บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

1. การจำแนกพันธุ์โดยวิธีสัณฐานวิทยา

1.1 วัสดุอุปกรณ์

1.1.1 ตัวอย่าง ใบ ดอก ผล และเมล็ด ของลิ้นจี่ 19 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์กะโหลกใบเถา กะโหลกใบยาว กะโหลกใบอ้อ กวางเจา กิมเจง ค่อม ค่อมลำเจียก จักรพรรดิ์ จีนเล็ก จีนใหญ่ บริวสเตอร์ ลูกลาย สาแหรกทอง สำเภาแก้ว แห้ว โอวเฮียะ ฮงฮวย1 ฮงฮวย2 และ Hakip จากศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จังหวัดเชียงราย

1.1.2 ไม้บรรทัด

1.1.3 เวอร์เนียแคลิปเปอร์

1.1.4 เครื่องชั่ง

1.1.5 เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (hand refractometer)

1.1.6 กระบอกตวง

1.2 วิธีการ

1.2.1 การสุ่มตัวอย่างพืช

สุ่มตัวอย่างพืชมาพันธุ์ละ 5 ต้น (ยกเว้นบางพันธุ์มีจำนวนต้นไม่ถึง 5 ต้น)

1.2.2 การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของส่วน ใบประกอบ 5 ใบต่อต้น ใบย่อย 15 ใบต่อต้น ช่อดอก 15 ช่อต่อต้น ผล 30 ผลต่อต้น และ เมล็ด 30 เมล็ดต่อต้น โดยทำการบันทึกข้อมูล ตามวิธีการของ Ramingwong and Chiewsilp (1994) ที่ทำกับลำไย และวิธีการของ Batten (1984) ที่ทำกับลิ้นจี่ ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของลิ้นจี่แต่ละพันธุ์แสดงเป็น ภาพถ่ายลักษณะโครงสร้างของลิ้นจี่ ตารางแสดงลักษณะของลิ้นจี่ และคำบรรยายรายละเอียดของลิ้นจี่

ข้อมูลที่บันทึก เป็นข้อมูล 2 แบบคือ ก. ข้อมูลทางด้านคุณภาพ ทำโดยการสังเกต เช่น สีของก้านใบ สีของใบแก่ รูปร่างของใบ ลักษณะของผิวใบ และ ข. ข้อมูลทางด้านปริมาณ ทำโดยการวัดหรือชั่ง เป็นค่าเฉลี่ย ร่วมกับค่าต่ำสุด – สูงสุด เช่น ความกว้างของใบประกอบ ความหนาของก้านใบ ปริมาตรของเนื้อ น้ำหนักของเมล็ด โดยข้อมูลทั้งหมดมีดังต่อไปนี้

ใบ

ขนาดของใบประกอบ

จำนวนคู่ของใบย่อย

สีก้านใบด้านบน

สีก้านใบด้านล่าง

ความเหนียวของก้านใบ

ความหนาของก้านใบ

สีของเส้นกลางใบ

สีของเส้นใบ

สีใบย่อย

ขนาดใบย่อย

รูปร่างใบ (รูปที่ 1)

ขอบใบ (รูปที่ 1)

ปลายใบ (รูปที่ 1)

ฐานใบ (รูปที่ 1)

ผิวใบ

ความหนาของใบ

ดอก

ลักษณะการออกดอก

ขนาดของช่อดอก

ความหนาแน่นของดอกบนช่อดอก

สีดอก

ผล

ขนาดผล

รูปร่างผล

ปริมาตรผล

น้ำหนักผล

สีเปลือก

ปริมาตรเปลือก

น้ำหนักเปลือก

สีเนื้อ

น้ำหนักเนื้อ

ปริมาณความชื้น

ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

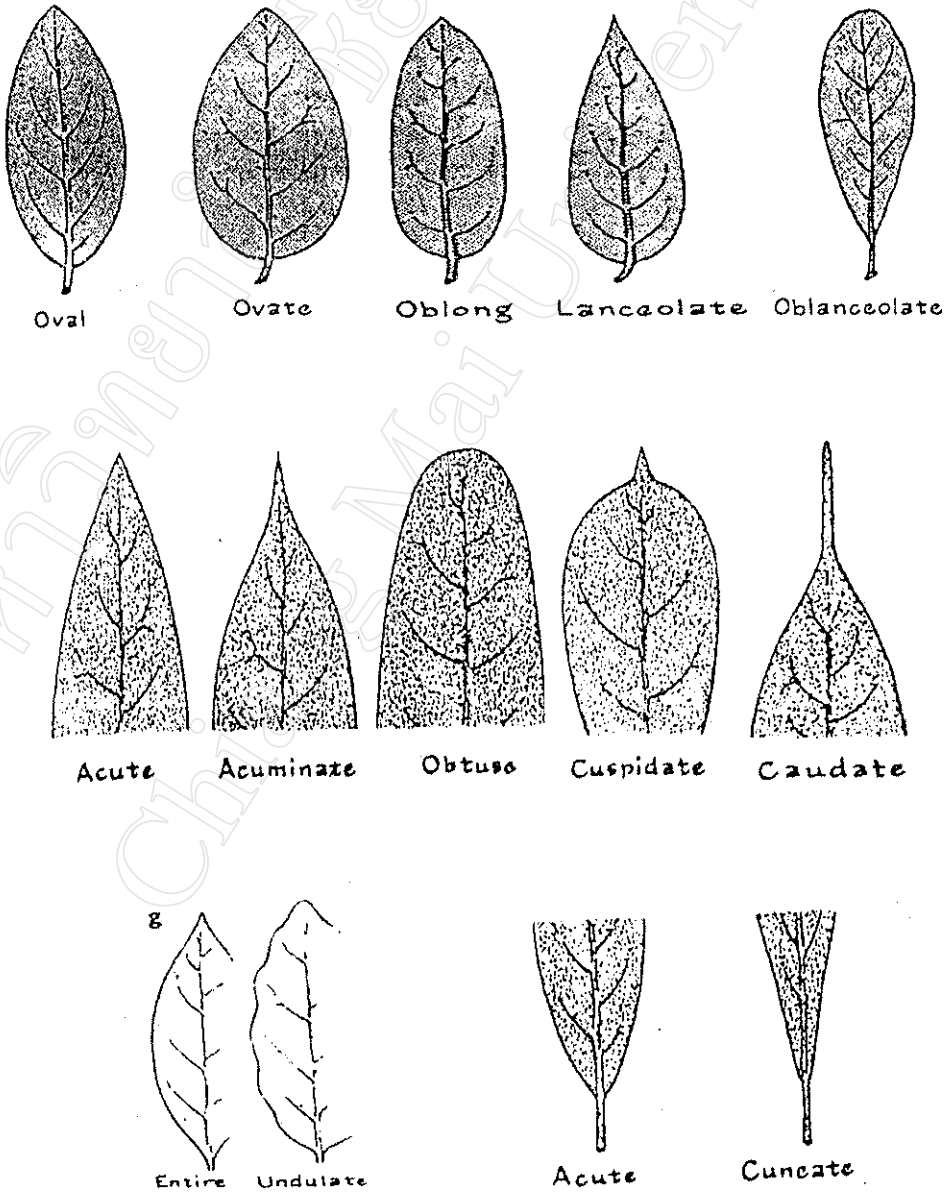
เมล็ด

ขนาดเมล็ด

รูปร่างเมล็ด

ปริมาตรเมล็ด

น้ำหนักเมล็ด



<u>รูปที่ 1</u> ลักษณะใบ (ณพพร, 2527)

2. การจำแนกพันธุ์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

2.1 วัสดุอุปกรณ์

2.1.1 ตัวอย่างใบแก่ของลิ้นจี่ 19 พันธุ์

2.1.2 เครื่องชั่งอย่างละเอียด

2.1.3 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

2.1.4 เครื่องหมุนเหวี่ยงตัวอย่าง (centrifuge)

2.1.5 โกร่งบด

2.1.6 ไนโตรเจนเหลวและถังบรรจุ

2.1.7 micro- pipette และ adjustable automatic pipette พร้อม tip

2.1.8 eppendrof tube ขนาด 1.5 มล.

2.1.9 ชุดสำหรับอิเล็กโทรโฟรีซิส แบบ slab gel

2.1.10 เครื่องจ่ายกระแสไฟ

2.1.11 เครื่องทำความเย็น (cooling unit) ตู้แช่ที่ 4 และ -20 องศาเซลเซียส

2.1.12 เครื่องคนสารละลาย (magnetic stirrer)

2.1.13 ถุงมือ

2.1.14 เครื่องแก้วต่างๆ

2.1.15 กระดาษกรอง

2.1.16 extraction buffer

2.1.17 ส่วนประกอบของเจล

2.1.18 electrode buffer

2.1.19 สีย้อม

2.1.20 marker

วิธีการเตรียมสารเคมีในข้อ 2.1.16 -2.1.20 แสดงไว้ในภาคผนวก

2.2 วิธีการ

2.2.1. การเตรียมตัวอย่างพืช

นำใบแก่ของลิ้นจี่น้ำหนักสด 1 กรัม ที่ผ่านการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาบดในโกร่งพร้อมกับเติมไนโตรเจนเหลวเพื่อให้ใบกรอบและบดง่ายขึ้น ใส่ extraction buffer 3 มิลลิลิตร นำไปแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที ดูด supernatant ที่ได้นำมาเข้าเครื่องเหวี่ยงอีกครั้ง แล้วจึง

ดูด supernatant ที่ได้ เก็บไว้ในหลอด eppendrof เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อจะทำการวิเคราะห์ จึงผสม supernatant 85 เปอร์เซ็นต์ กับ marker 15 เปอร์เซ็นต์ เขย่าให้เข้ากัน

2.2.2 การเตรียมเจล

ประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส ใส่ running gel ที่เตรียมไว้ สูงประมาณ 12 เซนติเมตร แล้วใส่น้ำกลั่น เพื่อทำให้ผิวหน้าของเจลเรียบ ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงเพื่อรอให้เจลเกิด polymerization แล้วใส่ stacking gel พร้อมกับ comb ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงเพื่อรอให้เจลเกิด polymerization อีกครั้ง จึงนำ comb ออก แล้วล้างผิวหน้าเจลด้วยน้ำกลั่น

2.2.3. การประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส

ประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส โดย เติม electrode buffer ลงใน chamber

2.2.4. การหยอดตัวอย่าง

หยอดตัวอย่างลงบนเจล แต่ละช่อง ช่องละหนึ่งตัวอย่าง ระวังอย่าให้ตัวอย่างฟุ้งกระจาย

2.2.5.การผ่านกระแสไฟฟ้า

ผ่านกระแสไฟ โดยควบคุมค่าความต่างศักย์ที่ 200-250 โวลต์ และกระแส 60 มิลลิแอมแปร์และควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ตัวอย่างที่มี marker ก็จะเคลื่อนที่ลงมา จนระดับของ marker อยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่นเจล ประมาณ 1 นิ้ว จึงหยุดกระแสไฟ แล้วนำเจลออกจากชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส

2.2.6. การย้อมสี

นำแผ่นเจลไปย้อมสี โดยทำปฏิกิริยากับsubstrate ของเอนไซม์แต่ละชนิด

2.2.7. การบันทึกข้อมูล

บันทึกการแสดงออกของไอโซไซม์แต่ละชนิดของพันธุ์ลิ้นจี่ที่ได้เป็นภาพถ่ายของแถบสี และวาดแผนภาพ zymogram ของไอโซไซม์ดังกล่าว แสดงตำแหน่ง จำนวน และขนาดของแถบสี วัดค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของแถบสี ตามสมการต่อไปนี้ (อาภัสสรา, 2537)

$$\text{ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (rf)} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสี}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของ marker}}$$

2.2.8. การวิเคราะห์กลุ่มพืช

นำค่าการมีแถบสี และไม่มีแถบสีมาวิเคราะห์กลุ่มพืช (cluster analysis) ของไอโซไซม์นั้น โดยกำหนดให้ตัวอย่างพืชเป็น operation taxonomic unit และแถบสีเป็นลักษณะ (character) ค่าที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้จากการมีแถบสีหรือไม่มีแถบสีของแต่ละตัวอย่าง แล้วแปลง

ค่าที่มีแถบสีเป็น 1 และค่าที่ไม่มีแถบสีเป็น 0 (Sokal and Sneath , 1973) นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ความแตกต่างของพันธุ์ลิ้นจี่ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์

3. การจำแนกพันธุ์โดยวิธีเซลล์พันธุศาสตร์

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 ปลายรากจากกิ่งตอนลิ้นจี่ 19 พันธุ์

3.1.2 ขวดแก้ว

3.1.3 แผ่นกระจก และแผ่นกระจกปิด

3.1.4 เข็มเขี่ย

3.1.5 ปากคีบ

3.1.6 กล้องจุลทรรศน์

3.1.7 ฟิล์มถ่ายภาพ

3.1.8 สารเคมีที่ใช้หยุดวงชีพเซลล์

3.1.9 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมน้ำยาในการรักษาสภาพเซลล์

3.1.10 สารเคมีที่ใช้ย่อยแยกเซลล์

3.1.11 สารเคมีที่ใช้ย้อมสีโครโมโซม

วิธีการเตรียมสารเคมีในข้อ 3.1.8 - 3.1.11 แสดงไว้ในภาคผนวก

3.2 วิธีการ

3.2.1 การเก็บตัวอย่างราก โดยการตัดปลายรากที่งอกใหม่มีสีขาว ยาว 0.5-1.0 เซนติเมตร ทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาประมาณ 9.00 น.

3.2.2 การหยุดวงชีพของเซลล์โดยแช่ปลายรากลงในสารละลาย paradichloro benzene เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง

3.2.3 การรักษาสภาพของเซลล์ โดยนำรากออกจากสารละลาย paradichloro benzene ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำรากไปแช่ในสารละลาย fixative นาน 5 นาที

3.2.4 การย่อยแยกเซลล์ โดยนำรากออกจากสารละลาย fixative แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น นำไปแช่ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วนำออกมาล้างด้วยน้ำกลั่น

3.2.5 การย้อมสีโครโมโซม นำรากที่ได้มาแช่ในสีย้อม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

3.2.6 การขยี้ปลายราก นำตัวอย่างปลายรากที่ย้อมสีแล้วมาวางบนแผ่นกระจก โดยตัดเอาเฉพาะส่วนปลายสุดของรากที่ยาว 1-2 มิลลิเมตร หยดสีย้อมหนึ่งหยดตรงบริเวณที่มีปลายราก ใช้เข็มเขี่ยขยี้ปลายรากให้แยกออกจากกัน ปิดแผ่นกระจกด้วยแผ่นกระจกปิด ใช้ปลายดินสอที่เรียบที่ยังไม่ได้เหลา เคาะเบา ๆ บนกระจก เพื่อให้เซลล์กระจายแยกจากกัน ใช้กระดาษซับวางบนกระจก ใช้นิ้วหัวแม่มือกดเบา ๆ เพื่อให้เซลล์กระจาย และซับสีที่มากเกินออกไป

3.2.7 การนับจำนวนโครโมโซม นำแผ่นกระจกไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมทาเฟส และมีโครโมโซมกระจายไม่ทับกัน นับจำนวนโครโมโซม แล้วบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4. สถานที่ทำการวิจัย

1. แปลงรวบรวมพันธุ์ลิ้นจี่ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย อ. เมือง จ. เชียงราย

2. ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ. เชียงใหม่

3. ห้องปฏิบัติการชีวเคมี งานชีวเคมีและห้องปฏิบัติการกลาง ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม

5. ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ระหว่างเดือน พฤษภาคม 2539 ถึง ตุลาคม 2540