บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

วัสดุพืช ต้นตอลำไยเถา ลำไยพันธุ์พื้นเมือง และลำไยพันธุ์สีชมพู อย่างละ 130 ต้น ปลูกในถุงพลาสติกสีดำ ขนาด 6×12 นิ้ว เลี้ยงต้นกล้าจนมีอายุได้ 12 เดือน (ภาพที่ 1-3) นำยอดลำไยพันธุ์ดอ พันธุ์แห้ว พันธุ์เบี้ยวเขียว และพันธุ์สีชมพู อย่างละ 90 ยอด มาเสียบโดยวิธีการแบบเสียบลิ่ม (Cleft grafting) โดยแบ่งออกเป็นเสียบบนต้นตอลำไยทั้ง 3 พันธุ์ข้างต้น พันธุ์ละ 30 ยอด เพื่อใช้ทดสอบทางสัณฐานวิทยา, กายวิภาคศาสตร์ และทดสอบแบบไอโซไซม์ อย่างละ 10 ยอด

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองที่ 1

1. สายวัด
2. ไม้บรรทัด
3. เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์
3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองที่ 2

1. เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบชนิดแผ่น (slab)
2. ตู้เย็น และตู้แช่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
3. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
4. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)
5. เครื่องหมุนเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็น (refrigerated centrifuge)
6. เข็มฉีดยาใส่สารปรับปริมาตรได้ (micro syringe) ขนาด 100 ไมโครลิตร
7. โกร่งบดตัวอย่าง
8. ไมโครปิเปต
9. หลอดใส่สารขนาด 5 มิลลิลิตร (eppendrof tube)
10. เครื่องแก้ว
11. กล้องถ่ายรูป
12. อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ถุงมือ กระดาษชั่งสาร ช้อนตักสาร กระดาษป้ายชื่อ ปากกาเคมี ถาดพลาสติก กระดาษกรอง ฯลฯ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเคมี และวิธีการเตรียม ที่ใช้ในการทดลองที่ 2 (ภาคผนวก ก.)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองที่ 3

1. เครื่องตัดเนื้อเยื่อพืชแบบเลื่อน (sliding microtome)
2. คีมคีบ
3. พู่กัน
4. จานแก้ว
5. กล้องจุลทรรศน์
6. กล้องถ่ายรูป

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองที่ 3 (ภาคผนวก ก.)

ภาพที่ 1 ต้นตอลำไยเถาที่มีอายุ 12 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 2 ต้นตอลำไยพันธุ์พื้นเมืองที่มีอายุ 12 เดือน

ภาพที่ 3 ต้นตอลำไยพันธุ์สีชมพูที่มีอายุ 12 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

งานวิจัยนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง

การทดลองที่ 1 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยอดลำไยพันธุ์ดอ พันธุ์แห้ว พันธุ์เบี้ยวเขียว และพันธุ์สีชมพู ที่เสียบยอดบนต้นตอลำไยเถา ลำไยพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์สีชมพู

