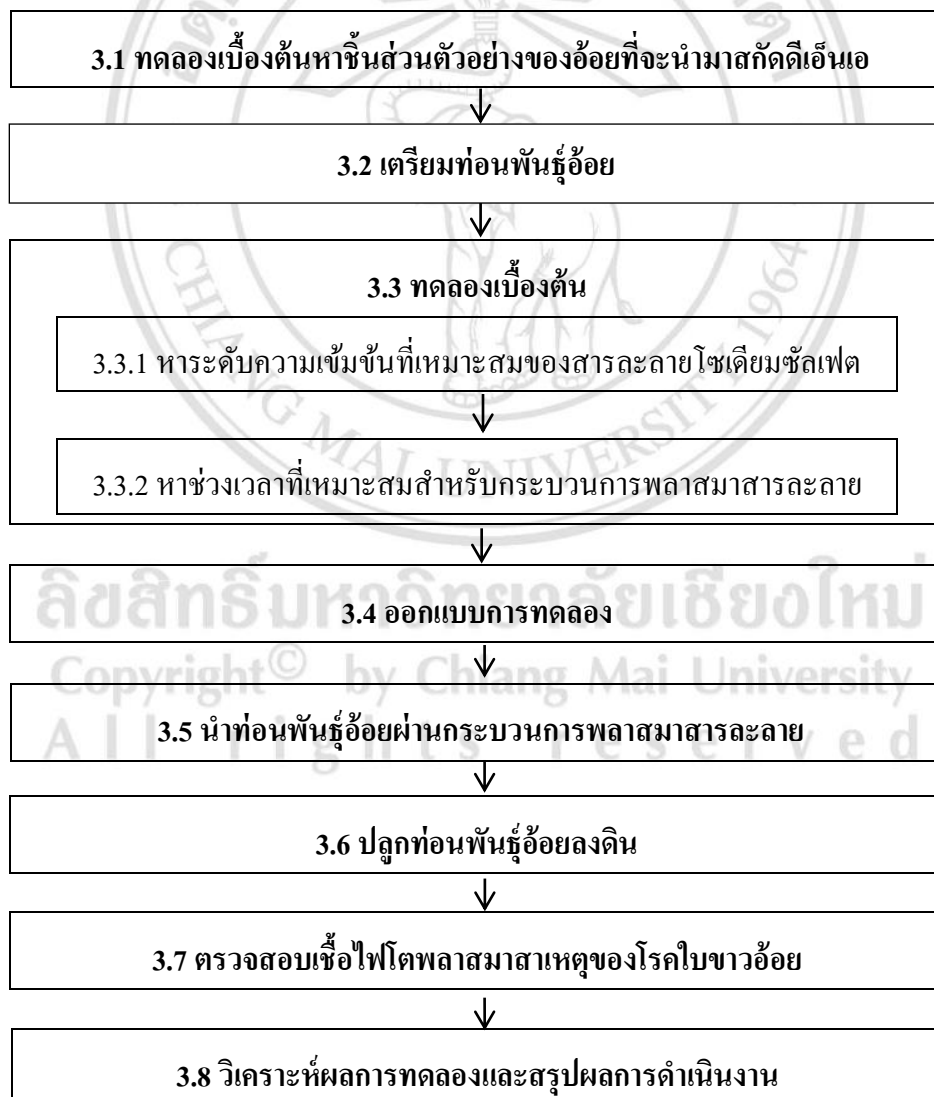


บทที่ 3

วิธีการวิจัย

การดำเนินงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการศึกษาและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับเรื่องกระบวนการพลาสมาสารละลาย เช่น การเกิดปฏิกิริยาระหว่างกระบวนการ การประยุกต์ใช้งานด้านการทำให้ปลอดเชื้อ และเรื่องโรคใบขาวอ้อย เช่น สาเหตุโรค ลักษณะอาการ และวิธีการตรวจสอบเชื้อ เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการลดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุของโรคใบขาวในท่อนพันธุ์อ้อย โดยมีขั้นตอนและวิธีการวิจัยดังภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 แนวทางและวิธีการวิจัย

3.1 ทดลองเบื้องต้นหาชิ้นส่วนตัวอย่างของอ้อยที่จะนำมาสกัดดีเอ็นเอ



ภาพที่ 3.2 แนวทางและวิธีการวิจัยหาชิ้นส่วนตัวอย่างของอ้อยที่จะนำมาสกัดดีเอ็นเอ

3.1.1 สกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนตัวอย่างของอ้อย โดยดัดแปลงวิธีการของ
โครงการ Outcrossing Rates/Microsat จากห้องปฏิบัติการ Kalisz (2006)
- เตรียมวัสดุอุปกรณ์ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

วัสดุอุปกรณ์
1. ขวดใสแบบมีฝาปิดขนาด 100 มิลลิลิตร
2. ขวดใสแบบมีฝาปิดขนาด 1,000 มิลลิลิตร
3. ปีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร
4. กระบอกตวงขนาด 200 มิลลิลิตร
5. แท่งแม่เหล็กกวนสาร
6. ซ้อนตักสาร
7. มีด/กรรไกร
8. ชุดโกร่งบด
9. Tip tube ขนาดต่างๆ
10. หลอดทดลองขนาด 1,500 ไมโครลิตร
11. ถุงซิปล
12. แท่นวางหลอดทดลอง
13. กล่องโฟม

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

วัสดุอุปกรณ์
14. กระดาษฟอยล์
15. ทิชชูแบบไม่มีขุย
16. ปากกาเมจิก
17. ไมโครทิปขนาดต่างๆ
18. เครื่องชั่งสาร
19. เครื่องอบแห้ง/ฆ่าเชื้อ
20. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave)
21. เครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer)
22. เครื่องเขย่าสาร (Incubated shaker)
23. เครื่องวัดค่า pH
24. เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Centrifuge machine)
25. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
26. ตู้แช่

- ล้างทำความสะอาดอุปกรณ์ทั่วไป (ลำดับ 1 – 7 จากตารางที่ 3.1) แล้วนำมาอบให้แห้งด้วยอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
- อบฆ่าเชื้ออุปกรณ์พิเศษ (ลำดับ 8 – 10 จากตารางที่ 3.1) ด้วยอุณหภูมิประมาณ 95 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที



ภาพที่ 3.3 เครื่องอบแห้ง/ฆ่าเชื้อ

- เตรียมสารเคมี สำหรับใช้สกัดดีเอ็นเอ (สำหรับ 100 ตัวอย่าง) ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

