บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการเจริญเติบโต

3.1.1 อุปกรณ์

3.1.1.1 พืชทดลอง คือ กิ่งคาร์เนชั่นชนิดดอกเดี่ยวและกลีบดอกซ้อน 5 พันธุ์ คือ White Sim (สีขาว) Flamingo Sim (สีชมพูอมส้มเข้ม) Chameur (สีม่วงเข้ม) Dark Lena (สีชมพูอมส้ม) และ Orange Triumph (สีส้ม)

3.1.1.2 เครื่องมือและสารเคมี

3.1.1.2.1 เครื่องฉายรังสีแกมมา

3.1.1.2.2 กระบะชำ และขี้เถ้าแกลบ

3.1.1.2.3 ฮอร์โมน NAA

3.1.2 วิธีการวิจัย

3.1.2.1 นำกิ่งพันธุ์คาร์เนชั่นทั้ง 5 พันธุ์ๆ ละ 50 กิ่ง ชำให้ออกรากในขี้เถ้าแกลบ โดยใช้ฮอร์โมน NAA ในรูปสารละลายความเข้มข้น 5,000 ppm เพื่อช่วยในการออกราก

3.1.2.2 นำกิ่งชำที่ออกรากแล้วไปฉายรังสีแกมมา ที่ปริมาณรังสี 10 20 30 และ 40 Gy โดยมีอัตรารังสี 7.208 Gy ต่อนาที (ปริมาณรังสี 1 Gy เท่ากับ 100 rad)

3.1.2.3 นำกิ่งชำไปปลูกในสภาพกลางแจ้งโดยไม่มีการควบคุมสภาพแวดล้อม โดยทำการวางแผนการทดลองแบบบล็อคสุ่มสมบูรณ์ มี 5 ซ้ำ ทำการบันทึกข้อมูล คือความสูงของต้น จำนวนวันนับจากวันปลูกจนถึงออกดอก จำนวนกิ่งแขนงต่อต้น จำนวนคู่ใบของต้นแรก จำนวนดอกต่อต้น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของดอกแรก และสีของดอก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 1 ลักษณะดอกของคาร์เนชั่น 5 พันธุ์ ที่ใช้ในการผสมข้ามพันธุ์

ก. Chameur

ข. White Sim

ค. Dark Lena

ง. Flamingo Sim

จ. Orange Triumph

3.2 การศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อรูปแบบเอ็นไซม์ peroxidase

3.2.1 อุปกรณ์

3.2.1.1 พืชทดลอง คาร์เนชั่นทั้ง 5 พันธุ์ที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาทุกระดับที่ปลูกขณะทดลองมีอายุได้ 1 เดือน ใช้เฉพาะส่วนของใบอ่อนที่ห่างจากปลายยอดลงมา 2 ซม.

3.2.1.2 เครื่องมือและสารเคมี

3.2.1.1 เครื่องอิเลคโตรโฟรีซีสแบบชนิดแท่ง (rod)

3.2.1.2 ตู้เย็น

3.2.1.3 ตู้แช่แข็ง

3.2.1.4 Spectrophotometer แบบ gel scanner

3.2.1.5 Densitometer

3.2.1.6 Refrigerated centrifuge

3.2.1.7 Homoginizer

3.2.1.8 Dialyse tube

3.2.1.9 Magnetic stirrer

3.2.1.10 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

3.2.1.11 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3.2.1.12 Degasser

3.2.1.13 โกร่ง

3.2.1.14 Vial ขนาด 1 Deam (~ 5 มล.)

3.2.1.15 หลอดทดลองมีฝาเกลียวขนาด 130x10 มม.

3.2.1.16 Syringe ขนาด 20 มล.

3.2.1.17 Micropipette ขนาด 5-50 µl

3.2.1.18 กล่องพลาสติกขนาดต่าง ๆ

3.2.1.19 ขวดใส่สารเคมีขนาด 100 250 500 และ 1,000 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.1.20 เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ beaker pipette และ cylinder

3.2.1.21 Pasture pipette

3.2.1.22 จุกยางขนาดเล็ก

3.2.1.23 ขวดน้ำกลั่น

3.2.1.24 ทรายที่ล้างด้วยกรด

3.2.1.25 pH meter

3.2.1.26 Petri dish

3.2.1.27 กรรไกร

3.2.1.28 NaOH 1 N

3.2.1.29 HCl 1 N

3.2.1.30 Phosphate buffer 0.1 และ 0.01 M. pH 7.5

3.2.1.31 Tris-buffer 0.1 และ 0.01 M. pH 8.2

3.2.1.32 Glycerine

3.2.1.33 Ammonium sulphate

3.2.2 วิธีการ

3.2.2.1 การแยกเอ็นไซม์

นำใบคาร์เนชั่นที่ได้จากต้นที่เจริญจากกิ่งชำที่ได้รับการฉายรังสีแล้ว ไปปลูกให้เจริญเติบโตจนมีอายุ 1 เดือน จากนั้นนำใบอ่อนที่อยู่ห่างจากปลายยอดลงมา 2 ซม. พันธุ์ละ 3 กรัม เก็บในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อหยุดยั้งการทำงานของเอ็นไซม์

นำใบคาร์เนชั่นที่แช่แข็งดังกล่าวบดในโกร่งที่อุณหภูมิ 4 °ซ (โกร่งเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 °ซ) พร้อมทรายที่ล้างด้วยกรด 1 กรัม และ tris buffer 0.1 M pH 8.2 จำนวน 5 มล. แล้วนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 5 °ซ ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำของเหลวที่อยู่ตอนบนของหลอดเหวี่ยงใส่ในขวด vial ที่มีกลีเซอรีน 0.1 มล. บรรจุอยู่ เขย่าให้เข้ากันแล้วเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 °ซ

เตรียมสารละลาย tris-buffer 0.1 M pH 8.2 โดยการรวมสารละลายของ tris (hydroxymethyl) aminomethane 0.1 M (12.1 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มล.) จำนวน 50 มล. เข้ากับสารละลายของกรดไฮโดรครอริก 0.1 M จำนวน 21.9 มล. เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวมเป็น 200 มล. เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิตู้เย็น (3-5 °ซ)

3.2.2.2 การเตรียมสารละลายเข้มข้นสำหรับเตรียมเจล

สารละลายเข้มข้น A pH 8.9

นำ tris-buffer 36.6 กรัม และ TEMED (N,N,N',N'-tetra-methylenediamine) 0.23 มล. ละลายในน้ำกลั่น 20 มล. ปรับ pH ให้ได้ 8.9 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มล. เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิตู้เย็น

สารละลายเข้มข้น B pH 6.7

นำ tris-buffer 5.98 กรัม และ TEMED 0.64 มล. ละลายในน้ำกลั่น 20 มล. เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 N จำนวน 48 มล. ปรับ pH ให้ได้ 6.7 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มล. เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิตู้เย็น

สารละลายความเข้มข้น C

ละลาย acrylamide 28 กรัม และ Bis-acrylamide 0.735 กรัม ในน้ำกลั่น 20 มล. เติมน้ำให้ครบ 100 มล. กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิตู้เย็น

สารละลายเข้มข้น D

ละลาย acrylamide 15.0 กรัม และ Bis-acrylamide 2.5 กรัม ในน้ำกลั่น 20 มล. เติมน้ำให้ครบ 100 มล. กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิตู้เย็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารละลายเข้มข้น E

ละลาย riboflavin 4.0 มิลลิกรัม ในน้ำ 100 มล. เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิตู้เย็น

สารละลายเข้มข้น F

ละลาย ammonium persulphate 0.14 กรัมในน้ำ 100 มล. เก็บในขวดสีชา อุณหภูมิตู้เย็น มีอายุใช้งานได้ไม่เกิน 7 วัน

สารละลายเข้มข้น electrode buffer

ละลาย tris-buffer 6.0 กรัม และ glycine 28.8 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มล. ปรับ pH ให้ได้ 8.3 เติมน้ำให้ครบ 1000 มล. เก็บในขวดสีชา อุณหภูมิตู้เย็น เมื่อจะใช้เติมน้ำกลั่นไปอีก 10 เท่า

3.2.2.3 การเตรียมเจล (acrylamide gel)

การเตรียม running หรือ separating gel

ผสมละลายเข้มข้น A:C:F:น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:2:4:1 คนให้เข้ากัน นำไปเทลงในหลอดแก้วกลวงโปร่งใส รูปทรงกระบอกที่มีความยาวหลอด 7.5 ซม. เส้นผ่าศูนย์-กลางภายใน 0.5 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 0.7 ซม. และปิดปลายด้านหนึ่งให้แน่นด้วยแผ่นพาราฟินให้มีความสูงของสารละลาย 6 ซม. ทำให้ผิวหน้าเจลเรียบโดยหยดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลอย่างช้าๆ สูง 2-3 มล. เหนือผิวเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวเป็นเวลานาน 90 นาที

การเตรียม stacking หรือ spacer gel

ผสมสารละลายเข้มข้น B:D:F:น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 40% ในอัตราส่วน 1:2:1:4 คนให้เข้ากัน นำไปเทในหลอดแก้วเดิมที่เตรียม running gel ไว้ให้มีความสูงของสารละลายประมาณ 0.5 ซม. แล้วเททิ้งเพื่อล้างน้ำกลั่นที่ค้างอยู่หน้าเจลออก เทสารละลายเดิมซ้ำลงไปอีกครั้งหนึ่งให้มีความสูง 1 ซม. ทำให้ผิวหน้าเจลเรียบโดยหยดน้ำกลั่นลงไปเช่นเดิม ทิ้งไว้เป็นเวลานาน 90 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2.4 การแยกแถบเอ็นไซม์ (protein banding seperation)

ดึงแผ่นพาราฟินที่อยู่ด้านล่างหลอดเจลที่เตรียมไว้ทิ้งไป ติดตั้งหลอดเจลเข้ากับช่อง upper chamber โดยยึดหลอดให้ตั้งตรงและติดแน่น ล้างผิวหน้าเจล 4-5 ครั้งด้วย electrode buffer วางลงใน upper chamber ให้เต็ม

หยดสารละลายที่สกัดเอ็นไซม์ แต่ละตัวอย่างลงในหลอดเจลแต่ละหลอดอย่างช้า ๆ ประมาณ 5-50 ul เติม bromophenol blue 0.02% และซูโครสเข้มข้น 10% ลงไป 1-2 หยด

ไล่ฟองอากาศออกจากส่วนล่างของเจลให้หมด ต่อสายไฟจากเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องแยกเอ็นไซม์โดยให้ upper chamber ต่อกับขั้วลบและ lower chamber ต่อกับขั้วบวก

เปิดมอเตอร์ให้มีการไหลเวียนของ electrode buffer ระหว่าง lower chamber กับ upper chamber

เดินเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า 3 mA ต่อหลอดไปจนกระทั่งเห็นสีของ bromophenol blue เคลื่อนไปอยู่ห่างจากปลายหลอดด้านล่างประมาณ 1 ซม. จึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

นำเจลออกจากหลอดแก้วโดยใช้ปลายเข็มของกระบอกฉีดยาที่บรรจุน้ำฉีดดันเจลออกช้า ๆ จนกระทั่งเจลหลุดออกมาจากหลอด (rimming) นำเจลที่ได้ไปย้อมสี

3.2.2.5 การตรวจจับเอ็นไซม์ peroxidase

สารเคมีที่ใช้ในการตรวจจับเอ็นไซม์มีส่วนประกอบของ

Stock A:	- 3 Amino-9 ethylcarbazole	420 มก.
	- B -napthal	290 มก.
	- Acetone	200 มล.
	ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิตู้เย็น	
Stock B:	- tris-buffer 0.1 M. pH 4.0	
	- tris-hydroxymethyl aminomethane	3.78 กรัม
	- Acetic acid	4.00 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ละลายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 2.5 ลิตร

(การปรับ pH ใช้ HCl 1 N หรือ NaOH 1 N)

ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิตู้เย็น

Stock C: H_2O_2 3%

H_2O_2 30% 10 มล.

