บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุอุปกรณ์

1.1 อุปกรณ์สำหรับใช้ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา

1.1.1 อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างพืชจากถิ่นอาศัยธรรมชาติ

1. กรรไกรตัดกิ่งไม้
2. ถุงพลาสติกขนาด 24x30 ตารางนิ้ว และถุงกระดาษขนาด 2.5x4 ตารางนิ้ว
3. กระดาษหนังสือพิมพ์
4. ถังพลาสติกพร้อมฝาปิด
5. ทรายแม่น้ำที่ล้างสะอาด
6. ฮอร์โมนเร่งราก Seradin เบอร์ 2
7. vernier carliper
8. eyepiece และ stage micrometer
9. กล้องจุลทรรศน์ชนิดคอมพาวด์
10. กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ
11. ชุดโปรแกรมวิเคราะห์สถิติ SPSS/PC+ รุ่น 3

1.1.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของละอองเรณู

1. ตัวอย่างดอกตูมที่มีกลีบดอกปรากฏให้เห็นและมีสีม่วงชมพู
2. บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร
3. ภาชนะกรองละอองเรณูที่มีรูขนาด 100 ไมโครเมตร
4. หลอดเซนทริฟิวจ์
5. ขวดเก็บละอองเรณูขนาดเล็ก
6. หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร

7. ไมโครปิเปตขนาดบรรจุ 1-5 มิลลิลิตร
8. เครื่องเซนทริฟิวจ์
9. warm plate
10. slide และ cover glass
11. สารละลาย NaOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์
12. glacial acetic acid
13. acetic anhydride
14. conc. sulfuric acid
15. ethanol 70 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์
16. benzene
17. silicone oil มีค่าความหนืด 2000 cts.
18. paraffin B.P. 56-58 องศาเซลเซียส
19. xylene
20. กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์
21. กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกนชนิด JEOL JSM-T220A

1.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเมล็ด

1. เมล็ดที่สมบูรณ์จากโคลงเคลงขนแต่ละประชากร
2. กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์พร้อม eyepiece micrometer
3. กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกนชนิด JEOL JSM-T220A

1.1.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นกล้า

1. petri dish
2. กระดาษกรอง
3. เมล็ดที่สมบูรณ์จากโคลงเคลงขนแต่ละประชากร

1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา isozyme electrophoresis

1. ตัวอย่างใบคู่ที่ 3 นับจากปลายยอด
2. เครื่องอิเลกโตรโฟรีซิสชนิดแผ่นแบบตั้ง
3. ตู้เย็นและตู้แช่เย็น
4. เครื่องเซนทริฟิวจ์ที่ปรับอุณหภูมิได้
5. mortar และ pestle
6. magnetic stirrer
7. เครื่องชั่ง
8. หลอด appendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
9. บิกเกอร์ขนาด 50 100 1000 มิลลิลิตร

10. กล่องพลาสติกใสขนาดต่าง ๆ

11. ปิเปต ไมโครปิเปต กระบอกตวง ขวดวัดปริมาตร

1.3 อุปกรณ์เก็บตัวอย่างดิน

1. เครื่องเจาะดินของ LaMotte Chemical Products Company

2. ถุงพลาสติกชนิดปิดปากถุงได้

3. ตะแกรงร่อนดินขนาดตาข่าย 1x1 ตารางมิลลิเมตร

2. วิธีการศึกษา

2.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา

2.1.1 การออกเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างพืชในพื้นที่ที่ระบุในบทที่ 2 โดยตัวอย่างพืชที่เก็บในแต่ละพื้นที่แยกเก็บ ดังนี้

1. ตัวอย่างใบ การเก็บทำโดยเก็บกิ่งที่มีใบคู่ที่ 2 ถึงคู่ที่ 5 นับจากปลายกิ่ง สมบูรณ์คือไม่ถูกทำลายและไม่เป็นโรค และเก็บ 1 กิ่งต่อ 1 ต้น เป็นจำนวน 100 กิ่งต่อพื้นที่ นำใบคู่ที่ 3 และกิ่งที่มีปล้องที่ 2 และ 3 มาศึกษา

2. ตัวอย่างดอก การเก็บทำโดยเก็บกิ่งที่มีช่อดอกที่มีดอกบานแล้ว เก็บ 1 กิ่งต่อ 1 ต้น เป็นจำนวน 100 กิ่งต่อพื้นที่ แล้วนำแต่ละกิ่งมาแยกส่วน คือ ส่วน calyx tube (hypanthium) และ calyx lobe ส่วนของกลีบดอก ส่วนของเกสรตัวผู้ทั้งสั้นและยาว และส่วนก้านเกสรตัวเมีย (style)

3. เก็บกิ่งในแต่ละพื้นที่จำนวน 10 กิ่งต่อพื้นที่ โดยตัดกิ่งที่มีอายุมากให้มีความยาวประมาณ 6 นิ้ว ตัดโคนเฉียง จุ่มน้ำให้โคนเปียก 1-2 เซนติเมตรแล้ว จุ่มใน saredin เบอร์ 2 (ให้เคาะกิ่งเพื่อให้ฮอร์โมนที่มากเกินไปออก) แล้วปักในถังพลาสติกที่มีทรายอยู่ รดน้ำให้ชุ่มและปิดฝาไว้

4. เก็บเมล็ดในแต่ละพื้นที่ โดยเก็บผลที่แตกแล้วใส่ถุงกระดาษ นำมาผึ่งลมให้แห้ง ขยี้เอาแต่เมล็ดไว้ เก็บใส่ถุงกระดาษ เขียนชื่อพื้นที่ที่เก็บเมล็ดมาบนถุงกระดาษแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20±2 องศาเซลเซียส

นำตัวอย่างใบและตัวอย่างดอกที่เก็บและผึ่งลมแล้วมาวัดขนาดของส่วนต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 3.1 จากนั้นทำการวิเคราะห์เทคนิคการวิเคราะห์ปัจจัย (factor analysis) และการวิเคราะห์จัดจำแนก (discriminant analysis) โดยแยกวิเคราะห์เป็นลักษณะต้นพืช (10 ลักษณะแรก) และลักษณะดอก (13 ลักษณะ) และเพื่อให้ข้อมูลทุกตัวแปรมี

การกระจายแบบปกติ (multinormality) ได้ทำการแปลง (transform) ข้อมูลดิบก่อนแล้วจึงนำข้อมูลที่ได้เข้าสู่การวิเคราะห์ การแปลงข้อมูลดิบใช้ฟังก์ชันดังนี้ (Baum and Bailey, 1984)

ตัวแปรที่ได้จากการวัด แปลงข้อมูลโดยใช้ logarithmic function ฐาน 10

ตัวแปรที่ได้จากการนับ แปลงข้อมูลโดยใช้ รากที่สอง

สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยการวิเคราะห์จัดกลุ่มไม่ต้องทำการแปลงข้อมูล แต่ให้ทำเป็นค่าคะแนนมาตราฐานก่อนนำเข้าสู่การวิเคราะห์

2.1.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาและลวดลายของละอองเรณู

2.1.2.1 การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์

การเก็บดอกที่จะนำละอองเรณูมาศึกษาทำโดยเก็บดอกตูมที่ใกล้บานหรือดอกที่บานได้เล็กน้อยใส่ถุงกระดาษ นำมาผึ่งลมให้แห้ง แล้วเก็บใส่ถุงกระดาษ วิธีการศึกษาได้เตรียมละอองเรณูที่ใช้ศึกษาโดยวิธีการ acetolysis ตามวิธีซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของโกสุม พีระมาน (2522) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Erdtman (1952) มีขั้นตอนดังนี้

1. นำอับเรณูมาต้มในสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที แล้วกรองด้วยภาชนะกรองละอองเรณู

2. รินสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่กรองไว้ลงในหลอดเซนทริฟิวจ์ แล้วนำเข้าเครื่องเซนทริฟิวจ์

3. รินสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งและระวังอย่าให้ละอองเรณูที่ตกตะกอนอยู่ด้านล่างกระจายหลุดออกมา เติมน้ำกลั่นลงไปเพื่อล้างสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ที่เหลืออยู่ นำไปเข้าเครื่องเซนทริฟิวจ์ รินน้ำกลั่นทิ้ง ทำเช่นนี้ 2-3 ครั้ง

4. เติม glacial acetic acid เพื่อล้างน้ำกลั่นออก นำไปเข้าเครื่องเซนทริฟิวจ์แล้วรินกรดทิ้ง

5. เตรียม acetolysis mixture โดยใช้ conc. sulfuric acid 1 ส่วนผสมกับ acetic anhydride 9 ส่วน ระวังอย่าให้ภาชนะที่ใช้เตรียมมีน้ำอยู่เพราะอาจเกิดระเบิดได้

6. เติม acetolysis mixture ที่เตรียมไว้ แล้วนำไปอุ่นในบิกเกอร์ที่ต้มน้ำไว้จนเดือด นาน 30 ถึง 60 วินาที แล้วนำไปเข้าเครื่องเซนทริฟิวจ์ ริน acetolysis mixture ทิ้ง

7. เติม glacial acetic acid เพื่อล้าง acetolysis mixture นำไปเข้าเครื่องเซนทริฟิวจ์ แล้วรินทิ้ง

ตารางที่ 3.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ปัจจัย การวิเคราะห์จัดจำแนกและการวิเคราะห์จัดกลุ่ม

ลักษณะ	ที่มาของข้อมูล
ตัวอย่างใบ	
LEL	ความยาวของแผ่นใบ
LEW	ความกว้างของแผ่นใบ
PTL	ความยาวของก้านใบ
PHL	ความยาวของขนที่ก้านใบ
PML	ความยาวของขนที่เส้นกลางใบ
UNL	ความยาวของปล้องระหว่างข้อที่ 2 กับข้อที่ 3
LNL	ความยาวของปล้องระหว่างข้อที่ 3 กับข้อที่ 4
HDU	ความหนาแน่นของขนบนแผ่นใบด้านบน
HDL	ความหนาแน่นของขนบนแผ่นใบด้านล่าง
APA	มุมของปลายใบวัดจากปลายใบลงมา 5 มิลลิเมตร
ตัวอย่างดอก	
NFI	จำนวนดอกต่อช่อ
HYL	ความยาวของ hypanthium
HYW	ความกว้างของ hypanthium
PDL	ความยาวของก้านดอก
CLL	ความยาวของ calyx lobe
CLW	ความกว้างของ calyx lobe
PEL	ความยาวของกลีบดอก
PEW	ความกว้างของกลีบดอก
LFL	ความยาวของก้านชูอับเรณูของเกสรตัวผู้ชนิดยาว
SFL	ความยาวของก้านชูอับเรณูของเกสรตัวผู้ชนิดสั้น
LAL	ความยาวของอับเรณูของเกสรตัวผู้ชนิดยาว
SAL	ความยาวของอับเรณูของเกสรตัวผู้ชนิดสั้น
STY	ความยาวของก้านเกสรตัวเมีย

8. เติมน้ำกลั่นเพื่อล้าง glacial acetic acid นำไปเข้าเครื่องเซนทริฟิวจ์ แล้วเททิ้ง ทำเช่นนี้ 2-3 ครั้ง

9. ทำ dehydration โดยใช้ ethyl alcohol 70 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยเติมลงไปแล้วนำไปเข้าเครื่องเซนทริฟิวจ์ และเทอัลกอฮอล์ทิ้ง

10. เมื่อถึงขั้นตอนที่เท ethyl alcohol 100 เปอร์เซ็นต์ทิ้ง ให้คว่ำหลอดเซนทริฟิวจ์ให้อัลกอฮอล์ระเหยไปให้หมด แล้วเติมเบนซีนลงไป เขย่าให้ละอองเรณูกระจาย แล้วเทลงขวดขนาดเล็กที่ใช้เก็บละอองเรณู หยด silicone oil ลงไป 3-4 หยด ตั้งขวดทิ้งไว้ รอจนเบนซีนระเหยไปหมดค่อยปิดฝาให้สนิท

11. การนำละอองเรณูที่เตรียมไว้มาศึกษาทำได้ดังนี้

11.1 เปิด warm plate ตั้งอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส

11.2 ใช้เข็มเขี่ยแตะเอา silicone oil ที่มีละอองเรณูกระจายอยู่ แล้วนำมาหยดลงบน slide ปิดด้วย cover glass

11.3 ใช้เข็มเขี่ยแตะเอาพาราฟินที่ชุดเป็นแผ่นบาง ๆ วางไว้ที่ขอบของ cover glass แล้วนำ slide วางบน warm plate รอจนพาราฟินละลายแทรกเข้าไปใต้ cover glass จนเต็ม จึงยก slide ออก นำไปวางในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า warm plate รอจนพาราฟินแข็งตัวดีแล้ว ใช้ xylene เช็ด slide ให้สะอาด

12. นำ slide ที่เตรียมได้มาวัดขนาดของละอองเรณูในแนว polar และ equator ด้วย eyepiece micrometer ที่เทียบค่าจาก stage micrometer แล้ว โดยวัด 100 grain ต่อตัวอย่างที่เก็บมาแต่ละพื้นที่ นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์สถิติ SPSS PC+ รุ่นที่ 3 โดยทำการทดสอบสถิติเบื้องต้นและการวิเคราะห์จัดจำแนก และหารูปร่างของละอองเรณูโดยนำค่าขนาดตามแนว polar หารด้วยขนาดในแนว equator แล้วเปรียบเทียบกับค่าที่ Erdtman (1952) ได้กำหนดไว้สำหรับหารูปร่างของละอองเรณู

หมายเหตุ ในการเซนทริฟิวจ์ ใช้ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ตลอดการศึกษา

2.1.2.2 การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนแบบสแกน

1. วางอับเรณูไว้ในจานแก้วแล้วนำไปวางไว้ใน descicator
2. นำอับเรณูที่แห้งมาหัก แล้วเคาะให้ละอองเรณูหล่นบน stub
3. เคลือบผิวละอองเรณูด้วยทองผสมพาลาเดียม
4. ศึกษารูปร่างและผิวของละอองเรณูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนชนิด JEOL JSM-T220A และบันทึกภาพ

2.1.3 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเมล็ด

1. วัดความกว้างและความยาวของเมล็ดจำนวน 25 เมล็ดต่อประชากร

2. ศึกษาลักษณะผิวของเมล็ดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนแบบสแกน

2.1 นำเมล็ดมาวางบน stub ใช้เข็มเขี่ยจัดให้เมล็ดวางตัวให้ด้านข้างของเมล็ดหงายขึ้น แล้วนำ stub วางใน descicator

2.2 นำ stub เข้าเครื่องเคลือบผิวเมล็ดด้วยทองผสมพาลาเดียม

2.3 นำไปศึกษาลักษณะผิวของเมล็ดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนชนิด JEOL JSM-T220A และบันทึกภาพ

2.1.4 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นกล้า

1. นำเมล็ดมาเพาะใน petri dish ที่มีกระดาษกรองรองอยู่และรดน้ำให้ชุ่ม

2. วัดลักษณะของต้นกล้าดังแสดงในตารางที่ 3.2 โดยวัดจากต้นกล้าจำนวน 25 ต้นต่อประชากร

ตารางที่ 3.2 ลักษณะของต้นกล้าที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ปัจจัยและการวิเคราะห์จัดจำแนก

ลักษณะ	ที่มาของข้อมูล
STEMLEN	ความยาวของลำต้นวัดจากโคนถึงข้อบนสุด
LEAFLEN	ความยาวของใบคู่แรก
LEAFWID	ความกว้างของใบคู่แรก
ROOTLEN	ความยาวของรากที่เกิดจาก radicle วัดจากโคนต้น
ROOTNO	จำนวนรากแขนง
INTERNO	จำนวนปล้อง

3. วิเคราะห์ข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ปัจจัยและการวิเคราะห์จัดจำแนก

2.2 การทำ isozyme electrophoresis

วิธีการที่ใช้คือเจลอิเลกโตรโฟริซิสแบบตั้ง (verticle-slab gel electrophoresis) ชนิด polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ตามวิธีการของ Akroyd (1967) (อ้างถึงในสุจิตรา จางตระกูลและคณะ, 2534) มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมกระจกสำหรับเตรียม polyacrylamide gel ในการเตรียมกระจก 1 ชุดสามารถใช้เตรียมเจลได้ 2 แผ่น

2. เตรียม running gel (separating gel) (ใช้สำหรับเจล 2 แผ่น ดูวิธีเตรียมในภาคผนวก)

2.1 ผสมสารละลาย A กับ B อัตราส่วน 20:20 มิลลิลิตร

2.2 เตรียมสารละลาย C

2.3 นำสารละลายในข้อ 2.1 และ 2.2 มาดูดอากาศ

2.4 ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกันในอัตราส่วน 1:1 แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง magnetic stirrer เบา ๆ นาน 1 นาที ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ

2.5 ค่อย ๆ เทสารละลายที่ได้ลงในช่องว่างระหว่างกระจก โดยให้สารละลายในช่องว่างสูงถึงระดับที่กำหนดไว้ ถ้าสารละลายอยู่สูงเกินกว่าระดับให้ใช้ suction ดูดสารละลายส่วนเกินออก

2.6 เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรเหนือสารละลายด้วยไมโครปิเปต ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงเพื่อให้เกิด polymerization

2.7 ใช้ suction ดูดน้ำส่วนที่อยู่เหนือเจลออกให้หมด

3. การเตรียม spacing gel

3.1 ผสมสารละลาย D E และ F ในอัตราส่วน 10:20:10 มิลลิลิตร แล้วดูดอากาศออก

3.2 เติมสารละลายที่ได้ลงในช่องว่างระหว่างกระจกจนถึงระดับที่อยู่ต่ำกว่าขอบกระจก 0.5 เซนติเมตร

3.3 เอา wel comb มาเสียบระหว่างกระจก ค่อย ๆ เอียงใส่จากซ้ายไปขวา ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ

3.4 ใช้ suction ดูดเจลที่ล้นออกมาทิ้งไป

3.5 นำไปวางไว้ในที่มีแสงเพื่อให้เกิด polymerization นาน 20 นาที

3.6 เมื่อสังเกตเห็นว่าเจลมีลักษณะขาวขุ่น ทิ้งไว้อีก 10 นาที แล้วจึงค่อย ๆ ดึง wel comb ออก จะได้ wel slot ที่ spacing gel

3.7 ล้าง wel slot โดยค่อย ๆ เติมสารละลายอิเลกโทรดบัฟเฟอร์ (Dilute Reservior Buffer, Dil.R.B.) ลงไปแล้วดูดออกด้วย suction ทำ 2-3 ครั้ง

4. เตรียมสารละลายอิเลกโทรดบัฟเฟอร์

4.1 เตรียม Dil.R.B. ปริมาตร 5,000 มิลลิลิตร

4.2 เปิดระบบควบคุมความเย็น (cooling system) เพื่อให้สารละลายอิเลกโทรดบัฟเฟอร์มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปิดไว้ก่อนที่จะใส่สารละลายที่มีไอโซไซม์ที่สกัดมาจากตัวอย่างพืชนาน 2 ชั่วโมง

5. เตรียมสารละลายที่ใช้ในการสกัดไอโซไซม์จากตัวอย่างพืช ซึ่งเรียกว่า extract buffer โดยเตรียมเป็น stock solution ไว้แล้ว คือ สารละลาย G H I และ J

6. ตัวอย่างพืชที่ใช้คือใบที่เก็บจากต้นพืชในธรรมชาติ

7. การสกัดไอโซไซม์จากตัวอย่างพืช

7.1 ชั่งตัวอย่างใบ 140 มิลลิกรัมและเติม polyvinyl pyrrolidone (PVP) 50 มิลลิกรัมเพื่อลดการเกิดออกซิเดชัน และเติม extract buffer สูตร e (ดูวิธีเตรียมจากภาคผนวก) 700 ไมโครลิตร ลงใน mortar ที่สะอาดและเย็น บดด้วย pestle ที่เย็น ขณะที่บดต้องแช่ในน้ำแข็ง เพื่อรักษา activity ของไอโซไซม์ บดจนตัวอย่างพืชละเอียดเป็นเนื้อเดียว แล้วใส่ในหลอด appendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

7.2 นำไปเซนทริฟิวจ์ที่ 13,000 รอบต่อนาที ประมาณ 30 นาที ที่ 0 องศาเซลเซียส

7.3 ดูดเอาสารละลายตอนบน (supernatant) ใส่ลงในหลอด appendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสและสามารถเก็บไว้ได้นาน 1 สัปดาห์

8. การเติมสารละลายที่มีไอโซไซม์ที่สกัดจากพืชลงบนแผ่นเจล

8.1 ประกบกระจกที่มีเจลที่เตรียมในข้อ 3. กับ cooling system ในข้อ 4. ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศระหว่างกระจกกับ cooling system แล้วเติม Dil. R.B. ลงบนตอนบนของ cooling system

8.2 เติมสารละลาย BPB-Tris-Glycine ซึ่งเป็น dye marker ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน wel slot ทุก ๆ 3 หรือ 5 ช่องเพื่อง่ายต่อการเติมสารละลายที่ได้ในข้อ 7.3 และใช้ติดตามการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์

8.3 ใช้ไมโครปิเปตขนาด 100 ไมโครลิตรดูดสารละลายที่ได้ในข้อ 7.3 ปริมาตร 40 ไมโครลิตรแล้วเติมลงใน wel comb โดยเว้นช่องแรกและช่องสุดท้าย

8.4 เติมสารละลาย BPB-Tris-Glycine ลงใน Dil.R.B. ที่อยู่ตอนบนของ cooling system

9. การปฏิบัติการอิเลกโตรฟอริซิส (running electrophoresis)

9.1 ต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับแหล่งจ่ายไฟกระแสตรง แล้วเปิดแหล่งจ่ายไฟฟ้า โดยควบคุมให้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 50 มิลลิแอมแปร์ต่อเจล 2 แผ่น

9.2 สังเกต dye marker ที่กำลังเคลื่อนที่ลงมาให้อยู่ห่างจากขอบกระจกด้านล่างประมาณ 0.5 นิ้ว จึงปิดแหล่งจ่ายกระแสไฟฟ้า

10. การย้อมสีจำเพาะไอโซไซม์

10.1 นำเจลที่ผ่านการแยกไอโซไซม์จากข้อ 9. มาย้อมด้วยสีจำเพาะซึ่งในการศึกษานี้คือ เปอร์ออกซิเดสและเอสเทอเรส (ดูวิธีการในภาคผนวก)

10.2 นำเจลที่ผ่านการย้อมสีและตากให้แห้งมาถ่ายรูป และเขียนแบบ-แผนของไอโซไซม์แต่ละระบบ โดยใช้ค่า R_f ที่คำนวนได้จากสูตร

$$R_f = \frac{\text{distance protein has migrated from origin}}{\text{distance from origin to tracking dye}}$$

10.3 เปรียบเทียบแบบแผนของไอโซไซม์ของโคลงเคลงขนแต่ละประชากร

2.3 การศึกษาลักษณะนิเวศวิทยาของถิ่นอาศัยของโคลงเคลงขนแต่ละประชากร

2.3.1 การวิเคราะห์ลักษณะของดิน

เก็บดินตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีการเก็บดินของ แสงจันทร์ ศรีสายเชื้อ (2532) ดังนี้ ใช้เครื่องเจาะดินของ LaMotte Chemical Products Company เจาะดินลึกลงไปจากผิวดิน 10 นิ้วในแนวดิ่งบริเวณใกล้โคนต้นพืช หมุนเครื่องเจาะแล้วค่อย ๆ ดึงเครื่องเจาะขึ้นตรง ๆ เก็บดินในช่วง 8 นิ้ววัดจากปลายที่เจาะดิน ทำการเก็บตัวอย่างดิน 5 จุดต่อพื้นที่ จากนั้นนำมาทุบให้ดินแตกละเอียดและผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำมาร่อนด้วยตะแกรงเพื่อขจัดชิ้นส่วนของพืชและก้อนหินออก ในแต่ละพื้นที่แบ่งตัวอย่างดินแต่ละจุดออกเป็น 2 ส่วน นำดินแต่ละจุดมา 1 ส่วน รวมกันใส่ถุงพลาสติกและติดฉลากระบุชื่อพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างดิน แล้วส่งวิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบและคุณสมบัติของดิน ได้แก่ ความเป็นกรดเบส (pH) สารประกอบอินทรีย์ (OM) ฟอสฟอรัสที่พืชนำไปใช้ได้ (P) โปแตสเซียมที่พืชนำไปใช้ได้ (K) โซเดียม (Na) แคลเซียม (Ca) และแมกนีเซียม (Mg) ที่กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ สำหรับตัวอย่างดินอีก 1 ส่วนให้เก็บใส่ถุงพลาสติกแยกกันแต่ละตัวอย่างและเขียนชื่อพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างดิน

2.3.2 ข้อมูลภูมิอากาศ

ได้จากกองภูมิอากาศ กรมอุตุนิยมวิทยา ประกอบด้วยข้อมูลปริมาณน้ำฝนรวมในแต่ละเดือน อุณหภูมิเฉลี่ยในแต่ละเดือน และความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศเฉลี่ยในแต่ละเดือนระหว่างช่วงปี พ.ศ.2523-2533 ข้อมูลภูมิอากาศดังกล่าวเก็บจากพื้นที่ที่มีสถานีตรวจวัดอากาศของกรมอุตุนิยมวิทยาหรือพื้นที่ใกล้เคียงกับพื้นที่ที่ทำการศึกษา