วิธีการ วางแผนการทดลองแบบแฟคตอเรียลในรูปแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorail Experiment in Completely Randomized Design; Factorial in CRD) ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 ได้แก่ต้นตอลำไย 3 พันธุ์ คือ ลำไยเถา ลำไยพันธุ์พื้นเมือง และลำไยพันธุ์สีชมพู ปัจจัยที่ 2 ได้แก่ ยอดลำไย 4 พันธุ์ที่นำมาเสียบ คือ ลำไยพันธุ์ดอ พันธุ์แห้ว พันธุ์เบี้ยวเขียว และพันธุ์สีชมพู มี 12 กรรมวิธี ๆ ละ 2 ซ้ำ ๆ ละ 5 ต้น เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยวัดความสูง (วัดจากระดับพื้นดินถึงปลายยอด) ความกว้างทรงพุ่ม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นตรงตำแหน่งเหนือ/ล่างรอยต่อ 5 เซนติเมตร ปริมาณการแทงยอดใหม่สะสม และน้ำหนักแห้งของราก ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ยอดลำไยพันธุ์ดอเสียบบนต้นตอลำไยเถา
กรรมวิธีที่ 2 ยอดลำไยพันธุ์แห้วเสียบบนต้นตอลำไยเถา
กรรมวิธีที่ 3 ยอดลำไยพันธุ์เบี้ยวเขียวเสียบบนต้นตอลำไยเถา
กรรมวิธีที่ 4 ยอดลำไยพันธุ์สีชมพูเสียบบนต้นตอลำไยเถา
กรรมวิธีที่ 5 ยอดลำไยพันธุ์ดอเสียบบนต้นตอลำไยพันธุ์พื้นเมือง
กรรมวิธีที่ 6 ยอดลำไยพันธุ์แห้วเสียบบนต้นตอลำไยพันธุ์พื้นเมือง
กรรมวิธีที่ 7 ยอดลำไยพันธุ์เบี้ยวเขียวเสียบบนต้นตอลำไยพันธุ์พื้นเมือง
กรรมวิธีที่ 8 ยอดลำไยพันธุ์สีชมพูเสียบบนต้นตอลำไยพันธุ์พื้นเมือง
กรรมวิธีที่ 9 ยอดลำไยพันธุ์ดอเสียบบนต้นตอลำไยพันธุ์สีชมพู
กรรมวิธีที่ 10 ยอดลำไยพันธุ์แห้วเสียบบนต้นตอลำไยพันธุ์สีชมพู
กรรมวิธีที่ 11 ยอดลำไยพันธุ์เบี้ยวเขียวเสียบบนต้นตอลำไยพันธุ์สีชมพู
กรรมวิธีที่ 12 ยอดลำไยพันธุ์สีชมพูเสียบบนต้นตอลำไยพันธุ์สีชมพู

วัดและบันทึกข้อมูลทุกๆ 14 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 การเปรียบเทียบแบบไอโซไซม์ของเนื้อเยื่อแคลลัสตรงบริเวณรอยต่อของยอดลำไย พันธุ์ดอ พันธุ์แห้ว พันธุ์เบี้ยวเขียว และพันธุ์สีชมพู ที่เสียบบนต้นตอลำไยเถา พันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์สีชมพู

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างพืช นำเนื้อเยื่อแคลลัสตรงบริเวณรอยต่อของต้นตอกับยอดพันธุ์ดีแต่ละคู่ที่เราต้องการทดสอบ นำไปชั่งตัวอย่างละ 0.5 กรัม บดตัวอย่างพร้อมกับ liquid nitrogen และสกัดด้วย phosphate buffer 0.1 M pH 7.5 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร (วิธีการเตรียมตามภาคผนวก) บดให้ละเอียด นำไปตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge, Kubota รุ่น 6930) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ใช้ไมโครปิเปตดูดเอาเฉพาะส่วนของน้ำใสเก็บไว้ในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ทดสอบในลำดับต่อไป

2. การเตรียมแผ่นเจล นำแผ่นกระจกมาทำความสะอาด โดยการเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ประกบชุดแผ่นกระจกสำหรับทำแผ่นเจลเข้าด้วยกัน เตรียมสารละลาย separating gel 7.5 เปอร์เซ็นต์ (วิธีการเตรียมตามภาคผนวก ก.) ใส่สารละลาย separating gel ลงระหว่างแผ่นกระจกอย่างช้าๆเพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศ เสียบหวีลงไปในเจล และคอยเติมสารละลาย separating gel ให้เต็มแผ่นกระจกอยู่เสมอถ้าหากพบว่าสารละลาย separating gel ลดระดับลง ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 30-60 นาที ดึงหวีเสียบออกจากเจล ระวังอย่าให้มีชิ้นส่วนของเจลตกค้างอยู่ภายในช่องของหวีที่เราดึงออกไปแล้ว