เติมน้ำกลั่นให้เป็น 100 มล. (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

เตรียมสารเคมีในการตรวจจับเอ็นไซม์โดยการ

ใช้อัตราส่วน A:B:C 20:80:1 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

นำใส่หลอดฝาเกลียว ขนาด 130x10 มม. พอประมาณแล้ว นำเจลใส่ลงไป ทิ้งไว้ 20-30 นาที ในที่มีอุณหภูมิน้อย

แล้วเก็บใน glycine 10% ใน acetic acid 7% เพื่อล้างสีส่วนเกินและตรึงสีย้อม 12-24 ชั่วโมง

3.2.2.6 การเก็บรักษาเจล

1. นำเจลออกจากหลอดทดสอบที่ล้างสีส่วนเกิน
2. ใส่ถาดล้างน้ำ 2-3 นาที หรือหลาย ๆ ครั้งจนกว่าเจลที่เป็นฉากมีลักษณะใส
3. นำเจลใส่หลอดทดลองเติมสารละลาย glycerine 10% ใน acetic acid 7%

3.2.2.7 การอ่านผล

อ่านผลด้วยเครื่อง Spectrophotometer gel scanner

3.3 ศึกษาการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีผสมข้ามพันธุ์

3.3.1 อุปกรณ์

3.3.1.1 พืชทดลอง กิ่งชำคาร์เนชั่นทั้ง 5 พันธุ์ คือ White Sim Dark Lena Flamingo Sim Chameur และ Orange Triumph

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1.2.1 วัสดุเพาะชำและวัสดุปลูก

3.3.1.2.2 โรงเรือนสำหรับปลูกคาร์เนชั่น

3.3.1.2.3 ถุงพลาสติกดำ ขนาด 8x10 นิ้ว

3.3.1.2.4 สารเคมีกำจัดแมลง (อโซดริน) และเชื้อรา (คูปราวิทและไวเดทแอล)

3.3.1.2.5 เครื่องมือผสมเกสร ซึ่งได้แก่

- ใบมีดโกน
- พู่กันเบอร์ 0,1
- กรรไกรเล็ก
- แอลกอฮอล์ 70%
- คีมคีบ
- แว่นขยาย
- ที่หนีบกระดาษ
- ถุงคลุม
- แผ่นป้ายชื่อ

3.3.2 วิธีการ

การศึกษาการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมข้ามพันธุ์ แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ

3.3.2.1 การผสมข้ามพันธุ์

3.3.2.2 การเปรียบเทียบคุณภาพลูกที่ได้กับพ่อแม่

การผสมข้ามพันธุ์

นำกิ่งชำคาร์เนชั่นทั้ง 5 พันธุ์คือ White Sim Dark Lena Flamingo Sim Chameur และ Orange Triumph พันธุ์ละ 40 กิ่ง ชำให้ออกรากในขี้เถ้าแกลบ โดยใช้ฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 5000 ppm ช่วยเร่งการเกิดราก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำกิ่งชำที่ออกรากลงปลูกในถุงพลาสติกสีดำ โดยใช้เครื่องปลูกที่เป็นส่วนผสมของดินดำ 3 ส่วน ขุยมะพร้าว 1 ส่วน ปลูกในโรงเรือนพลาสติก

ทำการเด็ดยอดเพื่อให้แตกกิ่งแขนง แล้วปล่อยให้กิ่งเจริญออกไปเพื่อให้ได้ จำนวน 3 ดอกต่อต้น

การดูแลรักษาโดย

ใส่ปุ๋ยยูเรีย อัตรา 1 ช้อนชาต่อน้ำ 1 ปี๊บ รดหลังปลูก 15 และ 30 วัน

ใส่ปุ๋ยเม็ดสูตร 15-15-15 อัตรา 1 ช้อนชา ต่อต้น หลังปลูก 45 และ 60 วัน

ฉีดพ่นสารเคมี อโซดรินในการกำจัดแมลงทุก ๆ 7 วัน และฉีดพ่นยาคูปราวิทและไวเดทแอลสำหรับป้องกันกำจัดเชื้อรา

วิธีการผสมข้ามพันธุ์

ทำการผสมพันธุ์คาร์เนชั่นทั้ง 5 พันธุ์ คู่ผสมละ 10 ต้นๆ ละ 3 ดอก โดยทำการผสมข้ามแบบพบกันหมด เพื่อสร้างเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 (F1) ซึ่งมีวิธีการเตรียมดอกในการผสมข้ามพันธุ์ดังนี้

ต้นที่ใช้เป็นต้นแม่ ตัดส่วนของกลีบดอกออก (ครึ่งบนของกลีบรองดอก) 7-10 วัน ก่อนเกสรตัวเมียจะแก่ เพื่อให้มองเห็นเกสรตัวเมียชัดเจนและสะดวกในการดึงเอาเกสรตัวผู้ออก และขณะผสมเกสร โดยเหลือกลีบดอกด้านนอกที่ไม่ได้ตัดไว้ 2-3 กลีบ คลุมด้วยถุงกระดาษไขไว้

ต้นที่ใช้เป็นต้นพ่อ ดึงกลีบดอกด้านในออกส่วนหนึ่ง เมื่อกลีบดอกเริ่มแย้ม เพื่อให้เห็นเกสรตัวผู้ได้ง่ายขึ้น แล้วคลุมถุงกระดาษไขไว้ เมื่อเกสรตัวผู้แก่แต่ไม่แก่จัดทำการเก็บละอองเกสรตัวผู้ใส่ไว้ในขวด Vial แล้วเก็บในกระป๋องพลาสติกมีฝาปิดซึ่งภายในบรรจุซิลิก้าเจล ซึ่งใช้เป็นสารดูดความชื้นเก็บไว้ในตู้เย็น ส่วนเกสรตัวผู้ที่แก่ในขณะที่เกสรตัวเมียพร้อมที่จะรับการผสมก็สามารถนำไปผสมเกสรได้เลย

เมื่อเกสรตัวเมียพัฒนาถึงระยะที่จะผสมเกสรได้ ซึ่งจะสังเกตได้จากการที่ยอดเกสรตัวเมียจะแยกออกคล้ายรูปตัว Y และมีขนอ่อนเกิดขึ้น นำเกสรตัวผู้แตะลงบนยอดเกสรตัวเมีย โดยใช้พู่กันที่ผ่านการทำความสะอาดโดยการจุ่มลงในแอลกอฮอล์ 70% และผึ่งให้แห้ง แล้วทำการผสมเกสรในช่วงระหว่างเวลา 09.00-11.00 น.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คลุมถุงกระดาษไขดอกที่ทำการผสมแล้ว

แขวนป้ายบันทึกคู่ผสม วัน เดือน ปี ที่ทำการผสม เวลาที่ทำการผสม

นำเมล็ดที่ได้จากการผสมเกสรของแต่ละคู่ผสมไปปลูกทดสอบโดยทำการ

เก็บเมล็ดจากฝักที่แก่ ผึ่งลมให้แห้งเป็นเวลา 2 สัปดาห์

นำเมล็ดเพาะในกะบะที่บรรจุขี้เถ้าแกลบ

นับจำนวนต้นที่งอก หลังจากส่วนของปลายยอดโผล่พ้นวัสดุเพาะ

ย้ายต้นกล้าลงปลูกในถุงพลาสติกสีดำ หลังจากที่ต้นกล้ามีใบจริง 1 คู่ใบ

พ่นยากำจัดเชื้อราทันทีหลังจากปลูก โดยใช้ยาไวเตทแอล

วัดอัตราการเจริญเติบโตทุก ๆ 7 วัน และบันทึกรายละเอียดอื่น ๆ

การเปรียบเทียบคุณภาพลูกที่ได้กับพ่อแม่

เปรียบเทียบลักษณะสีดอกของลูกผสมกับพ่อและแม่

3.4 สถานที่ทำการวิจัย

แปลงทดลอง ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เรือนเพาะชำโครงการหลวงอินทนนท์ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่

3.5 ระยะเวลาทำการวิจัย

มกราคม 2531 - ตุลาคม 2533

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved