ด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตร จึงปิดเครื่องป้อนพลังงาน แล้วนำ gel ออกมาย้อมสีโปรตีน โดยใช้สารละลาย coomassie brilliant blue R-250แล้วสังเกตเปรียบเทียบหาปริมาณตัวอย่างสารสกัดไอโซไซม์ที่ให้แถบสีจำนวนมากและมีความคมชัดมากที่สุดสำหรับไอโซไซม์แต่ละระบบ เพื่อใช้ในการตรวจสอบไอโซไซม์ในชงโคดำต่อไป

2.3.6 การตรวจสอบไอโซไซม์

ทำการตรวจสอบไอโซไซม์ 20 ระบบในชงโคดำทุกพันธุ์รวมทั้งสิ้น 4 ประชากร ประชากรละ 30 ตัวอย่าง โดยใช้ gel หนา 0.75 มิลลิเมตร ใช้ stacking gel 5% และ

separating gel 7.5%, 8% หรือ 8.5% ตามความหมาะสมกับไอโซไซม์แต่ละระบบ ใช้ไมโครปิเปด ดูดสารละลาย BPB-Tris-glycine ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมลงใน well ช่องซ้ายสุด แล้วดูดสารสกัดไอโซไซม์จากใบชงโคดำปริมาตรตามความเหมาะสมกับไอโซไซม์แต่ละระบบ เติมลงใน well ช่องถัดไป ช่องละ 1 ตัวอย่างจนครบทุกช่อง แล้วต่อเครื่องอิเลคโตรโฟรีซิสเข้ากับเครื่องป้อนพลังงาน โดยควบคุมกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 60 มิลลิแอมแปร์ ภายใต้อุณหภูมิ 0-4°C สังเกตการเคลื่อนที่ของ dye marker จนห่างจากขอบ gel ด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตร จึงปิดสวิตซ์แล้วนำ gel ออกมาเพื่อย้อมสีจำเพาะของไอโซไซม์แต่ละระบบต่อไป

2.3.7 การย้อมสีจำเพาะไอโซไซม์

นำ gel ที่ผ่านการแยกไอโซไซม์โดยเครื่องมืออิเลคโตรโฟรีซิสแล้วมาย้อมสีจำเพาะของไอโซไซม์ รวมทั้งสิ้น 20 ระบบ ดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ระบบไอโซไซม์ที่ศึกษาในชงโคดำ

ระบบไอโซไซม์	คำย่อ	E.C. number
acid phosphatase	ACP	3.1.3.2
alcohol dehydrogenase	ADH	1.1.1.1
catalase	CAT	1.11.1.6
dihydrolipoamide dehydrogenase	DDH	1.8.1.4
α - esterase	α-EST	3.1.1.1
formate dehydrogenase	FDH	1.2.1.2
glucose-6-phosphate dehydrogenase	G_6PDH	1.1.1.49
glucose-6-phosphate isomerase	GPI	5.3.1.9
glutamate dehydrogenase	GDH	1.4.1.2
glutamate oxaloacetate transaminase	GOT	2.6.1.1
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G_3PDH	1.2.1.9
isocitrate dehydrogenase	IDH	1.1.1.42
malate dehydrogenase	MDH	1.1.1.37
malic enzyme	ME	1.1.1.40

ตารางที่ 3.4 (ต่อ)

ระบบไอโซไซม์	คำย่อ	E.C. number
peroxidase	PER	1.11.1.7
phosphoglucomutase	PGM	5.4.2.2
phosphogluconate dehydrogenase	6PGD	1.1.1.44
shikimate dehydrogenase	SKDH	1.1.1.25
superoxide dismutase	SOD	1.15.1.1
xanthine dehydrogenase	XDH	1.1.1.204

2.3.8 การบันทึกข้อมูล

นำ gel ที่ย้อมสีจำเพาะไอโซไซม์แต่ละชนิดมาศึกษาตำแหน่ง จำนวน ขนาดและความเข้มของแถบสีของไอโซไซม์ แล้วหาค่าระยะทางสัมพัทธ์ (Rf) ของไอโซไซม์แต่ละระบบ ดังนี้

$$\text{ระยะทางสัมพัทธ์ (Rf)} = \frac{\text{ระยะทางที่แถบไอโซไซม์เคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่}}$$

จากนั้นนำข้อมูลมาจัดทำเป็นไซโมแกรมของไอโซไซม์ของซงโคดำทุกพันธุ์พร้อมทั้งบันทึกภาพไว้

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลโดยเทคนิค numerical taxonomy

2.4.1 การบันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาของใบ ดอก และเรณูของซงโคดำ

บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาของใบ ดอก และเรณูของซงโคดำทุกประชากร ประชากรละ 50 ตัวอย่าง โดยกำหนดค่าของลักษณะใบ ดอก และเรณูที่เป็นข้อมูลไม่ต่อเนื่อง (discontinuous data) ให้เป็นตัวเลขตามแนวของ Giussani, Martinez และ Collantes (1995)

และใช้ไม้บรรทัดวัดลักษณะต่างๆของใบ ดอก และเรณูที่เป็นข้อมูลต่อเนื่อง (continuous data) ดังตารางที่ 3.5 และตารางที่ 3.6

2.4.2 การบันทึกลักษณะแบบแผนไอโซไซม์ของชงโคดำ

บันทึกระยะทางสัมพัทธ์ (Rf) ของไอโซไซม์ทุกระบบของชงโคดำทุกพันธุ์ที่มีลักษณะเป็น polymorphism พันธุ์ละ 30 ตัวอย่าง โดยใช้ไม้บรรทัดวัดระยะทางที่แถบไอโซไซม์เคลื่อนที่เทียบกับระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่

2.4.3 การบันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาของใบ ดอก เรณู ฝัก และเมล็ดของชงโคดำ ชงโค และกาหลง

บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาของใบ ดอก เรณู ฝัก และเมล็ดของชงโคดำ ชงโคและกาหลง ประชากรละ 50 ตัวอย่าง โดยกำหนดค่าของลักษณะสัณฐานวิทยาที่เป็นข้อมูลไม่ต่อเนื่องเป็นตัวเลขและใช้ไม้บรรทัดวัดค่าของลักษณะสัณฐานวิทยาที่เป็นข้อมูลต่อเนื่องตามแนวเดียวกับการบันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาของชงโคดำ

2.4.4 การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยคอมพิวเตอร์

นำข้อมูลจากการบันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาของใบ ดอก เรณูและแบบแผนไอโซไซม์ของชงโคดำทุกประชากรรวมทั้งลักษณะใบ ดอก เรณู ฝัก และเมล็ดของชงโคดำ ชงโคและกาหลงมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ปัจจัย (factor analysis) การวิเคราะห์จัดกลุ่ม (cluster analysis) และการวิเคราะห์จัดจำแนก (discriminant analysis) โดยใช้ชุดโปรแกรมการวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS 7.5 for Windows

ตารางที่ 3.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของใบ ดอก เรณู ฝัก และเมล็ดที่เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพ

ลักษณะ	สัญญลักษณ์
ลำต้น	
ลักษณะวิสัย	HAB *
ไม้กึ่งรอเลื้อย	0
ไม้ยืนต้น	1
ไม้พุ่ม	2
ช่องอากาศที่เปลือกไม้	LEN *
รูปร่างกลมรี	0
รูปร่างเป็นขีดยาว	1
ใบ	
ลักษณะปลายใบ	TLE *
ปลายใบมน	0
ปลายใบแหลม	1
ลักษณะขนด้านบนใบ	HUE
velvety	0
puberulous	1
mouldy	2
glabrous	3
ลักษณะขนด้านล่างใบ	HLE
rusty velvety	0
pubescent	1
sparsely hairy	2
ดอก	
รูปร่างกลีบดอก	SPE
รูปใบหอก (lanceolate)	0
รูปช้อน (spathulate)	1
รูปใบหอกแคบ (narrowly lanceolate)	2
รูปขอบขนาน (oblong)	3

I19196994

ตารางที่ 3.5 (ต่อ)

ลักษณะ	สัญญลักษณ์
สีกลีบดอก	CPE
สีขาว มีแต้มสีเหลืองกลางกลีบที่ 2	0
สีแดง มีแต้มสีเหลืองกลางกลีบที่ 2	1
สีชมพู	2
สีขาว	3
สีอับเรณู	CAN
สีน้ำตาลอมดำ	0
สีเขียวอ่อน	1
สีน้ำตาลอ่อน	2
สีเหลือง	3
สีก้านชูอับเรณู	CFI
สีแดง	0
สีเขียวอ่อน	1
สีชมพู	2
สีขาว	3
รูปร่างยอดเกสรเพศเมีย	SSTI
กลมเด่นชัด (peltate)	0
ไม่เด่นชัด (truncate)	1
แบนเฉียง (oblique flat)	2
สียอดเกสรเพศเมีย	CSTI
สีน้ำตาลอมดำ	0
สีเขียวอ่อน	1
สีน้ำตาล	2
สีก้านเกสรเพศเมีย	CSTY
สีแดง	0
สีเขียวอ่อน	1
สีชมพู	2
สีขาว	3

ตารางที่ 3.5 (ต่อ)

ลักษณะ	สัญญลักษณ์
ลักษณะขนบนรังไข่	HOV
ขนยาวนุ่มและขนแข็งเอน	0
ขนสั้นนุ่มและขนแข็งเอน	1
ขนกำมะหยี่และขนแข็งเอน	2
ขนกำมะหยี่	3
ไม่มีขน	4
ลักษณะปลายดอกตูม	TBU ❊
ไม่มี free calyx-teeth	0
มี free calyx-teeth	1
ลักษณะสันที่ปลายดอกตูม	RBU
ไม่มีสัน	0
มีสัน	1
สีดอกตูม	CBU
สีเขียวอมน้ำตาล	0
สีเขียว	1
เรณู	
รูปแบบเรณู	TPO ❊
อยู่เดี่ยวๆ (monad)	0
อยู่เป็นกลุ่ม 4 เรณู (tetrad)	1
รูปร่างเรณู	SPO
ทรงกลม (spheroidal)	0
รูปกลมแป้น (oblate)	1
รูปคล้ายไข่ (prolate spheroidal)	2
รูปคล้ายรักบี้ (prolate)	3

ตารางที่ 3.5 (ต่อ)

ลักษณะ	สัญญลักษณ์
ชนิดช่องเปิดเรณู	TAP ✲
inaperturate	0
tricolporate	1
tricolporoidate	2
ตำแหน่งช่องเปิดเรณู	PAP ✲
ไม่มีช่องเปิด	0
แนวศูนย์สูตร (equatorial aperture)	1
ลวดลายผิวเรณู	ESC ✲
perforate	0
striato reticulate	1
reticulate	2
ฝัก	
รูปร่างฝัก	SPOD ✲
ขอบไม่ขนาน ปลายสุดเป็นจะงอย กว้าง : ยาว ประมาณ 1 : 7	0
ขอบขนาน กว้าง : ยาว ประมาณ 1 : 11	1
ขอบขนาน กว้าง : ยาว ประมาณ 1 : 6	2
สันของฝัก	RPOD ✲
ไม่มีสัน	0
มีสัน	1
เมล็ด	
รูปร่างเมล็ด	SSEE ✲
รูปกลม	0
รูปกลมรี	1
รูปไต	2

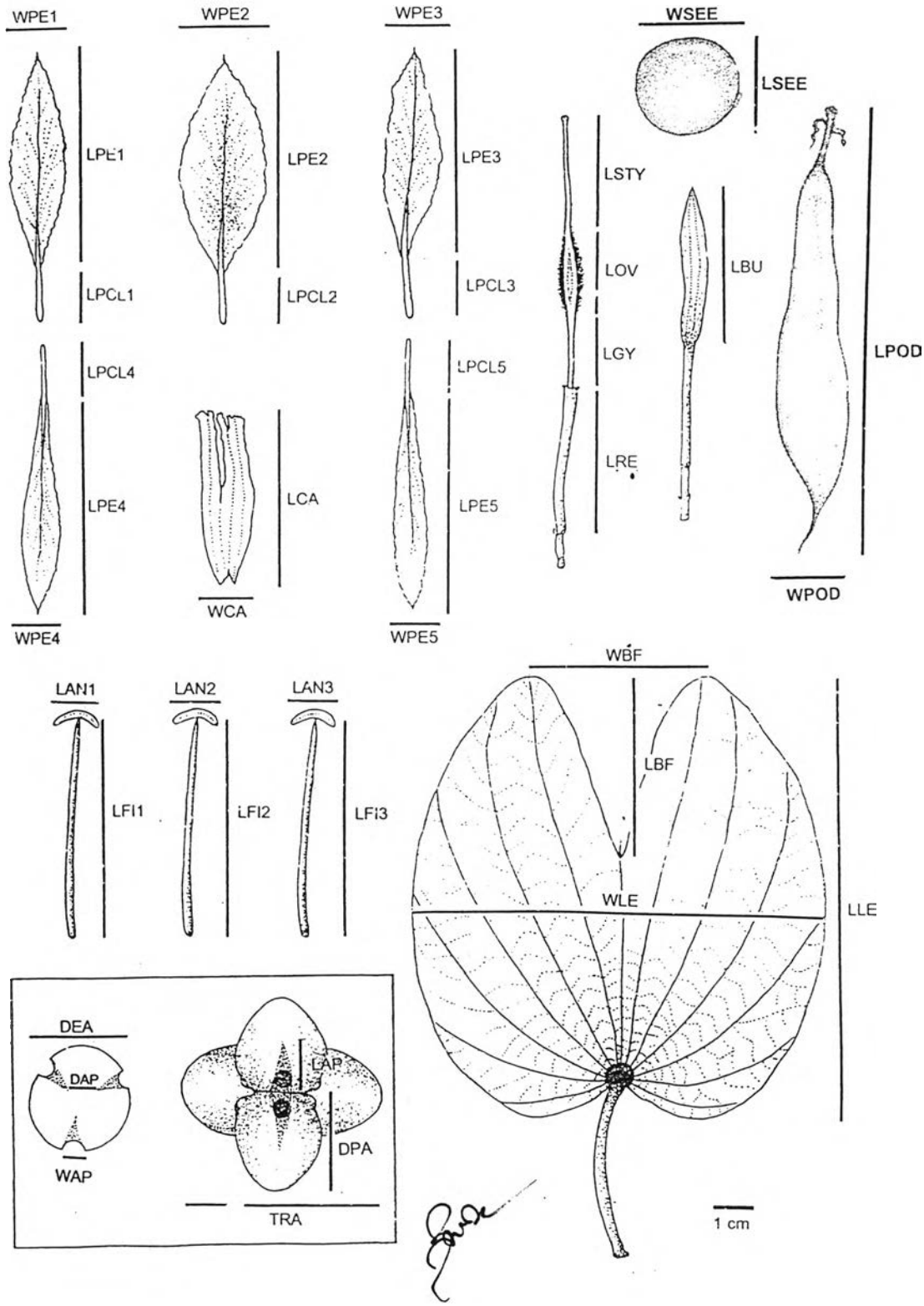
✲ หมายถึง ลักษณะที่ใช้เฉพาะการศึกษาเปรียบเทียบชงโคดำกับชงโคและกาหลง

ตารางที่ 3.6 ลักษณะสัณฐานวิทยาของใบ ดอก เรณู ฝัก และเมล็ดที่เป็นข้อมูลเชิงปริมาณ

ลักษณะ	สัญญลักษณ์
ใบ	
ความกว้างใบ	WLE
ความยาวใบ	LLE
ความกว้างรอยเว้าปลายใบ	WBF
ความลึกรอยเว้าปลายใบ	LBF
จำนวนเส้นใบ	NSV
ดอก	
ความกว้างกลีบเลี้ยง	WCA
ความยาวกลีบเลี้ยง	LCA
ความกว้างกลีบดอก 1-5	WPE 1-5
ความยาวกลีบดอก 1-5	LPE 1-5
ความยาวก้านกลีบดอก 1-5	LPCL 1-5
ความยาวอับเรณู 1-3	LAN 1-3
ความยาวก้านชูอับเรณู 1-3	LFI 1-3
อัตราส่วนความยาวอับเรณูตำแหน่งที่ติดกับก้านชูอับเรณู	RAF
จำนวนเกสรเพศผู้ที่สมบูรณ์	NFST
ความยาวก้านเกสรเพศเมีย	LSTY
ความยาวรังไข่	LOV
ความยาวก้านชูเกสรเพศเมีย	LGY
ความยาวฐานดอก	LRE
จำนวนดอกตูมต่อ 1 ช่อดอก	NBU
ความยาวดอกตูมที่ยาวที่สุดในช่อดอก	LBU
อัตราส่วนความยาวดอกตูมต่อความยาวฐานดอกของดอกตูม	RBR
เรณู	
เส้นผ่านศูนย์กลางกลุ่มเรณูในสภาพ tetrad	TRA
เส้นผ่านศูนย์กลางเรณูแนว polar axis	DPA
เส้นผ่านศูนย์กลางเรณูแนว equatorial axis	DEA
ระยะห่างระหว่างปลายสุดของช่องเปิดเรณู	DAP

ตารางที่ 3.6 (ต่อ)

ลักษณะ	สัญญลักษณ์
ความกว้างช่องเปิดเรณู	WAP
ความยาวช่องเปิดเรณู	LAP
polar field index	PFI
จำนวน verrucae	NVR
ฝัก	
ความกว้างฝัก	WPOD
ความยาวฝัก	LPOD
เมล็ด	
ความกว้างเมล็ด	WSEE
ความยาวเมล็ด	LSEE
จำนวนเมล็ดต่อฝัก	NSEE



แผนภาพที่ 3.2 การวัดลักษณะสัณฐานวิทยาของใบ ดอก เรณู ฝัก และเมล็ด ของชงโคดำ