3. การทำอิเล็กโทรโฟริซีส นำสารละลายใสของตัวอย่างพืชที่เราเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสออกมาทิ้งไว้ให้ละลาย จากนั้นดูดสารละลายใสของตัวอย่างพืชมา 90 ไมโครลิตร ผสมกับ marker dye solution 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี รอไว้ ต่อชุดทำอิเล็กโทรโฟริซีสเข้าด้วยกัน เติม electrode buffer (วิธีการเตรียมตามภาคผนวก ก.) ลงใน chamber คอยสังเกตดูอย่าให้เกิดการรั่วซึม ถ้ารั่วซึมให้ประกอบใหม่จนแน่ใจว่าไม่รั่วแล้ว ใช้ micro syringe ดูดสารละลายตัวอย่างเอนไซม์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ในแต่ละกรรมวิธี แล้วค่อยๆหยดผ่าน buffer ลงในช่องเจลจนครบทุกตัวอย่าง ต่อขั้วบวกและขั้วลบเข้ากับ chamber ให้ตรงกับขั้วบวกและขั้วลบของเครื่อง เปิดสวิตช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสที่ 220 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 40-60 นาที หรือดูจากสีของ bromophenol blue เคลื่อนตัวลงมาจนห่างจากขอบกระจกด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดสวิตช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า นำแผ่นกระจกออกจาก chamber ทำเครื่องหมายโดยตัดขอบเจลด้านล่างเพื่อเป็นสัญลักษณ์ให้ทราบว่าตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอนไซม์เริ่มต้นที่ใด ค่อยๆแกะเจลออกจากแผ่นกระจก นำเจลมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง แล้วเอามาวางบน plate เพื่อย้อมสีเอนไซม์ต่อไป

4. การย้อมสีเอนไซม์ เตรียม staining solution ของไอโซไซม์ 3 ชนิด คือ peroxidase, esterase และ acid phosphatase (วิธีการเตรียมตามภาคผนวก ก.) เทลงใน plate ที่มีเจลอยู่ นำไปเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ประมาณ 10-30 นาที จะปรากฏแถบสี เมื่อปรากฏแถบสีแล้ว เท staining solution ออก ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง แล้วแช่เจลไว้ใน acetic acid ความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ เพื่อตรึงสีย้อม รอบันทึกข้อมูลต่อไป

5. การบันทึกข้อมูล นำเจลที่ย้อมสีแล้วมาถ่ายภาพด้วยกล้องดิจิตอล จากนั้นศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ จากตำแหน่ง จำนวน และขนาดความกว้างของแถบสี บันทึกค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Relative mobility ; Rm) ตามสูตรของอาภัสสรา (2537) ดังนี้

$$\text{ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rm)} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสี}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสี bromophenol blue}}$$

นำค่าที่ได้ไปเขียนแผนภาพไซโมแกรม

การทดลองที่ 3 การเปรียบเทียบลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ตรงบริเวณรอยต่อ (graft union) ของยอดลำไยพันธุ์ดอ, แห้ว, เบี้ยวเขียว และสีชมพู ที่เสียบบนต้นตอลำไยเถา ลำไยพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์สีชมพู

วิธีการ เก็บตัวอย่างพืชตรงบริเวณรอยต่อของต้นตอและยอดพันธุ์แต่ละคู่ ตัดให้มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร โดยเก็บตัวอย่างพืชทุกๆ 7 วันหลังการเสียบติด นำตัวอย่างพืชที่ได้มาแช่ในน้ำยา FAA จากนั้นนำไปต้มในสารละลายกลีเซอรีนเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง นำไปตัดโดยเครื่อง sliding microtome ที่ความหนาประมาณ 35-40 ไมโครเมตร นำชิ้นส่วนตัวอย่างพืชที่ตัดได้ไปทำการดึงน้ำออกจากเซลล์และย้อมสีตามวิธีการของประศาสตร์ (2537) (วิธีการตามภาคผนวก ก.) mount ตัวอย่างลงบนสไลด์ ปิดด้วย cover slip โดยใช้ mounting medium เป็นตัวยึด จากนั้นนำไปถ่ายภาพด้วยกล้องดิจิตอล FUJIFILM model FinePix1300 พร้อม USB Card Reader/Writer software เปรียบเทียบการเชื่อมประสานรอยต่อของแต่ละกรรมวิธี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved