บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม

วัสดุและอุปกรณ์

1. โป๊ยเซียนจำนวน 6 พันธุ์
2. พู่กัน
3. ผ้าตาข่ายบางสีขาว
4. ที่หนีบกระดาษหรือเชือก
5. แผ่นป้าย (label)
6. แว่นขยาย
7. แอลกอฮอล์
8. กระบะเพาะ
9. วัสดุเพาะที่มีส่วนผสมของทรายร่อน : ขุยมะพร้าวร่อน อัตราส่วน 1 : 1
10. กระถางพลาสติกขนาด 6 นิ้ว
11. วัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของดินร่วน : เปลือกข้าว : เปลือกถั่ว : ปุ๋ยคอก อัตราส่วน 1 : 1 : 1 : 1
12. ปุ๋ยออสโมโค้ทสูตร 14 : 14 : 14
13. ปุ๋ยให้ทางใบสูตร 12 : 24 : 12

วิธีการวิจัย

1.1 <u>การเลือกลูกผสม</u>

เลือกพันธุ์ที่มีลักษณะดอกต่างกัน 6 พันธุ์ คือ

FS1	=	พันธุ์ที่มีดอกสีชมพู
FS2	=	พันธุ์ที่มีดอกสีเหลืองจุดแดง
FS3	=	พันธุ์ที่มีดอกสีแดงขนาดเล็ก
FS4	=	พันธุ์ที่มีดอกสีแดงขนาดใหญ่
FS5	=	พันธุ์ที่มีดอกสีขาว
FS6	=	พันธุ์ที่มีดอกสีเหลือง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

โดย การศึกษาการกระจายตัวของพ่อและแม่

FS1 x FS1, FS2 x FS2, FS4 x FS4, FS5 x FS5, FS6 x FS6

การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะจุดประบนกลีบดอก

FS1 x FS2, FS2 x FS4, FS2 x FS5, FS2 x FS6

การถ่ายทอดลักษณะสีดอก

FS1 x FS4, FS1 x FS5, FS4 x FS5, FS4 x FS6

การศึกษาขนาดดอก

FS3 x FS4

1.2 <u>การผสมพันธุ์</u>

<u>การเตรียมดอกที่ใช้เป็นดอกตัวเมีย</u>

ดอกที่ใช้ต้องมั่นใจว่าไม่ได้ถูกผสมพันธุ์มาก่อน โดยต้องคลุมถุงผ้าตาข่ายขาวบาง ขณะที่ดอกยังตูมอยู่ รอจนกว่าดอกจะพร้อมรับการผสม โดยสังเกตได้จากน้ำเหนียว ๆ บริเวณต่อมน้ำหวานและบนยอดเกสรตัวเมีย ที่แยกเป็น 3 แฉก

<u>การเตรียมดอกที่จะใช้เป็นดอกตัวผู้</u>

คลุมดอกด้วยผ้าตาข่ายขาวบาง ขณะที่ดอกยังตูมอยู่ รอจนกว่าละอองเกสรจะแตกออกมา พร้อมที่จะนำไปผสม ซึ่งสังเกตได้จากละอองเกสรจะแตกเป็นขุยสีเหลือง

1.3 <u>วิธีการผสมพันธุ์</u>

ใช้พู่กันรวบรวมละอองเกสรใส่ในภาชนะเล็ก ๆ แล้วนำไปแตะบนเกสรตัวเมียของดอกตัวเมียที่พร้อมรับการผสม หลังจากการผสมเกสรแล้วห้อยป้ายที่บันทึกคู่ผสมและวันที่ผสม หลังจากนั้นประมาณ 1 เดือน เมล็ดจะดีดตัวตกลงบนถุงผ้า เป็นเมล็ดสีน้ำตาล จึงเก็บเมล็ดไปเพาะ

1.4 <u>การเพาะเมล็ด</u>

นำเมล็ดโป๊ยเซียนเพาะในกระบะเพาะเมล็ด โดยใช้วัสดุเพาะที่มีทรายร่อน : ขุยมะพร้าวร่อน ในอัตราส่วน 1 : 1 รดน้ำพอสมควร ตั้งไว้ในที่มีแสงแดดส่องรำไรประมาณ 10 วัน เมล็ดจะเริ่มงอกเป็นต้นกล้า

1.5 การปลูกและการดูแลรักษา

เมื่อต้นกล้ามีใบจริง 3 - 4 ใบ จึงย้ายปลูกในกระถางพลาสติกขนาด 3 นิ้ว ให้ปุ๋ยออสโมโค้ทสูตร 14 : 14 : 14

เมื่อต้นกล้าอายุได้ 3 เดือน จึงย้ายปลูกในกระถางพลาสติกที่มีขนาด 6 นิ้ว โดยใช้วัสดุปลูกคือ ดินร่วน ขุยมะพร้าว เปลือกข้าวและปุ๋ยคอก ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 : 1 การใส่ปุ๋ยจะใส่ปุ๋ยออสโมโค้ทสูตร 14 : 14 : 14 และให้ปุ๋ยทางใบสูตร 12 : 24 : 12

1.6 การบันทึกข้อมูล

ทำการบันทึก

1. สีดอก
2. ขนาดดอก
3. จำนวนดอกต่อช่อ
4. ความยาวก้านดอก
5. ขนาดก้านดอก
6. ความคงทนของดอก
7. ลักษณะดอก
8. ลักษณะใบ
9. ลักษณะหนาม

การทดลองที่ 2 อิทธิพลของพันธุ์และสภาพความยาววันที่มีต่อการเจริญและการออกดอกของโป๊ยเซียน

1. กิ่งชำของโป๊ยเซียนที่มีขนาดสม่ำเสมอ 2 พันธุ์ ได้แก่ PS1 และ PS2 พันธุ์ละ 6 กิ่ง
2. กระถางพลาสติกขนาด 6 นิ้ว
3. พลาสติกสีดำคลุมเพื่อให้พืชได้รับวันสั้น
4. Timer
5. หลอดไฟขนาด 60 วัตต์
6. เทอร์โมมิเตอร์
7. ไม้บรรทัด
8. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา
   8.1 ขวดแก้วสำหรับเก็บตัวอย่างพืช

8.2 แท่งไม้ที่ใช้ยึดเนื้อเยื่อที่ฝังพาราฟิน

8.3 สไลด์ และ แผ่นแก้วปิดสไลด์

8.4 เข็มเขี่ย

8.5 ตะเกียงแอลกอฮอล์

8.6 ขวดแก้วสำหรับย้อมสี

8.7 มีดผ่าตัด

8.8 เครื่องตัดล้อหมุน (rotary microtome)

8.9 เครื่องอุ่นสไลด์

8.10 ตู้อบ (hot air oven)

8.11 กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และ photomicroscope

9. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

9.1 น้ำยาหยุดการทำงานของเซลล์และรักษาสภาพเซลล์ ได้แก่ สารละลาย formalin acetic acid alcohol (FAA) ประกอบด้วยส่วนผสมของ

- เอธิลแอลกอฮอล์ 50 หรือ 70 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 90 มิลลิลิตร
- กรดกราเซียลอะซิติก จำนวน 5 มิลลิลิตร
- ฟอร์มาลีน จำนวน 5 มิลลิลิตร

9.2 น้ำยาสำหรับไปแทนที่น้ำในเซลล์ (dehydrating reagent) ประกอบด้วย น้ำกลั่น เอธิลแอลกอฮอล์ 90 เปอร์เซ็นต์ เอธิลแอลกอฮอล์ บริสุทธิ์ และ tertiary butyl alcohol (TBA) โดยผสมเป็นอัตราส่วนต่าง ๆ 5 ระดับ คือ 50 70 85 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางภาคผนวกที่ 5)

9.3 พาราฟิน ใช้เป็นสารตัวกลางสำหรับฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ

9.3.1 พาราฟินสำหรับใช้เป็นตัวกลางในการแทรกซึมเข้าไปในช่องว่างของเนื้อเยื่อ (infiltration) ใช้ส่วนผสมของพาราฟินเหลว (paraffin oil) กับ TBA อัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร

9.3.2 พาราพลาสต์ (paraplast) สำหรับใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding)

9.4 adhesive สำหรับใช้ยึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดกับแผ่นสไลด์

9.5 xylene สำหรับทำความสะอาดเนื้อเยื่อ

9.6 สี saffanin และ fast green สำหรับใช้ย้อมเนื้อเยื่อ

9.7 สารตัวกลางแคนาดาบาลซัม (Canada balsum) สำหรับใช้ทำสไลด์ถาวร

วิธีการวิจัย

2.1 การเตรียมต้นพืชทดลอง

นำกิ่งโป๊ยเซียนที่รวบรวมไว้ในโรงเรือนเพาะชำจำนวน 2 พันธุ์คือ PS1 และ PS2 ชำในขี้เถ้าแกลบประมาณ 20 วัน จึงย้ายปลูกลงในกระถางที่มีวัสดุปลูกคือ ดินร่วน ขุยมะพร้าว เปลือกข้าวและปุ๋ยคอกในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 : 1 โดยปริมาตร

2.2 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 2x2x4 ปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ 6 ซ้ำ ประกอบด้วย 3 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 พันธุ์ มี 2 พันธุ์คือ พันธุ์ PS1 และ PS2

ปัจจัยที่ 2 สภาพความยาววันคือ วันสั้นและวันยาว

ปัจจัยที่ 3 จำนวนวันที่ได้รับแสง คือ 20 40 60 และ 80 วัน

ดังนั้นในการทดลองที่ 2 จึงมีการทดลอง 16 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีใช้พืชทดลอง 6 กระถาง

2.3 ขั้นตอนการศึกษา

2.3.1 นำต้นโป๊ยเซียนที่ปลูกในกระถาง จัดให้ได้รับสภาพวันยาวพันธุ์ละ 6 กระถาง และสภาพวันสั้นพันธุ์ละ 6 กระถาง

2.3.2 การควบคุมวันสั้นและวันยาว ต้นโป๊ยเซียนที่จัดไว้ในสภาพวันสั้นได้รับแสง 10 ชั่วโมงต่อวัน คือระหว่างเวลา 8.00 น. - 18.00 น. ส่วนต้นที่ได้รับวันยาวได้แสงตอนกลางของช่วงมืดระหว่างเวลา 22.00 น. - 01.00 น.

2.3.3 การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของตาใบและตาดอกโดยการสุ่มตัวอย่างจากปลายยอดของต้นโป๊ยเซียนจากแต่ละกรรมวิธี นำมาศึกษาตามวิธีการ paraffin embedding technique ของ Johansen (1940) ตามขั้นตอนดังนี้

2.3.3.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ ทำโดยการตัดเนื้อเยื่อของอวัยวะที่ต้องการศึกษา นำไปแช่ในน้ำยาที่ทำให้หยุดการทำงานของเซลล์และรักษาสภาพเซลล์คือ น้ำยา FAA

2.3.3.2 การแทนที่น้ำในเซลล์เนื้อเยื่อ โดยการผ่านเนื้อเยื่อจาก FAA ไปตามระดับของน้ำยาที่มีส่วนผสมของเอธิลแอลกอฮอล์และ TBA ในอัตราส่วนต่าง ๆ กันตั้งแต่ระดับ 70 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำยาไปจนถึง 100 เปอร์เซ็นต์ของน้ำยา

2.3.3.3 การซึมผ่านพาราฟินเข้าไปในเนื้อเยื่อ และการฝังเนื้อเยื่อลงในพาราฟิน เมื่อเนื้อเยื่อผ่านน้ำยาสำหรับไปแทนที่น้ำในเซลล์ในระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ของน้ำยา แล้วนำเนื้อเยื่อไปแช่ไว้ใน paraffin oil ทิ้งไว้ข้ามคืนแล้วจึงนำไปแช่ไว้ในพาราพลาสต์ที่หลอมไว้ในขวดแก้วขนาดเล็ก แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 55 - 60° ซ เพื่อให้พาราพลาสต์ซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อ เมื่อพร้อมที่จะตัดเนื้อเยื่อจึงนำไปฝังในพาราพลาสต์เพื่อนำไปตัดเนื้อเยื่อต่อไป

2.3.3.4 การตัดชิ้นส่วน โดยใช้เครื่องไมโครโตมแบบล้อหมุน ตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อตามขวางและ/หรือตัดตามยาวตามความเหมาะสมให้ชิ้นส่วนมีความหนา 13 - 15 ไมครอน

2.3.3.5 การติดชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อลงบนแผ่นสไลด์ ใช้ adhesive เป็นตัวยึดให้ติดกับสไลด์

2.3.3.6 การย้อมสีเนื้อเยื่อทำได้โดยการนำสไลด์ ที่ติดชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อแล้วไปย้อมสีเนื้อเยื่อโดยใช้สี saffanin และ fast green โดยให้ผ่านขั้นตอนของการละลายพาราพลาสต์ ออกจากเนื้อเยื่อโดยใช้ xylene หลังจากนั้นจึงนำไปย้อมสีแล้วปิดแผ่นแก้วปิดสไลด์ โดยใช้ canada balsum เป็นตัวยึดแผ่นสไลด์ถาวร

2.3.3.7 นำเนื้อเยื่อไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope

2.4 การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลของพืชทดลองดังต่อไปนี้

2.4.1 ความสูงจากผิวดิน

2.4.2 จำนวนใบ

2.4.3 การแตกกิ่ง

2.4.4 การเกิดช่อดอก

2.4.5 จำนวนดอกต่อช่อ

การทดลองที่ 3 อิทธิพลของความเข้มแสงที่มีต่อการเจริญเติบโตและการออกดอกของโป๊ยเซียน

วัสดุและอุปกรณ์

1. กิ่งชำของโป๊ยเซียนที่มีขนาดสม่ำเสมอ 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ PS3 และ PS4
2. ปุ๋ยออสโมโค้ทสูตร 14 : 14 : 14
3. กระถางพลาสติกขนาด 6 นิ้ว
4. ตาข่ายพลาสติกสีดำเพื่อพรางแสง
5. เทอร์โมมิเตอร์
6. ไม้บรรทัด
7. เครื่องวัดแสง

วิธีการวิจัย

3.1 การเตรียมต้นพืชทดลอง

นำกิ่งโป๊ยเซียนที่รวบรวมไว้ในโรงเพาะชำจำนวน 2 พันธุ์คือ PS3 และ PS4 เลือกกิ่งที่มีขนาดสม่ำเสมอ ชำในขี้เถ้าแกลบประมาณ 20 วัน จึงย้ายลงปลูกในกระถางที่มีวัสดุปลูกคือ ดินร่วน ขุยมะพร้าว เปลือกข้าวและปุ๋ยคอกในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 : 1 โดยปริมาตร

3.2 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 2x4x7 ปัจจัยร่วม ทำ 5 ซ้ำ ประกอบด้วย 3 ปัจจัยคือ

ปัจจัยที่ 1 พันธุ์ มี 2 พันธุ์คือ PS3 และ PS4

ปัจจัยที่ 2 ความเข้มแสงมี 4 ระดับคือ 720 4,900 9,200 และ 63,000 ลักซ์

ปัจจัยที่ 3 จำนวนวันที่ได้รับแสงคือ 10 20 30 40 50 60 และ 70 วัน

ดังนั้นในการทดลองที่ 3 จึงมีการทดลอง 56 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีใช้พืชทดลอง 5 กระถาง

3.3 ขั้นตอนการศึกษา

นำต้นโป๊ยเซียนทั้ง 2 พันธุ์ พันธุ์ละ 5 ต้น ให้ได้รับความเข้มแสงในระดับต่าง ๆ โดย

กรรมวิธีที่ 1-7 และ 29-35 = พันธุ์PS3 และ PS4 ปลูกเลี้ยงในสภาพตู้พรางแสง ความเข้มแสง720 ลักซ์ โดยวัดในเวลา 12.00 น. ในวันที่มีแสงแดดเต็มที่

กรรมวิธีที่ 8-14 และ 36-42 = พันธุ์PS3 และ PS4 ปลูกเลี้ยงในสภาพตู้พรางแสง ความเข้มแสง 4,900 ลักซ์ โดยวัดในเวลา 12.00 น. ในวันที่มีแสงแดดเต็มที่

กรรมวิธีที่ 15-21 และ 43-49 = พันธุ์PS3 และ PS4 ปลูกเลี้ยงในสภาพโรงเรือนพรางแสง ความเข้มแสง 9,200 ลักซ์ โดยวัดในเวลา 12.00 น. ในวันที่มีแสงแดดเต็มที่

กรรมวิธีที่ 22-28 และ 50-56 = พันธุ์PS3 และ PS4 ปลูกเลี้ยงภายใต้สภาพธรรมชาติ ความเข้มแสง 63,000 ลักซ์ โดยวัดในเวลา 12.00 น. ในวันที่มีแสงแดดเต็มที่

นำค่าเฉลี่ยของ จำนวนใบ กับความเข้มแสง และความสูง กับความเข้มแสง มาหาความสัมพันธ์ ในลักษณะเชิงเส้นตรง (linear correlation)

3.4 การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลของพืชทดลองต่อไปนี้

3.4.1 ความสูงจากผิวดิน

3.4.2 จำนวนใบ

3.4.3 การแตกกิ่ง

3.4.4 การเกิดช่อดอกต่อต้น

3.4.5 จำนวนดอกที่เกิดต่อช่อ

การทดลองที่ 4 การศึกษาจำนวนโครโมโซม

วัสดุและอุปกรณ์

1. ปลายยอดโป๊ยเซียน พันธุ์ FS1, FS2, FS3 และ FS4
2. ขวดแก้วขนาดจุ 15 มิลลิลิตร สำหรับเก็บตัวอย่างยอด
3. สไลด์ และ แผ่นแก้วปิดสไลด์
4. เข็มเขี่ย
5. ตะเกียงแอลกอฮอล์
6. กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และ photomicroscope
7. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาจำนวนโครโมโซม
   - 7.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับการหยุดการสร้างเส้นใย spindle (pre - treatment) ได้แก่ para - dichlorobenzene
   - 7.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมน้ำยาในการหยุดการเจริญของเซลล์ และรักษาสภาพเซลล์ (fixative) คือ เอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะซิติกเข้มข้นในอัตราส่วน 3 : 1
   - 7.3 สารเคมีสำหรับทำให้เซลล์แยกออกจากกัน (hydrolytic solution) คือ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล
   - 7.4 สารเคมีที่ใช้ย้อมสีโครโมโซมคือ lactopropionic orcein และ carbol fuchsin

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมปลายยอดโดยตัดเฉพาะส่วนปลายยอดที่กำลังเจริญเติบโตโดยเก็บในเวลา 13.00 น.
2. การหยุดการเจริญของเส้นใยสปินเดิลของเซลล์โดยการแช่ปลายยอดในสารละลาย para - dichlorobenzene เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
3. รักษาสภาพเซลล์ นำยอดออกมาจากสารละลาย para - dichlorobenzene ล้างยอดให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำยอดไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์นาน 5 นาที จากนั้นล้างยอดด้วยน้ำกลั่น
4. แยกเซลล์โดยการแช่ยอดลงในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 60°ซ แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น
5. ย้อมสีเนื้อเยื่อในสีย้อม carbol fuchsin โดยแช่นาน 15 - 17 ชั่วโมง

6. ขยี้เนื้อเยื่อปลายยอดบนแผ่นสไลด์ หยดสี lactopropionic orcein 1 หยดตรงบริเวณที่ปลายยอดใช้เข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อปลายยอดให้แยกออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ปิดแผ่นแก้วปิดสไลด์ บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อใช้กระดาษซับวางบนแผ่นสไลด์ บริเวณที่ปิดแผ่นสไลด์ กดนิ้วหัวแม่มือลงไปเพื่อให้เซลล์กระจายและเป็นการซับสีที่มากเกินไปออก
7. นำแผ่นสไลด์ ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟส โดยเลือกเซลล์ที่มีโครโมโซมกระจายไม่ทับกัน นับจำนวนโครโมโซม แล้วทำการบันทึกภาพ
8. นำกลุ่มข้อมูลของแต่ละพันธุ์ไปวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวิธี one way classification

การทดลองที่ 5 การเก็บรักษาละอองเกสรของโป๊ยเซียน

วัสดุและอุปกรณ์

1. ละอองเกสรของโป๊ยเซียน พันธุ์ PS5 และ PS6
2. กล้องจุลทรรศน์ ชนิด compound microscope
3. silica gel
4. จานแก้ว กระดาษกรอง แท่งแก้ว
4. สไลด์ และหลอดหยด
5. ถาดใส่จานแก้ว
6. ขวดบรรจุละอองเกสร
7. อาหารเหลวเลี้ยงละอองเกสร ซึ่งประกอบด้วย

Stock mineral solution

H_3BO_3	0.10	g
$Ca(NO_3).4H_2O$	0.30	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.20	g
KNO_3	0.10	g
น้ำ	100	ml

Culture solution		
Stock mineral solution	1.0	ml
Sucrose	1.0	g
น้ำ	9.0	ml

วิธีการวิจัย

เก็บละอองเกสรของต้นโป๊ยเซียนจำนวน 2 พันธุ์คือ PS5 และ PS6 โดยเก็บละอองเกสรที่เพิ่งเริ่มแตก แบ่งใส่ขวดสำหรับเก็บละอองเกสรปิดฝาให้แน่นป้องกันการปนเปื้อน แบ่งใส่พันธุ์ละ 4 ขวด เพื่อนำไปเก็บรักษาใน 4 สภาพ ได้แก่

สภาพที่ 1 ปิดฝาขวดและเก็บในขวดใหญ่ที่ภายในบรรจุผลึก silica gel เก็บภายใต้สภาพอุณหภูมิสูง (38 - 40°ซ)

สภาพที่ 2 ปิดฝาขวดและเก็บในขวดใหญ่ที่ภายในบรรจุผลึก silica gel เก็บภายใต้สภาพอุณหภูมิห้อง (25 - 28°ซ)

สภาพที่ 3 ปิดฝาขวดและเก็บในขวดใหญ่ที่ภายในบรรจุผลึก silica gel เก็บภายใต้สภาพอุณหภูมิ 13 - 15°ซ

สภาพที่ 4 ปิดฝาขวดและเก็บในขวดใหญ่ที่ภายในบรรจุผลึก silica gel เก็บภายใต้สภาพอุณหภูมิ 4 - 6°ซ

สุ่มละอองเกสรมาทดสอบการงอก (pollen germination) ทุกครั้ง เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0 , 1 , 3 , 6 , 10 , 15 , 21 , 28 , 36 , 45 , 55 , 66 , 78 และ 91 วัน ตามลำดับ โดยสุ่มละอองเกสรมาเลี้ยงในหยดอาหารบนสไลด์ แผ่นละ 2 หยด (สไลด์ 1 แผ่นต่อ 1 พันธุ์) แล้วนำสไลด์ไปไว้ในจานแก้ว ที่ภายในรองพื้นด้วยกระดาษกรองชุ่มน้ำ เพื่อให้ความชื้นแก่ละอองเกสรที่กำลังเจริญในหยดอาหารและมีแท่งแก้วรองรับสไลด์ อีกครั้งหนึ่ง ปิดฝาจานแก้ว แล้วนำเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำสไลด์ออกมาตรวจนับการงอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

<u>การบันทึกข้อมูล</u>

จากหยดอาหาร 2 หยดต่อสไลด์ ต่อพันธุ์ สุ่มนับจำนวนละอองเกสรที่สามารถงอกท่อละอองเกสรได้ ต่อจำนวนละอองเกสรที่เห็นทั้งหมดหยดละ 10 ตำแหน่ง (พันธุ์ละ 20 ตำแหน่ง) แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ย การบันทึกการงอกของละอองเกสรจะ

เป็น - , + , ++ ,+++ และ ++++ หมายถึง ไม่งอกท่อ มีการงอกเฉลี่ยต่ำกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ มีการงอกเฉลี่ย 5 - 20 เปอร์เซ็นต์ มีการงอกเฉลี่ย 20 - 50 เปอร์เซ็นต์ และ มีการงอกเฉลี่ยมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การทดลองที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างพ่อแม่และลูกผสมโดยใช้เทคนิคทางอิเล็กโทรโฟรีซีส

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืช พันธุ์ FS1, FS4 และลูกผสมข้ามพันธุ์ระหว่างพันธุ์ FS1xFS4
2. สารเคมี

1.1 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ extraction buffer มีดังนี้

- Phosphate buffer 0.1 M pH 7.5
- Polyvinyl - pyrrolidone (PVP) 5%

1.2 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของเจลมีดังนี้

- Acrylamide stock solution (acrylamide 28 กรัมและ bis-acrylamide 0.74 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณ 100 มิลลิกรัม เก็บไว้ในขวดสีชา ที่ 4° ซ)
- Tris - chloride buffer pH 8.9 (กรองและเก็บไว้ในขวดสีชา)
- Tris - chloride buffer pH 6.7 (กรองและเก็บไว้ในขวดสีชา)
- Ammonium persulfate (APS) เตรียมทันทีก่อนใช้

1.3 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ marker dye solution

- Glycerol
- Tris - chloride buffer pH 6.7
- Bromophenol blue

1.4 สารเคมีที่ใช้เป็น electrode buffer

- Tris
- Glycine
- NaOH
- น้ำกลั่น

1.5 สารเคมีที่ใช้ย้อมเอนไซม์

- Phosphate buffer 0.1 M pH 6.0
- Fast blue B Salt
- α - naphthyl acetate
- Absolute alcohol
- 3-amino - 9 - ethylcarbazole
- β- naphthol
- Acetone
- Tris buffer 0.1 M pH 4
- Tris - (hydroxymethyl) aminomethane
- Acetic acid
- Hydrogenperoxide 3% (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

3. เครื่องทำความเย็น ตู้เย็นและตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20° ซ
4. เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบชนิดแผ่น (slab)
5. เครื่องหมุนเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็นได้ (refrigerated centrifuge)
6. เครื่องกวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer)
7. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
8. โกร่งบดตัวอย่าง
9. หลอดใส่สารขนาดเล็ก (eppendrof tube) ขนาด 5 มิลลิลิตร
10. หลอดใส่สารปรับปริมาตรได้ (syringe)
11. Micropipette ชนิดปรับปริมาตรได้ model pipeman
12. เครื่อง degasser
13. เครื่องชั่ง
14. อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น ถุงมือ ปากคีบ กระดาษชั่งสาร ช้อนตักสาร กระดาษติดป้าย แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ กล้องถ่ายรูป ฟิล์มถ่ายรูป ฯลฯ

วิธีการวิจัย

6.1. การเตรียมชิ้นส่วนพืชคือ นำใบแก่มาตัดเส้นใบโดยเลือกใบที่สะอาดไม่เป็นโรค เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20° ซ

6.2. การเตรียม stock และสารละลาย

6.2.1 Electrode buffer

Solution A Tris buffer pH 8.3 (x 10)

Tris	6.0	g
Glycine	28.8	g
H_2O ปรับปริมาตร	1,000	ml

ปรับ pH เป็น 8.3 โดย NaOH

หมายเหตุ Tris คือ Trizma base หรือ Tris (hydroxymethyl) aminomethane

6.2.2 Gel buffer

Solution B Tris-chloride buffer pH 8.9

HCl 1 N	48.00	ml
Tris	36.60	g
TEMED	0.23	ml
H_2O ปรับปริมาตร	100	ml

กรองและเก็บในที่มืด

Solution C Tris-chloride buffer pH 6.7

HCl 1 N	48.00	ml
Tris	5.98	g
TEMED	0.46	ml
H_2O ปรับปริมาตร	100	ml

กรองและเก็บในที่มืด

หมายเหตุ TEMED คือ N,N,N,N, - tetramethyl ethylendiamine

Solution D Acrylamide stock

Acrylamide	28.00	g

N,N - methylene bisacrylamide 0.74 g

H_2O ปรับปริมาตร 0.46 ml

กรองและเก็บในที่มืด

Solution $(NH_4)_2S_2O_8$ (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

6.2.3 Marker dye solution

Bromophenolblue 0.05 g

Solution C 10.00 ml

Glycerol 1.00 ml

เวลาผสม marker dye solution จะใช้เพียง 10% เท่านั้น

<u>วิธีเตรียมเจลความเข้มข้น 8.5%</u>

Running gel

- Solution B 7.50 ml
- Solution D 18.21 ml
- Solution $(NH_4)_2S_2O_8$ 300.00 µl
- น้ำกลั่น 34.29 ml

ผสมให้เข้ากันใส่ลงในระหว่างแผ่นแก้วที่ประกบรอไว้ตามด้วยน้ำกลั่นทิ้ง polymerize ไว้ 60 - 90 นาที

Stracking gel

- Solution C 2.50 ml
- Solution D 2.00 ml
- Solution $(NH_4)_2S_2O_8$ 300.00 µl
- น้ำกลั่น 15.20 ml

ผสมให้เข้ากันใส่ลงด้านบนของ running gel แล้วเสียบหวีลงไป รอให้ polymerize 60 นาที

6.2.4 Extraction buffer

Phosphate buffer 0.1 M pH 7.5

Stock A : 0.1 M monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4)(13.60g./1000 ml)

Stock B : 0.1 M dibasic potassium phosphate (K_2HPO_4) (17.90g./1000ml)

Stock C : stock A 16.00 ml + stock B 84.00 ml เติมน้ำให้ครบ 200 ml. ปรับ pH 7.5

เวลาจะใช้ phosphate buffer 0.1 M pH 7.5 บดตัวอย่างพืชจะใช้ stock C 50.00 ml เติมน้ำให้ครบ 100 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.5

6.2.5. การเตรียมสารละลายเพื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์

6.2.5.1 Esterase (EST)

Phosphate buffer (0.1 M pH 6.0)	100	ml
Fast blue B salt	150	mg
กรองในที่มืด		
α-naphthyl acetic	3	ml (dilute 0.1 g in
absolute alcohol 10 ml)		

6.2.5.2 Peroxidase (PER)

Stock A : 3-amino-9-ethylcarbazole	0.42	g
β-naphthol	0.29	g
Acetone	200.00	ml
กรองในที่มืด		
Stock B : Tris buffer 0.1 M pH 4		
Tris-(hydroxymethyl) aminomethane	1.890	g
Acetic acid	2.026	ml
H_2O adjust	1,250	ml
เก็บในที่มืดและเย็น		

Stock C : Hydrogenperoxide 3%

H_2O_2 30% 10 ml

H_2O adjust 100 ml

เตรียมใหม่ทุกครั้ง

ใช้ในอัตราส่วนระหว่าง stock A : stock B : stock C = 20 : 80 : 1

6.3. การสกัดเอนไซม์

6.3.1 นำใบแก่ที่ตัดเส้นใบออกแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วสกัดด้วย phosphate buffer 0.1 M pH 7.5 + 5% polyvinyl-pyrrolidone (PVP) โดยใช้ตัวอย่าง 1.00 กรัม ต่อสารละลาย 1.00 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปบดในโกร่งที่เก็บในอุณหภูมิ 4° ซ

6.3.2 นำตัวอย่างที่สกัดได้จากข้อ 2.1 ไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 18,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 1 ชั่วโมง แยกสารละลายใสด้านบนที่ได้ใส่ใน eppendorf tube ที่สะอาด เก็บในตู้แช่ -20° ซ เพื่อนำไปทำ polyacrylamide gel electrophoresis

6.4. การเตรียม slab gel

6.4.1 ต่อชุดแผ่นแก้วสำหรับทำ slab gel ใช้ spacer เป็นตัวปรับความหนาของเจล ตามความต้องการ (0.75 - 1.00 มิลลิเมตร) คำนวณปริมาณของเจลที่จะใช้โดยจะใส่ stracking gel (upper gel) เหนือ separating gel (lower gel)

6.4.2 เทสารละลายของเจล 8.5% ที่ยังไม่ได้ polymerize ใส่ลงระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ให้สูง 12.5 ซม. จากนั้นค่อย ๆ หยดน้ำกลั่นให้คลุมผิวเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อเจลแข็งตัวจะเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำที่คลุมผิวเจลได้ชัดเจน

6.4.3 ค่อย ๆ ล้างส่วนของ separating gel ด้วยน้ำกลั่น แล้วเท stracking gel ลงบน separating gel สอด comb ลงใน gel plate ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดในช่องของหวี ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

6.4.4 ดึงหวีออกจาก stracking gel หยอดน้ำกลั่นลงในช่องซึ่งเกิดขึ้นหลังจากดึงหวีออก เพื่อล้างช่องนั้น หลังจากนั้นดูดน้ำกลั่นออกจนเห็นช่องว่างเหล่านั้นชัดเจน

6.5. การทำอิเล็กโทรโฟรีซีส

6.5.1 ต่อชุดอิเล็กโทรโฟรีซีสทั้งหมดเข้าด้วยกันเติม electrode buffer ลงใน chamber

6.5.2 ใส่ตัวอย่างเอนไซม์ที่ผสม marker dye solution ลงในช่องบน stracking gel โดยใช้เข็มสำหรับ loading ค่อย ๆ หยอดผ่าน buffer ลงในช่องเจล

6.5.3 ต่อขั้วบวกเข้ากั บ chamber ล่างและขั้วลบเข้ากับ chamber บน และเปิดสวิตช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสที่ 200 โวลท์

6.5.4 เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เมื่อเวลาผ่านไป 3 - 4 ชั่วโมง สีของ bromophenol blue จะเคลื่อนที่มาถึงปลายล่างของเจล

6.5.5 นำแผ่นแก้วออกจาก chamber และนำแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นแก้วออกมาวางบน plate เพื่อย้อมเอนไซม์ต่อไป

6.6. การย้อมสีเอนไซม์ในเจล

เตรียม staining solution ของไอโซไซม์แต่ละชนิด เทลงบน plate ที่มีเจลอยู่นำไปเก็บในที่มืดในอุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาทีจนปรากฏแถบสี

6.7. การบันทึกข้อมูล

นำเจลที่ย้อมสีแล้วมาศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ จากตำแหน่ง จำนวน ขนาด ตามสมการต่อไปนี้

ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) = ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสี / ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสี bromophenol blue

เวลาดำเนินการทดลอง

ตุลาคม 2538 - ธันวาคม 2539

สถานที่ดำเนินการทดลอง

โรงเรือนเพาะชำภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ห้องปฏิบัติการชีวเคมี แห่งศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University