สารและการเตรียมสาร	ปริมาตร
1. CTAB buffer - 1M Tris HCl pH.8 5 มิลลิลิตร - 0.5M EDTA pH.8 2 มิลลิลิตร - 5M NaCl 14 มิลลิลิตร - CTAB 1 กรัม - เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร - ก่อนนำไปใช้จะต้อง - ผสม PVP 8 กรัม - ผสม B-mercaptoethanol 0.25 มิลลิลิตร - เขย่าให้เข้ากัน แล้วแช่ไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส - CTAB Buffer ที่ผสม PVP และ B-mercaptoethanol จะต้องถูกใช้ภายใน 3 วัน	50 มิลลิลิตร
2. TE buffer - 1M Tris HCl pH.8 0.05 มิลลิลิตร - 0.5M EDTA pH.8 0.01 มิลลิลิตร - เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 5 มิลลิลิตร	5 มิลลิลิตร
3. น้ำกลั่น - เติมน้ำกลั่นลงในขวดไซ ปิดฝาแล้วใช้ถุงพลาสติกสวมครอบมิดไว้ - นำไปนั่งฆ่าเชื้อโรคที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 120 นาที	100 มิลลิลิตร
4. 1M Tris HCl pH.8 - ผสม Tris 1.211 กรัม กับน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตร - ใช้สารละลาย HCl ปรับให้ได้ค่า pH.8 และเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

สารและการเตรียมสาร	ปริมาตร
5. 0.5M EDTA pH.8 - ผสม EDTA 0.9306 กรัม กับน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร - ปรับค่า pH.8 โดยใช้สารละลาย NaCl และเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 5 มิลลิลิตร	5 มิลลิลิตร
6. 5M NaCl - ผสม NaCl 5.844 กรัม กับน้ำกลั่น 14 มิลลิลิตร - เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 20 มิลลิลิตร	20 มิลลิลิตร
7. 7.5M Ammonium acetate - ผสม Ammonium acetate 1.1562 กรัม กับน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร - เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 2 มิลลิลิตร	2 มิลลิลิตร
8. Isopropanal	20 มิลลิลิตร
9. Proteinase K	1 มิลลิลิตร
10. RNase A	1 มิลลิลิตร
11. 70% Ethanol	70 มิลลิลิตร
12. 95% Ethanol	70 มิลลิลิตร
13. Chloroform	50 มิลลิลิตร
14. ไนโตรเจนเหลว	1 ถัง
15. น้ำแข็ง	1 ถัง

- เตรียมชิ้นส่วนของตัวอย่างของอ้อย 3 ส่วนคือ ตา ใบอ่อน และน้ำอ้อย จากต้นอ้อย ปกติและต้นอ้อยที่แสดงอาการใบขาว



ภาพที่ 3.4 ชิ้นส่วนตาอ้อย

ชิ้นส่วนตา :

ตัดชิ้นส่วนตาออกจากลำปล้อง ลอกเปลือก
แข็งออก ล้างให้สะอาด หนักประมาณ
0.293 กรัม หั่นเป็น ชิ้นเล็กๆ ใส่โถง
บดละเอียดเป็นผงร่วมกับไนโตรเจนเหลว
แล้วดักใส่หลอดทดลอง พร้อมทำ
เครื่องหมายระบุไว้



ภาพที่ 3.5 ชิ้นส่วน ใบอ่อนอ้อย

ชิ้นส่วนใบอ่อน :

ทำความสะอาดผิวใบ แล้วตัดใบอ่อนเป็น
ชิ้นเล็กๆ ให้ได้ประมาณ 0.293 กรัม ใส่โถง
บดละเอียดเป็นผงร่วมกับไนโตรเจนเหลว
พร้อมทำเครื่องหมายระบุไว้



ภาพที่ 3.6 ชิ้นส่วนลำอ้อย

ชิ้นส่วนน้ำ :

ตัดส่วนที่เป็นลำอ้อย ล้างให้สะอาด ใส่ถุง
ซิปล้างแล้วทาบให้น้ำ คูณน้ำอ้อยที่ได้มาใส่ใน
หลอดทดลองปริมาตร 500 ไมโครลิตร
พร้อมทำเครื่องหมายระบุไว้

ตารางที่ 3.3 สัญลักษณ์ระบุบนหลอดทดลอง

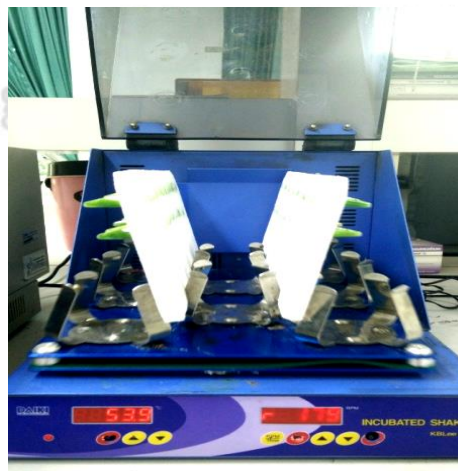
ลักษณะอ้อย	ตัวอย่างที่	ตา (B)	ใบ (L)	น้ำ (W)
อ้อยปกติ (N)	1	NB1	NL1	NW1
	2	NB2	NL2	NW2
อ้อยที่แสดงอาการใบขาว (P)	1	PB1	PL1	PW1
	2	PB2	PL2	PW2

- เติมน้ำสารละลาย CTAB buffer ที่ผสม PVP และ B-mercaptoethanol แล้ว ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และ Proteinase K ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ที่บรรจุตัวอย่างอ้อยแต่ละหลอด ปิดฝาแล้วเขย่าให้เข้ากัน (อย่าให้จับตัวเป็นก้อนอยู่ได้ หลอดทดลอง)



ภาพที่ 3.7 ตัวอย่างชิ้นส่วนอ้อยผสมกับสารละลายในหลอดทดลอง

- บ่มตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่านาน 60 นาที

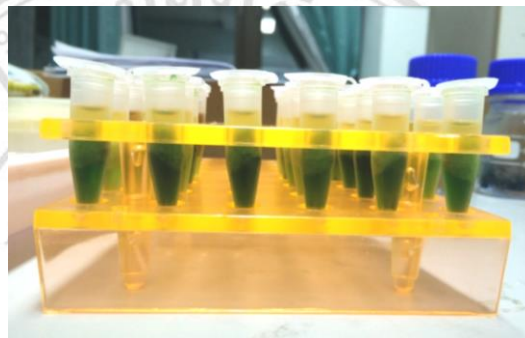


ภาพที่ 3.8 เครื่องเขย่าสาร

- เติม RNase A ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด แล้วบ่มตัวอย่างต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่านาน 60 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

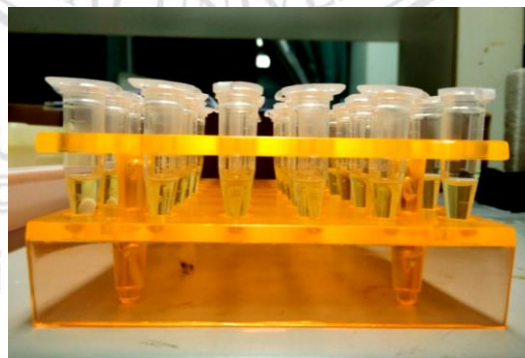
- เติม Chloroform ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด แล้วเขย่าให้เข้ากัน

- ปั่นเหวี่ยงตัวอย่าง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที จะได้สารละลายแยกชั้นดังภาพที่ 3.9



ภาพที่ 3.9 สารละลายแยกชั้นจากการปั่นเหวี่ยง

- ดูดส่วนใส (สารละลายชั้นบนสุด) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ของแต่ละหลอด ใส่หลอดทดลองหลอดใหม่



ภาพที่ 3.10 สารละลายเฉพาะส่วนใสในหลอดทดลองใหม่

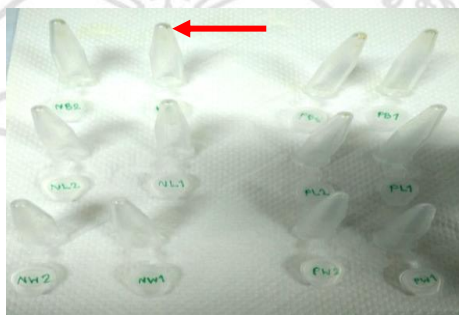
- เติม 7.5M Ammonium acetate ปริมาตร 16 ไมโครลิตร
- เติม Isopropanol ปริมาตร 116.64 ไมโครลิตร
- ปิดฝา เขย่าเบาๆ ให้สารละลายเข้ากัน แล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่ตู้แช่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน

- ปั่นเหวี่ยงตัวอย่าง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที

- ค่อยๆ เทสารละลายทิ้ง เหลือตะกอนดีเอ็นเอก้นหลอดไว้ เติม 70% Ethanol ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แต่ละหลอดทดลอง แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที

- ค่อยๆ เทสารละลายทิ้ง เหลือตะกอนดีเอ็นเอก้นหลอดไว้ เติม 95% Ethanol ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แต่ละหลอดทดลอง แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที

- ค่อยๆ เทสารละลายทิ้ง เหลือตะกอนดีเอ็นเอแห้งประมาณ 45 นาที



ภาพที่ 3.11 ตะกอนดีเอ็นเอบริเวณก้นหลอดทดลอง (ลูกศรชี้)

- เติม TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แต่ละหลอดทดลอง แล้วเก็บดีเอ็นเอไว้ที่ตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.2 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ 2 วิธี โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง NanoDrop Spectrophotometer เพื่อวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และใช้เทคนิค Gel Electrophoresis โดยใช้เจล Agarose เพื่อแยกสาร วิเคราะห์ และเตรียมสารให้บริสุทธิ์

- ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง NanoDrop Spectrophotometer มีขั้นตอนดังนี้

- 1) หยดน้ำกลั่นปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบนเลนส์ แล้วใช้กระดาษสำหรับเช็ดเลนส์ เช็ดทำความสะอาด
- 2) หยด TE buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงบนเลนส์ เพื่อกำหนดเป็นฐานข้อมูลอ้างอิง

- 3) หยดดีเอ็นเอ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงบนเลนส์ แล้ววิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Nucleic Acid พร้อมปรับดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร



ภาพที่ 3.12 ชุดอุปกรณ์ NanoDrop Spectrophotometer

- ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Gel Electrophoresis โดยใช้เจล Agarose มีขั้นตอนดังนี้

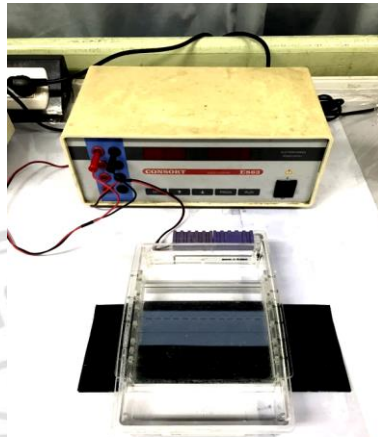
- 1) เตรียมสารละลาย TBE โดยผสม Tris Borate-EDTA buffer powder 51 กรัม กับน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 3,000 มิลลิลิตร
- 2) เตรียมเจล 2% Agarose โดยผสมผง Agarose 2 กรัม กับสารละลาย TBE ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำเข้าตู้อบไมโครเวฟนาน 4 นาที เขย่าให้ละลาย เติม Ethidium Bromide (สารเรืองแสงสีแดง) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วเทลงถาดที่มีหวีเสียบอยู่ ใต้ฟองอากาศออก ทิ้งไว้ให้แข็งตัวประมาณ 60 นาที จะได้แผ่นเจลที่มีช่องสำหรับโหลดดีเอ็นเอ



ภาพที่ 3.13 แผ่นเจล 2% Agarose

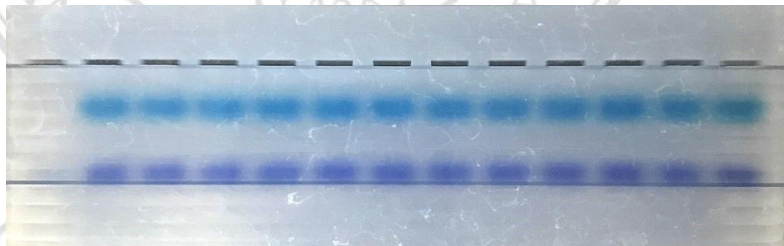
- 3) ทำการโหลดเจล โดยผสม Loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร กับดีเอ็นเอ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บนแผ่นพลาสติกใส แล้วดูดใส่ช่องแต่ละช่องในแผ่นเจล โดยให้ช่องแรกเป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (Ladder marker) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

- 4) ต่ออุปกรณ์จ่ายไฟเข้ากับเครื่อง Gel Electrophoresis ปรับแรงดันไฟฟ้าเท่ากับ 100 โวลต์ นาน 30 นาที



ภาพที่ 3.14 ชุดอุปกรณ์ Gel Electrophoresis

- 5) นำแผ่นเจลออกจากเครื่อง Gel Electrophoresis และนำไปวางบนเครื่อง UV Transilluminator แล้ววิเคราะห์แถบที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นเจลได้แสงยูวีด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Gene Snap from SynGene



ภาพที่ 3.15 แผ่นเจลที่ได้หลังจากผ่านเครื่อง Gel Electrophoresis



ภาพที่ 3.16 ชุดอุปกรณ์ UV Transilluminator

3.1.3 ทดสอบด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล Nested PCR

ทดสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล Nested PCR โดยดัดแปลงวิธีการของ
ยูพาและคณะ (2548) และสุภาพร (2558)

- เตรียมวัสดุอุปกรณ์สำหรับการทำ Nested PCR ดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 วัสดุอุปกรณ์สำหรับการทำ Nested PCR

วัสดุอุปกรณ์
1. หลอดทดลองสำหรับทำ PCR
2. Tip tube ขนาดต่างๆ
3. ไมโครทูปขนาดต่างๆ
4. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermalcycler)

- เตรียมสารเคมีสำหรับการทำ Nested PCR ดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 สารเคมีสำหรับการทำ Nested PCR

สารที่ใช้
1. Primer MLO-X : 5-GTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGC-3
2. Primer MLO-Y : 5-GTGCCAAGGCATCCACTGTATGCC-3
3. Primer P1 : 5-GTCGTAACAAGGTATCCCTACCGG-3
4. Primer P2 : 5-GGTGGGCCTAAATGGACTTGAACC-3
5. 10X Buffer
6. $MgCl_2$
7. Taq DNA polymerase (Invitrogen)
8. dNTP's (Invitrogen)
9. น้ำกลั่น

- เตรียมสารสำหรับทำปฏิกิริยครั้งที่ 1

ผสมสารละลายทั้งหมดตามตารางที่ 3.6 เข้าด้วยกันให้ได้ปริมาตรรวม 24 ไมโครลิตร

ตารางที่ 3.6 Master Mix ครั้งที่ 1

Master Mix ครั้งที่ 1	ปริมาตรรวม (24 ไมโครลิตร)
1. 10X Buffer	2.500
2. $MgCl_2$	1.000
3. dNTP's	0.250
4. Primer MLO-X	1.000
5. Primer MLO-Y	1.000
6. น้ำกลั่น	18.125
7. Taq DNA polymerase	0.125

- เติมดีเอ็นเอต้นแบบที่มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1.000 ไมโครลิตร ของแต่ละตัวอย่างลงในหลอดทดลอง
 - โหลดตัวอย่างใส่เครื่อง Thermalcycler โดยตั้งค่าที่ 35 รอบ ให้แต่ละรอบ ประกอบด้วยช่วง Denaturation 92 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที ช่วง Annealing 68 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และช่วง Extension 72 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที
 - เตรียมสารสำหรับทำปฏิกิริยาครั้งที่ 2
- ผสมสารละลายทั้งหมดตามตารางที่ 3.7 เข้าด้วยกันให้ได้ปริมาตรรวม 24 ไมโครลิตร

ตารางที่ 3.7 Master Mix ครั้งที่ 2

Master Mix ครั้งที่ 2	ปริมาตรรวม (24 ไมโครลิตร)
1. 10X Buffer	2.500
2. $MgCl_2$	1.000
3. dNTP's	0.250
4. Primer P1	1.000
5. Primer P2	1.000
6. น้ำกลั่น	18.125
7. Taq DNA polymerase	0.125

- เติมดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากปฏิกิริยาครั้งที่ 1 พร้อมทำให้เจือจางลงในอัตราส่วน 1 : 10 ของแต่ละตัวอย่างลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 1.000 ไมโครลิตร

- โหลดตัวอย่างใส่เครื่อง Thermalcycler โดยตั้งค่าที่ 40 รอบ ให้แต่ละรอบประกอบด้วยช่วง Denaturation 92 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที ช่วง Annealing 68 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และช่วง Extension 72 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที
- ทำ Gel Electrophoresis ที่ 2% Agarose



ภาพที่ 3.17 เครื่อง Thermalcycler

3.2 เตรียมท่อนพันธุ์อ้อย

- คัดลำอ้อย จากกออ้อยที่แสดงอาการใบขาว ด้วยวิธีสังเกตตามลักษณะอาการโรค โดยเลือกให้มีขนาดลำปล้อง สายพันธุ์ (อู่ทอง 12 จากไร่จังหวัดกำแพงเพชร) และอายุปลูก (ช่วง 7 – 10 เดือน) ที่ใกล้เคียงกัน



ภาพที่ 3.18 ต้นอ้อยที่แสดงอาการใบขาว (ลูกสร้าหน่อขาวที่ขึ้นแทรกบริเวณต่อ)

- สกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนตาบริเวณปลายลำ
- ยืนยันว่าอ้อยเป็นโรคใบขาวโดยการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค Nested PCR ร่วมกับเทคนิค Gel Electrophoresis ที่ 2% Agarose
- เทียบระดับความเข้มของแถบที่ปรากฏบนตำแหน่ง 210 bp แล้วคัดลำอ้อยที่มีความเข้มแถบใกล้เคียงกัน เพื่อนำไปใช้ทดลองในขั้นตอนถัดไป ตามภาพที่ 3.19 โดยแถบ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน แถบ W คือน้ำกลั่น แถบ N คืออ้อยปกติ แถบ P คืออ้อยที่เป็นโรคใบขาว แถบ A - I คือลำอ้อยแต่ละท่อนที่นำมาตรวจเชื้อ



ภาพที่ 3.19 ผลแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยขนาด 210 คู่เบส (ภาพ ก) และลำอ้อยที่ถูกคัดแล้วหลังจากตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค Nested PCR (ภาพ ข)

- ล้างทำความสะอาดผิวลำอ้อยด้วยผ้าชุบน้ำพอลิเมอร์ แล้วทอนลำอ้อยเป็นท่อนๆ ให้แต่ละท่อนมีขนาดความยาว 1 ตา โดยตัดให้ขอบล่างและขอบบนห่างจากเส้นแบ่งข้อประมาณ 1.5 เซนติเมตร (ความยาวแต่ละท่อนใกล้เคียงกัน)



ภาพที่ 3.20 ท่อนพันธุ์อ้อยที่ได้จากการทอน

3.3 ทดลองเบื้องต้น

3.3.1 หาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมซัลเฟต

- เตรียมสารละลาย โดยใช้โซเดียมซัลเฟตละลายในน้ำปราศจากไอออน ที่ระดับความเข้มข้น 0 - 497 กรัมต่อลิตร (สารละลายโซเดียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ 497 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง)

ตารางที่ 3.8 ระดับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมซัลเฟต

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	-	0.0	2.5	5.0	10	20	40	80	160	320	497
จำนวนท่อนพันธุ์อ้อย (ท่อน)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

- แخذท่อนพันธุ์อ้อยในสารละลายแต่ละระดับความเข้มข้นที่อุณหภูมิห้อง นาน 120 นาที
- ปลูกลำต้นพันธุ์อ้อยลงดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ในกระถางที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางหน้าตัด 7 เซนติเมตร รดน้ำ พร้อมบันทึกการเจริญเติบโตของอ้อย โดยวัดความสูงของยอดที่พ้นจากระดับผิวดิน



ภาพที่ 3.21 กระถางเพาะท่อนพันธุ์อ้อย

- ใช้เครื่อง OES วัดหาปริมาณธาตุต่างๆที่แตกตัวในแต่ละระดับความเข้มข้น แล้ววิเคราะห์ผลที่ได้ เพื่อหาระดับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมซัลเฟตที่เหมาะสม



ภาพที่ 3.22 ชุดอุปกรณ์ OES

3.3.2 หาช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการพลาสมาสารละลาย

- ชั่งสารโซเดียมซัลเฟตปริมาณ 10 กรัม (ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสม ได้จากการทดลองหาระดับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมซัลเฟตก่อนหน้า) ผสมกับน้ำปราศจากไอออน ให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร แล้วคนให้ละลาย
- เทสารละลายลงในถังอะคริลิก พร้อมติดตั้งเครื่องกวนสารและแท่งแม่เหล็กสำหรับกวนสาร
- ต่อขั้วไฟฟ้าทั้งสองด้านให้ขั้วแคโทดและแอโนดมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางหน้าตัด 1 มิลลิเมตร เข้ากับเครื่องจ่ายไฟ (1kV, 2A, DC power supply) โดยระยะห่างระหว่างขั้วทั้งสองเท่ากับ 3 มิลลิเมตร
- ปรับแรงดันไฟฟ้า 500 โวลต์
- บันทึกอุณหภูมิ กระแสไฟฟ้า และค่า pH ทุกๆ 1 นาที ตั้งแต่เริ่มกระบวนการจนกระทั่งอุณหภูมิของสารละลายเปลี่ยนเป็น 50 องศาเซลเซียส ตามตารางที่ 3.9
- วิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้ เพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการพลาสมาสารละลาย

ตารางที่ 3.9 ตารางบันทึกผลการทดลองตามช่วงเวลาเปลี่ยนแปลง

ระยะเวลาในกระบวนการ (นาที)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)											
ค่า pH											
กระแสไฟฟ้า (แอมแปร์)											

3.4 ออกแบบการทดลอง

การออกแบบการทดลอง สามารถแบ่งออกเป็นการทดลองชุดควบคุม การทดลองระบบ Wire to Wire Electrode ระบบ Plasma Jet และระบบ Gliding Arc โดยมีรายละเอียดของแต่ละระบบดังนี้

3.4.1 การทดลองชุดควบคุม

กำหนดชุดควบคุมการทดลอง เพื่อใช้เปรียบเทียบกับท่อนพันธู้อ้อยที่ผ่านกระบวนการพลาสมาสารละลาย โดยชุดควบคุมทั้งหมดจะถูกนำไปปลูกและวัดค่าต่างๆ เหมือนกับชุดทดลองปกติ ดังนี้

3.4.1.1 ท่อนพันธู้อ้อยไม่ผ่านกระบวนการใด

3.4.1.2 ท่อนพันธู้อ้อยแช่สารละลายเตตราไฮคลินเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4,320 นาที (3 วัน)

3.4.1.3 ท่อนพันธู้อ้อยแช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 120 นาที

3.4.1.4 ท่อนพันธู้อ้อยแช่สารละลายโซเดียมซัลเฟตที่อุณหภูมิห้อง นาน 120 นาที

3.4.1.5 ท่อนพันธู้อ้อยแช่สารละลายโซเดียมซัลเฟตที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 120 นาที

3.4.2 ระบบ Wire to Wire Electrode

ระบบ Wire to Wire Electrode ประกอบด้วยเครื่องจ่ายไฟ (1kV, 2A, DC power supply) ปรับแรงดันไฟฟ้า 500 โวลต์ ใช้เส้นทั้งสองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางหน้าตัด 1 มิลลิเมตร เป็นขั้วไฟฟ้าที่วางห่างกัน 3 มิลลิเมตร ดิสชาร์จสารละลายโซเดียมซัลเฟตเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ในถังอะคริลิกปริมาตรรวม 1 ลิตร โดยแบ่งวิธีการทดลองออกเป็น 3 ชุดดังนี้

3.4.2.1 แช่ท่อนพันธู้อ้อยขณะเกิดการดิสชาร์จ

แช่ท่อนพันธู้อ้อยขณะเกิดการดิสชาร์จ 1 และ 2 นาทีตามลำดับ ทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำๆ ละ 5 ตัวอย่าง

3.4.2.2 แท่นพ่นพัสดุย่อยหลังเกิดการดิสชาร์จ

แท่นพ่นพัสดุย่อย 5 10 15 30 60 120 180 240 300 และ 360 นาฬิกาตามลำดับ ด้วยพลาสมาสารละลายที่ดิสชาร์จไว้แล้ว (2 นาที) ทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำๆ ละ 5 ตัวอย่าง

3.4.2.3 แท่นพ่นพัสดุย่อยขณะเกิดการดิสชาร์จ แล้วดิสชาร์จซ้ำ

แท่นพ่นพัสดุย่อยขณะดิสชาร์จครั้งแรกนาน 2 นาที และดิสชาร์จซ้ำทุกๆ 2 10 และ 20 นาฬิกาตามลำดับ นาน 120 นาที ทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำๆ ละ 5 ตัวอย่าง

3.4.3 ระบบ Plasma Jet

ระบบ Plasma Jet ประกอบด้วยเครื่องจ่ายไฟ (80kHz, 800kHz, 100W, HV, RF, GENERATOR) ใช้กำลังไฟฟ้า 30 วัตต์ อัตราการไหลของแก๊สอาร์กอนเท่ากับ 5,000 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราการไหลของแก๊สออกซิเจนเท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อนาที แท่นพ่นพัสดุย่อยแต่ละท่อนขณะดิสชาร์จในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 30 มิลลิลิตร นาน 30 นาที แล้วแท่นพ่นพัสดุย่อยต่อ 0 180 300 และ 360 นาฬิกาตามลำดับ ทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำๆ ละ 5 ตัวอย่าง

3.4.4 ระบบ Gliding Arc

ระบบ Gliding Arc ประกอบด้วยเครื่องจ่ายไฟ (8 kV, 125W, DC power supply) ใช้แรงดันไฟฟ้า 8 กิโลโวลต์ อัตราการไหลของแก๊สอาร์กอนเท่ากับ 5,000 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราการไหลของน้ำเท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อนาที แท่นพ่นพัสดุย่อยแต่ละท่อนในพลาสมาสารละลายปริมาตร 30 มิลลิลิตร นาน 240 480 และ 720 นาฬิกาตามลำดับ ทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำๆ ละ 5 ตัวอย่าง

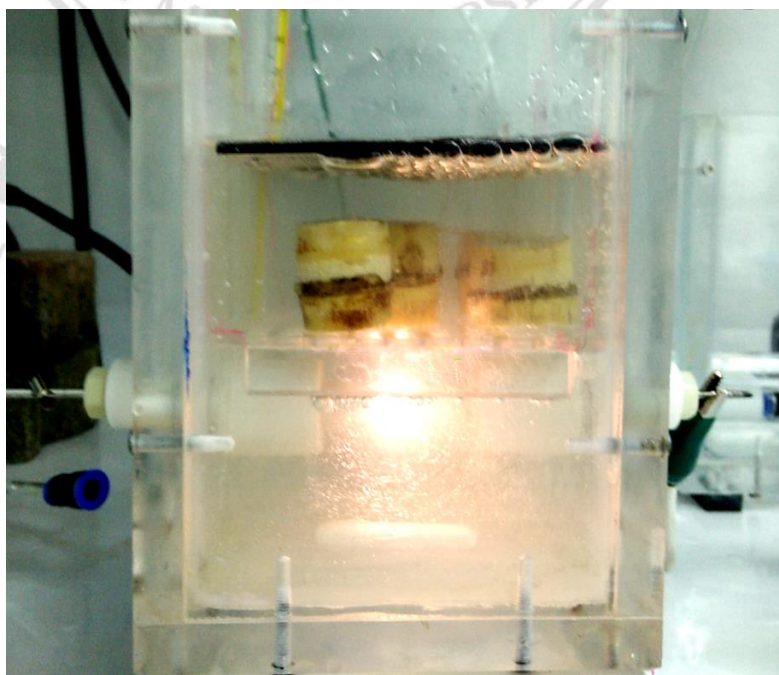
3.5 นำพ่นพัสดุย่อยผ่านกระบวนการพลาสมาสารละลาย

นำพ่นพัสดุย่อยผ่านกระบวนการพลาสมาสารละลายตามลำดับแผนการทดลองที่กำหนดไว้ โดยจะต้องปฏิบัติและควบคุมการทดลองแต่ละชุดการทดลองให้เป็นมาตรฐานและเป็นไปตามพื้นฐานของการทดลอง เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดปัจจัยรบกวนภายนอกที่อาจส่งผลต่อการทดลองและได้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือ สามารถนำไปวิเคราะห์ต่อได้โดยง่าย ดังนี้

3.5.1 ระบบ Wire to Wire Electrode

3.5.1.1 แท่นพ่นพัลส์อ้อยขณะเกิดการดิสชาร์จ

- เตรียมเครื่องจ่ายไฟ (1kV, 2A, DC power supply) ให้อยู่ในสถานะพร้อมใช้งาน และตั้งค่าไว้ที่จุดเริ่มต้นทุกครั้งก่อนทดลองทุกชุดการทดลอง
- ติดตั้งเครื่องกวนสาร แท่งแม่เหล็กสำหรับกวนสาร และตะแกรงอะคริลิกที่สะอาด โดยจัดให้อยู่ในตำแหน่งเดียวกันทุกชุดการทดลอง
- เตรียมสารละลายโซเดียมซัลเฟตให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตรรวม 1 ลิตร
- เทสารละลายและพ่นพัลส์อ้อยจำนวน 5 พ่นลงในถังอะคริลิกที่ล้างสะอาด
- ต่อขั้วไฟฟ้าทั้งสองขั้วให้ขั้วแคโทดและแอโนดมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางหน้าตัด 1 มิลลิเมตร เข้ากับเครื่องจ่ายไฟ โดยระยะห่างระหว่างขั้วทั้งสองเท่ากับ 3 มิลลิเมตร ทุกชุดการทดลอง
- ปรับระดับแรงดันไฟฟ้า 500 โวลต์ แล้วดิสชาร์จนาน 1 และ 2 นาทีตามลำดับ โดยขณะที่เกิดการดิสชาร์จให้ใช้เครื่อง OES วัดชนิดและปริมาณของธาตุต่างๆ และใช้ชุดทดสอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ตรวจสอบสารละลาย เพื่อยืนยันการเกิดปฏิกิริยา
- เก็บพ่นพัลส์อ้อยที่ผ่านกระบวนการพลาสมาสารละลายแล้ว ลงในภาชนะปิด



ภาพที่ 3.23 ระบบ Wire to Wire Electrode (แท่นพ่นพัลส์อ้อยขณะเกิดการดิสชาร์จ)

3.5.1.2 แซ่ท่อนพันธุ์อ้อยหลังเกิดการดิสซาร์จ

- เตรียมเครื่องจ่ายไฟ (1kV, 2A, DC power supply) ให้อยู่ในสถานะพร้อมใช้งาน และตั้งค่าไว้ที่จุดเริ่มต้นทุกครั้งก่อนทดลองทุกชุดการทดลอง
- ติดตั้งเครื่องกวนสาร และแท่งแม่เหล็กสำหรับกวนสารที่สะอาด โดยจัดให้อยู่ในตำแหน่งเดียวกันทุกชุดการทดลอง
- เตรียมสารละลายโซเดียมซัลเฟตให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตรรวม 1 ลิตร
- เทสารละลายโซเดียมซัลเฟตลงในถังอะคริลิกที่ล้างสะอาด
- ต่อขั้วไฟฟ้าทั้งสองให้ขั้วแคโทดและแอโนดมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางหน้าตัด 1 มิลลิเมตร เข้ากับเครื่องจ่ายไฟ โดยระยะห่างระหว่างขั้วทั้งสองเท่ากับ 3 มิลลิเมตร ทุกชุดการทดลอง
- ปรับระดับแรงดันไฟฟ้า 500 โวลต์ แล้วดิสซาร์จสารละลายนาน 2 นาที โดยขณะที่เกิดการดิสซาร์จให้ใช้เครื่อง OES วัดชนิดและปริมาณของธาตุต่างๆ และใช้ชุดทดสอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ตรวจสอบสารละลาย เพื่อยืนยันการเกิดปฏิกิริยา
- เทสารละลายลงในภาชนะปิดที่บรรจุท่อนพันธุ์อ้อยจำนวน 5 ท่อน แช่ไว้นาน 5 10 15 30 60 120 180 240 300 และ 360 นาทีตามลำดับ
- เก็บท่อนพันธุ์อ้อยที่ผ่านกระบวนการพลาสมาสารละลายแล้ว ลงในภาชนะปิด

3.5.1.3 แซ่ท่อนพันธุ์อ้อยขณะเกิดการดิสซาร์จ แล้วดิสซาร์จซ้ำ

- เตรียมเครื่องจ่ายไฟ (1kV, 2A, DC power supply) ให้อยู่ในสถานะพร้อมใช้งาน และตั้งค่าไว้ที่จุดเริ่มต้นทุกครั้งก่อนทดลองทุกชุดการทดลอง
- ติดตั้งเครื่องกวนสาร แท่งแม่เหล็กสำหรับกวนสาร และตะแกรงอะคริลิกที่สะอาด โดยจัดให้อยู่ในตำแหน่งเดียวกันทุกชุดการทดลอง
- เตรียมสารละลายโซเดียมซัลเฟตให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตรรวม 1 ลิตร
- เทสารละลายและท่อนพันธุ์อ้อยจำนวน 5 ท่อนลงในถังอะคริลิกที่ล้างสะอาด
- ต่อขั้วไฟฟ้าทั้งสองให้ขั้วแคโทดและแอโนดมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางหน้าตัด 1 มิลลิเมตร เข้ากับเครื่องจ่ายไฟ โดยระยะห่างระหว่างขั้วทั้งสองเท่ากับ 3 มิลลิเมตร ทุกชุดการทดลอง
- ปรับระดับแรงดันไฟฟ้า 500 โวลต์ แล้วดิสซาร์จครั้งแรกนาน 2 นาที แล้วดิสซาร์จซ้ำทุกๆ 2 10 และ 20 นาทีตามลำดับ นาน 120 นาที พร้อมทั้งควบคุมอุณหภูมิ

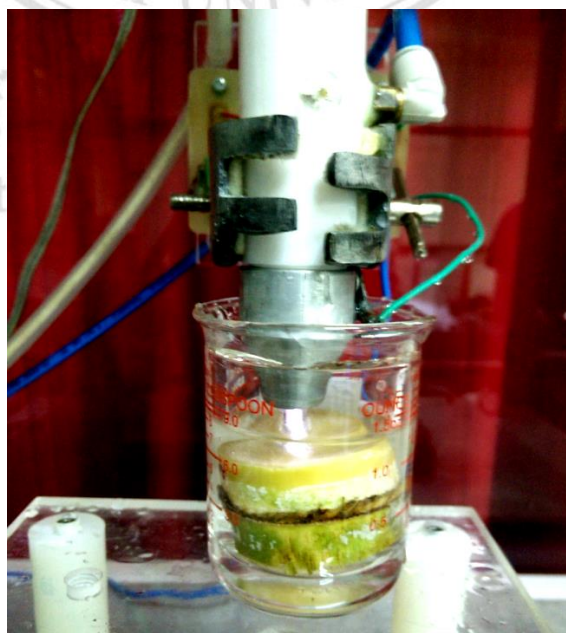
ให้คงที่ประมาณ 50 องศาเซลเซียส โดยขณะที่เกิดการดิสชาร์จให้ใช้เครื่อง OES วัดชนิดและปริมาณของธาตุต่างๆ และใช้ชุดทดสอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ตรวจสอบสารละลาย เพื่อยืนยันการเกิดปฏิกิริยา

- เก็บท่อนพันธู้อ้อยที่ผ่านกระบวนการพลาสมาสารละลายแล้ว ลงในภาชนะปิด

3.5.2 ระบบ Plasma Jet

- เตรียมเครื่องจ่ายไฟ (80kHz, 800kHz, 100W, HV, RF, GENERATOR) ให้อยู่ในสถานะพร้อมใช้งานและตั้งค่าไว้ที่จุดเริ่มต้นทุกครั้งก่อนทดลองทุกชุดการทดลอง

- ติดตั้งหัวจ่ายพลาสมาให้อยู่ในตำแหน่งผิวหน้าทุกชุดการทดลอง
- เตรียมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 30 มิลลิลิตร
- เทน้ำปราศจากไอออน และท่อนพันธู้อ้อยจำนวน 1 ท่อนลงในบีกเกอร์สะอาด
- ปรับระดับกำลังไฟฟ้า 30 วัตต์ อัตราการไหลของแก๊สอาร์กอนเท่ากับ 5,000 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราการไหลของแก๊สออกซิเจนเท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อนาที
- ดิสชาร์จท่อนพันธู้อ้อย 30 นาที แล้วแช่ต่อ 0 180 300 และ 480 นาทีตามลำดับ โดยขณะที่เกิดการดิสชาร์จให้ใช้เครื่อง OES วัดชนิดและปริมาณของธาตุต่างๆ และใช้ชุดทดสอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ตรวจสอบสารละลาย เพื่อยืนยันการเกิดปฏิกิริยา
- เก็บท่อนพันธู้อ้อยที่ผ่านกระบวนการพลาสมาสารละลายแล้ว ลงในภาชนะปิด



ภาพที่ 3.24 ระบบ Plasma Jet

3.5.3 ระบบ Gliding Arc

- เตรียมเครื่องจ่ายไฟ (8 kV, 125W, DC power supply) ให้อยู่ในสถานะพร้อมใช้งานและตั้งค่าไว้ที่จุดเริ่มต้นทุกครั้งก่อนทดลองทุกชุดการทดลอง
- ติดตั้งหัวจ่ายพลาสมาและภาชนะสำหรับรองรับพลาสมาสารละลายให้อยู่ในตำแหน่งเดิมทุกชุดการทดลอง
- ปรับระดับแรงดันไฟฟ้า 8 กิโลโวลต์ อัตราการไหลแก๊สอาร์กอนเท่ากับ 5,000 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราการไหลของน้ำเท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อนาที
- ร่อนพลาสมาสารละลาย ได้ปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยขณะที่เกิดการดีสชาร์จให้ใช้เครื่อง OES วัดชนิดและปริมาณของธาตุต่างๆ และใช้ชุดทดสอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ตรวจสอบสารละลาย เพื่อยืนยันการเกิดปฏิกิริยา
- เทพลาสมาสารละลายลงในภาชนะปิดที่บรรจุท่อนพันธุ์อ้อยจำนวน 1 ท่อน แล้วแช่ไว้นาน 240 480 และ 720 นาทีตามลำดับ
- เก็บท่อนพันธุ์อ้อยที่ผ่านกระบวนการพลาสมาสารละลายแล้ว ลงในภาชนะปิด



ภาพที่ 3.25 ระบบ Gliding Arc

3.6 ปลุกท่อนพันธุ์อ้อยลงดิน

- ตักดินที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ใส่กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางหน้าตัด 7 เซนติเมตร ประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของกระถาง
- วางท่อนพันธุ์อ้อยแต่ละท่อนที่ผ่านกระบวนการพลาสมาสารละลายแล้ว ลงบนหน้าดินและให้ส่วนตาอ้อยชี้ขึ้น



ภาพที่ 3.26 ท่อนพันธุ์อ้อยที่ปลูกลงดินในกระถาง

- ตักดินกลับท่อนพันธุ์อ้อย ให้ผิวดินต่ำกว่าขอบกระถางเล็กน้อย แล้วย้ายเข้าโรงเรือนที่มีตาข่ายป้องกันแมลง แสงแดดเข้าถึงง่าย และอากาศถ่ายเทสะดวก
- รดน้ำและสังเกตการเปลี่ยนแปลงของท่อนพันธุ์อ้อย นาน 30 วัน



ภาพที่ 3.27 โรงเรือนสำหรับเพาะท่อนพันธุ์อ้อย

3.7 ตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

หลังจากระยะเวลา 30 วัน อ้อยเจริญเติบโตมีราก ลำต้น และใบงอกจากท่อนพันธุ์เดิม จากนั้นจะถูกนำมาตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุของโรคใบขาวอ้อยอีกครั้ง โดยแบ่งการตรวจสอบออกเป็น 2 วิธีดังนี้

3.7.1 ตรวจสอบเชื้อในต้นอ้อยด้วยเทคนิค Nested PCR อีกครั้ง

สกัดดีเอ็นเอ จากชิ้นส่วนใบอ่อนอ้อย ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง NanoDrop Spectrophotometer พร้อมปรับค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ลดลงเหลือ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค Nested PCR ร่วมกับเทคนิค Gel Electrophoresis ที่ 2% Agarose

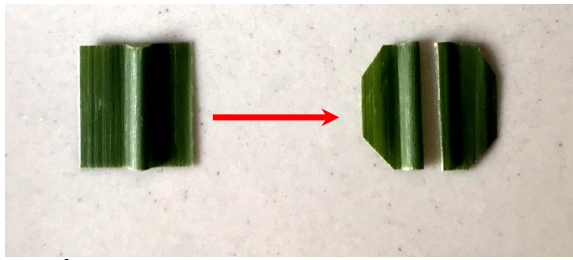
3.7.2 ตรวจสอบเชื้อในต้นอ้อยด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องกราด (LV-Scanning Electron Microscope, JSM 5910 LV)

- เตรียมต้นอ้อยปกติ (จากศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร จังหวัดพิษณุโลก) และต้นอ้อยที่แสดงอาการใบขาว สายพันธุ์เดียวกัน (อู่ทอง12) อายุปลูก 30 วัน



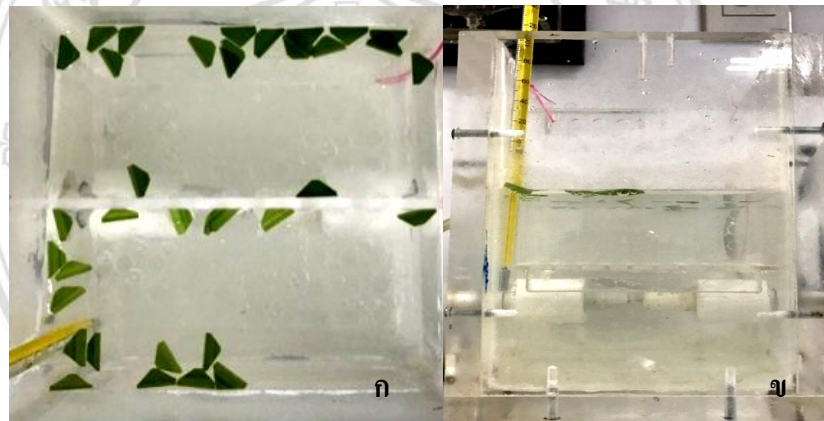
ภาพที่ 3.28 ต้นอ้อยปกติ (ภาพ ก) และต้นอ้อยที่แสดงอาการใบขาว (ภาพ ข) อายุปลูก 30 วัน

- ใช้ใบมีดคมตัดส่วนใบ ออกเป็นชิ้นๆ ยาวชิ้นละ 1 เซนติเมตร แล้วผ่าเส้นกลางใบตามแนวยาวให้แบ่งครึ่งใบอ้อยพอดี พร้อมทำเครื่องหมายที่ขอบมุมใบด้านนอก



ภาพที่ 3.29 ลักษณะใบอ้อยที่ถูกผ่าบริเวณเส้นกลางใบ

- นำตัวอย่างใบอ้อยผ่านกระบวนการพลาสมาสลายในระบบ Wire to Wire Electrode โดยแช่ใบอ้อยขณะเกิดการดีสชาร์จครั้งแรกนาน 2 นาที แล้วดีสชาร์จซ้ำทุกๆ 20 นาที นาน 120 นาที



ภาพที่ 3.30 ใบอ้อยในกระบวนการพลาสมาสลาย ภาพจากด้านบน (ภาพ ก)

และภาพจากด้านหน้า (ภาพ ข) ของถังปฏิบัติการ

- ส่งตัวอย่างใบอ้อยหลังผ่านกระบวนการพลาสมาสลายเข้าสู่กระบวนการเตรียมชิ้นงาน



ภาพที่ 3.31 ตัวอย่างใบอ้อยที่พร้อมเข้าสู่ส้อมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

- ส่องตัวอย่างใบอ้อยด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องกราด ซึ่งการทดลองแต่ละชุดประกอบด้วยตัวอย่างทั้งหมด 5 ตัวอย่าง โดยกำหนดให้ตัวอย่างที่ 1 และ 2 ใช้หลักการส่องตรวจที่บริเวณขอบใบ (หัวและท้าย) ตัวอย่างที่ 3 4 และ 5 ใช้หลักการส่องตรวจที่บริเวณกลางใบ เพื่อเป็นตัวแทนข้อมูลแต่ละชุดการทดลอง ซึ่งการส่องตรวจทุกครั้งจะต้องอยู่ในพื้นที่ที่เป็นท่อลำเลียงอาหารบริเวณ Sieve tube สังเกตได้จากผนังของ Sieve tube จะมีรูค่อนข้างกลม ขนาดเล็ก (Sieve pore) ประกอบอยู่



ภาพที่ 3.32 ชุดเครื่องมือกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องกราด

3.8 วิเคราะห์ผลการทดลองและสรุปผลการดำเนินงาน

ในขั้นตอนสุดท้ายนี้ ผู้วิจัยได้วิเคราะห์ สรุป และอภิปรายผลในด้านต่าง ๆ ตามขอบเขตงานวิจัย และวัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อหาช่วงของปัจจัยที่เหมาะสมในกระบวนการพลาสมาสลาย สำหรับลดเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุของโรคใบขาวในท่อนพันธุ์อ้อย รวมทั้งสรุปข้อจำกัดงานวิจัยและข้อเสนอแนะอื่นๆ เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อผู้ที่ศึกษางานวิจัยนี้